ED 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Faculté de Pharmacie de Marseille,
Thèse présentée et publiquement soutenue par

Cindy SERDJEBI

Le 25 Septembre 2015

PHARMACOGÉNÉTIQUE DES ANALOGUES NUCLÉOSIDIQUES : CYTIDINE DÉAMINASE ET ISSUE CLINIQUE

Pour obtenir le grade universitaire de
Docteur de l'Université d'Aix-Marseille
Spécialité : Oncologie

Membres du jury :

Pr Étienne CHATELUT, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole	Rapporteur
Dr Gérard MILANO, Centre Antoine Lacassagne, Nice	Rapporteur
Pr Duncan JODRELL, Cancer Research United Kingdom, Cambridge Institute	Examinateur
Pr Bruno LACARELLE, SMARTc, CRO2, UMR S_911	Examinateur
Dr Joseph CICCOLINI, SMARTc, CRO2, UMR S_911,	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Au Professeur Bruno Lacarelle,

Je tiens à vous exprimer toute ma profonde gratitude ainsi que mon plus grand respect pour m'avoir accueilli dans votre service de Pharmacocinétique et de Toxicologie alors que je n'y étais pas vraiment destinée. Je vous remercie de m'avoir accompagnée dans diverses démarches, notamment administratives lors des différentes demandes de financement pour la bourse doctorale, et encore récemment pour la bourse de mon post-doctorat, même si la demande n'a malheureusement pas été fructueuse. Merci également de m'avoir permis de travailler à vos côtés, et de m'avoir intégrée à votre équipe hospitalière. Enfin, je vous suis très reconnaissante de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

To the Professor Duncan Jodrell,

I had the pleasure to meet you at the PAMM-EORTC last January. I would like to express all my gratitude for accepting to evaluate this work, and for attending this presentation.

Au Professeur Etienne Châtelut,

Je tiens sincèrement à vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail et de siéger dans ce jury. Depuis les enseignements que vous m'avez donnés en Master jusqu'à aujourd'hui, j'ai eu le plaisir collaborer avec vous à l'hôpital, mais j'ai également eu l'occasion d'apprendre un peu à vous connaître, notamment dans le cadre de meetings. Je suis ravie qu'un grand pharmacien tel que vous soit l'un de mes rapporteurs aujourd'hui, afin que vous ayez vous-même l'occasion de dire à mes parents qu'ils ont toute votre gratitude.

Au Docteur Gérard Milano,

Cher Parrain de thèse, je vous remercie infiniment de m'avoir pris sous votre aile, dès notre première rencontre, au GMP à Paris en octobre 2012. Depuis, nos entrevues ont été plus farfelues les unes que les autres, mais toujours avec cette affection que je vous porte tant. Je me souviendrai toujours de la dernière de ces entrevues, à Philadelphie, pour le meeting AACR 2015. Blagues à part, je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de jugé ce travail et de composer ce jury aujourd'hui, et j'espère avoir un jour l'occasion de travailler avec vous.

Au Docteur Joseph Ciccolini, mon cher directeur de thèse,

Voilà, c'est une page qui se tourne aujourd'hui, avec la soutenance de cette thèse, marquant ainsi la fin de mon cursus pharmaceutique et la fin de mon doctorat universitaire. Mine de rien,

j'appréhende beaucoup de partir du labo, de vous quitter, vous et votre mauvaise humeur. En plus de m'avoir poussée, certes sans trop forcer, à faire ces études, vous m'avez permis de m'épanouir et de réellement trouver la voie professionnelle qui m'était destinée. Vous êtes un réel exemple qu'il existe des gens gentils, simples et compétents qui aiment leur travail. J'espère devenir l'une de ces personnes «quand je serai grande ». Merci de me faire l'honneur d'avoir mis ce beau costume aujourd'hui, et de ne PAS porter la moustache (à l'heure où j'écris, j'espère bien que vous avez oublié cette vilaine idée). Je vous serai éternellement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi, et j'espère très sincèrement revenir au plus vite dans votre équipe, pour de nouvelles aventures.

Au Docteur Florence Gattacceca,

Florence, je te remercie sincèrement pour ton aide précieuse pendant ce doctorat. Depuis notre première rencontre lors du GMP 2013 à Nice, nous nous sommes seulement vues pour des entrevues rapides mais toujours très constructives et pertinentes qui nous ont permis d'apprendre à nous connaître. Travailler avec toi en modélisation a vraiment été un réel plaisir. Je te remercie pour ta disponibilité, tes critiques, positives ou non, mais toujours très constructives, et ta bonne humeur, toujours au rendez-vous. Les futurs étudiants du master auront bien de la chance de pouvoir suivre tes enseignements.

Au Docteur Frédéric Fina,

Fred, mon cher Fred. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire sans *a priori*. La première rencontre ne m'a pas laissée la meilleure impression. Tu venais dans le cadre du Master expliquer les principes de techniques de génétique moléculaire. Ensuite, tu as tenté d'enseigner, non sans difficultés, les rudiments de la génétique à la pharmacienne que je suis qui connaissait tout juste le principe de la PCR. Aujourd'hui, on travaille sur les nouvelles techniques de séquençage ensemble et demain j'intègre ton service pour faire de l'analyse d'exomes. Que de chemin parcouru !

Te rencontrer a été pour moi un déclic. « *Quand je serai grande, je veux être Fred* ». J'admire ta franchise, ta conception des choses et ta capacité à toujours être en ébullition, pour proposer de nouvelles idées, qui permettront demain d'améliorer le quotidien des patients atteints de cancer. Je suis impatiente de rejoindre ton équipe, afin d'apprendre un maximum de choses.

Au Professeur Jean-François Seitz, au Service d'Oncologie Digestive de l'Hôpital de la Timone,

Je tiens à vous remercier pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de travailler sur le projet FFCD-1004, qui constitue le pilier majeur de ma thèse. Je tiens également à remercier l'ensemble du service d'Oncologie Digestive que vous dirigez, particulièrement Laetitia Dahan.

À la Fédération Francophone de Chirurgie Digestive,

Martina, Jaïc, Carole, Karine, Cécile, et l'ensemble de l'association, je tiens à sincèrement vous remercier pour toute l'aide que vous m'avez apportée, depuis le début du projet FFCD-1004 jusqu'à son aboutissement, avec la publication de l'article. Vous avez toujours été disponibles, et très patientes avec moi. Je n'ai malheureusement pas eu l'occasion de toutes vous rencontrer, mais soyez assurées de mon entière reconnaissance.

Au Professeur Athanassios Iliadis,

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude ainsi que mon plus grand respect pour m'avoir accueilli dans le service de Pharmacocinétique depuis la cinquième année d'études de pharmacie, en stage avec Jay Tibbits. Depuis, je n'ai eu que trop peu d'occasions de travailler sous votre tutelle. J'ai beaucoup apprécié recevoir vos enseignements de pharmacocinétique, notamment dans le cadre du Master et du Diplôme Universitaire. Vos cours, d'une qualité exceptionnelle, manqueront terriblement lors des prochaines sessions de Master. Je vous souhaite de bien profiter de votre retraite prochaine.

À la Fondation pour la Recherche Médicale,

Je remercie très chaleureusement la FRM qui a financé mes trois années de doctorat universitaire. Sans votre aide précieuse, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail. J'espère que, demain, ces travaux seront utiles pour nos patients. Je remercie également l'ensemble des donateurs qui font vivre cette association.

À Sarah, Raphaëlle,

Merci de m'avoir accueillie au labo comme si j'avais toujours été l'une des vôtres, même si je n'avais pas une goutte de sang corse. Sarah, merci pour tous ces excellents moments que l'on a passés ensemble, ceux où ta discrétion légendaire m'aura fait mourir de rire, et pour ta générosité et ta sincérité que j'adore. Raphaëlle, merci pour ta présence, tes conseils et pour ces moments « cancanage » qui m'auront bien détendue parfois. Je te souhaite plein de bonheur avec ta petite, je veux dire grande famille, maintenant.

À Séverine, Anne, et Florian

Séverine, tu auras été présente pour mon master et le début de ma thèse. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi, tu sais de quoi je parle ma coupine. Merci de m'avoir rendue plus humaine et plus sociable. J'ai adoré tous ces fous rires, ces sorties, ces resto qu'on aura partagés ensemble.

Anne, j'espère avoir été digne de l'accueil que j'avais moi-même reçu au labo. Je te souhaite de t'éclater dans ton doctorat autant que j'ai pu le faire. Merci d'avoir rempli ce dossier pour ma bourse, c'est grâce à toi si je peux faire le post-doc dont je rêvais ! Je te souhaite une très bonne continuation !

Flo, merci pour tes conseils bien utiles, tes informations précieuses et surtout pour ces séances de sport! Toi et moi on est dans la même galère. J'espère bien qu'on réussira ensemble à trouver notre petite place au soleil.

Au service de Pharmacocinétique de la Faculté de Pharmacie,

Et plus généralement, au 8e étage de la faculté, Muriel, Rachida pour les bons moments passés ensemble.

Au service de Pharmacocinétique et de Toxicologie de la Timone,

Merci à Caro, Sylvie, Béné, Mady, Manue, Christel, les secrétaires Patricia et Valérie, ainsi que l'ensemble du personnel. Merci de m'avoir accompagnée, pour certains depuis mon externat de 5e année. Merci pour vos précieux conseils, pour la confiance que vous m'avez accordée, et pour le temps que vous m'avez consacré. Merci aussi à tous les internes qui se sont succédé, et qui ont pu m'aider de près ou de loin à mener à bien ce projet. Je pense surtout à Tiphaine, Wakil, Nicolas, Benjamin, Amina, Julien qui ont bien veillé à mon bien-être moral et à mon bronzage.

À ma famille,

Papa, Maman, pour m'avoir donné les moyens d'arriver jusque-là. Je me souviens encore de ce jour, où un soir devant un reportage à propos de la recherche contre le SIDA, papa, je t'avais dit : « C'est nul la recherche ! Tu imagines, tu cherches toute ta vie et tu ne trouves pas ? » Et aujourd'hui, c'est le chemin que je prends.

Ninou, pour m'avoir supportée pendant 17 ans dans la même chambre, tu me manques ! Mamie, merci d'être là aujourd'hui.

Tracy et Rick, merci de m'avoir si bien accueillie dans votre famille. Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi, depuis 12 ans maintenant ! Nounou, merci pour tes conseils pendant cette thèse, notamment pour m'avoir fait comprendre que la recherche est pleine de

petites victoires qui nous permettent ensuite de faire de grandes avancées. Je suis très heureuse que tu sois là en ce jour.

Enfin, mon amour, je te remercie infiniment d'être avec moi. Pas aujourd'hui seulement, mais de m'accompagner dans la vie, et de me rendre meilleure. Tu es et resteras le « JOSEPH » de mon cœur, le seul et l'unique. Merci pour ces 12 belles années passées ensemble, qui j'espère, ne sont que le début d'une grande aventure qu'on vivra ensemble. ***Je t'aime.***

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1

ABRÉVIATIONS 3

FIGURES, TABLEAUX & ANNEXES 9

INTRODUCTION 11

PARTIE A : MÉDÉCINE PERSONNALISÉE EN ONCOLOGIE 17

I DÉFINITIONS 18

II BIOMARQUEURS PRÉDICTIFS EN ONCOLOGIE 20

1 BIOMARQUEURS PHARMACOGÉNOMIQUES SOMATIQUES 20

1.(1) Biomarqueurs des thérapies ciblées 20

1.1.(1) Le statut BRC-ABL 20

1.1.(2) La voie de signalisation EGFR 21

1.(2) Biomarqueurs des chimiothérapies : exemple de l'expression de la thymidylate synthase TS 27

1.(3) Biomarqueurs de l'hormonothérapie : exemple de l'expression des récepteurs aux estrogènes ER 27

2 BIOMARQUEURS PHARMACOGÉNÉTIQUES CONSTITUTIONNELS 29

2.(1) Le statut Thiopurine-S-méthyltransférase TPMT 29

2.(2) Le statut UDP-glucuronosyltransférase 1A1 UGT1A1 30

2.(3) Le statut Dihydropyrimidine déhydrogénase DPD 30

2.(4) Le statut Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) 33

2 BIOMARQUEURS NON IMPLÉMENTÉS EN ROUTINE 35

III LES ANALOGUES NUCLÉOSIDIQUES 38

1 LA FAMILLE DES ANTIMÉTABOLITES 38

2 LES ANALOGUES PYRIMIDIQUES 39

2.(1) Le 5-fluorouracile (Fluorouracile®) 39

2.(2) La capécitabine (Xeloda®) 40

2.(3) La gemcitabine (Gemzar®) 40

2.(4) L'azacytidine (Vidaza®) 41

2.(5) La cytarabine (Aracytine®) 42

3 TOXICITES CHIMIO-INDUITES DES ANALOGUES NUCLÉOSIDIQUES 42

IV LA CYTIDINE DÉAMINASE 45

1 DÉFINITION 45

1.(1) La protéine CDA 45

1.1.(1) Structure 45

1.1.(2) Expression et activité 46

1.(2) La CDA : un gène très polymorphe 48

2 QUE SAIT-ON DE LA CDA ? 49

2.(1) La CDA tumorale 49

2.(2) La CDA hépatique 49

PARTIE B : TRAVAUX PERSONNELS 56

I COMPARAISON DE 2 APPROCHES PHÉNOTYPIQUES POUR L'ÉVALUATION DU STATUT CDA 58

II INFLUENCE DU STATUT CDA SUR LES TOXICITÉS CHEZ UNE PATIENTE PÉDIATRIQUE TRAITÉE PAR CYTARABINE ET TRANSPLANTÉE HÉPATIQUE 71

III INFLUENCE DU STATUT CDA SUR L'ISSUE CLINIQUE DU SUJET ÂGÉ ATTEINT D'HÉMOPATHIE MALIGNE TRAITÉ PAR AZACYTIDINE 77

1 DÉCÈS TOXIQUE CHEZ UN PATIENT CDA-DÉFICIENT 77

2 DEUX DESTINS OPPOSÉS POUR UN MÊME TRAITEMENT 85

IV INFLUENCE DU STATUT CDA SUR LES TOXICITÉS ET LA PHARMACOCINÉTIQUE CHEZ LES PATIENTS TRAITÉS PAR GEMCITABINE SEULE OU EN ASSOCIATION 98

1 STATUT UM CDA ET ÉCHEC THÉRAPEUTIQUE SOUS GEMCITABINE 98

2 ESSAI CLINIQUE PROSPECTIF FFCD-1004 106

3 PHARMACOCINÉTIQUE DE POPULATION DELA GEMCITABINE ET DU DFDU SELON UNE STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE LIMITÉ ET ÉTUDE DES COVARIABLES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES 121

V ÉTUDE GÉNÉTIQUE APPROFONDIE DE LA *CDA* 137

1 INTRODUCTION 137

2 PATIENTS, MATÉRIELS ET MÉTHODES 137

2.(1) Patients et traitements 137

2.(2) Extraction d'ADN génomique 138

2.(3) Sélection des polymorphismes à rechercher 138

2.(4) Conception des amorces 139

2.(5) Pyroséquençage partiel de la *CDA* 140

2.5.(1) Préparation de la librairie 140

2.5.(2) Pyroséquençage et lecture 141

3 RÉSULTATS 142

DISCUSSION 143

COMMUNICATIONS ORALES & POSTERS 161

ANNEXES 168

AUTRES TRAVAUX 185

BIBLIOGRAPHIE 187

ABRÉVIATIONS

#

-2LL : *-2 log likelihood*

3'UTR : *3'-untranslated region*

5-FdUMP : 5-fluorouridine monophosphate

5'-FR : *5-flanking region*

5-FU : 5-fluorouracile

5-FUdR : 5-fluorouracile déoxyribose

5-FCdR : 5-fluorocytosine déoxyribose

6-MP : 6-mercaptopurine

6-TG : 6-thioguanine

A

ABL : Abelson

ABL : Gène codant pour la protéine ABL

ADME: Absorption, distribution, métabolisme et élimination

ADN: Acide déoxyribonucléique

AIC : *Akaike information criterion*

AID : *Activation induced cytidine deaminase*

ALK : *Anaplastic lymphoma kinase*

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AP-HM : Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille

APOBEC : *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*

APS : Adénosine phosphosulfate

Ara-C : Cytarabine ou aracytine

Ara-CMP : Cytarabine monophosphate

Ara-CDP : Cytarabine diphosphate

Ara-CTP : Cytarabine triphosphate

AS : Aamorce antisens

ASCO : *American Association of Clinical Oncology*

ATP : Adénosine triphosphate

ATU: Autorisation temporaire d'utilisation

B

BCR : *Breakpoint cluster region*

BCR : Gène codant pour la protéine BCR

BCR-ABL : Protéine de fusion impliquée dans la pathogénèse des leucémies myéloïdes chroniques

BCR-ABL : Gène de fusion codant pour BCR-ABL

BLASTN : *Basic Local Alignment Search Tool*

BMI : B*ody mass index*

BSA : *Body surface area*

BRAF : Potéine codée par *BRAF*

BRAF : *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*

C

CBNPC : Cancer bronchique non à petites cellules

CCR : Cancer colorectal

CDA : Cytidine déaminase

CDA : Gène codant pour la CDA

CDA27Q : Variant CDA codé par la *CDA* avec substitution c.79A>C

CDA70T : Variant CDA codé par la *CDA* avec substitution c.208G>A

CDD : *Charge-Coupled Device*

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CNV : *Copy number variation*

COP : Protocole de chimiothérapie avec cyclophosphamide, vincristine et prednisone

COPAD : Protocole de chimiothérapie avec cyclophosphamide, vincristine, prednisone, ara-C, et cis-platine

CPP : Comité de protection des personnes

CRP : Protéine C réactive

CTLA-4 : *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*

CYP2D6 : Cytochrome P450 2D6

CYP2D6 : Gène codant pour le CYP2D6

CYVE : Protocole de chimiothérapie avec ara-C et étoposide

D

dFdCMP : Difluoro-deoxycytidine monophosphate

dFdCDP : Difluoro-deoxycytidine diphosphate

dFdCTP : Difluoro-deoxycytidine triphosphate

dFdU : Difluoro-déoxyuridine

DHF : Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate réductase

DMT : Dose maximale tolérée

DPD : Dihydropyrimidine déhydrogénase

DPYD : Gène codant pour la DPD

DTIC : Dacarbazine

dUMP: Déoxyuridine monophosphate

dTMP : Déoxythimydine monophosphate

E

EBV : *Epstein-Barr virus*

EGF : *Epidermal growth factor*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

EGFR: Gène codant pour l'EGFR

EM : *Extensive metabolizer*

EMA : *European Medicines Agency*

EML4 : Gène codant pour *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4*

emPCR : *Emulsion polymerase chain reaction*

ER : *Estrogen receptor*

ERE: *Estrogen response element*

ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*

ErbB : *Erythroblastosis oncogene B*

ESHT : *Early severe hematological* toxicities

ESMO : *European Society for Medical Oncology*

ESR1, *ESR2* : Gènes codant pour ER

F

FBAL : Fluoro-β-alanine

FDA : *Food and Drug Administration*

Fm : *Metabolic fraction*

FOLFIRI : Protocole de chimiothérapie avec 5-FU, acide folique et irinotécan

FOLFOX : Protocole de chimiothérapie avec 5-FU, acide folique et oxaliplatine

FUH_2 : Fluoro-dihydrouridine

FUMP : Fluoro-uridine monophosphate

FUdTP : Flurodeoxyuridine triphosphate

FUTP : Fluorouridine triphosphate

FUPA : Acide 5-fluorouréidopropionique

G

GWAS : *Genome wide association*

GOF : *Goodness of fit*

H

HAS : Haute Autorité de Santé

hCNT : *Human concentrative nucleoside transporter*

hENT : *Human equilibrative nucleoside transporter*

HER2 : *Human epidermal growth factor 2*

HER2/neu : Gène codant pour HER2

HGPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

HRM : *High Resolution Melting*

I

IM : *Intermediate metabolizer*

IS : *Internal standard*

ITK: Inhibiteur de tyrosine kinase

K

KRAS : Protéine codée par *KRAS*

KRAS : *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

L

LAL : Leucémie aigüe lymphoblastique

LC-MSMS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LMC: Leucémie myéloïde chronique

LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique

LOH : *Loss of heterozygosity*

LSHT : *Late severe hematological toxicities*

M

MAF : *Minor allele frequency*

MEK /MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

miARN : Micro-acide ribonucléique

MID : *Multiplex identifier*

MTX: Méthotrexate

N

NCCN : *National Comprehensive Cancer Network*

NCI : *National Cancer Institute*

NCI-CTC : *NCI Common Terminology Criteria for Adverse Effect*

NGS : *Next-generation sequencing*

NLME : *Non linear mixed effects*

NRAS : Protéine codée par *NRAS*

NRAS : *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*

NUDT15: *Nudix (Nucleoside Diphosphate Linked Moiety X)-Type Motif 15*

P

pb : Paire de bases

PCR : *Polymerase chain reaction*

PD : Pharmacodynamie

PK : Pharmacocinétique

PM : *Poor metabolizer*

ppi : Pour préparation injectable

PPi : Pyrophosphate inorganique

PTP : *Pico titer* plate

PRPP : Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransférase

R

RCP: Résumé des caractéristiques du produit

RECIST : *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*

S

S : Amorce sens

SCM : *Selection covariate modeling*

SLC : *Solute carrier (organic anion transporter)*

SHT : *Severe hematological toxicities*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

SNV : *Single nucleotide variation*

T

TGF : *Transforming growth factor*

THF : Tétrahydrofolate

THSP : Toxicités hématologiques sévères précoces

TK : Tyrosine kinase

Tm : *Melting temperature*, température de fusion

TNM : *Tumor Node Metastasis classification*

TP : Thymidine phosphorylase

TPMT : Thiopurine-S-méthyl transférase

TPMT : Gène codant pour la TPMT

TS : Thymidylate synthase

U

U : Uracile

UH_2 : Dihydrouracile

UGT1A1 : UDP-glucuronosyltransférase isoforme 1A1

UGT1A1 : Gène codant pour l'UGT1A

UM : *Ultra-rapid metabolizer*

V

VPC : *Visual predictive check*

W

WT : *Wild type*

FIGURES, TABLEAUX, ANNEXES & DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES

Figures

Figure 1. Les différentes étapes composant le processus ADME
Figure 2. Implémentation en routine des associations pharmacogénétiques depuis leur découverte
Figure 3. Médecine personnalisée et apport des études GWAS et gène-candidat dans la recherche de biomarqueurs génétiques
Figure 4. Zone thérapeutique des médicaments
Figure 5 Translocation et formation du gène de fusion *BCR-ABL* sur le chromosome Philadelphie
Figure 6. Voies de signalisation et inhibiteurs du récepteur EGFR
Figure 7. Cycle de la biosynthèse de la déoxythymidine monophosphate dTMP par la thymidine synthase
Figure 8. Métabolisme de la thiopurine et azathioprine
Figure 9. Métabolisme de l'irinotécan
Figure 10. Organigramme décisionnel de la stratégie de typage de l'UGT1A1 à suivre selon la dose d'irinotécan
Figure 11. Métabolisme de la capécitabine et du 5-FU
Figure 12. Vue d'ensemble du mécanisme d'action des analogues pyrimidiques et des anti-folates.
Figure 13. Mécanisme d'action du 5-FU et MTX
Figure 14. Métabolisme de la capécitabine
Figure 15. Transport, métabolisme et mécanisme d'action de la gemcitabine
Figure 16. Transformation de la cytidine et déoxycytidine en uridine et déoxyuridine par la cytidine déaminase
Figure 17. Structure générale du gène *CDA*
Figure 18. Vue d'ensemble des travaux effectués
Figure 19. Principe du phénotypage de la CDA
Figure 20. Article I
Figure 21. Article II
Figure 22. Article III
Figure 23. Article IV
Figure 24. Article V
Figure 25. Article VI
Figure 26. Article VII
Figure 27. Principe Séquençage partiel de la CDA

Figure 28. Principe de la PCR en émulsion
Figure 29. Principe du pyroséquençage sur la technologie 454 des laboratoires Roche®

Tableaux

Tableau 1. Familles, structures et cibles des agents anti-cancéreux appartenant à la classe des antimétabolites.
Tableau 2. Polymorphismes génétiques de la CDA les plus étudiés dans la littérature.
Tableau 3. Etudes cliniques publiées éligibles pour la méta-analyse de Ding *et al.*
Tableau 4. Classification des variations génétiques de la *CDA* selon leur importance.
Tableau 5. Avantages et inconvénients des différentes générations de séquençage.

Annexes

Annexe 1. Tableau des marqueurs pharmacogénomiques reconnus par la FDA associés à des conditions de prescription en oncologie.
Annexe 2. Mode opératoire du dosage des protéines sériques par la technique de Pierce.
Annexe 3. Mode opératoire du dosage de l'activité CDA par spectrophotométrie.
Annexe 4. Mode opératoire pour la recherche du polymorphisme c.79A>C par analyse HRM.
Annexe 5. Mode opératoire du dosage de la gemcitabine et de la dFdU sur l'UPLC-TQD.
Annexe 6. Calcul de la MAF minimale d'un allèle permettant de vérifier le respect de l'équilibre d'Hardy-Weinberg chez une population de 120 patients.

Données supplémentaires

Données supplémentaires S1. Liste, classification des variations génétiques du gène de la *CDA*.
Données supplémentaires S2. Liste des amplicons choisis pour étudier le gène de la *CDA*.

INTRODUCTION

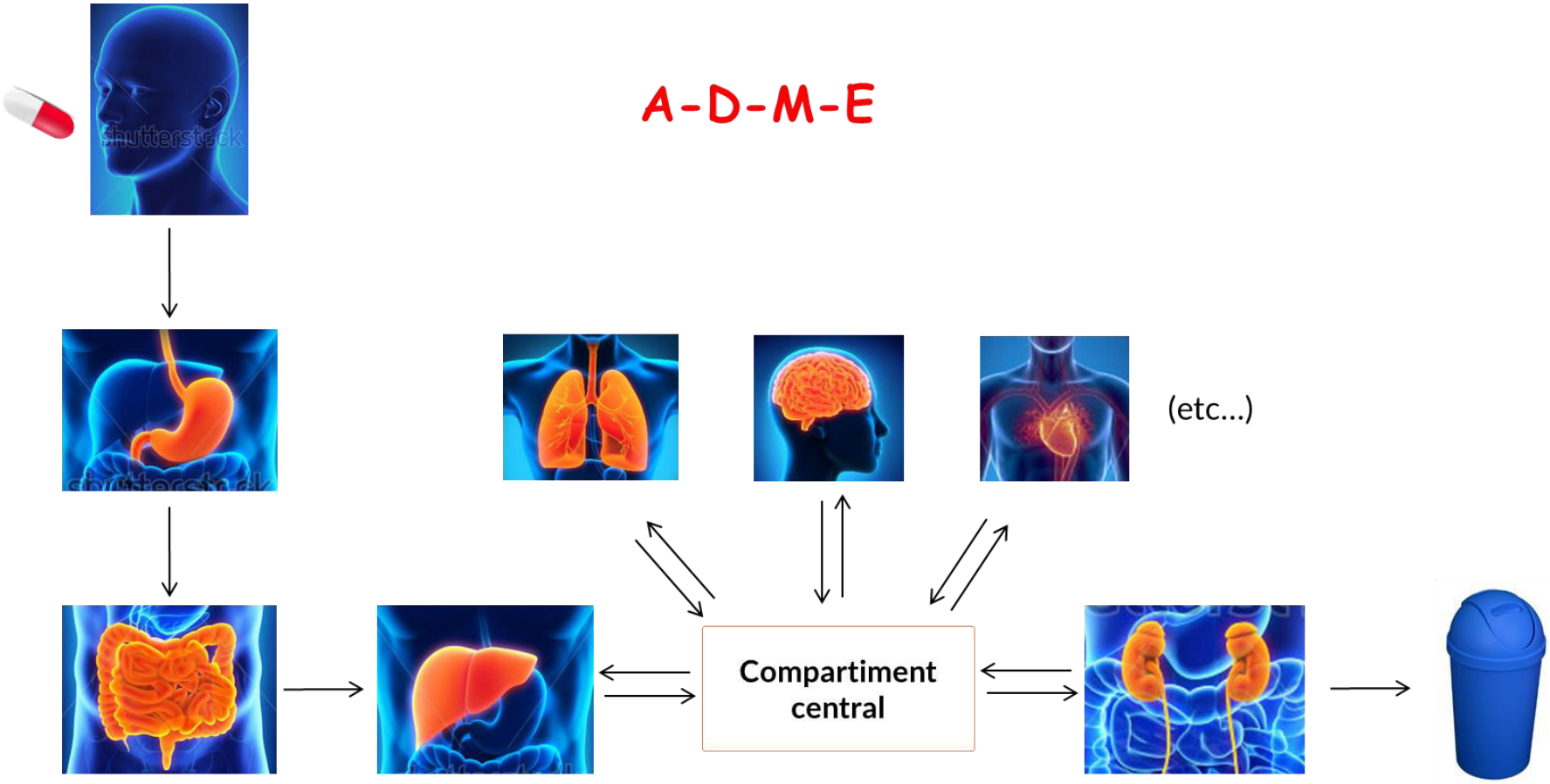


Figure 1. Les différentes étapes composant le processus ADME.
Le processus ADME est constitué de 4 étapes qui retracent le parcours d'un xénobiotique à travers l'organisme. L'absorption est l'étape durant laquelle le xénobiotique atteint la circulation générale. L'étape suivante, la distribution, consiste en la diffusion du xénobiotique dans l'organisme pour atteindre sa cible. Le métabolisme du xénobiotique est l'étape qui consiste à faciliter son élimination de l'organisme, après détoxification. Enfin, l'excrétion ou élimination du xénobiotique se fait principalement selon deux voies : la voie urinaire et la voie biliaire. L'ensemble du processus est soumis à des fluctuations, responsables de la variabilité inter-individuelle de réponse aux médicaments.

« If it were not for the great variability among individuals, Medicine might as well be a science and not an art."

Sir William Osler, 1892, The thoughts of Sir William Osler

Il existe naturellement une grande variabilité entre les individus. Outre le sexe ou la couleur des yeux, qui constituent des exemples de caractères variables aisément identifiables, cette variabilité inter-individuelle conditionne également la réponse clinique aux médicaments, en termes d'efficacité mais aussi de toxicité [1]. La variabilité de réponse aux médicaments chez les individus peut être de deux types différents, mais complémentaires : on retrouve la variabilité pharmacocinétique (PK) qui influence les différentes étapes du processus ADME (absorption, distribution, métabolisme et élimination/excrétion, **Figure 1)**, permettant au médicament d'avoir accès à sa cible depuis son site d'administration. L'autre type de variabilité est purement pharmacologique et concerne la cible du médicament ou plus globalement l'obtention d'un effet pharmacodynamique (PD). La variabilité peut également intervenir sur des paramètres d'origine constitutionnelle, caractéristiques innées du patient touchant les cellules germinales et transmises à sa descendance, ou d'origine somatique, relevant des caractéristiques acquises par l'individu au cours du temps, et ne sont donc pas héréditaires. Cette distinction est particulièrement pertinente le domaine de la cancérologie où une partie de l'identité génétique initiale de l'individu dérive, résultant en la cohabitation de deux génomes, l'un constitutionnel et l'autre tumoral. Quels que soient son origine et son type, la variabilité est souvent difficile à anticiper, et constitue une limitation importante à l'utilisation de certains médicaments.

En oncologie, les traitements utilisés présentent généralement un index thérapeutique étroit, laissant une faible marge de manœuvre aux cliniciens pour traiter au mieux la pathologie sans provoquer d'effets indésirables chez le patient. Ainsi, anticiper et donc contrôler la variabilité inter-individuelle *via* une démarche corrective appropriée constitue un défi majeur. Les récentes avancées, notamment réalisées dans le domaine de la génétique des cancers, ont permis de changer peu à peu de paradigme [2]. Initialement, la classification TNM (*Tumor Node Metastasis classification*) des tumeurs amenait à une prise en charge par un traitement standard chez les patients. De plus, la prise en charge des cancers ne reposait que sur l'administration de traitements non spécifiques à une dose standard ou pondérée selon des variables anthropométriques (poids, surface corporelle), sur le principe du «*one-size-fits-all* », qui visait à administrer un médicament de façon standardisée à l'ensemble des patients. Aujourd'hui, le développement de la médecine personnalisée, répondant à l'idée de donner le bon médicament, à la bonne dose et à la bonne personne (*The right drug for the right patient* [3]) remplace peu à peu les anciennes pratiques pour

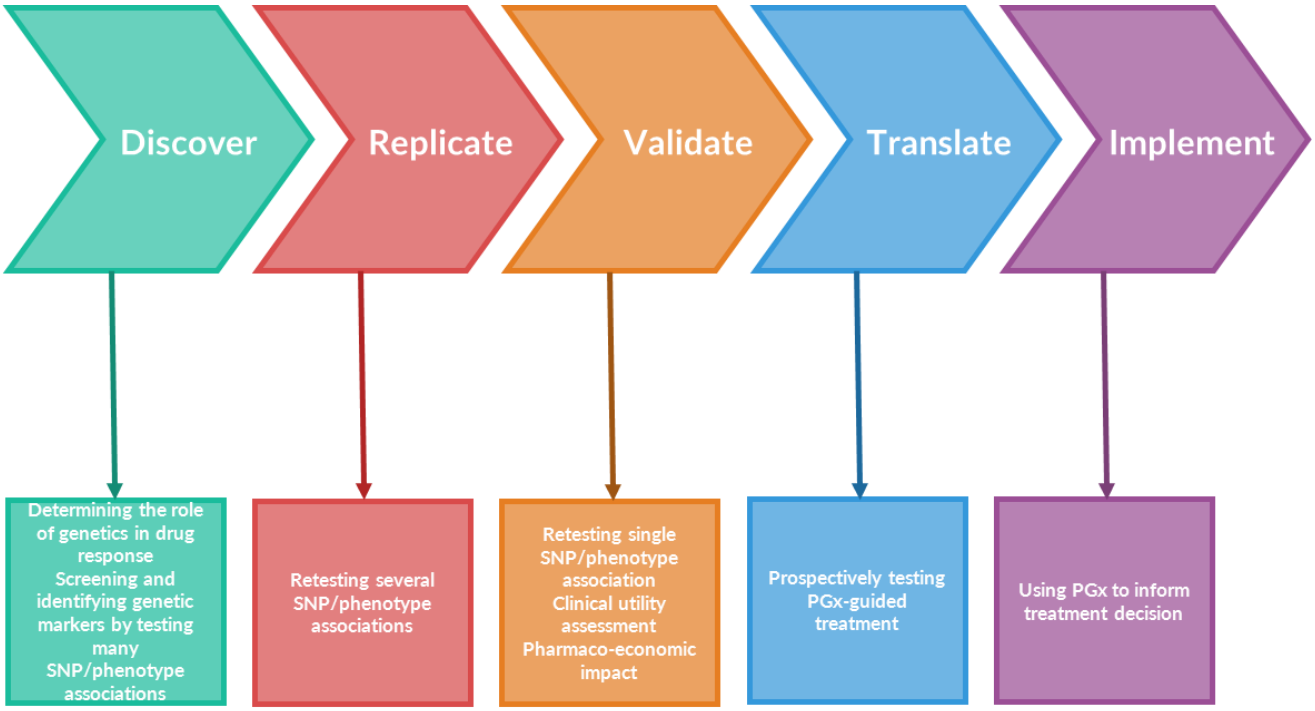


Figure 2. Implémentation en routine des associations pharmacogénétiques depuis leur découverte [8,9].
L'implémentation en routine de la recherche d'associations pharmacogénétiques comporte plusieurs étapes. Les études centrées sur la découverte des polymorphismes génétiques balaient généralement un grand nombre de variants et de phénotypes avec des seuils décisionnels subjectifs et variables. Les hits identifiés sont ensuite répliqués dans des cohortes indépendantes pour évaluer la reproductibilité et la robustesse du marqueur. La validation, ou démonstration de validité clinique, requiert un pouvoir statistique convenable, défini en amont de l'analyse. Une association pharmacogénétique reconnue cliniquement valide peut ensuite faire l'objet d'un transfert en routine lorsque la confirmation prospective de son utilité clinique a été associée à une amélioration de l'issue clinique des patients. Le biomarqueur est ensuite prêt pour une implémentation en routine clinique, permettant ainsi d'orienter les décisions thérapeutiques pour une meilleure prise en charge des patients.

une meilleure prise en charge des patients. Ainsi, les tumeurs sont désormais également classées selon leur caractéristiques génétiques moléculaires, et ce permettant la mise en place d'un traitement personnalisé. Le *National Cancer Institute* (NCI) a défini la médecine personnalisée comme une forme de médecine qui utilise les informations d'un individu issues de ses gènes, ses protéines et son environnement pour prévenir, diagnostiquer et traiter une maladie [4,5]. Le développement de la médecine personnalisée en oncologie a rapidement été accompagné par la recherche de biomarqueurs, permettant de caractériser et de stratifier les patients sur une probabilité de réponse thérapeutique ou de survenue de toxicités [6]. Ces biomarqueurs sont donc utilisés en support d'un dépistage médical, d'un diagnostic, de la réponse au traitement, ou de la toxicité de celui-ci [7]. Leur développement, depuis leur identification en recherche jusqu'à leur validation par des études rétrospectives puis prospectives, constitue un parcours long et complexe, dont le but est de définir l'intérêt clinique réel du biomarqueur étudié (**Figure 2**, [8,9]). Ainsi plusieurs éléments sont nécessaires à l'implémentation de l'analyse d'un biomarqueur en routine ; tout d'abord, un consensus scientifique émanant de pharmacologues, cliniciens, industriels et agences de régulation quant à la pertinence clinique du biomarqueur, des techniques de détection sensibles, spécifiques et peu onéreuses, la traduction claire de l'information apportée par le biomarqueur en terme de décision thérapeutique mais également la volonté de la part des autorités de santé de participer au remboursement de la recherche du biomarqueur [6,8]. Il faut également prendre en compte l'intérêt médico-économique de la mise en routine de la recherche d'un biomarqueur, en comparaison avec les surcoûts entraînés par la prise en charge d'effets secondaires, par exemple [10–12]. L'objectif final est de subordonner la prescription de certains médicaments au dépistage pré-thérapeutique de leurs biomarqueurs par l'utilisation de *companion-tests* (tests-compagnons, car accompagnant la prescription d'un médicament) développés pour rechercher, caractériser ou quantifier les biomarqueurs. La condition de prescription doit alors figurer dans les résumés des caractéristiques du produit (RCP) et être précisée dans l'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les autorités sanitaires américaines (*Food and Drug Administration*, FDA) ont été pionnières dans cette démarche, en publiant régulièrement des recommandations sur les biomarqueurs identifiés (**Annexe 1,** [13]). Dans le but d'une prise de décision éclairée, la FDA répartit les biomarqueurs en 3 catégories selon le niveau de preuve de la pertinence clinique du biomarqueur par rapport à un médicament donné : « requis », « conseillé », ou « à tester à titre d'information ». En France, la recherche du statut mutationnel *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) dans les traitements à base de biothérapies anti-EGFR a été le premier marqueur pharmacogénomique subordonnant le remboursement par l'assurance maladie des traitements chez les patients WT (*wild type*) uniquement. Par ailleurs, la caractérisation de KRAS étant devenu un acte de soin courant dans la prise en charge de certains cancers, notamment le

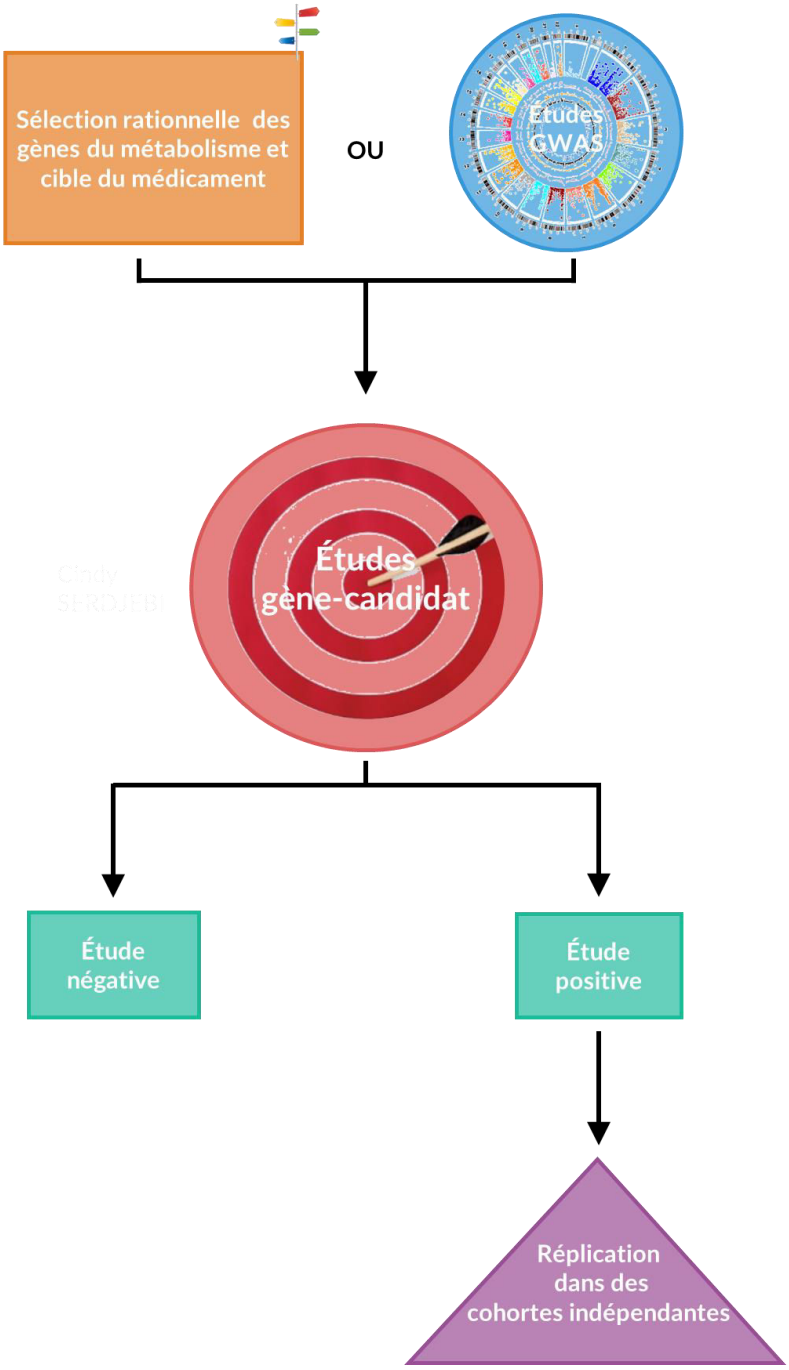


Figure 3. Médecine personnalisée et apport des études GWAS et gène-candidat dans la recherche de biomarqueurs génétiques [26].

Deux approches peuvent être utilisées pour rechercher des biomarqueurs génétiques. La première, l'approche Genome-wide association GWAS, consiste à étudier tous les gènes possibles, sans sélection aucune. Tous les gènes ressortant comme potentiellement associés à la réponse au médicament seront étudiés dans un second temps. L'autre approche consiste, à l'inverse, à sélectionner a priori les gènes participant au métabolisme ou codant pour la cible du médicament. Cette approche est appelée gène candidat. Une fois les associations mises en évidence, des études sont réalisés de façon rétrospective et/ou prospective. Si ces études amènent à des résultats positifs, ils devront faire l'objet d''études de réplication dans des cohortes indépendantes.

cancer colorectal métastatique, l'assurance maladie a décidé en février dernier de rembourser ce test, qui était jusqu'alors pris en charge par l'Institut National du Cancer (INCa, [14]).

En oncologie, les biomarqueurs sont essentiellement des gènes ou des protéines dont la séquence et/ou l'expression ont été modifiées de façon innée ou acquise [15]. Depuis l'élucidation de la structure hélicoïdale de l'ADN (acide désoxyribonucléique) par Watson et Crick en 1953 [16] et le premier séquençage en 1977 par Sanger [17], les continuelles avancées technologiques en matière de séquençage du génome humain ont permis de particulièrement s'intéresser aux biomarqueurs d'origine génétique de façon toujours plus poussée avec un coût réduit [18]. Ainsi, deux domaines de recherche complémentaires ont émergé: d'une part, l'étude de la génétique constitutionnelle qui, par définition, s'intéresse aux altérations génétiques héréditaires présentes sur les cellules germinales, et transmises à la descendance ; d'autre part, la génétique somatique, qui se concentre sur l'étude des altérations génétiques acquises au cours du temps. C'est ainsi que le concept de pharmacogénomique a fait son entrée dans l'application de la médecine personnalisée. La pharmacogénomique se définit comme l'étude de l'influence des variations génétiques innées et acquises sur la réponse au médicament [19]. Ce terme est très souvent utilisé de façon interchangeable avec le mot « pharmacogénétique » [20], utilisé pour la première fois par le Professeur Friedrich Vogel en 1959, pour définir les « bases héréditaires de la réponse aux médicaments [21,22]. Bien que les deux termes soient relatifs aux variations génétiques et leurs influences sur la réponse au traitement, il existe cependant des différences dans l'emploi de ces deux mots. Pour certains, la différence réside en oncologie dans l'origine du génome étudié, la pharmacogénomique faisant référence aux altérations intervenant sur des cellules somatiques et la pharmacogénétique sur des cellules germinales, avec des mutations dites «constitutionnelles», en cohérence avec la définition originelle de Vogel [8,23]. Pour d'autres, la pharmacogénétique serait l'étude ciblée des gènes influençant la réponse au traitement (étude gène-candidat) et la pharmacogénomique correspondrait à l'étude des phénomènes génétiques de plus grande envergure GWAS (*Genome-wide association*), incluant les phénomènes de régulation et épigénétiques (**Figure 3**, [24–26]). Enfin, il existe une troisième définition, où la différence entre les deux domaines résiderait dans le type de gènes touchés par les variations [12,27] : la pharmacogénétique étudierait l'influence des gènes responsables de la pharmacocinétique ADME des médicaments [27], alors que la pharmacogénomique se concentrerait sur les variations génétiques se produisant sur les facteurs pharmacodynamiques, en lien avec la cible du traitement. En oncologie, cette dernière définition recoupe le distinguo germinal (PK) et somatique/tumoral (PD) précédemment défini. Quel que soit le domaine considéré et sa définition, les deux approches tendent à développer des moyens rationnels pour optimiser les traitements selon les caractéristiques génétiques des patients, en améliorant la balance efficacité/toxicité [28].

Les conséquences cliniques des variations génétiques affectant l'ADME sont surtout connues pour la variabilité génétique affectant la sphère du métabolisme hépatique, même si l'impact de la variabilité génétique touchant le transport membranaire des xénobiotiques revêt un caractère de plus en plus important. Ces conséquences sont plus ou moins importantes et dépendent d'un certain nombre de facteurs : la molécule en question, l'importance de la voie métabolique affectée par la variation dans la clairance globale du médicament, l'existence de voies de secours (sécrétion biliaire, élimination urinaire, autres voies métaboliques), l'administration du médicament sous forme active ou de pro-drogue, la formation de métabolites pharmacologiquement actifs ou non, et enfin de l'index thérapeutique, comme cité précédemment [29]. L'existence de variations génétiques affectant les gènes codant pour les enzymes du métabolisme aboutit à distinguer dans la population différentes classes d'individus en fonction de leur capacité métabolique vis-à-vis d'une enzyme donnée : les métaboliseurs lents (*Poor metabolizers* PM) présentant une diminution de l'activité enzymatique étudiée, les individus ultra-rapides (*Ultra-rapid metabolizers* UM) qui ont une capacité métabolique supérieure à la normale, et les individus extensifs (*Extensive metabolizers* EM) avec une activité enzymatique normale. Selon l'enzyme considérée (par exemple, le cytochrome P450 isoforme 2D6 CYP2D6), une quatrième classe peut être définie, avec les métaboliseurs intermédiaires (*Intermediate metabolizer* IM), qui possèdent une activité enzymatique diminuée mais tout de même supérieure à celle des PM [30].

Parmi les très nombreuses protéines constituant le capital enzymatique de l'espèce humaine, on retrouve la cytidine déaminase (CDA), enzyme d'origine hépatique, responsable de la régulation du pool de cytidine et d'uridine dans l'organisme. Le gène *CDA*, codant pour l'enzyme du même nom, fait l'objet de nombreuses variations génétiques et épigénétiques, conduisant à une large variabilité inter-individuelle en termes d'activité enzymatique. Or, la CDA constitue également une enzyme majeure dans la détoxification de nombreux agents antimétabolites utilisés en oncologie, tels que la gemcitabine [31], l'azacytidine [32] ou encore l'aracytine [33–35]. Ainsi, les patients présentant une déficience en CDA présenteraient potentiellement plus à risque de déclarer des toxicités sévères par surexposition plasmatique à l'agent anti-cancéreux, due à un défaut d'élimination hépatique [36–40]. A l'inverse, le risque d'échappement thérapeutique sous analogues nucléosidiques serait plus grand chez les patients au profil UM. En effet, leur capacité métabolique à détoxifier l'agent anti-cancéreux étant accrue, une dose standard ne permet pas d'assurer une exposition plasmatique garantissant un effet pharmacologique suffisant (excepté pour la capécitabine, pro-drogue inactive nécessitant l'intervention de la CDA pour exercer son effet pharmacologique).

Depuis l'identification de la CDA comme enzyme-clé du métabolisme des analogues nucléosidiques, les dérégulations affectant la CDA ont d'abord été étudiées sur le plan

pharmacogénomique tumoral, une surexpression en CDA étant associée à un phénotype de chimiorésistance de la cellule cancéreuse. Concernant la CDA au niveau constitutionnel, de nombreuses études ont été menées à travers le monde, mais n'ont pas suffi à établir le statut CDA comme biomarqueur validé de l'issue clinique des patients traités par analogues nucléosidiques [41–43].

Cette thèse a pour objet de déterminer si la CDA constitutionnelle peut être considérée comme biomarqueur d'efficacité et de toxicité chez les patients traités par cette classe de médicaments.

Ce manuscrit a été articulé en deux parties. Dans la première partie, nous présentons quelques biomarqueurs dont l'implémentation en routine a été réalisée avec plus ou moins de succès dans le cadre du développement d'une médecine personnalisée en oncologie afin d'illustrer cette tendance de fond dans l'émergence d'une nouvelle stratégie thérapeutique en oncologie. Ensuite, nous revoyons les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques des principaux analogues nucléosidiques et présentons également la CDA, avec une revue des connaissances actuelles sur les relations pharmacogénétiques entre analogues nucléosidiques et CDA. La deuxième partie de ce manuscrit détaille nos travaux personnels dont le but était d'étudier l'influence du statut CDA sur l'issue clinique des patients traités par analogues nucléosidiques à travers plusieurs études cliniques conduites pendant notre doctorat. Nous vous présentons également les premiers travaux réalisés dans le but de réaliser un séquençage partiel de la *CDA*, en utilisant le principe du pyroséquençage, technique de séquençage haut-débit (*Next-generation* sequencing, NGS) de deuxième génération Enfin, dans une discussion globale, nous présentons l'apport de nos résultats aux connaissances actuelles et discutons des perspectives dévoilées par ces travaux.

PARTIE A

MÉDECINE PERSONNALISÉE EN ONCOLOGIE

I DÉFINITIONS

La dernière décennie a vu des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui permettent la formation, le maintien et la progression d'une tumeur, jouant un rôle critique dans le développement des biomarqueurs en oncologie [7]. Des avancées considérables ont été réalisées pour tenter de caractériser les tumeurs chez l'Homme [44] et ont permis de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouvelles stratégies de traitement. La prise en charge des patients à un stade avancé de cancer a évolué depuis un traitement empirique basé sur le profil clinico-pathologique vers une stratégie thérapeutique dictée par les biomarqueurs et le profil moléculaire de la tumeur [7]. Notre connaissance du cancer a profondément modifié la façon de prendre en charge la pathologie et a permis de s'intéresser non plus seulement à la localisation et à l'histologie de la tumeur (TNM, *Tumor Node Metastasis classification*) mais également à son profil génétique et moléculaire.

Étant donné la diversité biologique qui existe entre les tumeurs, les biomarqueurs sont de plus en plus utilisés pour individualiser les thérapies. Les mutations somatiques, retrouvées au sein de la tumeur, ainsi que les mutations germinales, héréditaires, peuvent influencer l'évolution de la maladie et la réponse au traitement. Ainsi peut-on distinguer deux catégories de biomarqueurs [45,46] :

- les marqueurs pronostiques, qui sont des caractères ou ensembles de caractères d'un individu en rapport avec la maladie d'intérêt, mais sans lien avec le traitement. Ils sont associés à l'évolution de la maladie, indépendamment de tout traitement.
- les biomarqueurs prédictifs ou diagnostiques, qui sont des caractères ou ensembles de caractères d'un individu qui conditionnent l'évolution de la maladie par rapport à un traitement donné. Ils sont associés à la réponse au traitement [47,48].

Les biomarqueurs de type prédictif sont identifiés en caractérisant les mutations-clés et les voies de signalisation impliquées dans le développement et la prolifération tumorale, et en identifiant les variations génétiques conduisant à des modifications dans la pharmacodynamie ou la pharmacocinétique du médicament utilisé. Ces biomarqueurs constituent un support à la décision thérapeutique, en donnant des informations permettant d'évaluer la probabilité de réponse à une thérapie. La pharmacogénomique est l'étude des variations génétiques intervenant sur les cibles thérapeutiques des traitements, responsables de la variabilité inter-individuelle dans la réponse thérapeutique. Elle vise à différencier les patients à l'échelle moléculaire pour leur assurer un traitement plus efficace en fonction du profil génétique de leur tumeur [27]. Avec l'arrivée des thérapies ciblées, dont le rôle est d'inhiber une cible spécifique de la pathologie, la

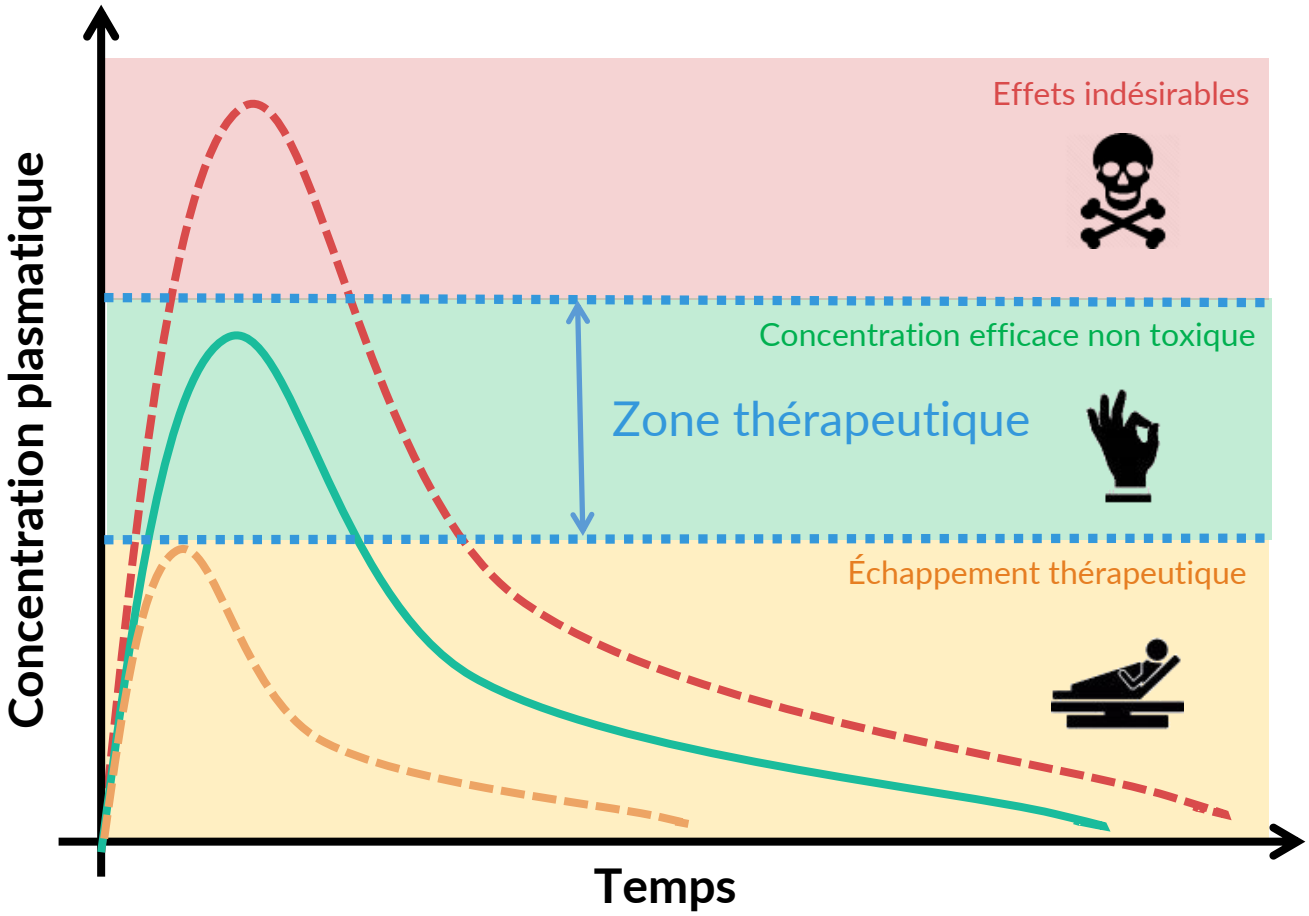


Figure 4. Zone thérapeutique des médicaments.
Les concentrations plasmatiques des médicaments contrôlent l'exposition des patients. On peut ainsi distinguer trois zones de concentrations. La première zone regroupe les concentrations basses en médicament, qui ne permettent pas un effet thérapeutique. Lorsque les concentrations du patient se trouvent dans cette zone, le patient ne bénéficie pas des effets de son traitement. Dans la partie haute est définie la zone de concentrations toxiques, où une exposition prolongée ou répétée du patient entraîne des toxicités sévères. Enfin, au milieu, la zone de concentrations restantes délimite la zone thérapeutique. Lorsque le patient est exposé à des concentrations appartenant à cette zone, le patient bénéficie de l'efficacité de son traitement sans subir d'effets secondaires. En oncologie, cette zone est étroite, notamment avec les agents cytotoxiques, utilisés à la dose maximale tolérée.

pharmacogénomique a connu un essor et un intérêt grandissant pour aider à mieux comprendre les différences génétiques qui déterminent la réponse aux thérapies ciblées. La pharmacogénétique, qui s'intéresse aux variations génétiques qui influencent le processus ADME des médicaments, est également appliquée à de nombreuses thérapies, mais connaît de plus grande difficulté à être transférée en routine.

Le paradigme actuel des traitements par chimiothérapie en oncologie consiste à administrer la dose maximale tolérée (DMT), qui est le schéma posologique (dose, fréquence, durée) maximal entraînant une toxicité acceptable pour le patient. Or, ces thérapies non spécifiques possèdent une zone thérapeutique très étroite, au-dessous de laquelle la concentration ne permettra pas un bénéfice thérapeutique pour le patient et au-dessus de laquelle les toxicités engendrées sont sévères (**Figure 4**). Malheureusement, les traitements ont pour la plupart une variabilité pharmacocinétique inter-individuelle inhérente importante. A l'heure actuelle, les seuls facteurs pris en compte dans la détermination d'une dose individualisée restent encore trop souvent la surface corporelle du patient BSA (*Body surface area*), ou bien son poids [49]. Ces paramètres informant sur la taille du patient n'expliquent qu'une partie de la variabilité pharmacocinétique, le reste étant la conséquence de la variabilité des différentes étapes du processus ADME. Pour chaque xénobiotique, il existe plusieurs enzymes et transporteurs responsables du processus ADME. L'expression et l'activité de ces enzymes et transporteurs sont hautement variables entre les patients, en partie à cause de la variabilité génétique de chaque individu.

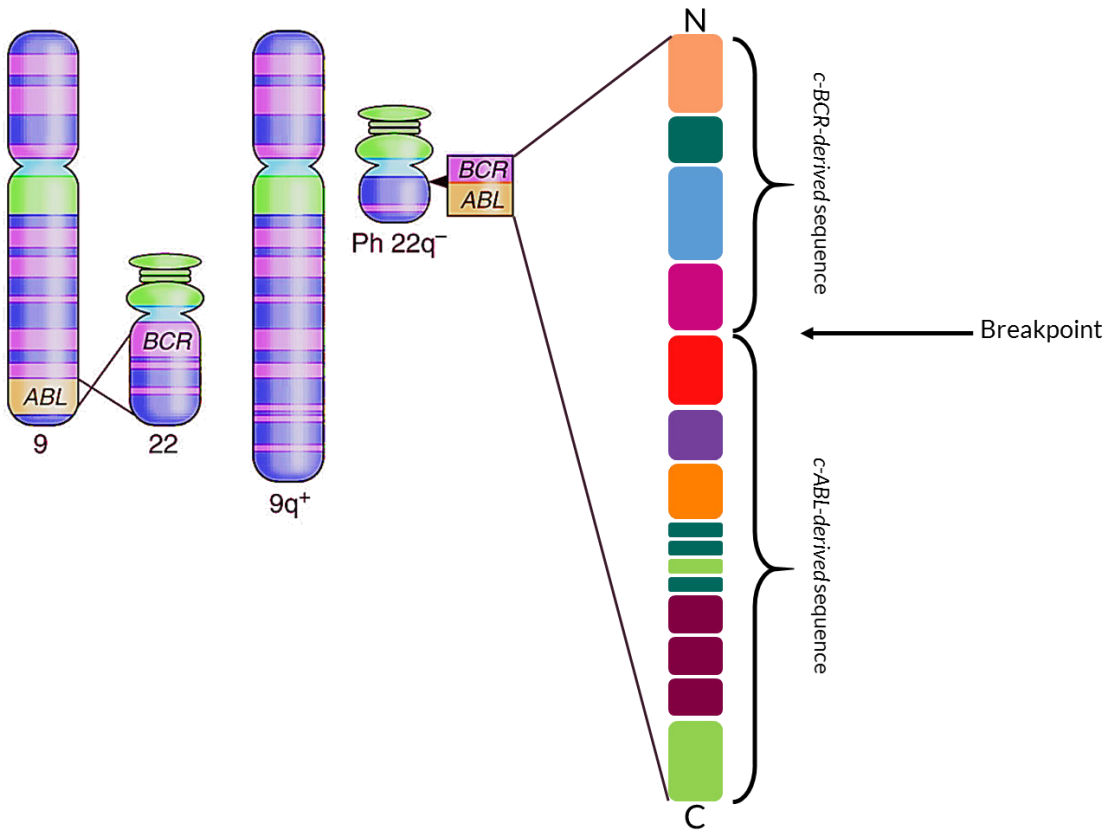


Figure 5. Translocation et formation du gène de fusion *BCR-ABL* sur le chromosome Philadelphie [57,58].
Les gènes BCR et ABL résident dans le long bras des chromosomes 9 et 22, respectivement. Résulte de la translocation (9 :22) un gène de fusion BCR-ABL, formé par le chromosome 22 nouvellement formé (chromosome Philadelphie).

II BIOMARQUEURS PRÉDICTIFS EN ONCOLOGIE

Les biomarqueurs de type prédictif fournissent une information sur la probabilité des patients de développer une réponse favorable ou une toxicité importante à une thérapie donnée [47] et constituent ainsi un support à la décision thérapeutique [48]. Un certain nombre de ces biomarqueurs moléculaires sont actuellement utilisés en pratique clinique de routine pour déterminer le choix de la thérapie, notamment dans la prise en charge de plusieurs pathologies cancéreuses: la leucémie myéloïde chronique (LMC), la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), le cancer colorectal (CCR), le cancer du sein, du poumon et le mélanome, le plus souvent dans le cadre de l'utilisation de biothérapies ou thérapies ciblées. En théorie, les biomarqueurs prédictifs dans ces pathologies, qu'ils soient d'origine somatique ou germinale, sont utilisés pour évaluer les bénéfices qui peuvent être atteints durant la mise en place du traitement par thérapies ciblées, et les effets toxiques de la chimiothérapie [46]. Cependant, la pratique révèle que la présence de ces biomarqueurs constitue le plus souvent des facteurs prédictifs de non-réponse à une thérapie. De plus, il faut garder en tête que de nombreux biomarqueurs, en dépit d'un rationnel scientifique relevant, ont montré des résultats décevants dans des études cliniques prospectives visant à confirmer leur intérêt [50].

1 BIOMARQUEURS PHARMACOGÉNOMIQUES SOMATIQUES

1.(1) Biomarqueurs des thérapies ciblées

1.1.(1) Le statut BRC-ABL

Première pathologie maligne à avoir été associée à la présence d'une anomalie chromosomique, la LMC est le syndrome myéloprolifératif le plus fréquent, représentant 15 à 20% des leucémies [51,52]. À l'origine de ce cancer hématologique, la présence d'une anomalie génétique dans 85% des cas : le chromosome Philadelphie (Ph, [52]). Cette anomalie résulte de la translocation réciproque des chromosomes 9 et 22 t(9 ;22)(q34 ;q11), et conduit à la fusion du gène *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) avec l'oncogène *ABL* (Abelson), pour donner le nouveau gène *BRC-ACL* porteur d'une mutation sur la partie *ABL* (**Figure 5**, [53–58]). Cette mutation induit la transcription d'une protéine BCR-ABL dont la partie tyrosine kinase est constitutivement active [59–61].

En 2001, la mise sur le marché des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), ayant pour cible la partie intracellulaire des récepteurs à activité tyrosine kinase, a considérablement changé la prise en charge des LMC Ph+ [62]. L'imatinib (Glivec®), chef de file des ITK, a permis d'améliorer

favorablement le pronostic de la LMC, en permettant une rémission durable chez la majorité des patients en phase chronique [63]. Cependant, certains patients ne répondent pas à un traitement par imatinib. Dans la plupart des cas, la résistance est causée par la présence ou l'acquisition de mutations entraînant des modifications sur le domaine à activité tyrosine kinase de la protéine, empêchant ainsi la fixation de l'imatinib et donc son activité [64]. La présence de mutations sur la partie du gène codant pour le domaine tyrosine kinase est observée chez 50% des patients en situation d'échappement thérapeutique ou en progression sous imatinib [65–68]. Aujourd'hui, plus de 80 substitutions d'acides aminés ont été associés à une résistance à l'ITK [65–68]. Ces mutations sont également susceptibles d'entraîner une instabilité génétique et augmentent ainsi le risque de progression de la maladie indépendamment du traitement [62]. C'est pour pallier ces nouvelles mutations qu'ont été conçus les ITK de deuxième et troisième générations, avec le dasatinib (Sprycel®) et le nilotinib (Tasigna®) en 2006 et 2007. Ces deux principes actifs sont susceptibles d'être actifs sur un plus grand nombre de mutations que l'imatinib, même si la pratique révèle qu'il existe également de nombreuses mutations entraînant des modifications de la tyrosine kinase de BCR-ABL associées à une rechute soit sous nilotinib (p.Y253H, p.E255K/V, p.F359V/C/I) soit sous dasatinib (p.V299L,p.F317L/V/I/C, p.T315A) [62,68].

Il existe également une autre mutation qui confère une résistance au traitement par les ITK de la première à la troisième génération : la mutation p.T315I. Bien que cette mutation ne modifie pas la structure globale de BCR-ABL, elle affecte la poche de liaison de l'ATP (adénosine triphosphate, [69]). La modification du résidu thréonine en isoleucine est critique pour la formation de la liaison hydrogène entre BCR-ABL et les ITK. Ainsi, sans ce résidu, les ITK ne peuvent se fixer. La mutation p.T315I, aussi appelée « mutation *gatekeeper* » en raison de sa localisation stratégique, est retrouvée dans 20 à 25% des cas de résistance ou de rechute au traitement par ITK [69,70], mais représente seulement 2% des patients traités en première ligne pour une LMC. A l'heure actuelle, seul le ponatinib (Iclusig®) a démontré une activité *in vitro* sur la protéine porteuse de la mutation p.T315I mais également chez les patients [62].

1.1.(2) La voie de signalisation EGFR

La progression tumorale est fortement associée à l'activité des récepteurs cellulaires membranaires ainsi qu'à la transduction du signal intracellulaire, qui régule diverses fonctions telles que la différenciation et prolifération cellulaires, l'apoptose (ou mort cellulaire programmée), la motilité, l'adhésion ou l'angiogénèse. De récentes études ont surligné le rôle des SNP (*Single nucleotide polymorphism*), des mutations et des variations de copies de gène CNV (*Copy number variation*) dans les différents gènes impliqués dans la croissance anormale des cellules cancéreuses [71,72]. Dans ce contexte, et basé sur le rôle majeur du récepteur du facteur de croissance

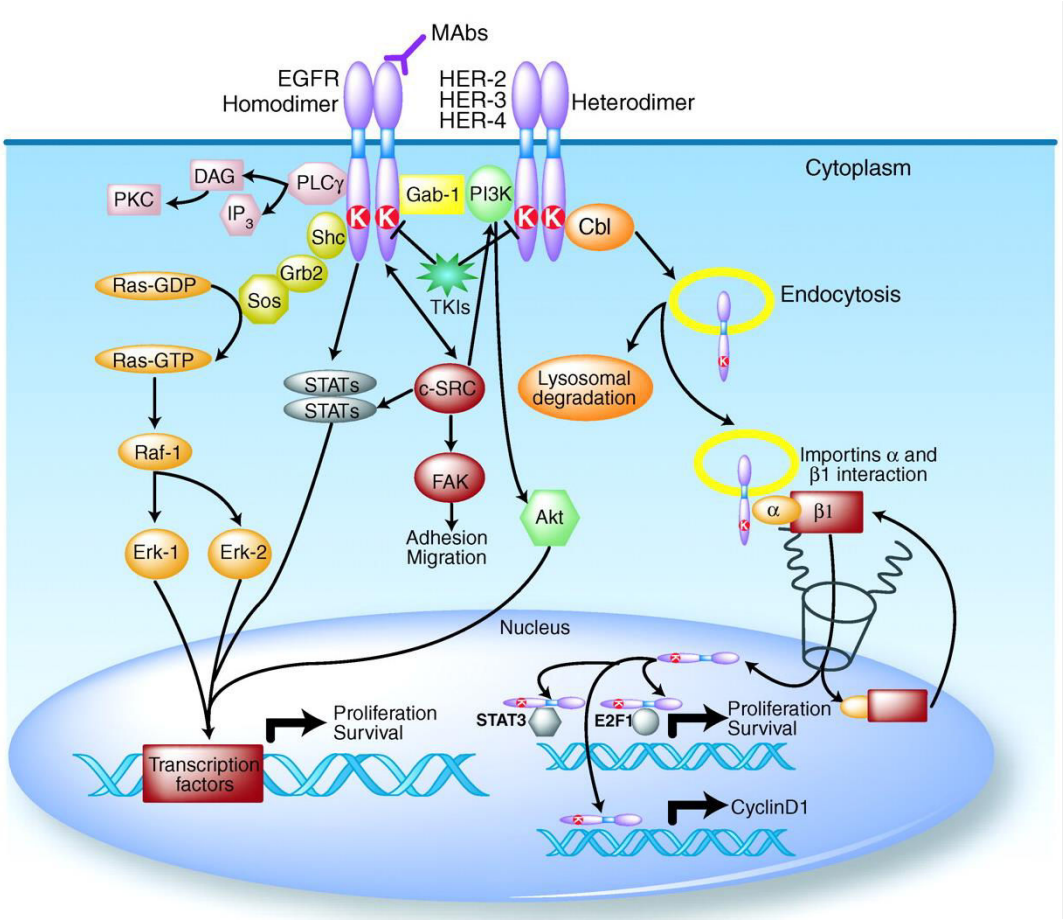


Figure 6. Voies de signalisation et inhibiteurs du récepteur EGFR [77].
L'activation d'EGFR conduit à son homodimérisation ou hétérodimérisation, la phospshorylation de résidus tyrosine spécifiques, et au recrutement de plusieurs protéines dans le périmètre proche de la partie intracellulaire du récepteur. La phospholipase Cγ (en rose) et les facteurs de transcription STAT (en bleu) se lient directement au récepteur, tandis que les voies de signalisation Ras/Raf/MAPK (en orange) et PI3K (en vert) ont besoin de molécules adaptatrices spécifiques (en jaune). D'autre part, les récepteurs activés peuvent également subir une endocytose et suivre ensuite deux voies : une dégradation liposomale ou une translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, EGFR peut se comporter soit comme un facteur de transcription ou comme un co-régulateur d'autres facteurs de transcription. Les deux voies conduisent à l'activation nucléaire de gènes associés à la prolifération, survie, invasion cellulaires et au processus métastatique. Les deux principales stratégies pour inhiber la voie EGFR sont les anticorps monoclonaux et les ITK. Les anticorps monoclonaux agissent sur la partie extracellulaire en empêchant les ligands d'EGFR de se lier, alors que les ITK agissent par inhibition compétitive avec l'ATP pour se lier au domaine kinase.

.

épidermique EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) dans la pathogénèse d'un certain nombre de tumeurs solides, les facteurs de transcription impliqués dans la signalisation à partir d'EGFR sont considérés comme des cibles des thérapies anti-cancéreuses [73].

Le statut EGFR (HER1)

La protéine EGFR est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs ErbB (*Erythroblastosis oncogene B*, [74]). L'épiréguline, l'amphiréguline, l'EGF (*Epidermal growth factor*) et le TGF (*Transforming growth factor*) comptent parmi les ligands naturels du récepteur [75]. Lors de la fixation d'un de ses ligands, le récepteur se dimérise, activant ainsi la phosphorylation réciproque des domaines intracellulaires des deux récepteurs dimérisés. S'en suit une cascade d'événements intracellulaires : une fois dans le noyau, EGFR peut se comporter comme un facteur de transcription, ou comme un co-régulateur d'autres facteurs de transcription (**Figure 6,** [19,76,77]). Les deux voies conduisent à l'activation nucléaire de gènes associés à la prolifération, survie, invasion cellulaires et au processus métastatique.

La découverte des mutations sur le gène *EGFR*, ainsi qu'une meilleure connaissance de la cascade de signalisation que son activation implique, ont permis le développement de nouvelles thérapies [78]. Aujourd'hui, il existe sur le marché plusieurs thérapies ciblées dirigées contre différentes parties de l'EGFR. Les deux principales stratégies pour inhiber la voie EGFR sont les anticorps monoclonaux et les ITK. Les anticorps monoclonaux anti-EGFR, tels que le cetuximab (Erbitux®) ou le panitumumab (Vectibix®), inhibent l'activation du récepteur EGFR en empêchant la fixation de ses ligands naturels. Ce blocage extracellulaire inhibe de fait la dimérisation du récepteur et ainsi la cascade de signaux intracellulaires qui en découle. Les autres molécules, plus petites, que sont les ITK anti-EGFR tels que le géfitinib (Iressa®) ou l'erlotinib (Tarceva®), sont responsables du blocage de la partie intracellulaire du récepteur par inhibition de la phosphorylation des tyrosine-kinases en interférant avec l'ATP et/ou les sites de fixation du ligand, supprimant ainsi la signalisation par EGFR. La réponse à ces différentes thérapies varie entre les patients, notamment selon le statut EGFR. Aujourd'hui, quatre paramètres sont importants concernant le statut EGFR :

- le niveau d'expression du gène *EGFR*.
- la présence de mutations sur *EGFR* dans les cellules tumorales, résultant en une activation permanente du récepteur. Ces mutations sont associées à une réponse favorable aux ITK anti-EGFR.
- la présence de CNV.
- la présence de polysomie du chromosome 7, porteur du gène *EGFR*.

Dans les CCR, le récepteur à l'EGF est surexprimé dans environ 70% des cas [79,80]. Toutefois, sa surexpression n'est pas un prérequis à l'utilisation de ses antagonistes. En effet, en l'absence d'une valeur-seuil consensuelle de l'expression d'EGFR qui permette de prédire la réponse au traitement par anticorps monoclonaux, et malgré la controverse de l'utilisation d'un test pour EGFR chez tous les patients [79], le traitement par thérapies ciblées, telles que le cetuximab, a permis d'augmenter significativement la survie des patients, particulièrement quand elles sont associées à une chimiothérapie, de type FOLFIRI (5-FU, acide folinique, irinotécan) et FOLFOX4 (5-FU, acide folinique, oxaliplatine).

Le récepteur à l'EGFR est aussi une cible thérapeutique privilégiée des thérapies utilisées dans le cadre de la prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Dans ce contexte, les mutations *EGFR* sont plus fréquentes chez les femmes, les patients d'origine asiatique, les non-fumeurs et les cancers du poumon non-squameux. Les mutations les plus fréquentes se produisent dans l'exon 19 (60%, [80]).

Les mutations portées par le gène *EGFR* peuvent être des biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement, notamment lors de l'utilisation d'ITK. De nombreuses études démontrent que la réponse thérapeutique aux ITK est associée à une signalisation aberrante d'EGFR à cause de mutations activatrices entraînant des modifications sur le domaine tyrosine-kinase (TK) du récepteur (exons 18 à 21, [81–83]). Les mutations les plus connues sont la délétion de 4 acides aminés dans la séquence peptidique (p.E746_A750del) et la substitution d'une thymine en guanine dans l'exon 21 conduisant à la modification d'une arginine en leucine en position 858 (p.L858R, [84,85]). Ces mutations sont retrouvées chez respectivement 10 à 15% et 30 à 40% des patients caucasiens et asiatiques présentant un CBNPC [80]. Les patients porteurs de ces mutations montrent un meilleur taux de réponse lors d'une thérapie ITK anti-EGFR par rapport aux patients non mutés *EGFR* [85]. Certaines études ont même montré que l'erlotinib et le géfitinib devraient être administrés en première intention aux patients atteints de CBNPC présentant des mutations sur les exons 19 ou 21 grâce à l'augmentation de la survie sans progression qu'ils ont démontrée [86]. Ainsi l'ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) recommande que les patients atteints de CBNPC naïfs de traitement soient testés pour les mutations sur *EGFR* afin de décider de la meilleure stratégie thérapeutique à adopter en première intention.

D'autre part, les patients atteints de CBNPC initialement sensibles aux ITK sont susceptibles d'acquérir de nouvelles résistances aux deux thérapies ciblées. Ainsi, la mutation p.T790M, causée par la substitution d'une cytosine par une thymine dans l'exon 20 du gène, apparaît dans près de la moitié des adénocarcinomes pulmonaires [46,87,88]. Le changement d'acide aminé à la position 790 de la séquence protéique conduit à une interférence de type stérique avec le site de liaison des ITK, restaurant, et même augmentant l'affinité initiale de la protéine pour l'ATP [89]. Il existe

quelques cas où cette mutation p.T790M est retrouvée de façon constitutive. Dans cette configuration, la mutation a un rôle pronostique majeur dans la croissance tumorale et dans la susceptibilité de déclarer un cancer du poumon [89].

Quelques questions subsistent encore lorsque l'on s'intéresse aux ITK anti-EGFR chez les patients traités pour CBNPC. Tout d'abord, la relation entre les mutations *EGFR* et l'amélioration de la réponse clinque est toujours controversée à cause de la différence de design des études menées, mais également à cause de l'hétérogénéité des tumeurs pulmonaires. Certains chercheurs suggèrent que le nombre de gènes *EGFR* ou son niveau d'expression pourrait être un meilleur marqueur du bénéfice de traitement par ITK. Cette question reste sans réponse à l'heure actuelle [90,91]. Ensuite, chez les patients déjà traités dans le cadre de leur CBNPC, on ne sait dans quelle mesure le statut mutationnel *EGFR* peut être utilisé pour guider le choix du traitement.

L'expression du récepteur HER2

HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*) est un récepteur à la surface de la membrane cellulaire, impliqué dans la transmission de signaux contrôlant la croissance et la différenciation cellulaires [92]. Il appartient à la même famille que le récepteur EGFR et est codé par le gène *HER2/neu*, initialement identifié chez le rat porteur de tumeur de l'ectoderme neural, d'où son nom. Malgré un rôle majeur dans le développement des cellules normales, l'amplification du gène *neu* conduit à une sur-expression de la protéine HER2, impliquée dans le développement de nombreux cancers dont le cancer du sein [93].

L'augmentation de l'expression de la protéine HER2 ou l'amplification du gène *HER2/neu* se produit dans 15-30% des cas de cancers du sein invasifs [7,92,94]. Cette augmentation constitue un marqueur de mauvais pronostic, causée par une croissance accrue de la tumeur et une activité métastatique exacerbée [93,94]. La sur-expression de HER2 constitue également un facteur prédictif de réponse favorable au trastuzumab (Herceptin®), anticorps monoclonal humanisé spécifique de HER2 [79]. Il existe également un autre agent inhibiteur spécifique de HER2, le lapatinib, ITK qui bloque le domaine intracellulaire du récepteur HER2. L'utilisation simultanée des deux thérapies ciblées chez les patients atteints de cancer du sein HER+ permet une amélioration significative de la survie sans progression et un contrôle efficace de la maladie [95]. Le statut HER2 a été approuvé par la FDA comme biomarqueur avant mise sous traitement par trastuzumab, lapatinib, et pertuzumab en situation néo-adjuvante, adjuvante et métastatique. Enfin, récemment le statut HER2+ a été également associé à une réponse favorable aux agents anti-topoisomérase II, comme la doxorubicine ou l'épirubicine [80].

Le statut *KRAS*

Les gènes RAS constituent les oncogènes les plus fréquemment activés dans les cancers [80]. Participant à la signalisation intracellulaire de EGFR, la protéine KRAS est codée par *KRAS*, un proto-oncogène (gène participant à la croissance et différenciation cellulaires dans des conditions normales, mais ses mutations le transforment en oncogène qui contribue à la tumorogénèse). La protéine KRAS est une GTPase qui fonctionne comme un bouton « *on/off* » dans la transduction du signal extracellulaire depuis le récepteur à l'EGF jusqu'au noyau, commandant ainsi aux cellules de croître, proliférer ou d'entrer en apoptose [96,97]. Le rôle de la signalisation par KRAS (RAS, RAF, MAPK) a été étudié dans le cadre de la modulation de la réponse aux agents anti-EGFR.

Les mutations somatiques de *KRAS* sont les plus précoces dans la carcinogénèse des CCR [7]. Près de 40% des cancers du côlon sont mutés sur le gène *KRAS* sur les codons 12 et 13 ; 61% des CCR sont également mutés *KRAS* et sont résistants aux traitements par des anticorps monoclonaux anti-EGFR, tels que le cetuximab ou le panitumumab [7,98]. Le statut génétique *KRAS*, avec notamment la recherche des mutations sur les codons 12 et 13, constitue ainsi le seul biomarqueur prédictif validé de l'éligibilité des patients pour des thérapies anti-EGFR (cetuximab ou panitumumab) dans le CCR métastatique : les patients exempts de mutations sur ces deux codons ont 50% de chance supplémentaire de répondre au traitement. Ainsi, le cetuximab et le panitumumab ne possèdent pas actuellement l'AMM pour les patients porteurs de mutation sur *KRAS* [80]. Cependant, même si la présence de ces mutations sur le gène *KRAS* permet d'exclure les patients d'une thérapie par anticorps anti-EGFR, le statut WT du gène pour ces mutations ne garantit pas l'efficacité d'un traitement anti-EGFR chez un patient présentant un cancer EGFR+ : les patients sur-exprimant EGFR pourraient échapper au traitement si leur tumeur présente des mutations *KRAS* sur les codons 61 ou 146 [99]. Le statut *KRAS* n'a pas de valeur prédictive dans les autres types de tumeurs, ni dans la réponse au géfitinib et erlotinib.

Le statut *NRAS*

NRAS est une protéine membranaire, structurellement très proche de la protéine KRAS, qui navigue entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmatique, codée par le gène du même nom (*NRAS*, *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog* [100,101]). De même que KRAS, elle possède une activité GTPase intrinsèque.

Plusieurs mutations somatiques ont été mises en évidence sur le gène *NRAS* et ont été associées à un profil anti-apoptotique, notamment dans le CCR et dans le mélanome [102]. Contrairement aux mutations *KRAS* retrouvées de façon fréquente dans les CCR, les mutations portant sur *NRAS* ne sont retrouvées que dans 3 à 5% des CCR et se produisent préférentiellement

dans le codon 61 plutôt que dans les codons 12 et 13 [103,104]. En revanche, les mutations *NRAS* sont mutuellement exclusives avec les mutations *KRAS*, de la même façon que les mutations *BRAF*. Cette propriété rend légitime la recherche du statut mutationnel de *NRAS* avant la mise en place d'une thérapie par anti-EGFR seulement chez les patients WT *KRAS* [104,105]. Il semble également que le nombre de mutations sur *NRAS* augmente dans les métastases [104].

Concernant le rôle prédictif du statut *NRAS* dans le CCR, la présence de mutations sur ce gène est associée à un manque de réponse sous cétuximab ou panitumumab d'après plusieurs études [106–109], même si Russo *et al.* n'a pas retrouvé d'association entre les mutations *NRAS* et l'issue clinique sous cetuximab [110].

Dans le mélanome, *NRAS* a été le premier oncogène identifié par Albino *et al.* en 1984 [111], même si les récentes avancées thérapeutiques se sont plutôt concentrées sur le ciblage de la protéine BRAF. Le rôle de NRAS dans la progression tumorale des mélanomes a été confirmé en 2009 après que l'extinction du gène ait été associée à une réduction marquée de la croissance cellulaire [112]. Désormais, on sait que les mutations *NRAS* sont présentes dans 20% des mélanomes, avec une majorité de mutation en position 61 de la chaîne aminée [113]. L'une des stratégies actuelles pour traiter les mélanomes en présence de mutations sur le gène *NRAS* consiste désormais à utiliser des inhibiteurs de MEK (*Mitogen-activated protein kinase*), protéine en aval de NRAS dans la voie de signalisation cellulaire EGFR. Mais l'efficacité de cette stratégie est très modeste, avec un taux de réponse objective de 10% pour les inhibiteurs de première génération de MEK [114]. Cependant, les récentes études cliniques visant à étudier l'efficacité des anti-MEK de troisième génération, avec notamment le tramétinib (GSK1120212) et MEK162 (ARRY-438162) montrent une meilleure réponse objective des patients. D'autres études sont actuellement en cours, avec les anti-MEK.

Le statut *BRAF*

Le gène *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) est un gène codant pour une protéine effectrice en aval de la signalisation de KRAS, *de* la famille raf/mil des sérine-thréonine kinases. La protéine BRAF est impliquée dans la régulation des MAP kinases (*Mitogen-activated protein kinases*, MAPK) et dans la signalisation ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), qui affecte la division cellulaire, la différentiation et la sécrétion. Une augmentation de la signalisation BRAF et de la tumorogénèse pourrait être des conséquences de la présence de mutations activatrices sur *BRAF*.

BRAF constitue un biomarqueur prédictif intéressant pour les patients atteints de mélanome à un stade avancé. Les mutations somatiques faux-sens du gène *BRAF* (p.V600E/K/D/R/M) se produisent dans de nombreux types de tumeurs. Cependant, c'est dans le mélanome malin que

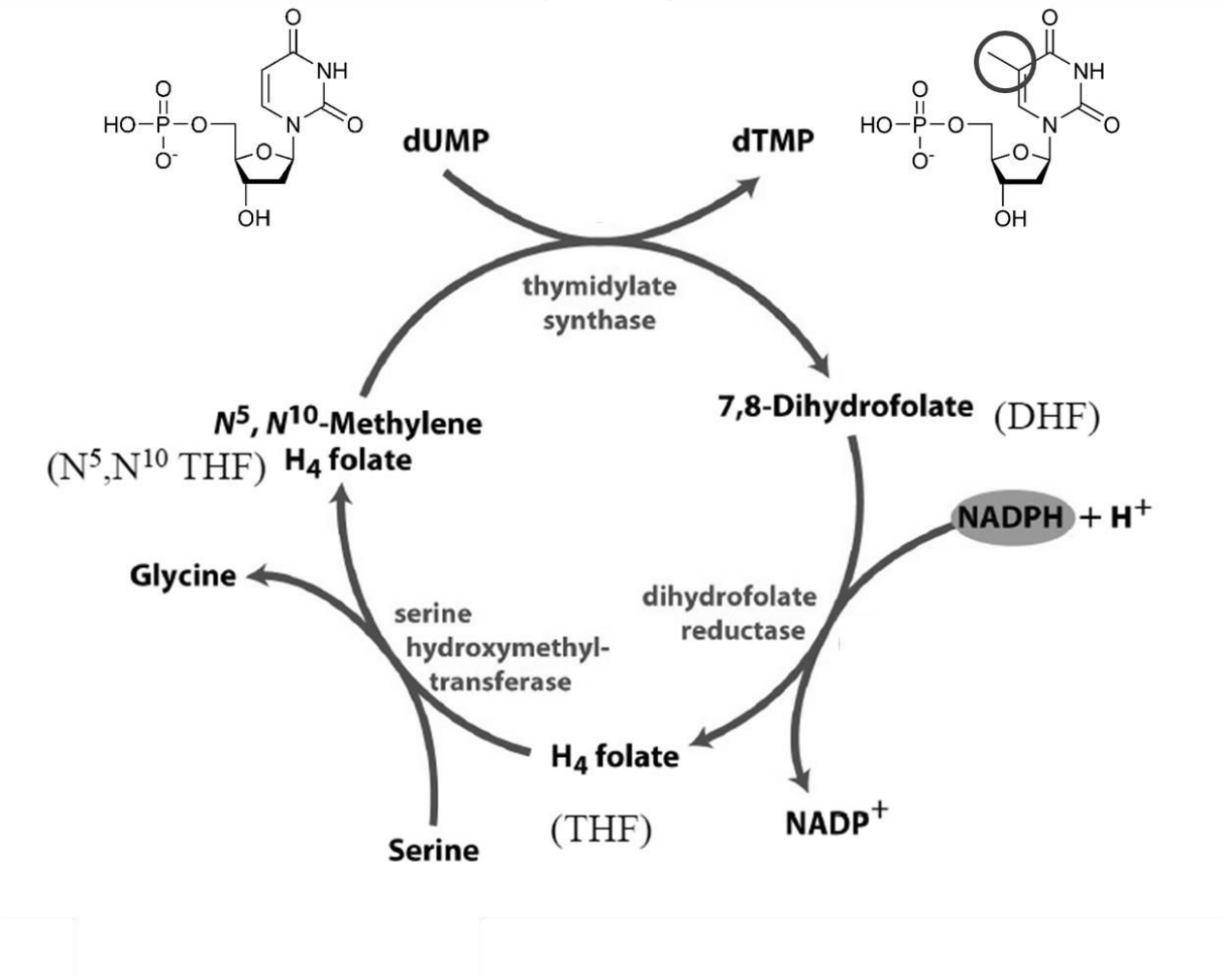


Figure 7. Cycle de la biosynthèse de la déoxythymidine monophosphate dTMP par la thymidine synthase [121]. *La TS est l'enzyme responsable de la synthèse de dTMP. Elle fixe deux substrats: le dUMP et le methylène tétrahydrofolate, pour former un complexe ternaire qui aboutira à la conversion du dUMP en TMP.*

l'incidence de ces mutations est le plus élevé avec 50 à 66% de mutations, la plus répandue étant la mutation p.V600E (c.1799T>A, [115]). Pendant de nombreuses années, la seule thérapie existant pour la prise en charge des mélanomes était la dacarbazine (DTIC), avec un taux de réponse de 10% [116]. L'identification de la mutation p.V600E, substitution d'une valine par un acide glutamique en position 600 de la séquence protéique de BRAF, ainsi que le développement d'un inhibiteur spécifique de la protéine mutée, le vémurafénib (Zelboraf®), ont marqué un changement radical de la prise en charge de cette pathologie. L'utilisation du vémurafénib a permis de réduire de 63% et 74% le risque de décès et de progression respectivement par rapport à la DTIC chez des patients inopérables non traités, atteints de mélanomes de stade III ou IV, et porteurs de la mutation p.V600E. Parmi les thérapies ciblées spécifiques de la mutation V600, il existe également le dabrafénib (Tafinal®), commercialisé en 2013. De nombreux essais cliniques consistant à associer le vémurafénib à d'autres thérapies ciblés telles que des anti-MEK (cobimetinib), ou bien des anti-CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) comme l'ipilimumab (Yervoy®) ont récemment été menés et ont conduit à des résultats prometteurs en termes de réponse [117,118]. Plus récemment, le cobimetinib a obtenu une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) en association avec le vémurafénib chez les patients adultes, atteints d'un mélanome non résécable (stade III) ou métastatique (stade IV) porteur d'une mutation BRAF V600.

Dans la prise en charge du CCR, la mutation p.V600E constitue un marqueur émergent de la non-réponse aux thérapies ciblant KRAS. Actuellement, 35 à 45% des CCR sont mutés *BRAF* et cette mutation est considérée comme un marqueur de faible pronostic chez les patients naïfs de traitement [7]. On estime que 5 à 9% des CCR sont porteurs de mutations *BRAF* [119,120].

1.(2) Biomarqueurs des chimiothérapies : exemple de l'expression de la thymidylate synthase TS

La thymidylate synthase (TS), catalyse physiologiquement la méthylation du déoxyuridine monophosphate (dUMP) en déoxythimydine monophosphate (dTMP), réaction majeure dans la production de thymidine pour la synthèse d'ADN constituant ainsi la seule source *de novo* de thymidine dans la cellule (**Figure 7,** [121–123]**)**. La TS joue donc un rôle important dans les processus de réplication et de réparation de l'ADN, ainsi que dans la prolifération des cellules cancéreuses. De plus, elle constitue une cible majeure, directe ou indirecte, pour de nombreux agents antimétabolites, tels que le 5-FU, et sa pro-drogue orale, la capécitabine, le méthotrexate, le raltitrexed et le pémétrexed. Plusieurs études cliniques suggèrent que le niveau d'expression intra-tumoral de la TS pourrait être un marqueur déterminant permettant de déterminer l'éligibilité des patients à une thérapie à base de 5-FU (5-fluorouracile) ou de pémétrexed [124–127],

l'augmentation de son expression étant associée à une diminution de l'efficacité de la chimiothérapie. Cependant, la TS n'est pas actuellement un biomarqueur d'utilité clinique reconnu dû à un manque d'études prospectives validant son intérêt [80].

1.(3) Biomarqueurs de l'hormonothérapie : exemple de l'expression des récepteurs aux estrogènes ER

Les récepteurs aux estrogènes (ER) sont des récepteurs intracellulaires se trouvant à la surface externe de la membrane nucléaire. Ils sont activés par la fixation de l'estrogène [128]. Il existe deux formes différentes de récepteurs aux estrogènes, nommés α et β, chacune codée par un gène différent (*ESR1* et *ESR2*). Lorsque le récepteur fixe son ligand, il change de conformation et se dimérise (homo ou hétéro-dimérisation, [129]). Le récepteur transloque dans le noyau pour se fixer à une région spécifique de l'ADN, région appelée ERE (*Estrogen response element*), proche des gènes régulés par les hormones sexuelles. Après fixation de co-activateurs supplémentaires, le complexe ainsi formé active la transcription de certains gènes, entraînant la production de protéines spécifiques dont le rôle est cellule-dépendant. Le rôle majeur de la fixation des estrogènes sur les récepteurs ER est d'activer la prolifération cellulaire, mettant ainsi en relief leur importance majeure dans la prise en charge des cancers du sein.

On estime à 70% la proportion de cancers du sein sur-exprimant le récepteur aux estrogènes ER : le cancer est dit ER+. Malgré la large distribution de valeurs-seuils utilisées pour interpréter le niveau d'expression d'ER (1%, 5%, ou 10% des cellules tumorales), ER est apparu comme un marqueur prédictif d'efficacité dans la prise en charge des cancers du sein hormono-dépendants depuis que l'issue clinique a été corrélée au niveau d'expression du récepteur ER [80]. En effet, une augmentation de l'expression des récepteurs ER est prédictive du bénéfice thérapeutique que peut apporter une hormonothérapie en situation adjuvante ou métastatique. L'expression d'ER est un facteur prédictif du bénéfice par tamoxifène (Nolvadex®) chez les patients traités pour un carcinome ductal *in situ*, et du bénéfice par tamoxifène ou inhibiteurs d'aromatase dans les cancers du sein précoces et avancés. Actuellement, un traitement par hormonothérapie est recommandé pour tous les patients au statut ER+ quel que soit le niveau d'expression du récepteur ER [130]. Le statut ER pouvant évoluer au cours de la pathologie, un statut ER dans les métastases différent de la tumeur primaire a été retrouvé dans 20% des cas [131]. Ainsi, avant toute instauration d'une hormonothérapie dans le cadre d'une première récurrence, les autorités recommandent une biopsie pour confirmer le statut hormono-dépendant de la maladie [132,133].

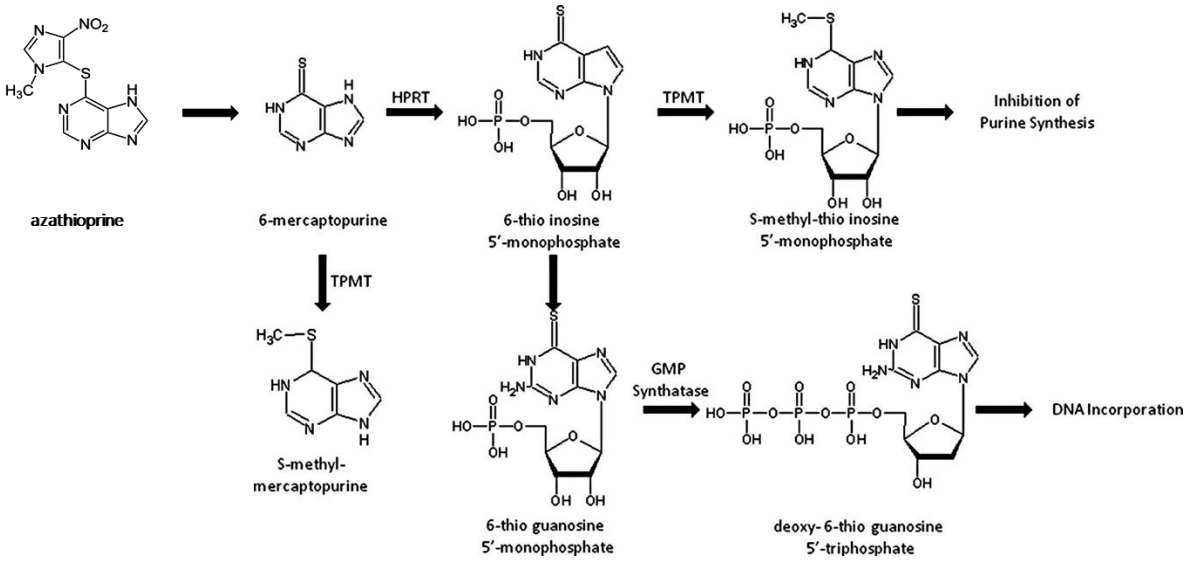


Figure 8. Métabolisme de la thiopurine et azathioprine [139].
L'azathioprine est une molécule dérivée de la 6-mercaptopurine (6-MP). La 6-MP est rapidement dégradée par thiopurine-S-méthyltransférase (TPMT). D'autre part, la 6-MP est également métabolisée par l'hypoxanthine- guanine phosphoribosyltransférase en un composé qui est activé cette fois-ci par la TPMT, et est responsable de l'activité inhibitrice de la synthèse des purines. L'autre activité pharmacologique des analogues des bases puriques est causée par leur incorporation dans l'ADN, après activation par une GMP synthase.

2 BIOMARQUEURS PHARMACOGÉNÉTIQUES CONSTITUTIONNELS

2.(1) Le statut Thiopurine-S-méthyltransférase TPMT

La thiopurine-S-méthyl-transférase (TMPT) est l'enzyme responsable de la dégradation des thiopurines, traitements utilisés dans la prise en charge des LAL, maladies auto-immunes et greffes d'organes (**Figure 8**, [134–139]). Malgré des profils d'efficacité et de tolérance jugés acceptables, le traitement par thiopurines doit être interrompu chez 10 à 30% des patients, et 1 à 5% des patients présentent des cas de myélosuppression mortelle [140].

De nombreuses études ont pu associer la survenue de ces effets indésirables à une diminution de l'activité TPMT. En effet, l'activité de la TPMT a été identifiée comme un facteur prédictif de l'efficacité et de la toxicité d'un traitement par thiopurines [44,140], avec une augmentation du risque de toxicités par myélosuppression mais également de l'efficacité par surexposition aux nucléotides guanines actifs chez les patients traités à dose standard présentant un profil PM pour la TPMT [141,142]. De plus, ces patients ont également un plus grand risque de développer des cancers secondaires. Cependant, la conduite à tenir pour ces patients quant à la dose à administrer reste encore inconnue [9].

La variation d'activité de la TPMT peut être partiellement expliquée par une variabilité génétique. En effet, le gène *TPMT* fait l'objet d'un polymorphisme génétique, incluant quelques variations non-synonymes (p. ex. **2* et **3*, [143,144]), mais également des variants d'épissage. A l'heure actuelle, il existe un consensus évident selon lequel le génotype *TMPT* du patient est un facteur prédictif de la concentration en nucléotides mais aussi de la réponse et de tolérance au traitement [145,146]. Le génotypage préventif de la *TMPT* chez les patients éligibles à un traitement par analogues puriques est d'un intérêt médico-économique reconnu [147] et des recommandations d'ajustement de posologie ont été émises [148]. Cependant, les polymorphismes génétiques touchant la *TPMT* n'expliquent pas la survenue de tous les effets indésirables sous thiopurines et il demeure des cas de toxicités ayant mis en jeu le pronostic vital non expliqués [134]. Récemment, certaines toxicités sous mercaptopurine ou azathioprine ont pu être attribuées à la présence d'un polymorphisme additionnel sur le gène *NUDT15* (*Nudix (Nucleoside diphosphate linked moiety X)-Type Motif 15* [149,150]), qui code pour une protéine dont le rôle est d'hydrolyser certains nucléotides diphosphates [100]. Ainsi, un score génétique de risque a pu être défini : il prend en compte le nombre d'allèles variants des deux gènes *TMPT* et *NUDT15* présents chez l'individu [150]. Ce score varie de 0 (patients WT pour les deux gènes) à 2 (hétérozygotes pour les deux *loci* ou homozygote pour l'un des deux gènes), le score de 1 étant attribué aux patients hétérozygotes pour l'un des deux gènes [150].

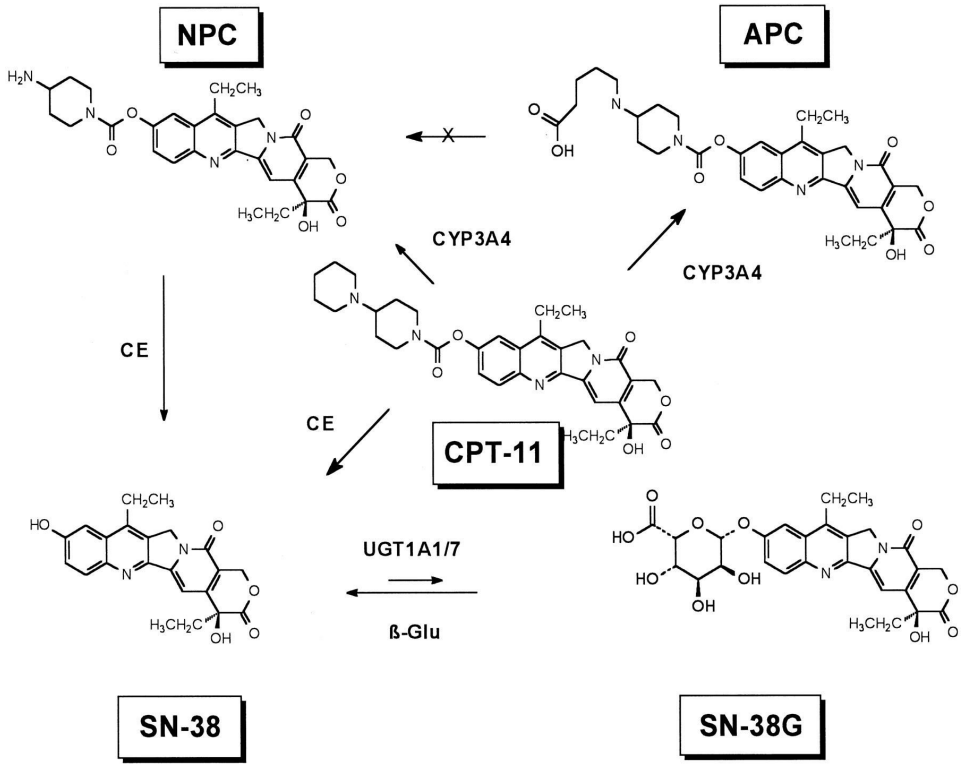


Figure 9. Métabolisme de l'irinotécan [152].
L'irinotécan (CPT-11) subit une hydrolyse de la part de la carboxylestérase (CE) pour obtenir le métabolite actif, SN-38. La détoxification du SN-38 se fait par l'UGT1A isoformes 1 et 7. L'irinotécan peut aussi être métabolisé par le CYP3A4 pour obtenir deux autres composés différents.

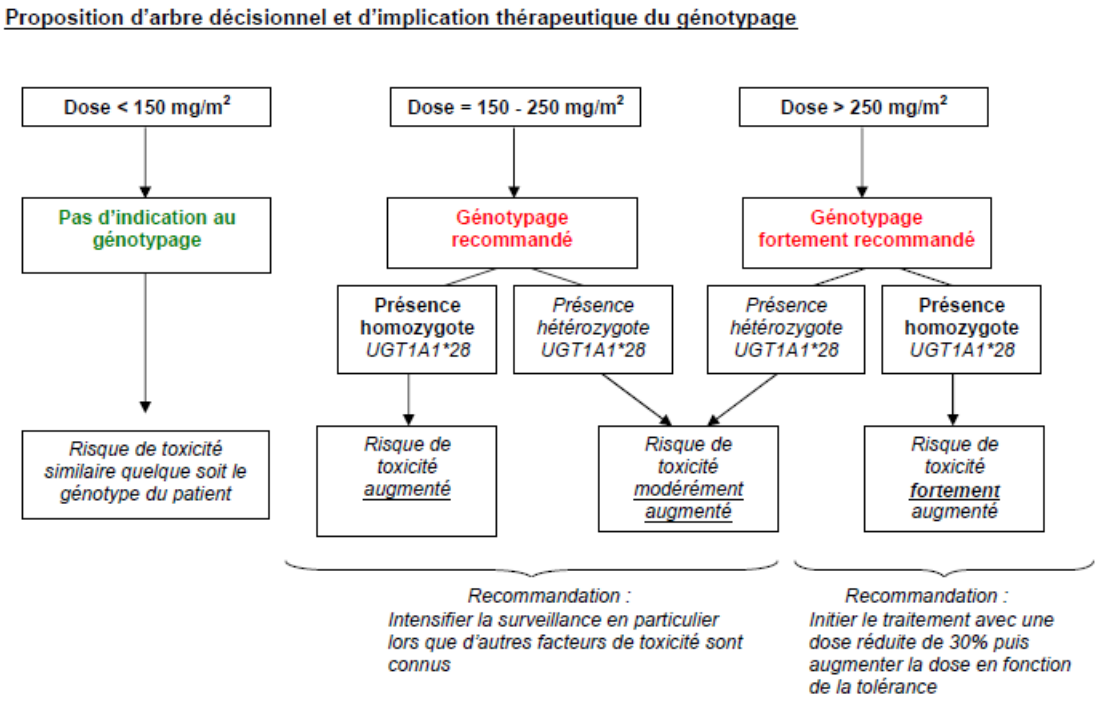


Figure 10. Organigramme décisionnel de la stratégie de typage de l'UGT1A1 à suivre selon la dose d'irinotécan.
*Organigramme décisionnel proposé par le Réseau hospitalier de Pharmacogénétique. La stratégie de typage à suivre diffère selon les doses d'irinotécan. Ainsi, lorsque la dose d'irinotécan utilisée chez le patient est inférieure à 150 mg/m², le génotype UGT1A1 n'influence pas la survenue de toxicités. En revanche, pour des doses supérieures à 250 mg/m², le génotypage de l'enzyme est fortement recommandé, puisque la présence du polymorphisme UGT1A1*28 augmente fortement le risque de toxicités sous irinotécan. Pour les doses intermédiaires comprises entre 150 et 250 mg/m², le risque est augmenté de façon plus ou moins modérée : ainsi le génotypage est également recommandé.*

2.(2) Le statut UDP-glucuronosyltransférase 1A1 UGT1A1

Enzyme de phase II du métabolisme, l'UDP-glucuronosyltransférase isoforme 1A1 (UGT1A1) est responsable de la glucuronidation de substrats endogènes et exogènes, notamment la bilirubine [151]. Elle est également responsable de la dégradation du SN-38, métabolite actif obtenu après clivage par les carboxylestérases de l'irinotécan, un cytotoxique majeur en oncologie digestive (**Figure 9,** [152]). Le gène codant pour la protéine, *UGT1A1*, connaît un polymorphisme génétique, notamment dans la région promotrice du gène, induisant une variabilité de la transcription de celui-ci. En particulier, il existe un variant causé par la modification du motif TATA box, passant de 6 à 7 répétitions de la séquence TA, conduisant à la production d'une protéine modifiée dont l'expression et l'activité globale sont diminuées [153], notamment par une diminution de 70% de l'activité transcriptionnelle [154–156]. La présence de ce variant, noté *UGT1A1*28* (rs8175347), retrouvé chez 30% des patients caucasiens [157,158], est connue au sein de la communauté médicale puisque cet allèle est aussi à l'origine du syndrome de Gilbert, caractérisé par une hyper-bilirubinémie [158].

Dans le cadre d'un traitement par irinotécan en oncologie digestive, l'exposition au SN-38 est l'un des facteurs prédictifs de l'efficacité du traitement mais aussi de l'apparition de toxicités, de types neutropénie et toxicités digestives. La diminution de l'activité de l'UGT1A1 chez les patients portant l'allèle *UGT1A1*28* conduit à une augmentation de l'exposition par diminution de la clairance du SN-38 et donc à un risque accru de toxicités [159–161]. Cet effet semble particulièrement prononcé chez les patients recevant des protocoles d'irinotécan à hautes doses (**Figure 10**). L'influence du génotype *UGT1A*28* sur l'efficacité du traitement est moins établie, et plusieurs méta-analyses n'ont pas détecté d'association significative [162,163] suggérant qu'une diminution de la dose pourrait significativement limiter les toxicités sans altérer l'efficacité du traitement. Des études d'escalade de doses [164–166] ont d'ailleurs servi de support à de nouvelles études prospectives dont le but est de démontrer le maintien de l'efficacité de l'irinotécan chez les patients au génotype **28/*28* ayant reçu une dose diminuée. En attendant la fin de ces études, le génotypage de l'*UGT1A1* n'est pas recommandé en pratique clinique de routine [80] malgré l'existence d'un test validé par la FDA. Les patients testés sont généralement ceux qui ont déclaré des toxicités à une thérapie antérieure, et où une diminution de posologie est recommandée.

2.(3) Le statut Dihydropyrimidine déhydrogénase DPD

La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), codée par la *DPYD*, est l'enzyme majeure responsable de la dégradation du 5-FU puisqu'elle catabolise 80% de la fluoropyrimidine

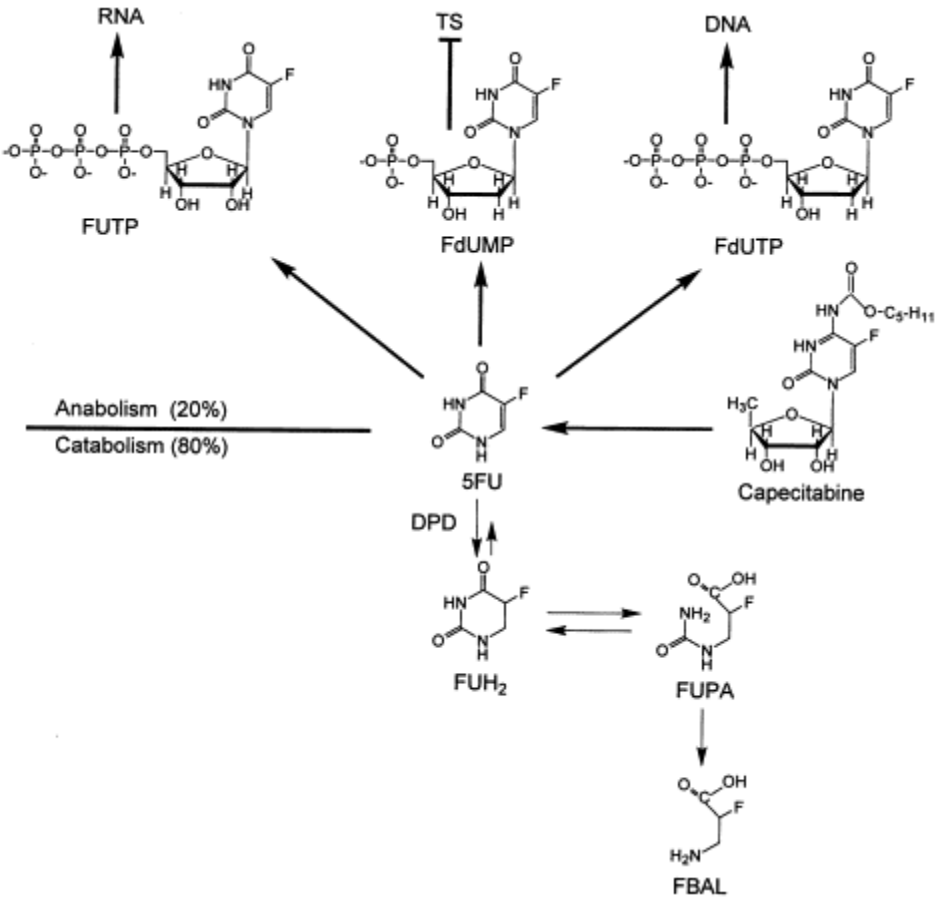


Figure 11. Métabolisme de la capécitabine et du 5-FU [171].
Après administration orale, la capécitabine est transformée en 5-FU au niveau tumoral. Le 5-FU peut suivre deux voies métaboliques : la principale (80%) est le catabolisme du 5-FU par la DPD en FUH_2, inactif. La seconde voie, est une voie d'anabolisme, qui conduira à la formation des métabolites actifs, responsables des différentes activités pharmacologiques.

[167,168]. Les niveaux d'activité de la DPD peuvent grandement varier entre les individus : ainsi 3 à 5% de la population sont partiellement déficients, et 0.2% ont une déficience sévère en DPD [169,170]. De par son rôle dans le métabolisme du 5-FU, la DPD apparaît désormais comme un biomarqueur prédictif de l'apparition des toxicités sous fluoropyrimidine (**Figure 11,** [171]). En effet, les patients avec une activité DPD réduite sont susceptibles de déclarer des toxicités sévères par surexposition au 5-FU [172–174].

Outre le rôle activateur des facteurs de transcription SP1 et SP3, cette variabilité phénotypique s'explique, en partie, par l'existence de plus de 30 polymorphismes sur la *DPYD* conduisant à un phénotype de type PM [168,175]. L'association pharmacogénétique est difficile à étudier étant donné la faible fréquence allélique des variants. Notamment le variant d'épissage (*splicing*) *DPDYD*2A* (IV14+1G>A) a été associé à l'augmentation de risque de toxicités, en particulier digestives [176]. Fin 2014, ont été publiés les résultats d'une méta-analyse regroupant 7 études cliniques dont le but était d'étudier le rôle des polymorphismes génétiques de la *DPYD* sur l'incidence des toxicités chez 946 patients porteurs d'un CCR et traités par 5-FU [177]. Les différentes variations retrouvées (c.-à-d. IVS14+1G>A, c.464T>A, et c.2194G>A) ont toutes été associées à une augmentation de l'incidence des toxicités myélosuppressives mais également des événements gastro-intestinaux.

D'autre part, une étude pour mesurer l'impact d'une diminution de posologie de 5-FU ou de capécitabine (pro-drogue orale du 5-FU) a été réalisée chez les patients atteints de CCR [178]. Cet essai a recruté 1700 patients, et le variant *DPYD*2A* a été recherché. Les patients porteurs du polymorphisme avait une réduction de posologie de 50%, voire plus, selon le tableau clinique du patient. Les données de tolérance ont été comparées avec 45 contrôles *DYPD*2A* ayant reçu la dose protocolaire. Dix-sept patients étaient hétérozygotes pour ce variant. Chez ces patients, les toxicités de grade 3 ont été réduites de 68 à 15% entre le groupe n'ayant pas fait l'objet d'adaptation et le groupe de patients dont la dose a été adaptée. De même, le taux de mortalité est passé de 10 à 0% au sein de ces deux mêmes groupes. L'intérêt de cette étude résidait en particulier dans la mise en évidence d'une exposition comparable entre les patients déficients et les patients WT, supportant l'intérêt d'un guidage de posologie par génotypage pour les toxicités [178]. Cependant, et malgré ces données sur l'exposition et la toxicité, peu d'études se sont intéressées à l'effet d'une réduction de dose guidée par génotypage sur l'efficacité du traitement.

Il existe donc différentes limites à l'implémentation du typage *DPYD* en routine. Tout d'abord, la faible fréquence du variant *DPYD*2A* rend sa recherche non pertinente en clinique. Même s'il existe un test reconnu par la FDA pour détecter les variations génétiques de la *DPYD*, Theraguide 5-FU®, il ne couvre pas l'ensemble des variations, et est donc peu utilisé. Ensuite, différents protocoles d'administration du 5-FU, par voie intraveineuse ou orale (capécitabine), ont

été développés pour diminuer les toxicités liées au traitement standard et ont été utilisés avec succès. Ainsi, le caractère prédictif d'une déficience en DPD reste incertain [179,180], et en raison du peu d'information sur l'efficacité, le génotypage préventif de la *DPYD* n'est pas recommandé en pratique clinique de routine. À ce jour, la FDA a seulement émis des avertissements sur les résumés des caractéristiques de produit du 5-FU et de la capécitabine [13].

L'activité DPD peut également être déterminée à l'aide d'un phénotypage, qui consiste en une mesure directe de l'activité enzymatique. Plusieurs techniques sont actuellement utilisées, en routine ou bien dans le cadre de protocoles de recherche [181]. On retrouve en premier lieu la technique qui consiste à mesurer l'activité DPD à partir des cellules mononuclées de la circulation périphérique, bien que la DPD soit une enzyme hépatique. En effet, une forte corrélation entre l'activité hépatique et lymphocytaire de la DPD existe [182]. L'activité DPD peut être ainsi mesurée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MSMS), à partir de la thymine [183] ou du 5-FU [184] ou par radiochromatographie à partir du 5-FU radiomarqué [185–187]. L'activité DPD est finalement exprimée en fonction de la quantité de protéines dans l'échantillon mesurée. Il existe également un test permettant de mesurer la quantité de $^{13}CO2$ expirée à partir de l'ingestion d'une solution aqueuse de 2-^{13}C-uracile [188]. Cette dernière technique, bien que rapide et non invasive, ne possède pas une cinétique corrélée à la cinétique plasmatique de l'uracile radiomarqué, et nécessite un matériel particulier (spectroscopique infrarouge). Elle est donc très peu utilisée en routine. Enfin, il existe encore une troisième approche qui consiste en la détermination de la quantité d'uracile U, substrat naturel de la DPD, et de son métabolite le dihydrouracile UH_2, et/ou du ratio U/UH_2 ou UH_2/U, dans les urines ou le plasma [189–192]. Les patients déficients en DPD présentent des taux circulants d'U élevés tandis qu'UH_2 est présent en faible quantité. Cette méthode a démontré ses avantages, notamment par la bonne corrélation entre le ratio UH_2/U dans le plasma et les demi-vie, clairance et concentrations du 5-FU [193], mais également grâce à la simplicité du test et du matériel non spécifique requis pour son implémentation en routine [181]. Enfin, il faut préciser l'existence d'un rythme circadien dans l'activité de la DPD, ce qui complexifie l'interprétation des essais réalisés.

D'autres méthodes existent également, notamment celles qui consistent en l'administration d'une dose de charge d'uracile ou de 5-FU à partir d'une solution buvable [194,195], ou bien un test salivaire [196] ou également le suivi thérapeutique du 5-FU et de son métabolite [189,197]. Pour les deux méthodes utilisant une dose de charge, il n'existe pas encore de consensus sur la dose à administrer. De plus, administrer une dose de charge de 5-FU présente un risque de toxicité pour le patient [181].Enfin, on peut également suivre les concentrations circulantes en 5-FU lors

du traitement du patient, mais cette méthode ne permet pas de déterminer *a priori* les risques de toxicité du patient.

Contrairement à l'approche génétique, il existe deux essais cliniques qui ont testé l'efficacité d'un traitement par 5-FU après réduction des posologies guidée par une approche pharmacocinétique pour la première, et fonctionnelle pour la seconde [172,198]. En effet, la diminution des doses était guidée par les concentrations de 5-FU à l'équilibre dans l'étude de Gamelin *et al.* en 2008, et en fonction du statut DPD pour la seconde. Malgré des stratégies différentes, les deux études sont parvenues à des résultats similaires et ont conclu que l'ajustement individualisé des posologies de 5-FU permettait une réduction significative des toxicités sévères, tout en maintenant l'efficacité du traitement.

2.(4) Le statut Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6)

Le CYP2D6 représente 2 à 4% des cytochromes P450 exprimés au niveau hépatique [199]. Cette enzyme de phase I, dont le rôle est de rendre ses substrats hydrosolubles afin de faciliter leur élimination, est responsable du métabolisme de plus de 25% des xénobiotiques actuellement sur le marché, dont le tamoxifène (Novaldex®), traitement de référence dans la prise en charge des cancers du sein hormono-dépendants chez la femme non ménopausée [200]. Le tamoxifène, peu actif, nécessite une transformation enzymatique en endoxifène actif, médiée notamment par le CYP2D6. Or, cette enzyme est codée par le gène *CYP2D6*, hautement polymorphe et reconnu pour sa grande variabilité d'expression inter-individuelle [201,202]. Des centaines de variations génétiques ont été reportées sur ce gène, incluant SNP, CNV, délétions, et sont susceptibles de modifier l'activité enzymatique de la protéine.

L'activité CYP2D6 appréhendée par le génotype a été identifiée comme un biomarqueur prédictif potentiel de l'efficacité du tamoxifène chez les patientes ER+ en situation adjuvante [203]. Certains travaux ont montré que le génotype *CYP2D6* était prédictif de l'exposition en endoxifène [203–205], bien qu'une partie de la variabilité puisse être attribuée à d'autres facteurs génétiques ou clinique [206]. Notamment, la présence des polymorphismes *CYP2D6*3*, **4*, **5* et **6* a été associée à une diminution des taux d'endoxifène [202]. Une étude prospective a été réalisée dans le but de guider la dose à administrer au patient selon leur génotype *CYP2D6* afin d'atténuer les différences en termes d'exposition [207]. Ainsi, les patients aux profils IM ou PM recevaient 40 mg de tamoxifène par jour, alors que les individus EM en recevaient la dose standard de 20 mg/jour. Les concentrations résiduelles en endoxifène, significativement plus basses chez les IM et PM avant l'augmentation de posologie vers 40 mg/jour, ont augmenté de manière significative, permettant une exposition correcte pour les patientes IM, mais toujours insuffisantes chez les PM. L'essai a donc conclu que doubler la dose de tamoxifène chez les patients IM permettait une

normalisation significative des concentrations en endoxifène, et une augmentation significative mais non suffisante chez les PM. Bien que cette étude n'ait pas évalué l'efficacité ni le taux de rechute, d'autres études antérieures avaient montré que les patients avec des taux plus bas en endoxifène avaient de plus grande chance de récidiver, les PM étant le groupe présentant les plus mauvais taux de survie [208,209]. La relation entre l'exposition à l'endoxifène et la réponse au traitement n'est actuellement pas clairement établie, même s'il existe une évidence certaine qu'une meilleure exposition en endoxifène serait associée à une augmentation de l'efficacité [208] et de la toxicité du traitement [210].

Aujourd'hui, il demeure toujours une controverse sur l'utilité clinique du génotypage *CYP2D6* [211]. La discordance des résultats fournis jusqu'à l'heure s'explique notamment par l'impossibilité de reproduire les résultats dans de grandes études cliniques prospectives, notamment avec les essais BIG 1-98 et ATAC [212,213] dont le but était d'étudier l'influence du génotype sur l'issue clinique des patients. Ces deux études, dont les résultats plaidaient en défaveur d'un typage CYP2D6 en support à une thérapie par tamoxifène, ont été très largement contestées dans la sphère scientifique [214,215]. En effet, des critiques ont été soulevées suite à la mise en évidence d'un déséquilibre marqué du modèle de Hardy-Weinberg, théorie de génétique des populations qui affirme qu'il existe un équilibre des fréquences alléliques et génotypique au sein de la population. Ce déséquilibre a pu être expliqué par l'utilisation d'ADN tumoral et non germinal pour déterminer le génotype *CYP2D6* des patients étudiés. Or, des phénomènes de pertes d'hétérozygotie (*Loss of heterozygosity* LOH) ont été décrits sur la lignée tumorale [216], pouvant ainsi fausser les génotypes établis. Cependant, des résultats similaires ont été retrouvés dans une autre étude rétrospective incluant 731 femmes ménopausées [217]. Cette dernière étude a également déterminé le génotype à partir d'ADN tumoral, mais les génotypes susceptibles d'être affectés par une LOH avaient été exclus en amont. Ce troisième essai a conclu qu'aucune corrélation n'existait entre le phénotype CYP2D6 prédit par le génotype *CYP2D6* et la survie sans maladie.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'association entre le génotype et l'issue clinique n'est pas assez robuste pour une implémentation en pratique clinique de routine [80]. D'autres études prospectives sont nécessaires pour évaluer l'impact d'un ajustement de posologie chez les PM et IM sur les taux de récidive et permettre de définir l'utilité clinique d'un génotypage *CYP2D6*. A l'heure actuelle, l'ESMO (*European Society of Medical Oncology*) *et* le NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) ne recommandent pas le génotypage du *CYP2D6* en routine [213,215]. Le développement d'une forme orale d'endoxifène pourrait permettre de passer outre ces problèmes de pharmacogénétique [218].

3 Biomarqueurs non implémentés en routine

Il existe encore d'autres biomarqueurs pharmacogénétiques constitutionnels, dont la recherche n'est pas systématique car le niveau de preuve des études déjà réalisées ne permet pas d'établir un rationnel fort.

En ce qui concerne le cyclophosphamide, on retrouve notamment le *CYP2B6*, porteurs de nombreux polymorphismes, comme l'allèle *CYP2B6*6* associé à une diminution de la demi-vie plasmatique et une augmentation de la clairance du cyclophosphamide, le variant *CYP2B6*5*, ou bien encore la présence des substitutions g.-2320T>C, g.-750T>C et g.18492T>C sur le gène codant pour le CYP2B6 qui ont été associées à des leucopénies sévères [41,219]. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés dans des études ultérieures [220,221]. D'autres polymorphismes touchant également les cytochromes ont fait l'objet d'études d'association pharmacogénétique avec le cyclophosphamide, comme le *CYP2C19*2*, *CYP2B6*5* prédictifs de l'efficacité thérapeutique d'après les travaux de Tulsyan *et al.* [222], les variants *CYP3A4*1B/A5*1* corrélés à la pharmacocinétique [223], et les *CYP2C8*3 et CYP2C9*2* associés à la toxicité. La plupart de ces études a été réalisée de façon monocentrique, et nécessitent des réplications dans des études indépendantes pour être confirmée, ou bien n'a pas été confirmée dans les études qui ont suivi.

De même pour la famille des taxanes, les statuts des gènes codant pour les cytochromes CYP1B1 et CYP2C8 ont été associés à la réduction du risque de toxicités et/ou à l'efficacité du traitement [224–226] mais ces associations demeurent encore à confirmer.

D'autres biomarqueurs, d'origine somatique, ont été décrits comme prédictifs de la réponse clinique en termes d'efficacité mais ne sont pas utilisés dans le cadre d'une prise en charge de routine.

Parmi ces marqueurs, on retrouve la DPD intra-tumorale, dont l'activité est corrélée à l'efficacité du 5-FU au sein de la tumeur. En effet, l'expression intra-tumorale de la DPD est associée à une résistance à une thérapie à base de 5-FU dans la prise en charge des cancers du poumon, gastrique et CCR [227–230].

De même, l'augmentation de l'expression intra-tumorale des transporteurs nucléosidiques hENT1 (*Human equilibrative nucleoside transporter* 1) et hCNT (*Human concentrative nucleoside transporter*) 1 et 3, effecteurs actifs de la pénétration cellulaire de la gemcitabine, a été associée à une meilleure survie chez les patients traités par gemcitabine pour un adénocarcinome pancréatique [231]. Cependant, les résultats de cette étude rétrospective n'ont pas été reproduits dans des études ultérieures.

Concernant les biomarqueurs pharmacogénomiques constitutionnels, on retrouve le gène *TYMS*, codant pour la TS, dans l'apparition des toxicités sévères sous fluoropyrimidines. Son rôle a

été étudié, notamment récemment dans une méta-analyse comprenant également une revue systématique de la littérature [232]. Ces travaux ont permis de montrer que les polymorphismes *TYMS* 5′VNTR 2R/3R et *TYMS* 3′UTR 6bpins-del pouvaient être partiellement considérés comme facteur prédictifs indépendants des toxicités, et notamment que l'attribution d'un score chez les patients informant du nombre d'allèles mutés était un facteur prédictif des toxicités sous capécitabine.

ANALOGUES NUCLÉOSIDIQUES & CYTIDINE DÉAMINASE

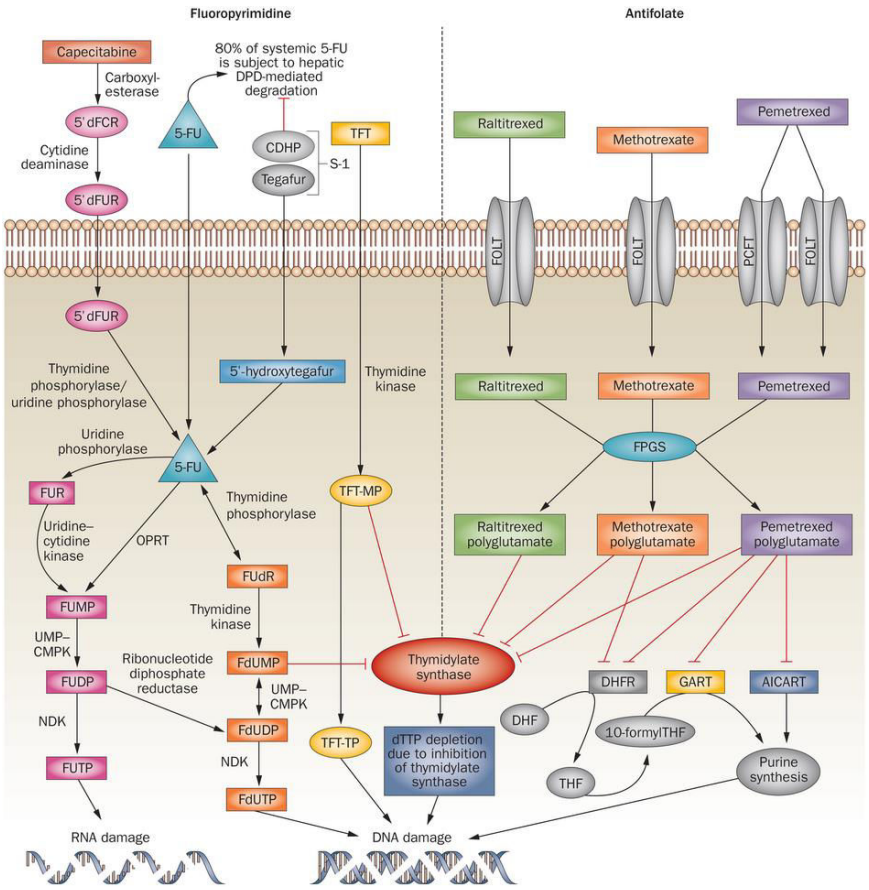


Figure 12. Vue d'ensemble du mécanisme d'action des analogues pyrimidiques et des anti-folates [234].
Les antimétabolites agissent par mimétisme des métabolites normalement retrouvés dans la cellule et nécessaires à la synthèse d'ADN et d'ARN. Les enzymes participant à la synthèse des acides nucléiques constituent leur cible principale.

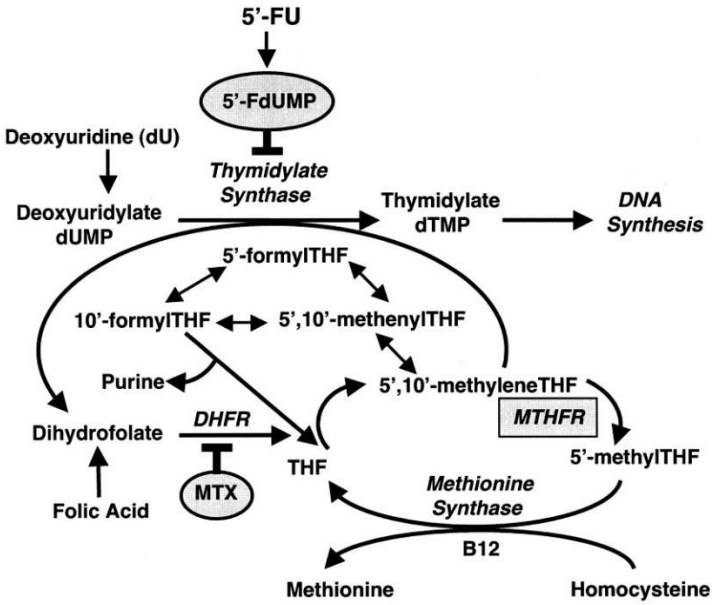


Figure 13. Mécanisme d'action du 5-FU et MTX [239].
Le 5-FU exerce son effet cytotoxique après métabolisation en FdUMP, en formant un complexe ternaire avec la TS et le 5,10-methyleneTHF, inhibant ainsi l'activité de la TS, conduisant à une pénurie de thymidylate intracellulaire et par conséquent à une inhibition de la synthèse de l'ADN. D'autre part, la production de 5,10-methyleneTHF est rendue possible par la réduction antérieure du DHF en THF par la DHFR. C'est cette dernière qui constitue la cible du MTX.

III LES ANALOGUES NUCLÉOSIDIQUES

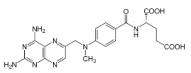
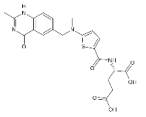
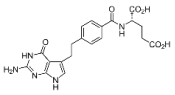
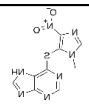
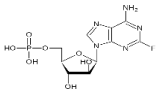
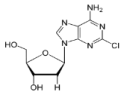
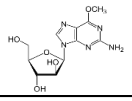
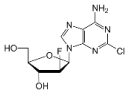
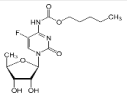
1 LA FAMILLE DES ANTIMÉTABOLITES

Les antimétabolites sont des agents cytotoxiques utilisés principalement dans le traitement des cancers. Ils constituent une famille de médicaments très largement utilisée, avec notamment le 5-FU et la gemcitabine qui sont les anticancéreux les plus prescrits au monde (1er et 3ème rangs respectivement, [233]). Bien que certaines molécules aient été développées dans les années 1950, les antimétabolites sont toujours utilisés aujourd'hui, et ce dans de nombreuses indications, allant des tumeurs solides jusqu'aux hémopathies malignes, aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant.

De façon générale, l'action des antimétabolites sur les cellules s'exerce durant la phase S de la mitose, en amont de la division cellulaire en interférant avec la synthèse d'ADN. Leur nom provient de leur capacité à substituer un composé qui fait partie du métabolisme normal. En, oncologie, ils ont la propriété d'inhiber la production des acides nucléiques nécessaires à la synthèse de l'ADN et ARN (acide ribonucléique), en s'y incorporant à la place des composés endogènes dont ils sont structurellement proches, entraînant ainsi la mort cellulaire par blocage de l'activité enzymatique de synthèse. Ils agissent donc par inhibition compétitive, en mimant les composés endogènes, jouant ainsi un rôle de leurre biochimique moléculaire (**Figure 12,** [234]**)**. De par leur mécanisme d'action, le pouvoir cytotoxique des antimétabolites est très largement dépendant des taux de métabolites naturels avec lesquels ils sont en compétition [156]. Dans le but d'augmenter leur efficacité, les antimétabolites peuvent être utilisés seuls ou en association, avec d'autres agents cytotoxiques, antimétabolites ou non (par exemple, méthotrexate et 6-mercaptopurine dans la prise en charge des LAL), ou bien avec des thérapies ciblées (par exemple, protocole FOLFOX : 5-FU/acide folinique/oxaliplatine et bevacizumab dans le traitement des CCR avancés ou métastatiques [235]). Il existe trois catégories de médicaments antimétabolites utilisés en oncologie (**Tableau 1**):

- les analogues des folates, qui ont une structure très proche de l'acide folique, ou vitamine B9, dont ils sont antagonistes, avec le méthotrexate (MTX, Méthotrexate®) comme chef de file. Il agit par inhibition de la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme responsable de la réduction du dihydrofolate (DHF) en tétrahydrofolate (THF), qui est un cofacteur essentiel de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques intervenant dans la structure des acides nucléiques de l'ADN et ARN.
- les analogues des bases puriques agissent par inhibition enzymatique de la voie de synthèse des purines, entraînant ainsi une diminution de leur incorporation dans l'ADN. Ils

Tableau 1. Familles, structures et cibles des agents anti-cancéreux appartenant à la classe des antimétabolites

Famille	DCI	Structure	Cible moléculaire	Spécialité
Antifolates	Méthotrexate		Dihydrofolate réductase (DHFR)	Méthotrexate, Ledertrexate
	Raltitrexed		Thymidylate synthase (TS)	Tomudex
	Pémétrexed		Glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT), DHFR, TS	Alimta
Antipurines	6-Mercaptopurine		Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase, amidophosphoribosyltransférase, adénylosuccinate synthase, IMP déshydrogenase	Purinéthol
	6-Thioguanine			Lanvis
	Azathioprine			Evoltra
	Fludarabine		Ribonucléotide Réductase (RR), ADN polymérase	Fludara
	Cladribine			Litak, Leustatine
	Nélarabine			Nipent
	Clofarabine			Atriance
Antipyrimidines	5-Fluorouracile		Thymidylate synthase (TS)	Fluorouracile
	Capécitabine			Xeloda
	Cytarabine		ADN polymérase	Aracytine, Dépocyte
	Gemcitabine		ADN polymérase	Gemzar
	Azacytidine		ADN méthyltransférase, ADN polymérase	Vidaza
	Décitabine		ADN méthyltransférase	Dacogen
Autres antimétabolites	Hydroxyurée		RR	Hydréa

- sont principalement utilisés dans le traitement des hémopathies malignes, avec la 6-MP (Purinéthol®) comme chef de file.
- les analogues des bases pyrimidiques, que nous développerons dans un paragraphe dédié.

Enfin, il existe également un quatrième groupe, qui compte les composés ne répondant pas aux définitions précédentes, dont l'hydroxyurée, qui est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase. Dans les paragraphes suivants, les caractéristiques des produits sont extraites des différentes bases officielles où sont détaillés les RCP : Haute Autorité de Santé (HAS), Vidal®, Dorosz® édition 2012, et l'EMA (*European Medicine Agency*).

2 LES ANALOGUES PYRIMIDIQUES

Les analogues pyrimidiques sont des prodrogues, et nécessitent une transformation intracellulaire pour être activés. Généralement, ils ont besoin d'être triphosphorylés afin d'être incorporés à la place des nucléotides dans la synthèse de l'ADN, après une première étape optionnelle de ribosylation. Leur structure se rapproche des bases pyrimidiques, cytidine et uridine pour les citer, et le chef de file est le 5-FU [236].

2.(1) Le 5-fluorouracile (Fluorouracile®)

Le 5-FU (5-fluoro-1H-pyrimidine-2,4-dione, 5-FU) a été découvert en 1957 par Heidelberger. Comme son nom l'indique, il est composé d'un uracile substitué d'un atome de fluor en position 5, et possède donc une réactivité chimique très différente du composé naturel, tout en conservant un volume stérique très proche. Ceci entraîne des perturbations métaboliques dans la biosynthèse de l'ADN et ARN.

Le 5-FU pénètre dans la cellule via un transport actif par SLC22A7 (*Solute carrier family* 22A7, [156]), pour y subir un important métabolisme intracellulaire. Il subit une première étape qui consiste à substituer l'hydrogène de l'azote 1 par un déoxyribose, permettant d'obtenir le 5-fluorouracil déoxyriboside (5-FUdR). Ce dernier est phosphorylé ensuite par la thymidine kinase en 5-fluoro-2-deoxyuridine monophosphate (5-FdUMP). Ce métabolite actif, en compétition avec le déoxyuridine monophopshate, dUMP, est responsable du principal mode d'action du 5-FU : il inhibe la TS en formant un complexe ternaire stable avec le cofacteur folate sous forme réduite THF [237], bloquant ainsi la croissance cellulaire (**Figure 13,** [238,239]). D'autre part, le FdUTP, forme triphosphorylée, peut introduire des cassures simple-brin dans l'ADN [240]. Pour ces raisons, le 5-FU est très souvent associé à de l'acide folinique, qui permet d'augmenter le pool de folates intracellulaires, stabilisant ainsi le complexe 5-FU-TS et augmentant l'activité du cytotoxique. D'autres métabolites sont également formés et sont capables d'inhiber la synthèse

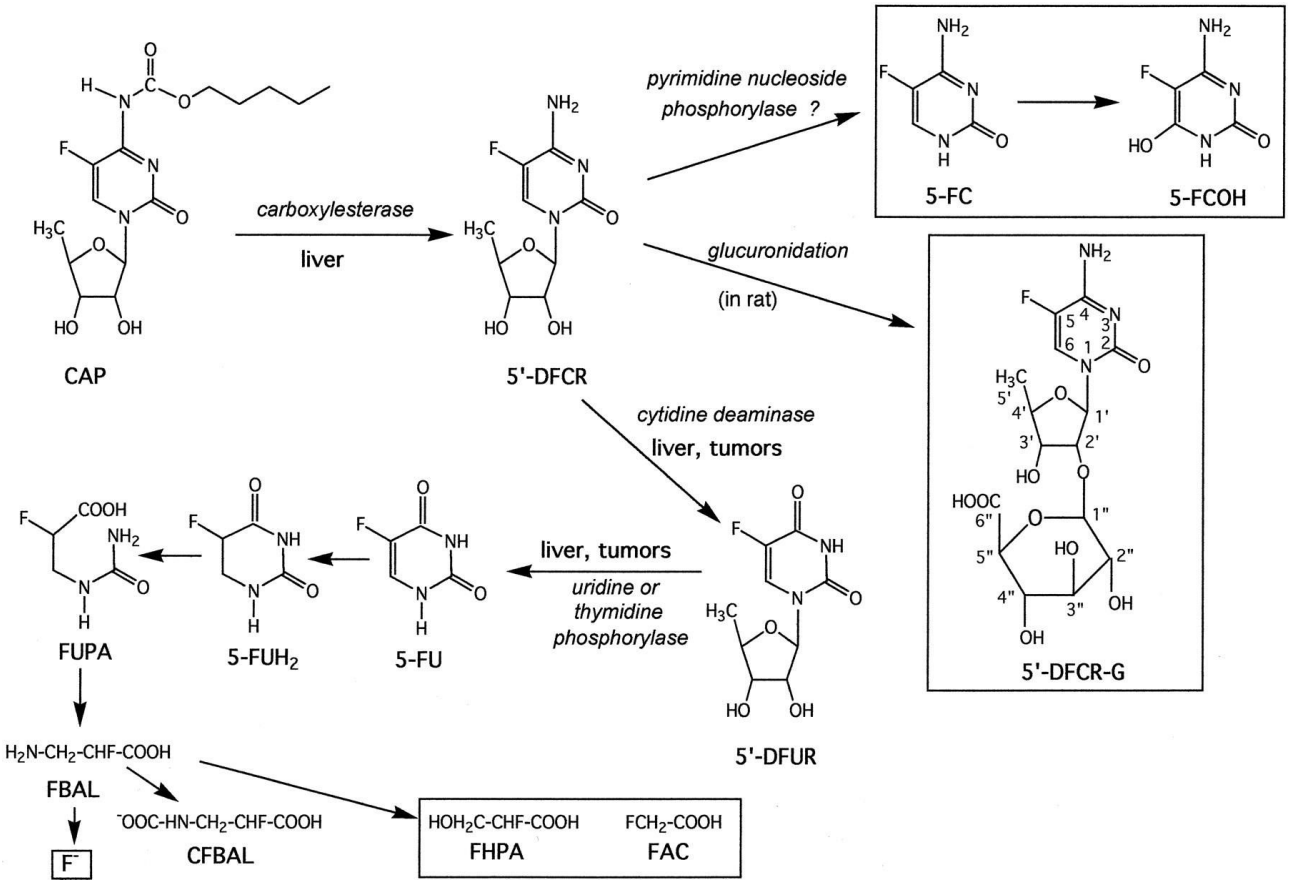


Figure 14. Métabolisme de la capécitabine [242].
Après ingestion, la capécitabine subit une réduction par la carboxylesterase, qui permet de couper la chaîne ester. Le 5'-dFCR obtenu est ensuite métabolisé au niveau tumoral et hépatique pour finalement obtenir le 5-FU, qui sera lui-même activé par la suite.

de l'ARN [241]. Notamment, le 5-FU peut être phosphorylé directement en FUMP, puis FUTP incorporé dans l'ARN et engendrer des erreurs de lecture du code génétique.

D'autre part, le 5-FU est catabolisé par l'enzyme DPD en dihydro-5-fluorouracile (FUH_2) beaucoup moins toxique (*cf paragraphe Partie I, Chapitre II, section 2.(3) Le statut de la DPD*). La dihydropyrimidinase clive le noyau pyrimidine pour donner l'acide 5-fluorouréidopropionique (FUPA). Finalement la β-uréidopropionase clive le FUPA en fluoro-β-alanine (FBAL) qui est éliminé dans l'urine. L'activité de la DPD constitue l'étape limitante.

En France, le 5-FU est administré par voie intraveineuse et est utilisé pour traiter un très grand nombre de pathologies malignes solides chez l'adulte, dont le cancer du sein, du pancréas, colorectal, de la sphère otorhinolaryngée (ORL), gastrique, le plus souvent en association avec d'autres cytotoxiques et /ou thérapies ciblées.

2.(2) La capécitabine (Xeloda®)

La capécitabine est un carbamate non cytotoxique des fluoropyrimidines et se comporte comme un précurseur oral du 5-FU, permettant la prise en charge en ambulatoire des patients traités. La capécitabine possède donc les mêmes propriétés pharmacodynamiques que le 5-FU.

Elle est d'abord métabolisée par la carboxylestérase hépatique en 5-FCdR qui est ensuite converti en 5-FUdR par la CDA, principalement localisée dans le foie et les tissus tumoraux. L'activation catalytique finale du 5'-FUdR en 5-FU se déroule ensuite sous l'action de la thymidine phosphorylase (TP). La biotransformation enzymatique séquentielle de la capécitabine en 5-FU présente l'intérêt d'obtenir des concentrations élevées dans les cellules tumorales préférentiellement (**Figure 14**, [242]).

La capécitabine est indiquée dans le traitement adjuvant du cancer du côlon, CCR métastatique, cancer gastrique avancé, cancer du sein localement avancé ou métastatique, après échec à une chimiothérapie cytotoxique.

2.(3) La gemcitabine (Gemzar®)

La gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine, dFdC) est le troisième analogue pyrimidique en termes de volume de prescription. Contrairement au 5-FU, la gemcitabine s'apparente à la cytidine, et possède déjà le déoxyribose. Par ailleurs, les deux atomes de fluor sont venus substituer les atomes d'hydrogène du déoxyribose.

Après pénétration dans la cellule par des transporteurs nucléosidiques actifs (hENT1 (codé par *SLC29A1*), hCNT3 (codé par *SLC28A3*), [231]), la gemcitabine va subir une série de phosphorylations par des nucléosides kinases pour obtenir les formes mono (dFdCMP), di

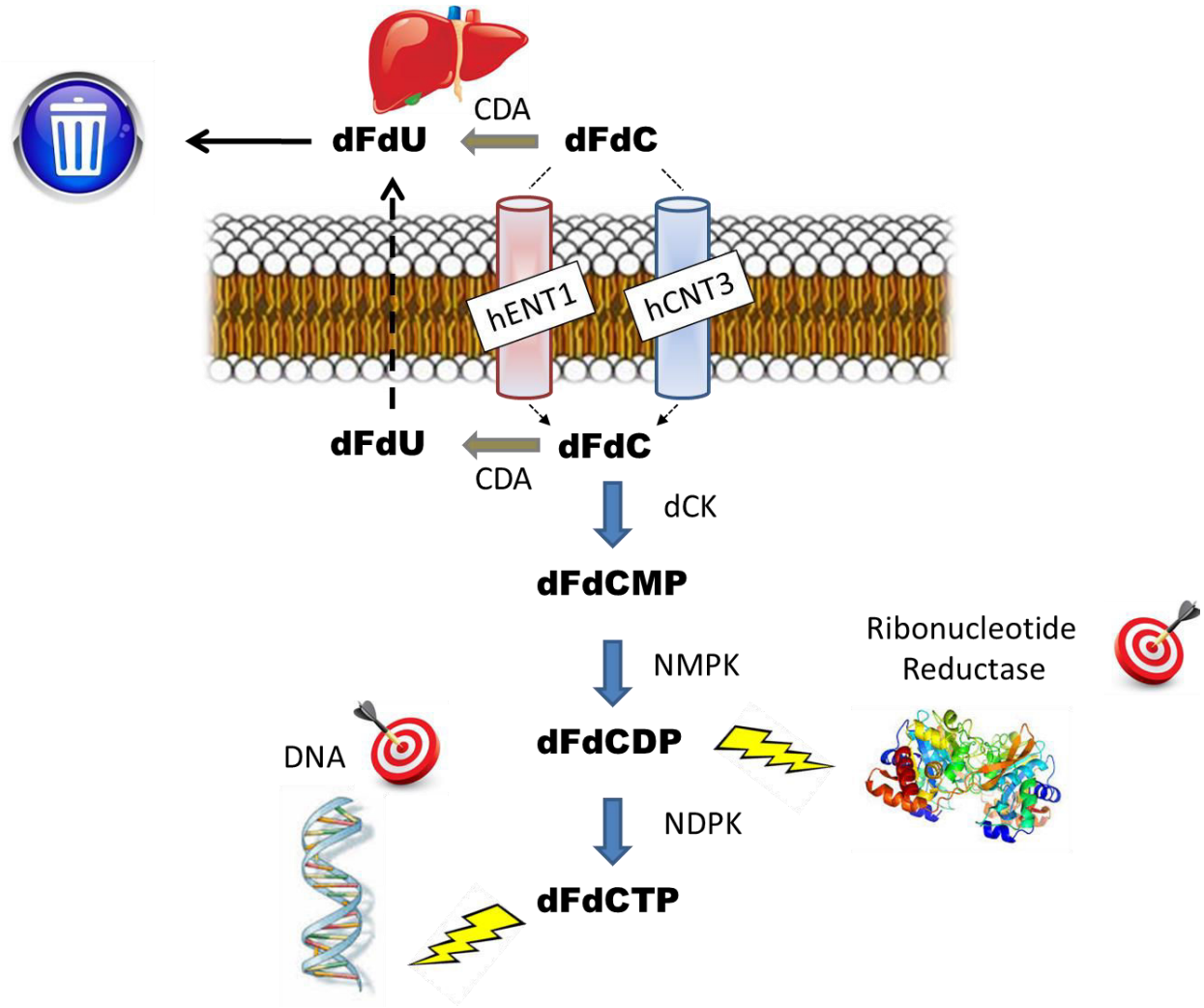


Figure 15. Transport, métabolisme et mécanisme d'action de la gemcitabine.
La gemcitabine pénètre à l'intérieur de la cellule via des transporteurs nucléosidiques. Après transformation, elle inhibe la dCMP déaminase, la thymidylate synthase et la ribonucléotide réductase, afin d'inhiber la synthèse d'ADN et d'ARN. D'autre part, la gemcitabine est métabolisée à 90% par la CDA.

(dFdCDP) et triphosphate (dFdCTP, **Figure 15** [243]). L'action cytotoxique de la gemcitabine est due à l'inhibition de la synthèse d'ADN par la double action du dFdCDP et du dFdCTP. D'abord, le dFdCDP inhibe la ribonucléotide réductase qui agit comme unique catalyseur des réactions qui produisent des déoxynucléosides triphosphorylés destinés à la synthèse de l'ADN. L'inhibition de cette enzyme par le dFdCDP entraîne une réduction des concentrations de déoxynucléosides en général, et du dCTP en particulier. En second lieu, le dFdCTP entre en compétition avec le dCTP pour son incorporation dans l'ADN (auto-potentialisation). Ainsi, la réduction de la concentration intracellulaire du dCTP potentialise l'incorporation du dFdCTP dans l'ADN. Après incorporation de la forme triphosphorylée de la gemcitabine dans l'ADN, un nucléotide supplémentaire s'ajoute aux chaînes d'ADN en cours d'élongation. À la suite de cette adjonction, on assiste essentiellement à une inhibition complète de la synthèse de l'ADN (terminaison de chaîne masquée), induisant l'apoptose de la cellule [243]. De la même manière, une faible quantité de gemcitabine peut aussi être incorporée dans l'ARN. Enfin, la gemcitabine est également rapidement métabolisée par la cytidine déaminase (CDA) en 2'-déoxy-2',2'-difluorouridine (dFdU), inactif, qui représente 90% de la quantité initiale de gemcitabine.

La gemcitabine est utilisée dans la prise en charge de cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules, cancers de l'ovaire, de la vessie, du pancréas, du sein, seule ou en association avec d'autres cytotoxiques [244–246].

2.(4) L'azacytidine (Vidaza®)

L'azacytidine (Vidaza®) possède un noyau triazolé et son ribose n'est pas substitué en fluor. Elle exerce son activité antinéoplasique par divers mécanismes sur les cellules hématopoïétiques anormales : l'azacytidine s'incorpore dans les chaînes d'acides nucléiques, inhibe la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines, et active divers mécanismes d'apoptose cellulaire. L'incorporation de l'azacytidine dans l'ADN entraîne une inactivation des méthyltransférases, conduisant à un effet épigénétique, par hypométhylation de l'ADN. Dans les cellules cancéreuses, les gènes impliqués dans la régulation, différenciation et mort cellulaires, sont souvent hyperméthylés, bloquant ainsi leur expression. L'hypométhylation permet de restaurer les fonctions suppressives initiales de ces gènes. Les cellules non-prolifératives sont relativement insensibles à l'azacytidine.

L'azacytidine subit une hydrolyse spontanée après pénétration dans les cellules à l'aide des transporteurs nucléosidiques, et une déamination par la CDA. L'azacytidine et ses métabolites sont éliminés par voie urinaire.

L'azacytidine est utilisée par voie sous-cutanée pour traiter les syndromes myélodysplasiques, la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), LMA, chez des patients non éligibles à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

2.(5) La cytarabine (Aracytine®)

La cytarabine, ou cytosine arabinoside ou ara-C, est un analogue structural de la déoxycytidine. La modification structurale de l'ara-C par rapport aux produits physiologiques ne se situe pas sur la base pyrimidique mais sur le ribose. Dans le ribose normal, les deux groupes OH sont en position cis, alors que dans l'ara-C, ils sont en position trans, ce qui gêne la rotation du noyau ribose par rapport à la cytosine. L'incorporation de l'ara-C dans l'ADN, après sa phosphorylation en dérivés mono, di et triphosphates, ara-CMP, ara-CDP et ara-CTP, perturbe la structure dimensionnelle et la réplication de l'ADN. À la toxicité habituelle des antinéoplasiques, atteintes hématologiques et digestives, il faut ajouter des troubles cérébelleux, nystagmus, dysarthrie et ataxie, qui se manifestent surtout à fortes doses pour les traitements à base de cytarabine.

La cytarabine est l'antimétabolite le plus utilisé dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes et lymphoblastiques. Elle est notamment indiquée par voie sous-cutanée dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques de l'adulte et de l'enfant, également en cas de rechute, des leucémies secondaires. La voie intrathécale est utilisée dans la prise en charge des localisations méningées des leucémies aigües. Enfin, la cytarabine peut être utilisée dans certains cas de lymphomes non hodgkiniens voire d'autres tumeurs solides.

3 TOXICITÉS CHIMIO-INDUITES DES ANALOGUES NUCLÉOSIDIQUES

Hormis le 5-FU et malgré un profil général de tolérance jugé acceptable, les analogues nucléosidiques sont responsables de nombreuses toxicités non spécifiques, qui atteignent de façon générale toutes les cellules en division rapide.

Parmi les toxicités retrouvées communément à la gemcitabine, capécitabine, cytarabine et azacytidine, nous retrouvons essentiellement les toxicités hématologiques, et les troubles digestifs de type nausées et vomissements. La fréquence de ces toxicités semble diminuer au fur et à mesure du traitement [247–249], même si la pratique a révélé des cas de thrombopénies cumulatives pour la gemcitabine.

Concernant la gemcitabine, la myélosuppression engendrée peut se manifester sous forme de neutropénie, thrombopénie, et d'anémie. Administrée en monothérapie, on estime que le gemcitabine entraîne 5 à 10 % de toxicités hématologiques sévères [39,250,251], jusqu'à 25% pour les neutropénies [248], et le risque de déclarer ce type de toxicités augmente lorsque la gemcitabine est utilisée en association avec d'autres agents cytotoxiques. Les autres toxicités de type non hématologiques fréquemment retrouvés chez les patients traités par gemcitabine sont des troubles d'ordre général, à titre de nausées/vomissement, asthénie, augmentation des

phosphatases alcalines, protéinurie, fièvre, hématurie, rash, dyspnée, et œdème périphérique. Des cas de toxicités pulmonaires, hépatiques et rénales ont également été reportés chez les patients utilisant la gemcitabine seule ou en association.

Les effets secondaires causés par l'azacytidine diffèrent légèrement selon la voie d'administration mais sont principalement retrouvées les toxicités hématologiques touchant les trois lignées cellulaires ainsi que des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, constipation, [252]). Les toxicités hématologiques sévères sont très fréquentes chez les patients traités par azacytidine (75 à 90%), en lien avec ses indications puisque l'azacytidine est utilisée dans la prise en charge des troubles hématologiques sévères chez les patients non éligibles à une greffe de cellules souches hématopoïétiques.

De même que pour l'azacytidine, la cytarabine possède un mode d'action visant à attaquer les cellules hématopoïétiques. Ainsi la toxicité majeure causée par cet agent anticancéreux est une myélosuppression, avec atteinte des lignées plaquettaire, leucocytaire et érythrocytaire [253], retrouvée chez 15 à 25% des patients [254]. La sévérité des effets toxiques hématologiques dépend de la dose ainsi que du protocole d'administration. D'autres toxicités, moins fréquentes, peuvent également se manifester, notamment des troubles digestifs (nausées/vomissements, diarrhées et douleurs abdominales, ulcérations buccales), ainsi que des troubles du système nerveux central chez 8 à 37% des patients [255].

La prise en charge des toxicités hématologiques repose sur différentes approches, consistant à rapidement revenir à un nombre de cellules hématopoïétiques permettant le maintien des fonctions vitales du patient, et d'autre part à protéger du risque de choc septique ainsi que des infections opportunistes qui pourraient se développer en l'absence d'un système immunitaire efficace. Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont ainsi largement utilisés dans la prise en charge de ce type de toxicités, diminuant le nombre de recours aux transfusions sanguines, et réduisant la morbi-mortalité associées au développement d'infections opportunistes [249,256].

Les toxicités, notamment hématologiques, causées par les analogues pyrimidiques, ont de lourdes conséquences pour le patient ainsi que pour la collectivité. À l'échelle du patient, la myélosuppression augmente le risque d'infections, de fatigue, affecte la qualité de vie du patient, et peut également diminuer sa survie [257]. Par exemple, les neutropénies peuvent amener le clinicien à réduire la posologie, ou encore à retarder la poursuite du traitement. Tout retard dans l'enchaînement des cures de chimiothérapie ou radio-chimiothérapie a un effet délétère en terme de survie. D'autre part, les toxicités hématologiques ont des conséquences sur le système immunitaire non négligeables. En effet, outre le risque infectieux important causé notamment par la diminution drastique des neutrophiles, l'atteinte du système immunitaire a également des conséquences néfastes chez le patient car on sait désormais que l'immunité participe activement

à la lutte contre le développement de la tumeur au sein de l'organisme. D'un point de vue plus large, les toxicités engendrées par les analogues nucléosidiques génèrent également un surcoût, notamment lié à la prise en charge de ces toxicités chez les patients. En effet, l'hospitalisation du patient, sa prise en charge de par du personnel compétent, sans oublier les coûts des traitements nécessaires à la prise en charge symptomatique du patient, génèrent des frais importants pour la collectivité.

Anticiper les toxicités causées par les analogues nucléosidiques constitue donc un défi important, que ce soit au niveau individuel et collectif.

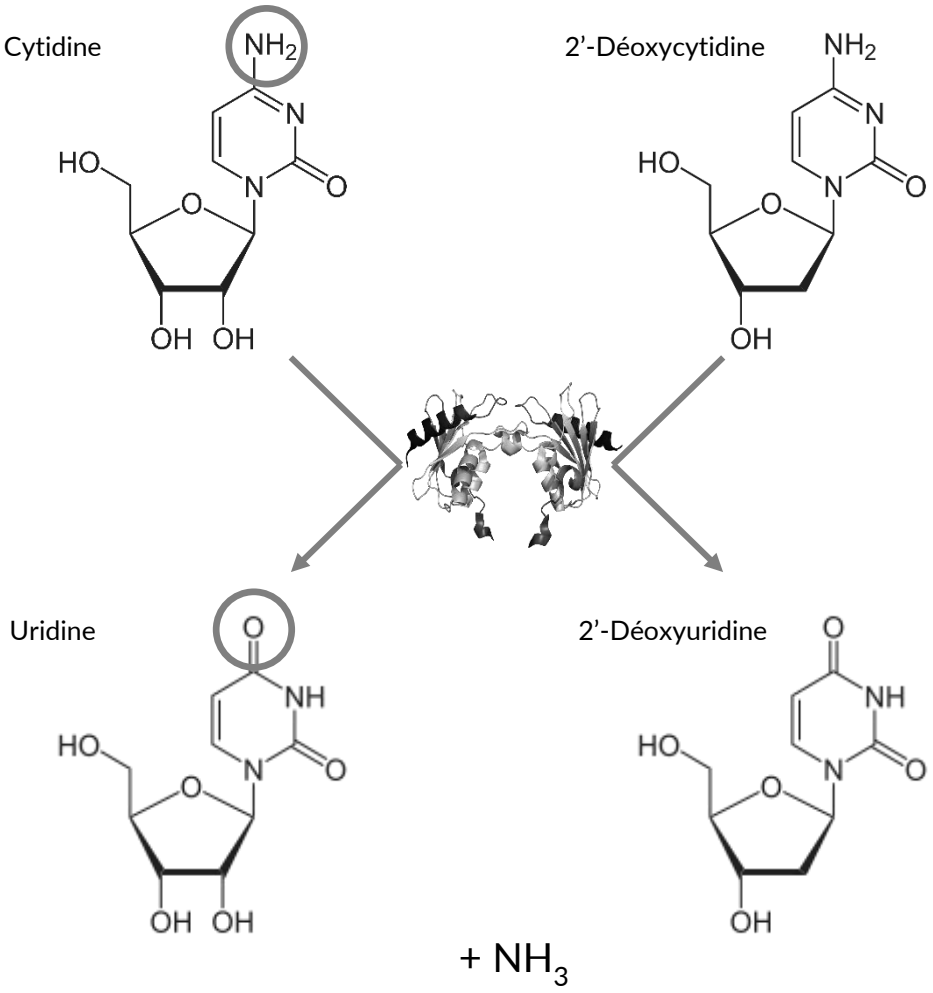


Figure 16. Transformation de la cytidine et déoxycytidine en uridine et déoxyuridine par la cytidine déaminase. *La cytidine déaminase ôte le groupement aminé situé sur le noyau pyrimidine et oxyde le noyau azolé. La réaction provoque le relargage d'ammonium.*

IV LA CYTIDINE DÉAMINASE

1 DÉFINITION

Les cytidine déaminases représentent une super-famille d'enzymes dont le rôle physiologique est de catalyser l'hydrolyse irréversible de la cytidine et déoxycytidine en uridine et déoxyuridine respectivement, par élimination du groupement amine (**Figure 16**). Il existe plusieurs enzymes réalisant cette catalyse chez l'Homme dont les plus connues sont celles appartenant à la famille APOBEC (*Apoliprotein-B mRNA editing enzyme*, *catalytic polypeptide-like*) et la CDA. Les APOBEC réalisent l'hydrolyse du substrat directement sur l'ADN simple brin ou l'ARN, alors que la CDA est une protéine qui catalyse la cytidine et déoxycytidine lorsque celles-ci sont sous forme libre, de mononucléotides ou de nucléosides [258]. C'est d'ailleurs cette dernière qui nous intéresse puisqu'elle a été identifiée comme enzyme responsable du métabolisme des analogues pyrimidiques.

1.(1) LA PROTÉINE CDA

1.1.(1) Structure

La CDA est une métalloprotéine constituée de 146 acides aminés [259,260], formée par 4 sous-unités identiques de 15 kDa [261–263], chacune contenant un atome de zinc nécessaire à leur activité [264].

La particularité structurelle de cette protéine réside dans le fait que le site actif d'un monomère est constitué par les acides aminés composant les autres sous-unités, et ce par un jeu complexe d'interactions [263]. Le site catalytique comporte plusieurs acides d'importance capitale. Tout d'abord, chaque sous-unité comporte 9 résidus cystéine [265], dont trois en position 65, 99 et 102 (C65, C99 et C102) d'importance majeure car participent à la coordination de l'action catalytique du zinc [263,265]. Il semblerait que le rôle de la cystéine en position 65 soit davantage de participer à l'activité catalytique que le maintien du zinc dans la poche catalytique, contrairement aux deux autres résidus cystéine. L'alanine, en position 66 (A66), établit les ponts hydrogène avec le ligand. En position 67, se trouve l'acide glutamique (E67) dont la chaîne latérale porte un groupement carboxylique essentiel pour établir le lien avec le ligand. En effet, sa position, dans le site catalytique, et son rôle sont fondamentaux pour apporter un proton au groupement aminé ôté ainsi qu'à l'azote N-3 du cycle pyrimidique. Lors de la réaction de déamination, le substrat est entamé en position C-4 par une molécule d'eau, formant ainsi un groupement hydroxyle qui interagit avec l'ion Zn^{2+}et le carboxylate, provenant de E67. En revanche, E67 ne

participe pas à la reconnaissance du substrat [265]. D'autres acides aminés semblent également tenir un rôle majeur, soit dans l'activité catalytique de la CDA, soit dans la liaison de la CDA avec son substrat. Ainsi, le résidu alanine en position 70 (A70) est proche du site catalytique, par opposition au résidu lysine en position 27 (L27, [263]). Ce même résidu en position 70 se trouve au milieu d'une hélice α, qui prend son origine dans le site catalytique. Lys27 est localisée sur une autre hélice α, séparée du site de liaison par un feuillet β.

Enfin, le groupement hydroxyle, manquant sur la déoxycytidine par rapport à la cytidine, n'est pas un élément nécessaire à la reconnaissance du substrat par la CDA puisque la cytidine et la déoxycytidine sont catalysées avec la même affinité [266,267].

1.1.(2) Expression et activité

Deux transcrits de la CDA ont été décrits (CDA-001, CDA-002 [268,269]) dont le second correspond à une protéine tronquée. Nous parlerons seulement du transcrit CDA-001 dans la suite de ces travaux. La CDA est ubiquitaire et exprimée à des niveaux variables dans les différents tissus de l'organisme. Alors que l'ARNm est retrouvé à des taux élevé dans le foie et le placenta, expliquant la forte activité retrouvée au niveau hépatique et splénique, une activité modérée est retrouvée dans les poumons et les reins, et nulle dans le cerveau, le cœur et les muscles [259]. D'autre part, la CDA est un marqueur de maturation des cellules myéloïdes (macrophages et polynucléaires neutrophiles) puisque son expression augmente avec la différenciation de ces cellules [270,271]. Enfin, les taux de CDA augmentent dans le sérum et le liquide synovial en présence de phénomènes inflammatoires, tels que l'arthrose par exemple, décrit par Kassimos *et al.* [272] et reporté par l'équipe de Micozzi [263], mais également observé en routine chez les patients suivis au sein de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM). Par ailleurs, historiquement, la CDA a été utilisée comme marqueur d'un syndrome inflammatoire chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [273,274], corroborant avec les observations en routine où nous avons remarqué que l'activité CDA était influencée par la concentration de protéine-C réactive (CRP). Même si, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée afin de connaître l'impact réel de la CRP sur l'activité CDA, l'équipe de Ciccolini a arbitrairement fixé la valeur-seuil de 20 mg/l, valeur au-dessus de laquelle la CRP est considérée comme élevée [13], et en-dessous de laquelle la CDA n'est pas influencée par la CRP.

Actuellement, l'activité CDA est mesurée selon deux approches principales *ex vivo* : la première, consiste en une mesure du ratio de métabolisation après action sur l'un de ses substrats en CLHP à partir de différentes matrices et dont les premiers essais ont été publiés en 1987 [274–276]. La seconde technique repose sur la mesure de l'ammonium libéré lors de l'incubation de sérum avec de la cytidine [36]. Ces deux méthodes ont notamment fait l'objet d'une étude de *cross-*

validation entre l'équipe de Peters et celle de Ciccolini, au cours de laquelle le compartiment sanguin le plus pertinent pour la mesure de l'activité CDA a été déterminé, ainsi que la méthode la plus rentable, en analysant la balance coût-efficacité [277]. Dans la suite de ce manuscrit, nous parlerons de l'activité CDA mesurée par la technique spectrophotométrique, utilisée en routine à l'AP-HM. Enfin, l'activité CDA est exprimée en fonction de la quantité de protéines sériques.

L'activité de la CDA connaît une grande variabilité. D'une part, à cause de sa différence d'expression dans les différents organes, et d'autre part, à cause de sa variabilité inter-individuelle. En effet, l'activité CDA peut varier entre les individus, allant d'une activité quasi-nulle (0,65 U/mg [36] jusqu'à des valeurs extrêmes : 27,8 U/mg [277] et même 40 U/mg [278]). L'équipe de Peters a retrouvé des activités moyenne et médiane de 9,91 et 7,9 U/mg respectivement chez le volontaire sain, alors que Ciccolini *et al.* ont retrouvé 3,6 et 3,2 U/mg comme activités moyenne et médiane chez le patient adulte, et 3,6 U/mg chez l'enfant. Cette variabilité de l'activité enzymatique de la CDA nous permet de distinguer trois profils dans la population générale. Outre les individus possédant une activité CDA normale comprise entre 2,5 et 4, des patients présentent une activité CDA très inférieure (i.e. 0,65 U/mg, PM) mettant en exergue une déficience en CDA. L'étude de Ciccolini *et al.* en 2010 a estimé à 7% la proportion de patients déficients au sein d'une population de patients traités par gemcitabine, seule ou en association pour divers types de cancers [36]. D'autre part, il existe également des individus chez lesquels une forte activité de la CDA a été observée, jusqu'à 20% des patients selon une étude de 2013 [279]. Enfin, l'âge et le sexe n'ont pas d'influence sur l'activité CDA [43,277], même si une étude menée par Mahfouz *et al.* a montré une différence significative de l'activité CDA entre les hommes et les femmes [276], certainement causée par un biais lors du regroupement des patients pour l'analyse statistique [43]. Concernant la variabilité intra-individuelle de la CDA, il n'existe pas de données publiées en faisant état. En revanche, l'expertise clinique acquise par les services de Marseille révèle que la mesure répétée de l'activité CDA chez les patients sur de longues périodes de temps est stable. Cependant, ceci ne semble plus vrai lorsque les patients sont traités dans le cadre de cancers hématologiques, pour lesquels une diminution franche de l'activité CDA est observée au fur et à mesure des cures, sans qu'une explication ne soit pour le moment avancée.

Comme nous l'avons mentionné plus tôt, l'activité CDA est toujours exprimée en fonction de la quantité de protéines, l'intérêt étant de rendre compte de la qualité de l'échantillon au sein duquel la CDA est mesurée. En effet, depuis la mise en place en routine de l'utilisation du test spectrophotométrique, la mesure des protéines sériques a permis de s'affranchir de nombreux phénomènes pouvant moduler l'homogénéité de la matrice, comme par exemple des phénomènes d'hémolyse ou encore la présence de fibrine, et ainsi gêner l'interprétation des résultats de phénotypage. Il existe deux techniques spectrophotométriques très largement utilisées : la

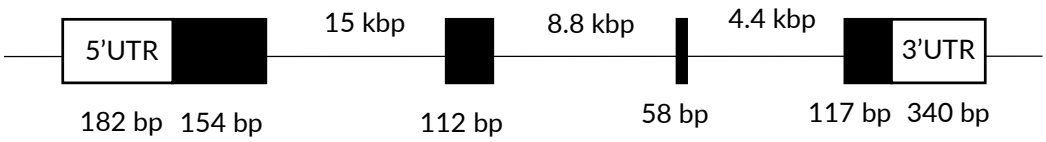


Figure 17. Structure générale du gène *CDA* [280].
Le gène CDA est composé de 4 exons (rectangles noirs). Les rectangles blancs sont des portions des exons codant pour des régions non traduites du gène

technique de Bradford et la technique de Pierce dont la lecture se fait par mesure de l'absorbance par spectrophotométrie aux longueurs d'onde de 595 et 562 nm, respectivement.

1.(2) La CDA : un gène très polymorphe

Le gène *CDA*, situé sur la première paire de chromosomes, est un petit gène d'environ 30 kilopaires de bases, comprenant 4 exons pour un transcrit de 963 paires de bases (pb) codant pour 146 acides aminés (**Figure 17**, [280]). La *CDA* compte 1095 variations génétiques, dont 28 somatiques, se répartissant depuis le promoteur du gène jusqu'à la séquence 3'UTR (*3'-UnTranslated Region*, [268]). Ces variations peuvent être des insertions/délétions, provoquant ainsi un décalage du cadre de lecture ou bien des substitutions, modifications d'une base ou d'un groupe de bases. Lorsque la variation génétique ne concerne qu'une seule base, on peut distinguer les *Single nucleotide variations* (SNV), par opposition aux SNP auxquels s'ajoute une notion de fréquence totalement arbitraire, précisant que l'allèle le moins représenté doit avoir une fréquence minimum de 1% dans la population générale. Ceci nous permet de définir la notion d'allèle : un gène peut être représenté par plusieurs versions ou allèles. Chaque individu compte deux allèles, identiques ou différents, pour chaque gène, un sur chacun des chromosomes formant une même paire (un hérité du père, l'autre de la mère). La notion d'allèle peut ainsi s'appliquer à un gène entier, ou simplement à un locus, qui ne constitue qu'une localisation précise du gène. Un SNP de substitution peut introduire des mutations *non-sens*, entraînant l'apparition d'un codon stop, ou *faux-sens*, conduisant au changement de la séquence protéique, des modifications de conformation, altérer des sites d'épissage etc… tandis qu'une délétion ou insertion va entraîner un décalage du cadre de lecture.

Plusieurs variations constitutionnelles de la *CDA* ont été étudiées jusqu'à ce jour, depuis la région 5'-FR (*flanking region*) contenant le promoteur du gène jusqu'à la partie 3'-UTR (*Untranslated region* [281], **Tableau 2**). Ainsi, jusqu'à 17 polymorphismes, 16 SNP et une insertion/délétion, et leurs effets ont été analysés. En particulier, certains polymorphismes ont été très largement étudiés car désignés comme importants, soit en termes de fréquence au sein de la population, ou bien par leur impact clinique potentiel. On retrouve notamment la délétion c.-33_-31delC (rs3215400), sur le promoteur de la *CDA*, qui augmente l'expression du gène [282], et les substitutions non-synonymes c.79A>C (rs2072671) sur l'exon 1, et c.208G>A (rs60369023) sur le deuxième exon. Tandis que les conséquences de la substitution c.208G>A sur l'activité enzymatique de la CDA sont évidentes et entraînent une déficience sévère en CDA, les modifications d'activité engendrées par la substitution sur l'exon 1 sont plus équivoques. D'autres variations génétiques ont également été décrites, tels que le SNP synonyme c.435C>T [281,283], des variations en amont du gène telles que les substitutions c.-1138G>A (rs12240109), c.-

Tableau 2. Polymorphismes génétiques de la *CDA* les plus étudiés dans la littérature.

DNA position	Identification Number	Type	Modification of codon	Modification of protein sequence	SIFT score	PolyPhen score	Tags (LD)	Tagged by (LD)	MAF 1000Genome Phase I populations	Anti-cancer agents	References
c.-1138A>G	rs12240109	Upstream gene variant, Regulatory gene variant							0.064	Ara-C	Fitzgerald et al. 2006
c.-451C>T	rs532545	Upstream gene variant, Regulatory gene variant		Perte d'ETS1 binding et gain d'un site LYF1			rs 602950 rs2072671 rs603412 rs66731853 rs588485		0.206	Gemcitabine, Ara-C	Mahlknecht U et al. 2009, Fitzgerald et al. 2006, Caronia et al. 2011
c.-205C>G	rs603412	Upstream gene variant, Regulatory gene variant					rs602950 rs2072671 rs66731853 rs588485	rs532545	0.268	Ara-C	Fitzgerald et al. 2006
c.-92A>G	rs602950	5' UTR variant, Regulatory gene variant		Gain d'un AP2A et AP2G sites			rs 2072671	rs532545 rs603412	0.208	Ara-C	Fitzgerald et al. 2006
c.-33_-31delC	rs3215400	5' UTR variant, Regulatory gene variant, Feature truncation		Increase of expression, in LD with rs532545					0.459	Gemcitabine	Caronia et al. 2011
c.79A>C	rs2072671	Missense variant, Regulatory region variant	AAG, CAG	Lys27Gln	0.35	0.01		rs532545 rs603412 rs602950		Gemcitabine, Ara-C	Ensembl
c.154+37G>A	rs12059454	Intron variant, Regulatory region variant							0.130	Gemcitabine	Raynal et al. 2010
c.208G>A	rs60369023	Missense variant, Regulatory region variant	GCT, ACT	Ala70Thr	0	0.963			0.002	Gemcitabine, Ara-C	Ensembl
c.435C>T	rs1048977	Synonymous	ACC, ACT	Thr145	NA	NA				Gemcitabine	Tanaka et al. 2010, Ensembl

Important consequences	Regulatory region variant	Synonymous variant	<0.05	>0.85	MAF=0.000 ou NA
	Exon variant	Non synonymous	>0.05	0.6<x<0.85	MAF≥0.16
				<0.6	0.001≤MAF<0.16

1075A>G, c.-897C>A (rs10916823), c.-451C>T (rs532545), c.-205C>G (rs603412), c.-92A>G (rs602950), ou encore des variations introniques comme la substitution c.154+37G>A (rs12059454, [280,281,284,285]).

Dans la prochaine section, nous allons discuter des différents travaux menés jusqu'à ce jour sur la CDA (protéine et/ou gène), en détaillant les relations qui ont été décrites entre les polymorphismes identifiés, leur conséquence sur l'activité CDA, sur la pharmacocinétique des médicaments métabolisés par la CDA, et les conséquences cliniques de ces variations génétiques ou enzymatiques.

2 Que sait-on de la CDA ?

Depuis l'identification de la CDA comme enzyme-clé du métabolisme des antimétabolites (ara-C [286,287], azacytidine [32], gemcitabine [31] et capécitabine [288]) et la mise en évidence d'une variabilité inter-individuelle inhérente de l'activité CDA [261], de nombreuses équipes de recherche se sont attachées à déterminer si son statut était corrélé à la réponse (efficacité/toxicité) aux agents anticancéreux cités précédemment. Ainsi, la variabilité du statut CDA, appréhendée par une approche fonctionnelle ou génétique, a été très largement étudiée depuis les années 1970 jusqu'à aujourd'hui.

2.(1) LA CDA TUMORALE

Très tôt, la CDA a été étudiée au niveau tumoral, où l'augmentation de son expression a pu être associée à l'acquisition d'un phénotype résistant par rapport à l'ara-C [289–292] et l'azacytidine [32] dans un premier temps, puis par rapport à la gemcitabine [289]. L'ara-C et l'azacytidine étant utilisées dans le traitement des leucémies, l'activité CDA a été comparée dans les cellules leucocytaires normales et cancéreuses. Deux études ont d'ailleurs permis de montrer que l'activité CDA était supérieure dans les cellules saines matures que dans les cellules cancéreuses immatures, supportant l'hypothèse que la CDA est un marqueur de maturation des leucocytes [270,271].

2.(2) LA CDA HÉPATIQUE

Outre le rôle de la CDA dans les leucémies résistantes au traitement, l'intérêt pour la CDA constitutionnelle n'est arrivé que plus tard, au début des années 1980, lorsque la CDA a été identifiée comme marqueur de grossesse anormale [278,293,294]. Ainsi, plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer l'activité enzymatique de la CDA à partir d'un échantillon sanguin. Historiquement, la première consistait en un test spectrophotométrique qui mesurait l'ammonium

libéré lors de l'incubation du sérum des patients avec de la cytidine [294]. Cette méthode a été réadaptée par notre groupe [36] tandis que d'autres équipes ont développé une méthode utilisant la CLHP à partir de différentes matrices : liquide synovial [295], plasma [274], sérum [296], ou encore culot érythrocytaire [275]. Récemment, une étude a été réalisée visant à déterminer quel compartiment sanguin et quelle technique (CLHP ou spectrophotométrie) était la plus simple et efficace pour mesurer l'activité CDA en routine chez des patients atteints de cancer [277].

L'activité enzymatique de la CDA a été associée au risque de toxicités sévères sous analogues pyrimidiques. Ainsi les différents phénotypes (PM, ou UM) ont été étudiés afin de comprendre si l'activité CDA pouvait avoir un rôle prédictif dans l'apparition des toxicités sous analogues nucléosidiques.

Le profil PM est celui qui a été le plus largement étudié, car c'est celui qui est susceptible d'être associé à une plus grande fréquence et sévérité des toxicités chez les patients par analogues pyrimidiques (excepté capécitabine). Le premier décès toxique sous gemcitabine associé à une déficience en CDA a été publié en 2007 par l'équipe de Ciccolini [297]. Ensuite, plusieurs études ont investigué l'influence d'une déficience enzymatique sur la pharmacocinétique des agents anticancéreux, notamment la gemcitabine, qui est la plus utilisée des analogues pyrimidiques métabolisés par la CDA [39,40,281,298,299]. Dans chacune de ces études, une déficience en CDA est systématiquement associée à une augmentation de la fréquence ou de la sévérité des toxicités. En 2010, notre groupe a réalisé une étude rétrospective sur 150 patients traités par gemcitabine, seule ou en association pour divers types de cancers solides. Environ 7% de patients étaient déficients. Concernant les autres analogues nucléosidiques, il existe peu de données publiées mettant en évidence une relation une déficience en CDA et l'apparition de toxicités, mis à part quelques cas sporadiques publiés [276,300,301]. Cependant, le laboratoire de Pharmacocinétique de la Faculté de Marseille, travaillant en étroite collaboration avec le service d'Onco-hématologie du Pr Costello (Hôpital La Conception, AP-HM, Marseille), certaines données cliniques out pu être recueillies auprès de patients traités par cytarabine dans le cadre d'une leucémie myéloïde aiguë ou d'un syndrome myélodysplasique [302]. Dans cette étude de 40 patients, une grande proportion d'individus déficients a été retrouvée (24%), comparativement au 7% dans l'étude détaillée précédemment [36]. La durée d'aplasie était significativement plus longue chez les PM que dans le reste de la cohorte, pendant les phases d'induction et de consolidation. De plus, les patients PM ont tous présenté des toxicités sévères, dont 3 décès toxiques. Outre une confirmation du rôle de la CDA dans l'apparition des toxicités sévères sous cytarabine, ces premières données semblent indiquer que le statut CDA pourrait être influencé par le type de cancers, avec une diminution possible dans les cancers hématologiques. Ces résultats méritent d'être confirmés dans de plus larges cohortes en situation prospective.

D'autre part, il existe également des individus chez lesquels une forte activité de la CDA a été observée [37,303] avec des conséquences différentes selon le traitement des patients. La première publication de 2009 traite d'un patient ayant déclaré des toxicités sévères sous capécitabine à faibles doses. Il semble que le profil UM du patient ait contribué à augmenter l'exposition au traitement de celui-ci par intensification de la conversion de capécitabine en 5-FU. Une étude réalisée en 2013 a permis d'objectiver 20% de patients UM [279]. Enfin, l'âge et le sexe n'ont pas d'influence sur l'activité CDA [43], même si une étude menée par Mahfouz et al. a montré une différence significative de l'activité CDA entre les hommes et les femmes [276], certainement causée par un biais lors du regroupement des patients pour l'analyse statistique [43].

Comme on le voit, un nombre croissant d'études, conduites par des groupes indépendants, tend à démontrer l'implication de la dérégulation en CDA sur une modification clinique (efficacité, toxicité) avec de nombreux analogues nucléosidiques. Cette grande variabilité fonctionnelle de la CDA est, au moins en partie, liée à la variabilité du gène. En effet, comme dit précédemment, la CDA est un gène qui compte de nombreuses variations génétiques et épigénétiques, notamment constitutionnelles. Ainsi, la présence de certains polymorphismes a pu être associée à une modulation de l'activité CDA, et finalement à des réponses inattendues chez le patient.

La variation génétique la plus largement étudiée de la CDA, de par les résultats contradictoires qu'elle engendre et sa fréquence, est le SNP c.79A>C. Ce polymorphisme, situé sur la première base du codon 27 sur l'exon 1 du gène, est non-synonyme : sa présence conduit à la modification de la séquence en acides aminés de la protéine. Ainsi, la lysine normalement présente en position 27 est substituée par une glutamine suite à la modification de l'adénine en cytidine : p.Lys27Gln (CDA27Q). Cette modification a fait l'objet de nombreuses études, au niveau moléculaire et clinique chez le patient.

Micozzi et ses collègues ont montré que la substitution est localisée sur une hélice α, séparée du site de liaison par un feuillet β [263]. L'hypothèse que la substitution intervienne à une position relativement éloignée du site catalytique est appuyée par les résultats de Micozzi [263] et Yue [291] qui montrent que la protéine inchangée et la CDA27Q présentent peu de différences d'activité catalytique avec les substrats naturels, bien que Carpi *et al.* qualifient la substitution c.79A>C comme conférant un gain d'activité avec la cytidine [304]. En revanche, lorsqu'on s'intéresse à la capacité de la CDA27Q à catalyser les analogues nucléosidiques par rapport à la protéine native, l'activité enzymatique de la protéine mutée est 10 fois supérieure pour l'ara-C [263]. Ces données suggèrent que les patients porteurs du polymorphisme ont une meilleure activité catabolique de la cytarabine que la protéine commune. Mais ces résultats sur le

Tableau 3. Etudes cliniques publiées éligibles pour la méta-analyse de Ding *et al.* [309]

Author	Ethnicity	Year	SNP	Cancer	Chemotherapy	No. of patients	Age	Male	OS	Response	PFS	Toxicity
Xu J (Xu et al., 2012)	Asian	2012	79A > C, 208G > A	Multiple cancer	GEM/GEM + platinum/GEM + docetaxel/GEM + other	50	58.4 ± 10.5, mean sd	46.0%	N/A	N/A	N/A	Neutropenia and 79A > C
Li L (Li et al., 2012)	Caucasian	2012	rs818194	NSCLC	GEM + platinum/GEM + paclitaxel/GEM + etopside/GEM + EGFR-TKI	394	61.9 ± 10.94, mean sd	54.6%	rs818194	N/A	N/A	N/A
Kasuya K (Kasuya et al., 2012)	Asian	2012	208G > A	Pancreatic cancer	GEM	48	68 (48–85)	62.5%	NA	NA	NA	NA
Erčulj N (Erculj et al., 2012)	Caucasian	2012	79A > C,208G > A,rs3215400	Malignant mesothelioma	GEM + platinum	107	62 (32–83)	75.7%	NA	NA	NA	Nausea/vomiting and 79A > C
Joerger M (Joerger et al., 2012b)	Caucasian	2012	79A > C	NSCLC	GEM + cisplatin/GEM + carboplatin	146	59.7 (37–79)	56.0%	NA	NA	NA	Leukopenia
Tibaldi C (Tibaldi et al., 2012)	Caucasian	2012	79A > C,435C > T	NSCLC	GEM + cisplatin/GEM + carboplatin	126	<63 (50.8%)	70.6%	79A > C, 435C > T	NA	79A > C, 435C > T†	NA
Farrell JJ (Farrell et al., 2012)	Caucasian	2012	79A > C	Pancreatic cancer	GEM	185	35–80, range	55.0%	NA	NA	NA	Hematological toxicity
Joerger M (Joerger et al., 2012a)	Caucasian	2012	79A > C	NSCLC	GEM + cisplatin	27	56, mean	N/A	N/A	N/A	N/A	NA
Rodriguez J (Rodriguez et al., 2011)	Caucasian	2011	79A > C	Colorectal cancer	GEM + oxaliplatin/GEM + irinotecan/GEM + fluoropyrimidines; cetuximab/bevacizumab	95	59 (35–77)	62.0%	79A > C	79A > C	79A > C†	NA
Tanaka M (Tanaka et al., 2010)	Caucasian	2010	79A > C,435C > T	Pancreatic cancer	GEM + cisplatin/GEM + oxaliplatin	149	62 (38–86)	60.4%	NA	79A > C	NA†	Neutropenia and 79A > C
Okazaki T (Okazaki et al., 2010)	Mixed	2010	79A > C,435C > T	Pancreatic cancer	GEM/GEM + cisplatin	154	63 (38–84)	62.3%	NA	NA	N/A	Neutropenia and 435C > T
Soo RA (Soo et al., 2009)	Asian	2009	79A > C,435C > T	NSCLC	GEM + carboplatin	53	59 (39–74)	68.0%	NA	435C > T	435C > T†	N/A
Tibaldi C (Tibaldi et al., 2008)	Caucasian	2008	79A > C	NSCLC	GEM + cisplatin	65	65 (44–77)	78.5%	79A > C	NA	79A > C†	Neutropenia

SNP: single nucleotide polymorphism; PFS: progression-free survival; OS: overall survival; NSCLC: non-small cell lung cancer; GEM: gemcitabine; NA: no significant association; N/A: not available.
† Time to progression.

variant CDA27Q diffèrent de ceux retrouvés chez Baker qui n'a pas mis en évidence de différence entre les deux versions de la protéine sur la déamination de l'ara-C, ni de la gemcitabine [305], bien que l'équipe de Gilbert ait trouvé une diminution modérée de l'activité vis-à-vis de la gemcitabine [281]. Enfin, CDA27Q est plus sensible à l'action de la THU (tétrahydrouridine) et, vis-à-vis la capacité de la CDA à catalyser l'aza-déoxycytidine et la 6-azacytidine, aucune différence d'activité n'a été retrouvée [305].

D'un point de vue clinique, c.79A>C est retrouvé chez les patients de types caucasien, africain, et asiatique à une fréquence de seulement 10% chez les individus africains, et jusqu'à 39% dans la population italienne (19% dans la base de Projet *1000 Genomes Phase I populations*, [281,304,306]). Tout comme l'étude de l'activité moléculaire de la CDA27Q a apporté des résultats discordants, les études qui ont investigué le rôle clinique du polymorphisme c.79A>C sont également assez divergentes. En 2012 et 2013, Joerger *et al.* d'une part, et Mahfouz ses collègues d'autre part, ont confirmé la diminution de l'activité enzymatique de la CDA chez les patients porteurs de l'allèle C [276,299,307], déjà observée par Gilbert *in vitro* [281], et ce malgré l'absence d'association significative entre le polymorphisme et l'activité CDA dans une étude antérieure de Ciccolini *et al.* [36]. En revanche, l'étude de Carpi *et al.* publiée en 2013 chez les volontaires sains associent la présence du polymorphisme à une augmentation de l'activité enzymatique sur la cytidine, tout comme l'étude de Tibaldi *et al.* en 2008 [39,304]. Un effet genre a été retrouvé dans l'étude de Mahfouz et suggéré par Carpi, mais les résultats ont été controversés et discutés pour Mahfouz et étaient non significatifs pour l'article de Carpi.

En ce qui concerne l'impact du polymorphisme sur l'impact clinique des patients traités par analogues nucléosidiques, deux méta-analyses ont été réalisées, se concentrant sur la gemcitabine et regroupant les principales investigations réalisées sur le sujet. La première, en 2014, visait à étudier l'impact réel de la présence du polymorphisme c.79A>C sur la réponse clinique des patients traités par gemcitabine [308]. La méta-analyse a regroupé 6 études pour un total de 623 patients. Il en ressort que les profils WT et hétérozygotes présentent moins de toxicités hématologiques que les patients au génotype C/C. En revanche, les autres types de toxicités ne semblent pas influencés par le génotype du patient, toujours d'après cette étude, et les taux de réponse sont identiques. Une autre méta-analyse, plus récente, a regroupé 13 études (**Tableau 3** [309],). Malgré un manque d'association avec la survie globale ou la réponse, le polymorphisme c.79A>C est également apparu comme prédictif de l'apparition de neutropénies sévères. Enfin, par rapport à la capécitabine, une étude récente a montré que les patients homozygotes mutés ou hétérozygotes présentaient moins de toxicités que les individus WT pour ce polymorphisme [310]. Ceci appuie donc la théorie selon laquelle le polymorphisme c.79A>C entraînerait une diminution de l'activité

CDA, conduisant à un défaut d'activation de la capécitabine en 5-FU, et donc à une protection vis-à-vis des toxicités.

L'ensemble de ces résultats reste contradictoire, certainement en raison du manque de stratification ethnique, ou bien thérapeutique des essais réalisés [304]. Cependant, il se dégage tout de même une tendance à associer la présence du polymorphisme c.79A>C à une diminution de l'activité enzymatique sur la gemcitabine, avec une augmentation du risque de toxicités hématologiques sévères dues à une surexposition à la gemcitabine. Enfin, aucun rôle pronostic de ce variant n'a pu être mis en évidence, notamment dans le cancer du poumon [311].

Un second polymorphisme a également fait l'objet de nombreuses recherches, notamment pour son fort potentiel prédictif de toxicités : il s'agit de la substitution c.208G>A, situé sur le deuxième exon de la CDA.

À l'échelle moléculaire, la substitution de la guanine par une adénine à la position 208 de la séquence codante, entraîne la modification d'une alanine par une thréonine au niveau du résidu 70 (p.A70T, CDA70T). Cette substitution intervient au milieu d'une hélice α, qui prend son origine dans le site catalytique, et qui comporte trois acides aminés essentiels : C65, A66 qui établit les ponts hydrogène avec le substrat, et E67 qui établit également le lien avec le ligand grâce à sa chaîne latérale, et qui est fondamental pour l'activité fondamentale [263]. Cette modification de la séquence protéique a plusieurs conséquences sur l'activité enzymatique ainsi que sur l'affinité de la CDA70T. L'étude de Baker *et al.* menée sur des protéines CDA recombinantes a montré que CDA70T présente une activité et une affinité altérées vis-à-vis de la cytarabine [305]. Ces résultats ont été en partie confirmés par l'équipe de Micozzi, qui a retrouvé une activité enzymatique de la CDA70T divisée par 100 par rapport à la CDA commune, mais n'a pas mis en évidence de modification de l'affinité de la CDA modifiée pour l'ara-C (Km inchangé [263]). Ces deux études permettent également d'appuyer les résultats qu'avaient obtenus Sugiyama et ses collègues où la protéine mutée avait une activité diminuée vis-à-vis de la gemcitabine [37,38].

D'un point de vue clinique, la substitution c.208G>A a été le premier polymorphisme de la CDA à être associé à une réduction de la clairance et une augmentation de l'exposition à la gemcitabine chez les patients japonais [37,38]. Dans une étude pharmacocinétique de population sur la gemcitabine en 2010, l'équipe de Sugiyama a montré que les patients homozygotes mutés et hétérozygotes présentaient une clairance diminuée de 64 et 17%, respectivement par rapport aux patients WT. La particularité de cet allèle est que l'homozygotie n'a été observée qu'une fois au sein de la population asiatique, et plus précisément chez un seul patient Japonais, et qu'il n'a jamais été retrouvé au sein de la population caucasienne [39,299,312,313]. Ainsi, malgré la tentative de Ding *et al.*, il n'existe aucune méta-analyse faisant un constat de l'activité de ce variant

et de ses conséquences cliniques chez les patients, de par le faible nombre d'études cliniques sur la CDA70T. Cependant, il existe un consensus clair autour de l'impact clinique de ce polymorphisme : l'allèle c.208G>A conduit à une diminution de l'activité de la CDA vis-à-vis de l'ara-C et de la gemcitabine, entraînant un fort risque de toxicités sévères chez le patient. Tout comme pour le variant c.79A>C, l'étude Zhou *et al.* en 2012 n'a pas retrouvé d'association entre la présence du polymorphisme de l'exon 2 et un risque de déclarer un cancer du poumon [314].

Il existe également un polymorphisme bien décrit portant sur le promoteur de la CDA : il s'agit de la délétion c.-33_-31delC, qui a plusieurs fois été corrélée à une augmentation de l'activité de la CDA [37,282,285]. Sugiyama a observé une augmentation de 7% de la clairance de la gemcitabine chez les patients porteurs de la délétion [37], et Caronia *et al*. ont associé la présence du polymorphisme à une multiplication par 6 de l'expression de l'ARNm chez des patients traités par capécitabine [282]. La conséquence de cette sur-expression s'est traduite par une augmentation de la fréquence des toxicités spécifiques à la capécitabine, à savoir le syndrome main-pieds. L'origine mécanistique de cette modification d'expression de la CDA portant la mutation pourrait provenir de la suppression d'un site de liaison pour le facteur de transcription E2F, qui avait initialement pour rôle de réduire la production de la CDA [282,285], comme suggéré par les études in silico réalisées dans cette même étude. L'augmentation de l'activité CDA par la présence de la délétion a également été retrouvée dans l'étude d'Abraham *et al*. chez les patients, mais aussi chez les volontaires sains [285]. Les travaux antérieurs menés par Gilbert *et al*. sur l'effet des variants situés sur le promoteur de la CDA sur la transcription avaient déjà montré l'augmentation de la transcription chez les haplotypes porteurs de la délétion [281]. Il existe cependant un cas où la délétion a été associée à un phénotype déficient [301]. Il s'agit du cas de patiente qui portait un double polymorphisme : elle était C/C pour la substitution c.-79A>C et -/- pour la délétion c.-33_-31delC. Seule une mesure fonctionnelle de l'activité CDA nous a permis de déterminer son phénotype déficient, en accord avec le tableau clinique qu'elle présentait.

Enfin, d'autres polymorphismes ainsi que leurs conséquences sur l'issue clinique des patients ont été décrits, mais peu étudiés. On retrouve des polymorphismes en amont du gène : c.-92A>G, c.-205C>G, c.-451C>T, c.-897C>A, c.-1075A>G et c.-1181G>A [281,284,285]. Les polymorphismes c.-92A>G, qui entraîne le gain d'un site de liaison à AP2A et AP2G (dinucléotides phosphatases), et c.-451C>T, qui conduit à la perte d'un site de liaison de ETS1 et le gain d'un site LYF1, sont en déséquilibre de liaison avec le polymorphisme c.79A>C [284,315]. Ainsi, ces deux polymorphismes liés ont été associés à une réduction de l'expression de la CDA et de son activité enzymatique, augmentant ainsi le risque de toxicités sous ara-C [284]. La substitution en position

c.-451 a également été identifiée comme marqueur de mauvais pronostique chez les patients traités par ara-C pour une leucémie myéloïde aigüe à caryotype normal [316]. La substitution c.-1075A>G conduit au gain d'un site NYK3, et le polymorphisme c.-1181G>A entraîne la perte d'un site FXR [284]. Une substitution synonyme a aussi fait l'objet de quelques études contradictoires: le polymorphisme c.435C>T sur l'exon 4 de la CDA [40,285,298]. D'autres variations génétiques, à type de répétition de séquence, avec le motif TCAT, semblerait induire l'augmentation de l'expression de la CDA [285]. Ces derniers polymorphismes que nous venons de voir ne disposent pas d'un niveau de preuve suffisant pour faire l'objet d'études de grande envergure. Certains sont trop peu fréquents, ou peuvent être étudiés par le biais d'autres polymorphismes, grâce au déséquilibre de liaison.

De l'ensemble de ces données, se dégagent différents constats. Le premier est que le statut UM n'a fait l'objet que de peu d'études. Celles qui ont déjà été réalisées se sont essentiellement concentrées sur la survenue de toxicités sous capécitabine. Mais le phénotype UM pourrait également se traduire par une perte de chance face à la maladie lorsque les patients sont traités par analogues pyrimidiques inactivés par la CDA. Ensuite, la plupart des études s'est concentrée sur la gemcitabine : il existe peu de données sur les conséquences cliniques d'une modification du statut CDA sur les traitements par analogues nucléosidiques autres que la gemcitabine. Enfin, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude ayant totalement investigué l'impact de la variabilité de la CDA, d'un point de vue génétique et phénotypique, sur la pharmacocinétique de ces agents anticancéreux, mais également sur l'issue clinique, en termes d'efficacité et de toxicités. Ce type d'études, réalisé dans une démarche prospective, permettrait de déterminer finalement le rôle prédictif ou non du statut CDA dans la réponse aux analogues pyrimidiques.

PARTIE B

TRAVAUX PERSONNELS

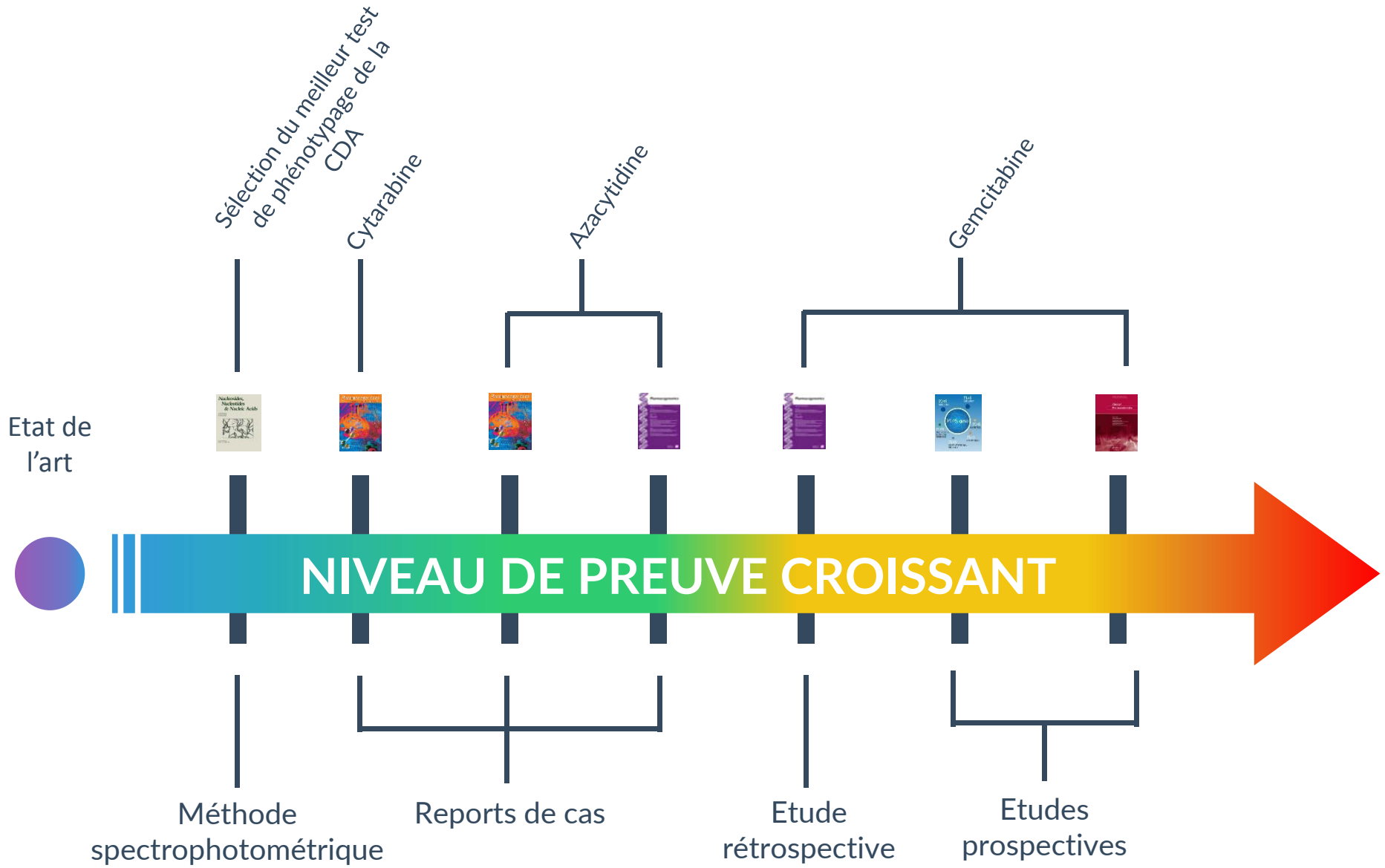


Figure 18. Vue d'ensemble des travaux effectués

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous nous proposons de présenter les résultats de nos travaux qui ont consisté à étudier l'influence du statut CDA sur l'efficacité et la toxicité des analogues pyrimidiques. À travers différentes études et divers cas cliniques, nous avons examiné dans quelle mesure le statut CDA est capable de moduler la réponse aux agents anticancéreux métabolisés par l'enzyme.

Dans un premier temps, nous avons comparé les deux techniques historiques qui consistent à mesurer l'activité CDA, en termes de robustesse, précision et fidélité, mais aussi sur le plan économique. Ensuite, nous abordons l'influence du statut CDA sur la survenue de toxicités, avec plusieurs cas cliniques chez des patients traités par analogues nucléosidiques. Dans un troisième temps, nous nous concentrons sur deux études de moyenne échelle qui ont plus précisément investigué l'influence du statut CDA sur l'issue clinique chez des patients traités par gemcitabine, avec notamment une étude pharmacocinétique de population. Et enfin, nous présentons les premiers travaux réalisés dans le cadre d'un projet de séquençage partiel de la CDA par l'utilisation d'une plateforme de séquençage haut-débit (**Figure 18**).

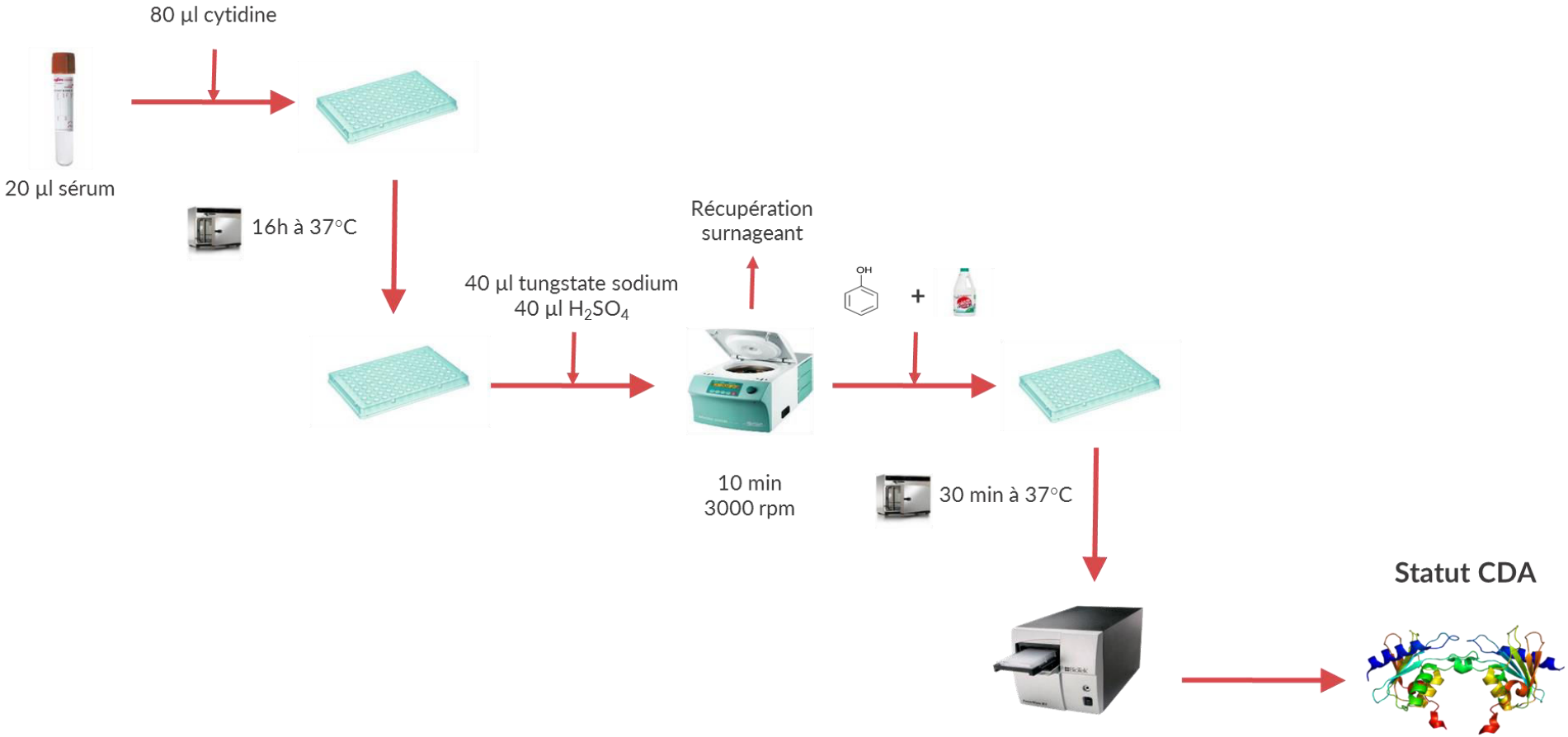


Figure 19. Principe du phénotypage de la CDA.
Après incubatin du sérum de patient avec de la cytidine pendant 16 heures à 37°C, les protéines de l'échantillon sont éliminées par précipitation. L'ammonium libéré lors de la transofrmation de la cytidine en uridine est ensuite couplé à du phénol et de l'hypoclhorite de sodium, avant d'être révélé par spectrophotométrie visible. La quantité d'ammonium libéré est comparée par rapport à une calibration, réalisée en parallèle.

I COMPARAISON DE DEUX APPROCHES PHÉNOTYPIQUES POUR L'ÉVALUATION DU STATUT CDA (Article I)

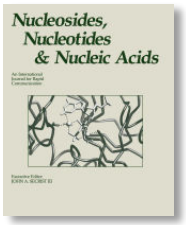
Les effets indésirables imputables aux analogues nucléosidiques dus à une modification de l'activité CDA semblent relativement fréquents et font encore l'objet d'investigations. Ainsi, les cliniciens recherchent un outil prédictif permettant de stratifier les patients dans le but d'optimiser leur chimiothérapie *via* une démarche adaptative. Jusqu'alors, de nombreux essais enzymatiques ont été développés pour déterminer l'activité CDA dans les différents compartiments sanguins, utilisant la CLHP ou la spectrophotométrie. Les avantages et les inconvénients de ces techniques ont très souvent été débattus dans la littérature, notamment en termes de reproductibilité et de prédictivité. Dans le but d'utiliser en routine un test robuste et fiable permettant de mesurer l'activité CDA, nous avons réalisé une étude de *cross-validation*, visant à déterminer quel compartiment cellulaire devrait être utilisé pour phénotyper la CDA, et quelle technique de dosage (CLHP *versus* spectrophotométrie) montrerait la plus grande fiabilité et un meilleur rapport coût-efficacité.

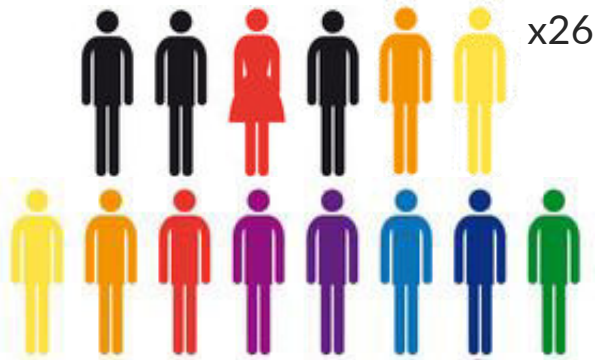
Pour réaliser cette étude, nous avons recueilli le sérum ainsi que le sang total de volontaires sains et de patients traités par gemcitabine, au département d'Oncologie Médicale du Centre Médical VU Université, à Amsterdam. Les prélèvements ont été divisés en trois aliquots : un aliquot de sang total sang dans un tube hépariné, d'où nous avons également isolé le plasma, et un aliquot pour le sérum issu d'un prélèvement sur tube sec. Le taux de protéines a été mesuré selon deux techniques différentes bien connues : la technique de Bradford, avec le kit Bio-Rad®, basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie lorsque celui-ci est fixé à des protéines ; et la méthode de Pierce (**Annexe 2**), qui repose sur la formation de complexes entre les ions cuivre et les liaisons peptidiques des protéines. Le phénotypage de la CDA par spectrophotométrie repose sur la mesure de la quantité d'ammonium formée lors de la conversion de la cytidine en uridine par la CDA (**Figure 19**, **Annexe 3**). La quantité d'ammonium formée est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde λ=625 nm. Le résultat est exprimé en pmol d'ammonium /h/mg de protéines. La mesure de l'activité CDA par CLHP repose sur la conversion de la gemcitabine en dFdU : c'est la formation de ce dernier qui est corrélée à l'activité de la CDA. Le résultat est exprimé en pmol de dFdU /h/mg de protéines.

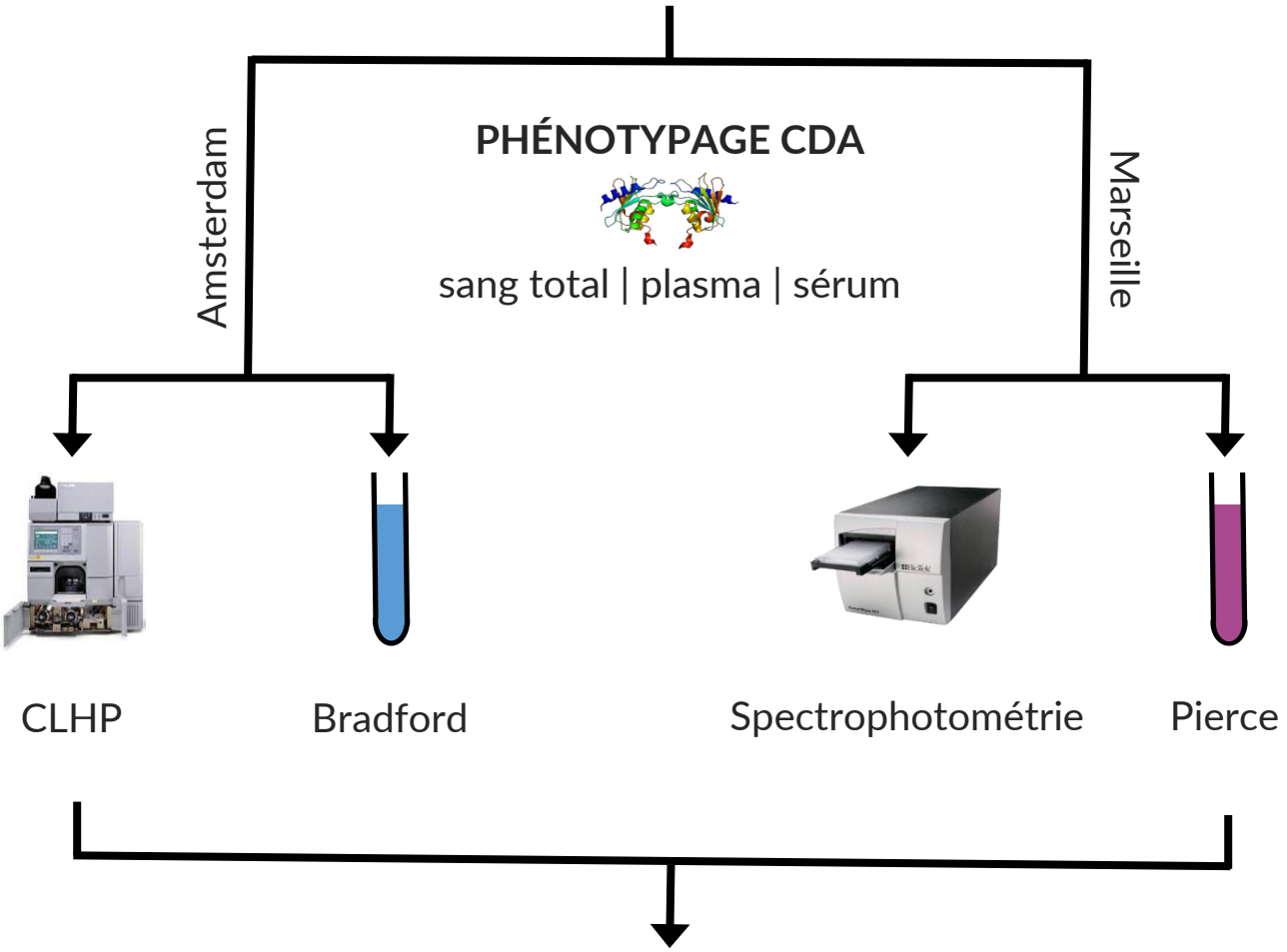
L'activité CDA a été mesurée chez 26 volontaires sains (10 hommes, 16 femmes, médiane : 30 ans, 22 à 58 ans) par les deux techniques précédemment citées dans différents compartiments sanguins. La corrélation entre les deux méthodes sur des échantillons sériques était excellente (r^2=0.963), et acceptable dans le sang total (r^2=0.9142) bien que l'activité CDA soit

significativement plus élevée dans ce dernier compartiment, probablement en raison d'une expression érythrocytaire de l'enzyme. En revanche, les corrélations des méthodes dans le plasma et sur le culot érythrocytaire montrent d'importantes variations, de la même façon que dans le plasma et le sang total. La normalisation de l'activité d'une enzyme est très dépendante de la mesure du taux de protéines. La méthode de Pierce a montré une meilleure fiabilité que la méthode de Bradford quand le test doit être utilisé dans différents laboratoires. La méthode de phénotypage de la CDA par spectrophotométrie a été transférée dans le groupe de G.J. Peters (Amsterdam). Les phénotypages de 26 volontaires sains, réalisés à deux années d'intervalle ont permis d'obtenir une excellente corrélation des courbes de calibration. Par ailleurs, cela a permis de démontrer la stabilité de l'enzyme CDA sur 24 mois lorsque les échantillons sont conservés à -80°C et transférés sous carboglace d'un centre à un autre. Enfin, il n'y avait pas de différence de reproductibilité dans la mesure des protéines à l'intérieur d'un même laboratoire entre la technique de Bradford et celle de Pierce, même si une plus grande variabilité inter-laboratoire a été observée sur le dosage des protéines.

L'essai spectrophotométrique apparaît comme le test le plus simple et le moins coûteux. Il doit être réalisé sur sérum et les protéines devraient être mesurées par la technique de Pierce (acide bicinchonique). L'avantage de cette approche est la simplicité de l'appareillage qu'elle nécessite (spectrophotomètre visible), le faible coût des réactifs requis et la relative rapidité du rendu des résultats (moins de 24h entre la réception des tubes au laboratoire et le rendu de l'activité, en incluant l'incubation *overnight*).







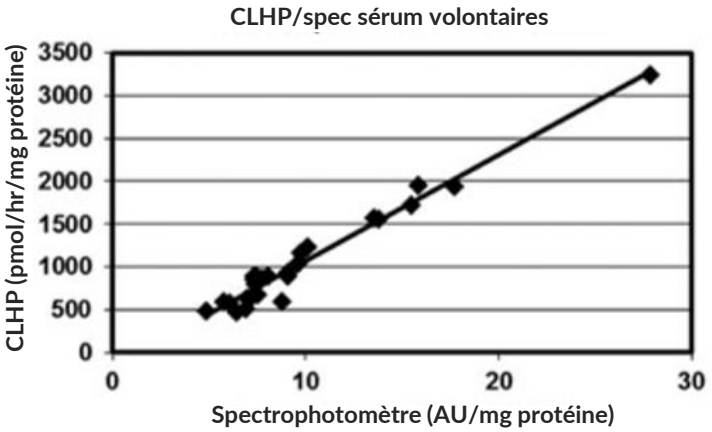


Figure 20. Article I

PUBLICATION I

FIGURE 20

Selection of the best blood compartment to measure cytidine deaminase activity to stratify for optimal gemcitabine or cytarabine treatment

---

Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 33:403–412, 2014
Copyright © Taylor and Francis Group, LLC
ISSN: 1525-7770 print / 1532-2335 online
DOI: 10.1080/15257770.2014.894196

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

SELECTION OF THE BEST BLOOD COMPARTMENT TO MEASURE CYTIDINE DEAMINASE ACTIVITY TO STRATIFY FOR OPTIMAL GEMCITABINE OR CYTARABINE TREATMENT

Godefridus J. Peters,[1] Richard J. Honeywell,[1] Marie Maulandi,[1,2] Elisa Giovannetti,[1] Nienke Losekoot,[1] Marie-Christine Etienne-Grimaldi,[3] Gerard Milano,[3] Cindy Serdjebi,[2] and Joseph Ciccolini,[2] for the EORTC-Pharmacology and Molecular Mechanism Group

[1]*Department of Medical Oncology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands*
[2]*Transfer Oncology Laboratory, Aix-Marseille University, Marseille, France*
[3]*Laboratoire d'Oncopharmacologie, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France*

□ *Cytidine deaminase (CDA) plays a crucial role in the degradation of cytidine analogs, such as gemcitabine and cytarabine. Several studies showed that a low CDA activity is associated with more toxicity but a higher efficacy, while a high activity will lead to a lower efficacy but less toxicity. A stratified dosing strategy based on the relative CDA activity would increase efficiency. In order to predict these events, a reliable measurement of CDA with a validated method is crucial. We aimed to determine which phenotype assay would be most suitable; a spectrophotometric assay using cytidine as a substrate, or an HPLC assay using gemcitabine as a substrate. In serum and whole blood of 26 volunteers, both assays showed an excellent correlation ($R > 0.999$), but not in plasma nor in red blood cells. Moreover, there was no difference between males and females.*

In conclusion, the spectrophotometric assay seems the most simple and cost-effective test. It should be performed in serum, while it should be normalized on protein content as measured by the Bicinchoninic Acid.

Keywords Cytidine deaminase; gemcitabine; cytarabine; protein assays

INTRODUCTION

Cytidine deaminase (CDA) plays an important role in pyrimidine nucleoside homeostasis. Pyrimidine nucleotides can be synthesized either by the pyrimidine de novo nucleotide pathway in the liver or via the salvage pathway, which utilizes preformed nucleosides.[1] Alternatively, nucleosides can be obtained via food intake which subsequently enters the salvage pathway.[2] However, both will ultimately lead to the synthesis of UMP and CMP,

Received 1 October 2013; accepted 9 February 2014.
Address correspondence to Godefridus J. Peters, Department of Medical Oncology, VU University Medical Center, PO Box 7057, 1007 MB Amsterdam, The Netherlands. E-mail: gj.peters@vumc.nl

which form the basis for the synthesis for other uridine and cytidine nucleotides. Brain and mature lymphocytes have a very low pyrimidine de novo pathway, while red blood cells completely lack a de novo pathway, since they lack mitochondria.[1,3] Hence, these tissues are highly dependent on the salvage pathway. Exogenous cytidine proved to be a much more efficient substrate for the salvage pathway than uridine.[4,5] Moreover, deoxycytidine is an important source for deoxyuridine, serving as a precursor for thymidylate synthase. The role of CDA within this pathway might explain its elevated levels in patients with infections,[6] since the stimulated blood cells need increased (deoxy) nucleotide levels.[1]

Next to its physiological function CDA plays an important role in the degradation of cytidine analogs, such as gemcitabine, cytarabine (ara-C), 5-azacytidine, and 5-aza-2′-deoxycytidine (DAC).[7,8] A high activity of systemic CDA will degrade the analogs to inactive metabolites, reducing the efficacy of these drugs. On the other hand, a low activity of CDA may lead to excessive toxicity, sometimes even lethal.[9,10] In several studies, gemcitabine pharmacokinetics, CDA activity, mRNA expression, or CDA polymorphisms have been evaluated in relation to each other, the efficacy and toxicity of treatment.[11,12] Gemcitabine is predominantly used in the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and non-small-cell lung cancer (NSCLC) while ara-C is used mainly in treatment of various forms of leukemia. In these and other diseases, a low CDA activity was strongly associated with toxicity and efficacy.[12–15] In contrast, a high CDA activity was associated with increased toxicity of capecitabine, which requires CDA for its activation.[16] Several polymorphisms in the gene have been associated with either an altered CDA activity.[8,9,12,13,17–19] For example, polymorphism 79 A>C, replacing lysine 27 by a glutamine, results in a higher CDA activity.[20]

The side-effects of nucleoside analog treatment are relatively frequent. Therefore, a predictive test for CDA would be able to stratify patients into more efficient dosing strategies. A number of different assays have been used to determine CDA activity in various blood compartments, enzyme assays with HPLC and a spectrophotometric assay. The pros and cons of each assay have been discussed repeatedly in the literature, both for their reproducibility and predictivity. In order to establish a reliable, consistent, and robust CDA activity assay; we initiated a validation study, focusing on which cellular compartment should be used (whole blood, red blood cells, plasma, serum), and which assay (spectrophotometric test, HPLC-UV) showed the greatest reliability and cost effectiveness.

METHODOLOGY

Blood Sampling

Blood was sampled from healthy volunteers and patients to be treated with gemcitabine. Care was taken that none had any inflammation since

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

CDA is known to be increased during inflammation.[6] Blood was immediately separated in three parts, one for whole blood/plasma (heparin added) and one for serum (clotting). From the heparinized blood, one part was immediately stored (whole blood) while the remainder was centrifuged to obtain plasma (10 min 1,800 g at 4°C). In addition, MESED separation of red blood cells (RBC) from whole blood (2 times 5 min at 3000 g at 4°C and once at 1800 g for 5 min) was stored as 100 μl RBC pellets. The clotted blood sample was centrifuged to obtain serum (10 min 1,800 g at 4°C). All fractions were stored at –80°C until analysis.

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

Protein Assays

Although protein assays are considered standard procedures in many laboratories, deviations of these standard protocols are often present in different laboratories, leading to different outcomes. To prevent such aberrations technical details of the two protein assays are given below.

Bradford (BIO-RAD)

The CDA activity was initially normalized on protein determined by the Biorad assay.[21] This assay is based on the color shift when an acidic solution of Coomassie brilliant blue binds to protein. The subsequent stabilization of the anionic dye initiates a distinct color alteration; this effect is observable across a 10-fold range of concentrations. Adaptations of this assay with the addition of NaOH, as suggested by Stoscheck increase the reliability and accuracy.[22] The assay is rapid and economical to perform in relation to high throughput analysis. Briefly, appropriately diluted protein samples (usually in a volume of 10–50 ul) were pipetted into an Eppendorf tube (an equal volume of 1 M NaOH can be added at this stage to increase solubility of the sample in the reagent if necessary) Subsequently, milliQ water was added to adjust the volume to 800 μl, after which 200 μl the dye Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, 500-0006) was added and thoroughly mixed. A 200 μl was pipetted into a flat-bottomed 96-well plate and absorbance was read at 595 nm. The calibration line consisted of 4 points (10, 20, 30, 40 mg bovine serum albumin (BSA)/ml (BSA fraction V, Boehringer Mannhein, 735 078).

Bicinchoninic Acid

The bicinchoninic acid assay (as provided by Pierce) is based on the complexing of copper ions with the peptide bonds within proteins. This assay is more stable and reliable compared to the traditional Lowry method. This methodology enables the complexing and colorization agents to be added simultaneously decreasing costs and increasing efficiency. This methodology also lends itself to 96-well plate procedures, significantly increasing efficiency. Briefly 150 μl of calibration solution (prepared as for the Bradford assay) or diluted sample (ranging from 1:2,000 to 1:3,000 for serum and

whole blood) is added to a 96-well plate, 150 μl of combined reagents is added to each sample or standard, After application of plate seal, the solutions are mixed for 5 minutes before incubation at 37°C for 2 hours. After incubation absorbance of the cooled plate is determined at 562 nm.

Protein Calculation and Acceptance Specifications

Protein quantification is not linear across the 2–3-fold range measured; hence, a second polynomial correlation is made using the duplicate 5-point calibration. Specifications for the calibration restricts acceptance to 15% variation of individual points and 15% variation in the historical slope of the generated line. A maximal of 2 points can be removed from the calibration to improve response; while calibrations not meeting specifications are discarded along with all associated samples. Statistical screening of the calibration data was performed and screening of sample absorbances in relation to the control blank and top calibration point were made. All data points not conforming to established specifications (<blank; >top calibration and duplicates ±15%) were discarded.

Spectrophotometric CDA Assay

The colorimetric assay for CDA was performed as described earlier.[14] The principle of the assay is based on the conversion of cytidine → uridine which releases NH_3, which can subsequently be quantified. Briefly, in a 96-wells plate a 7-point calibration line (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, and 0) for ammonium chloride in 20 μl of buffer and 20 μl of the relevant blood compartment was combined with 80 μl 2 mM cytidine (final 1.6 mM), and incubated for 16 hours incubation at 37°C. Ammonia was measured spectroscopically after the addition of 40 μl sodium tungstate and 40 μl 1 N sulphuric acid. The plates were centrifuged and 25 μl was transferred to another plate and 75 μl phenol solution and 100 μl hypochlorite solution were added. The absorbance was measured at 625 nm. Activity was expressed as arbitrary unit (AU)/mg protein, which represents pmol ammonia/hr/mg protein. Statistical screening of the calibration data was performed and screening of sample absorbances in relation to the control blank and top calibration point were made. All data points not conforming to established specifications (<blank,>top calibration and duplicates ±15%) were discarded.

HPLC Assay for CDA

The HPLC assay coupled with UV detection at 254 nm was performed as described previously.[20] The assay is based on the conversion of gemcitabine to its deaminated product 2′,2′-difluoro-2′-deoxyuridine (dFdU). The formation of dFdU is taken as measure for enzyme activity. Shortly, 20 μl of diluted blood compartment extract was mixed with 170 μl buffer

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

and 10 μl gemcitabine (final concentration 250 μM) was added as substrate and incubated for 30 or 60 min at 37°C. After protein precipitation and neutralization as described before the product was analyzed with ion-pair reversed phase HPLC using PIC B7 (heptane sulfonic acid solution) +3.5% acetonitrile with a Phenomenex Aqua column (150 × 4.6 mm, 3 μm at a flow of 1 ml/min using UV detection at 254 and 280 nm. Activity was expressed as pmol dFdU formed per hr per mg protein.

RESULTS

Blood Compartment

In order to determine which compartment would be most suitable for determination of the CDA activity samples were taken from 26 healthy volunteers (10 males, 16 females; 22–58 years; median 30) and stored at –20°C in 0.5 ml aliquots. In all samples, CDA was determined with both the HPLC-UV assay using gemcitabine and with the spectrophotometric assay using cytidine as the enzyme substrate. The CDA activities determined in the various blood samples with both assays are summarized in Table 1. The CDA activity with both assays was linear in time and with the amount of protein added.

The correlation between both methodologies in serum samples was excellent ($r^2 = 0.963$, Figure 1). Also in whole blood the correlation between methodologies proved to be reliable ($r^2 = 0.9142$), although activity was significantly higher (5415 ± 2023 vs. 1064 ± 624) in whole blood compared to serum. Correlation between methodologies in plasma and red blood cell pellets demonstrated significant variation ($r^2 = 0.4954$ and 0.3322, respectively). Furthermore, correlations between CDA activities between different compartments was poor as well, such as between serum and full blood ($r^2 = 0.0939$) (Figure 2). When a mix of samples (plasma and serum) was compared between different laboratories this led to a poor correlation and evaluation of mixed samples was discontinued.

TABLE 1 CDA activity in different blood compartments as determined with two CDA assays

	Spectrophotometric assay			HPLC assay		
	AU/mg protein			pmol dFdU/hr/mg protein		
	Mean ± SD	Median	Range	Mean ± SD	Median	Range
Serum	9.91 ± 4.96	7.9	4.88–27.84	1064 ± 624	889	479–3245
Plasma	7.53 ± 1.68	7.34	5.35–11.98	806 ± 277	757	41–1321
Whole blood	40.9 ± 14.1	33.8	17.1–75.4	5415 ± 2023	5505	1960–10589
Red blood cells	28 ± 13.4	26.9	5.9–56.3	9564 ± 6706	8588	745–26789

Values are means ± SD of 26 volunteers; AU/mg protein represents pmol ammonia/hr/mg protein. Data are normalized on protein assayed with the Bio-Rad assay.

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

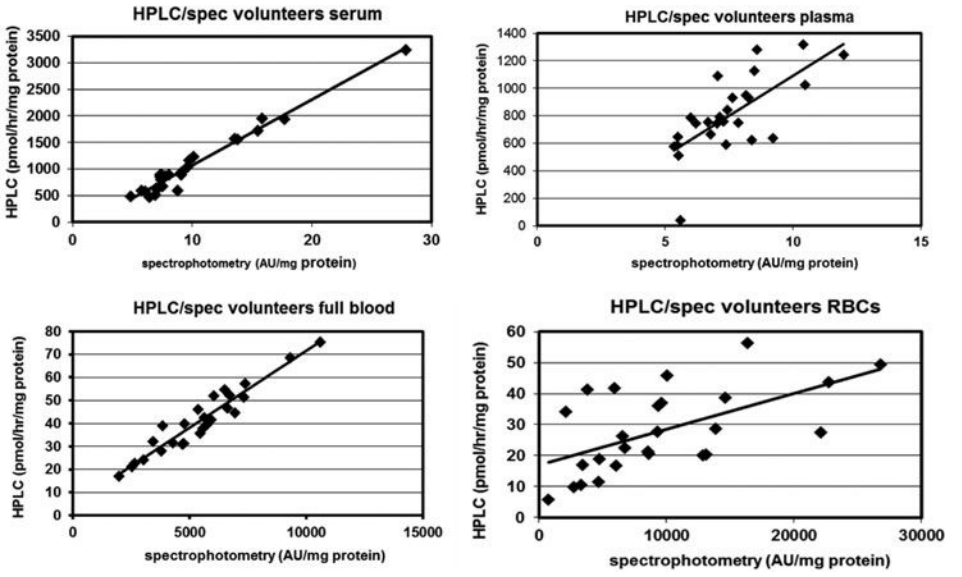


FIGURE 1 Correlation between the HPLC and spectrophotometric assay in blood compartments from 26 volunteers. CDA activity was measured with either the spectrophotometric (spec) or the HPLC assay in four different compartments. Activities were normalized on protein assayed using the Bio-Rad assay. Calculations between assays were performed using the Pearson linear regression algorithm from Excel software. The correlation coefficients were: serum $r = 0.983$, full blood $r = 0.956$, plasma $r = 0.704$ and RBC $r = 0.576$. AU represents pmol ammonia/hr/mg protein.

Since an earlier report postulated a gender difference in CDA expression[23] activities in males and females were compared. With gemcitabine as the substrate, serum CDA activity in males was 1155 ± 842 pmol dFdU formed/hr mg protein compared to that in females of 944 ± 388 pmol dFdU formed/hr mg protein. With cytidine as the substrate the values in

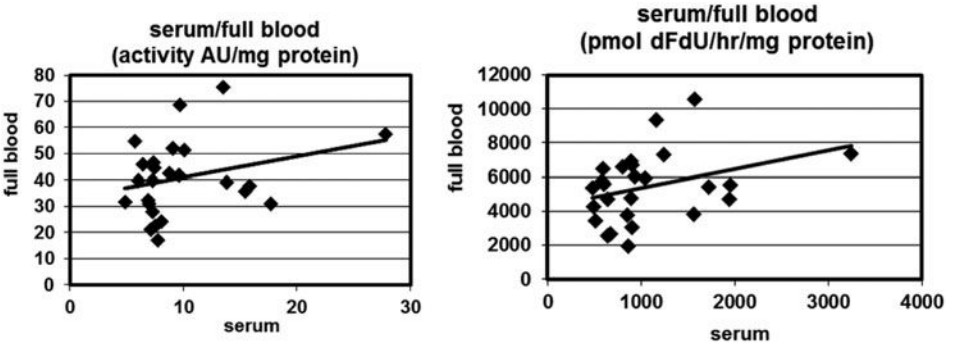


FIGURE 2 Correlation of the CDA activity assay between two different blood compartments. Correlation were calculated using the Pearson linear regression of Excel software and were $r = 0.280$ for the spectrophotometric assay and $r = 0.339$ for the HPLC assay. AU represents pmol ammonia/hr/mg protein.

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

males were 12.00 ± 6.47 and that in females were 8.85 ± 3.05 pmol ammonia per hr (AU)/mg protein, respectively. No significant difference was observed via either methodology between male and female subjects ($p = .391$ and $p = .172$, respectively). A similar pattern was observed after comparison of CDA activity determined in plasma, whole blood and red blood cell pellets.

Protein Assay

Normalization of enzymes assays on protein is very much dependent on the protein assay. When performed within one laboratory the Bradford assay was adequate. However, initial data on a comparison between different laboratories revealed that reproducibility of protein measurements was poor and out of specification (>15%) (data not shown). This led to a poor correlation between data from the HPLC assay between two different laboratories. Therefore, an alternative protein assay kit (Pierce international inc) based on the Bicinchoninic Acid protocol was tested for reliability. This assay showed a much better reliability within specification (<15%).

Robustness, Stability and Reproducibility

An assay developed for interlaboratory comparison should be robust and reliable, while a long-term stability of the CDA protein would be an advantage as well. Therefore, the CDA spectrophotometric assay as transferred from Marseille to Amsterdam, was performed by different persons at different time points and different places. Figure 3A represents an example for the

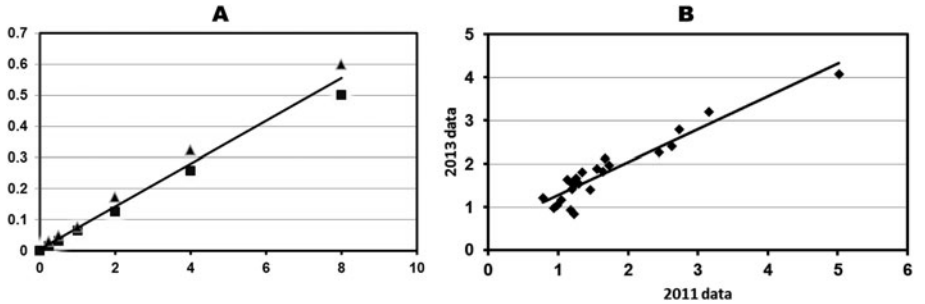


FIGURE 3 Correlation of the CDA spectrophotometric assay performed by two different individuals at two different time points and 2 years interval. Figure 3 A represents CDA calibration lines two years apart. The figure also represents two different ways of calculation, with on the Y-axis normalized on μg ammonia/hr per mg protein and on the X-axis as pmol ammonia/hr per mg protein. In earlier literature data, AU/mg protein was given as μg ammonia/hr per mg protein. This assay was validated on the Bradford assay, but the Bicinchoninic Acid assay gave a similar correlation. B shows the correlation between CDA activities in serum of healthy volunteers performed 2 years apart. The correlation coefficient was 0.89. Activities are expressed as μg ammonia/hr/mg protein with protein measured with the Bradford assay. The Bicinchoninic Acid assay gave a similar result.

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

comparison of calibration lines performed by two different individuals two years apart, showing two ways of calibration as well, normalized to pmol ammonia and μg ammonia. The data show an excellent correlation. Next the CDA activity in the healthy volunteers was compared by different individuals (Figure 3B). The data show a high degree of robustness, reproducibility and a very stable enzyme, since activities were not different. There was no difference in reproducibility of protein assays within one laboratory, since a similar correlation was found between the Bradford and Bicinchoninic Acid assay.

DISCUSSION

The data showed that serum (Figure 3) samples seem the best source for evaluation of CDA activity, since they gave the most consistent pattern, while correlation between two different assays was very good. In literature, a debate is ongoing regarding the question whether CDA measurement in blood samples would help to predict toxicity or efficacy of cytidine analog treatment.[4,10,14,15,23,24] Using a spectrophotometric assay in serum, it should be possible to predict occurrence of serious toxicity (lethal) [10]; this was confirmed independently with an alternative HPLC assay.[12] Similarly, gene expression of CDA mRNA as well as certain polymorphisms[11] suggest a strong correlation to toxicity. SNP analysis has as an advantage that DNA required for this can easily be isolated and that they can easily be assayed. Although there is a correlation between enzyme activity and certain polymorphisms, there appears to be a large overlap.[20] There was a preference between authors for different assays, but there is a consensus that pretreatment measurement of CDA activity can greatly benefit patients.[4,14] Criteria for such an assay indicate that it should be simple, reproducible and robust while adhering to strict quality control specifications. Blood sampling should be standardized and applicable in each routine laboratory. The present study showed that although the HPLC fulfilled all the technical criteria, it would not be suitable for a standard routine laboratory with high overhead costs and lengthy analysis times. The spectrophotometric assay, when normalized on protein (Bicinchoninic Acid assay) is preferable due to very low assay costs, quick analysis turn around, robustness and reliable data.

In conclusion, for routine assay for CDA, the spectrophotometric assay seems preferable in combination with the Bicinchoninic Acid assay for protein measurement.

REFERENCES

1. Peters, G.J.; Veerkamp, J.H. Purine and pyrimidine metabolism in peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Biochem.* **1983**, 15, 115–123.
2. Moyer, J.D.; Oliver, J.T.; Handschumacher, R.E. Salvage of circulating pyrimidine nucleosides in the rat. *Cancer Res.* **1981**, 41, 3010–3017.

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

3. Peters, G.J.; Veerkamp, J.H. Pyrimidine metabolism in rat brain cortex and liver. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1984**, 165A, 531–534.
4. Giovannetti, E.; Tibaldi, C.; Falcone, A.; Danesi, R.; Peters, G.J. Impact of cytidine deaminase polymorphisms on toxicity after gemcitabine: the question is still ongoing. *J. Clin. Oncol.* **2010**, 28, e221–e222.
5. Pels Rijcken, W.R.; Overdijk, B.; van den Eijnden, D.H.; Ferwerda, W. Pyrimidine nucleotide metabolism in rat hepatocytes: evidence for compartmentation of nucleotide pools. *Biochem. J.* **1993**, 293(Pt 1), 207–213.
6. Chalmers, I.M.; Thomson, G.T.; Desjardins, P. Serum cytidine deaminase as a laboratory test for acute inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **1988**, 47, 173–174.
7. Bergman, A.M.; Pinedo, H.M.; Peters, G.J. Determinants of resistance to 2′, 2′-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Res.* Updates **2002**, 5, 19–33 (erratum: 5, 176).
8. Elnaggar, M.; Giovannetti, E.; Peters, G.J. Molecular targets of gemcitabine action: rationale for development of novel drugs and drug combinations. *Current Pharm. Design* **2012**, 18, 1811–1829.
9. Yonemori, K.; Ueno, H.; Okusaka, T.; et al. Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin.Cancer Res.* **2005**, 11, 2620–2624.
10. Mercier, C.; Raynal, C.; Dahan, L.; et al. Toxic death case in a patient undergoing gemcitabine-based chemotherapy in relation with cytidine deaminase downregulation. *Pharmacogenet. Genomics* **2007**, 17, 841–844.
11. Bengala, C.; Guarneri, V.; Giovannetti, E.; et al. Prolonged fixed dose rate infusion of gemcitabine with autologous haemopoietic support in advanced pancreatic adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **2005**, 93, 35–40.
12. Tibaldi, C.; Giovannetti, E.; Tiseo, M.; Leon, L.G.; D'Incecco, A.; Loosekoot, N.; Bartolotti, M.; Honeywell, R.J.; Cappuzzo, F.; Ardizzoni, A.; Peters, G.J. Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* **2012**, 23, 670–677.
13. Tibaldi, C.; Giovannetti, E.; Vasile, E.; Mey, V.; Laan, A.C.; Nannizzi, S.; Di Marsico, R.; Antonuzzo, A.; Orlandini, C.; Ricciardi, S.; Del Tacca, M.; Peters, G.J.; Falcone, A.; Danesi, R. Correlation of cytidine deaminase, ercc1 and xpd polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 1797–803.
14. Ciccolini, J.; Dahan, L.; Andre, N.; et al. Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J. Clin. Oncol.* **2010**, 28, 160–165.
15. Ciccolini, J.; Mercier, C.; Dahan, L.; Andre, N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing-time for a change? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, 8, 439–444.
16. Mercier, C.; Dupuis, C.; Blesius, A.; Fanciullino, R.; Yang, C.G.; Padovani, L.; Giacometti, S.; Frances, N.; Iliadis, A.; Duffaud, F.; Ciccolini, J. Early severe toxicities after capecitabine intake: possible implication of a cytidine deaminase extensive metabolizer profile. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, 63, 1177–1180.
17. Fukunaga, A.K.; Marsh, S.; Murry, D.J.; Hurley, T.D.; McLeod, H.L. Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. *Pharmacogenomics. J.* **2004**, 4, 307–314.
18. Gilbert, J.A.; Salavaggione, O.E.; Ji, Y.; Pelleymounter, L.L.; Eckloff, B.W.; Wieben, E.D.; Ames, M.M.; Weinshilboum, R.M. Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 1794–1803.
19. Sugiyama, E.; Kaniwa, N.; Kim, S.R.; et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J. Clin. Oncol.* **2007**, 25, 32–42.
20. Giovannetti, E.; Laan, A.C.; Vasile, E.; Tibaldi, C.; Nannizzi, S.; Ricciardi, S.; Falcone, A.; Danesi, R.; Peters, G.J. Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2008**, 27, 720–725.
21. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

22. Stoscheck, C.M. Increased uniformity in the response of the coomassie blue G protein assay to different proteins. *Anal. Biochem.* **1990**, 184, 111–116.
23. Mahfouz, R.Z.; Jankowska, A.; Ebrahem, Q.; Gu, X.; Visconte, V.; Tabarroki, A.; et al. Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, 19, 938–948.
24. Ciccolini, J.; Peters, G.J.; Giovannetti, E. Gender, cytidine deaminase, and 5-aza/decitabine. *Clin. Cancer Res.* **2013**, 19, 3105.

Downloaded by [Vrije Universiteit Amsterdam] at 05:08 09 September 2014

II INFLUENCE DU STATUT CDA SUR LES TOXICITÉS CHEZ UNE PATIENTE PÉDIATRIQUE TRAITÉE PAR CYTARABINE ET TRANSPLANTÉE HÉPATIQUE (Article II)

Nous reportons ici le cas d'une patiente de cinq ans ayant déclaré des toxicités hématologiques sévères sous cytarabine.

Après le diagnostic d'une atrésie des voies biliaires, cette patiente avait reçu une transplantation hépatique à l'âge de onze mois. Quatre ans plus tard, elle présentait un syndrome lymphoprolifératif induit par le virus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus* EBV) probablement contracté lors de l'intervention chirurgicale. Dans le cadre de son traitement, l'enfant recevait quatre cures de rituximab, qu'elle tolérait bien. Cependant, une biopsie réalisée un an plus tard sur une masse médiastinale a confirmé un lymphome de Burkitt EBV+. Le traitement suivant lui a donc été proposé : rituximab en association avec un protocole COP (cyclophosphamide, vincristine, prednisolone), suivi d'un protocole COPAD (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicine et prednisolone), suivi par deux cures de protocoles CYVE (cytarabine à hautes doses, étoposide) et terminé par une cure de COPAD.

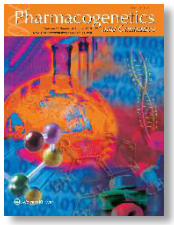
Étant donné l'hypertension portale et les dysfonctionnements hépatiques que présentait la patiente, nous avons décidé de vérifier la capacité métabolique de l'enfant à détoxifier les agents anti-cancéreux qu'elle allait recevoir. En particulier, la CDA étant l'enzyme-clé responsable du métabolisme de la cytarabine et une déficience en CDA pouvant conduire à une surexposition de la patiente, nous avons recherché la présence de polymorphismes génétiques pouvant conduire à une diminution de l'activité CDA et nous avons également mesuré l'activité enzymatique de la CDA.

Malgré un profil sauvage pour le polymorphisme recherché (c.79A>C) sur ADN lymphocytaire, la patiente présentait tout de même une diminution modérée de l'activité CDA de l'ordre de 40% (CDA = 2.1 U/mg de protéines *versus* 3.5 U/mg, activité CDA médiane retrouvée chez les enfants lors d'une étude rétrospective). La détection de cette déficience modérée a conduit les cliniciens à réduire de 30% la dose de cytarabine initialement prévue. Les premiers protocoles, COP et COPAD, ont été administrés avec succès, et avec un excellent profil de tolérance. En revanche, malgré la réduction de posologie de 30% de cytarabine pour le protocole CYVE, la patiente a présenté de sévères toxicités de grades 3-4, conduisant à l'arrêt immédiat du traitement et son admission en soins intensifs.

Étant donné les toxicités observées dès l'introduction de la cytarabine, nous avons décidé d'étudier de façon plus poussée le statut CDA. Notamment, la CDA étant une enzyme

principalement exprimée au niveau hépatique, c'est le génotype du donneur, provenant du foie transplanté, plutôt que le statut du receveur qui aurait dû faire l'objet de recherches pour l'individualisation du traitement sur la base d'une altération du métabolisme. En conséquence, nous avons recueilli de l'ADN provenant du greffon hépatique avant transplantation ainsi que de l'ADN provenant d'une biopsie récente de la patiente, dans le but d'étudier le génotype du donneur et le génotype du foie transplanté. L'analyse HRM (*High resolution melting)* a permis ainsi de confirmer le statut sauvage de l'enfant mais a également mis en évidence un profil hétérozygote pour l'allèle c.79A>C à partir de l'ADN issu de la biopsie. Un séquençage par la technique de Sanger sur les différents ADN (ADN lymphocytaire de la patiente, ADN du foie avant greffe, et ADN du foie après greffe) a été finalement réalisé pour éclaircir ces résultats très contradictoires. L'absence de polymorphisme chez la patiente a été confirmée une seconde fois, alors que le donneur était homozygote pour l'allèle c.79A>C. Le séquençage a finalement révélé le profil homozygote C/C à partir de l'ADN du foie une fois greffé, avec une contamination par l'allèle A.

Ces résultats, très surprenants, démontrent la complexité d'établir un profil génétique pour un patient, lorsque celui-ci est transplanté hépatique. Malgré l'absence de polymorphisme chez le patient receveur, la présence de variations génétiques dans le foie du donneur a conduit à une modification modérée du phénotype du receveur provenant de réarrangements tissulaires. Suite à l'identification de ces modifications, le traitement par cytarabine a pu être poursuivi chez la patiente, avec une réduction de dose plus importante, et une surveillance accrue. Aujourd'hui, la patiente est en rémission complète plus de deux ans après l'arrêt du traitement. La patiente a reçu un nouveau greffon, et se porte toujours bien à ce jour. Nous avons récupéré une nouvelle biopsie hépatique de la patiente suite à sa nouvelle transplantation. Nous sommes actuellement en train d'établir le nouveau génotype de la patiente et attendons également un autre prélèvement sanguin afin de vérifier si le statut CDA s'est normalisé chez cette patiente.



ADN lymphocytaire
extrait du sang total

Transplantation hépatique

Déficience modérée

Lymphome de Burkitt

Traitement par cytarabine
Réduction posologique 30%

ADN lymphocytaire
extrait du sang total

Toxicités sévères

ADN extrait du foie après
greffe

INVESTIGATIONS RÉTROSPECTIVES SUR LE STATUT CDA

Analyse HRM

Séquençage Sanger

Figure 21. Article II

PUBLICATION II

FIGURE 21

Recipient/donor contradictory genotypes with impact on drug pharmacogenetics after liver transplant : a deadly gift?

Recipient/donor contradictory genotypes with impact on drug pharmacogenetics after liver transplant: A deadly gift?

Cindy Serdjebi[a,d], Joseph Ciccolini[a,d], Frederic Fina[a,d], Arnauld Delarue[b], Arnauld Verschuur[c], Bruno Lacarelle[d], L'Houcine Ouafik[a,d] and Nicolas André[c,d]

A 5-year-old girl who had undergone liver transplantation was scheduled for treatment with high-dose cytarabine for a Burkitt lymphoma. Because of impaired transplantation, a study of cytidine deaminase (CDA), the liver enzyme responsible for cytarabine detoxification, was conducted before initiating treatment to evaluate the risk for toxicity in this patient. The CDA genotype and phenotype were both studied and showed none of the polymorphisms usually associated with impaired CDA, but surprisingly functional deficiency was observed. Despite a subsequent 30% reduction in cytarabine dosing, life-threatening toxicities appeared quickly and treatment was discontinued. Further genetic investigations performed on liver biopsy showed that the donor was actually homozygous for *CDA*2*, a genotype associated with severe CDA deficiency. On the basis of the liver genotype, treatment was resumed with further dose reduction, which led to a better tolerance. This case report highlights the limits of searching germline polymorphisms in patients with liver transplant when the story plays in the liver. ***Pharmacogenetics and Genomics*** **24:527–529 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.**

Pharmacogenetics and Genomics 2014, **24**:527–529

Keywords: cytarabine, cytidine deaminase, liver transplantation, pharmacogenetics, toxicity

[a]Transfert Oncology Unit, Nord Hospital, [b]Surgery Unit, La Timone Hospital, [c]Pediatric Oncology Unit, La Timone Hospital and [d]UMR S 911 - CRO2, Aix-Marseille Université, Marseille, France

Correspondence to Cindy Serdjebi, PharmD, Pharmacokinetics Department, SMARTc, CRO2 INSERM UMR _S911, Faculté de Pharmacie, 27, bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France
Tel: +33 4 91 83 55 09; e-mail: cindy.serdjebi@univ-amu.fr

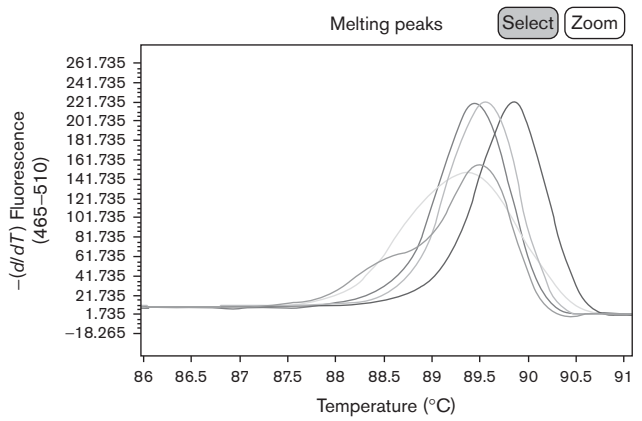
Received 23 April 2014 **Accepted** 8 June 2014

We report here the case of a 5-year-old girl who experienced extremely severe toxicities after cytarabine-based therapy. This child had initially undergone liver transplantation when she was 11 months old, after which a biliary atresia was diagnosed. Four years later, she was treated with four courses of rituximab as an Epstein–Barr virus-induced lymphoproliferative syndrome was diagnosed. However, a mediastinal mass was detected the following year and a biopsy confirmed an Epstein–Barr virus-positive Burkitt lymphoma without C-oncogene rearrangement. The following regimen was then scheduled: rituximab associated with COP (cyclophosphamide, vincristine, prednisolone), then COPAD (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, prednisolone), followed by two courses of CYVE (cytarabine, etoposide) with high-dose cytarabine, and one final course with COPAD. Given the portal hypertension and several liver dysfunctions seen in this frail patient, we performed a pretherapeutic screening to evaluate her ability to fully metabolize cytotoxic agents before initiating treatment. In this regard, as cytarabine is mainly detoxified by cytidine deaminase (CDA), the patient's CDA status was evaluated. Indeed, CDA deficiency is a condition likely to be associated with severe or lethal toxicities in patients treated with pyrimidine analogs [1–3]. Our group has previously described the case of another young patient who underwent near-fatal toxicities upon cytarabine + mercaptopurine intake. In this first patient, genotypic investigations had been performed only retrospectively and showed that she was wild type for *TPMT*, but bore rs2072671 and rs3215400 polymorphisms (i.e. 79A > C and -31C deletion, respectively) on the *CDA* gene, leading to a marked deficiency syndrome responsible for the toxicities. For this new patient, CDA status was established prospectively using a double strategy. After obtaining informed consent from the patient's parents and after obtaining authorization, a genotypic assay on lymphocyte DNA was performed using the high-resolution melting (HRM) method. We screened for the usually described polymorphisms (i.e. 79A > C, 435C > T, 208G > A, and del-31C) using the HRM method. The patient was found to be wild-type homozygous for all screened polymorphisms. In addition, a phenotypic approach was used to evaluate the patient's CDA status. Residual CDA activity in the serum was measured as a surrogate for hepatic enzymatic activity and showed a marked deficiency (CDA = 2.1 U/mg; i.e. 40% reduction as compared with reference values recorded in children). Despite the absence of the risk genotype, it was decided to reduce cytarabine dosing by 30%. Initial COP and COPAD were successfully administered and radiologic response was achieved on D8, followed by CYVE administration with a tailored dose of cytarabine. Despite the reduction in cytarabine dosing, extremely severe toxicities showed quickly after the start of the course (i.e. grade 3 rectorragia, grade 3 melena, grade IV neutropenia, thrombopenia, anemia, and sepsis). Extensive supportive care was undertaken immediately

1744-6872 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins DOI: 10.1097/FPC.0000000000000076

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

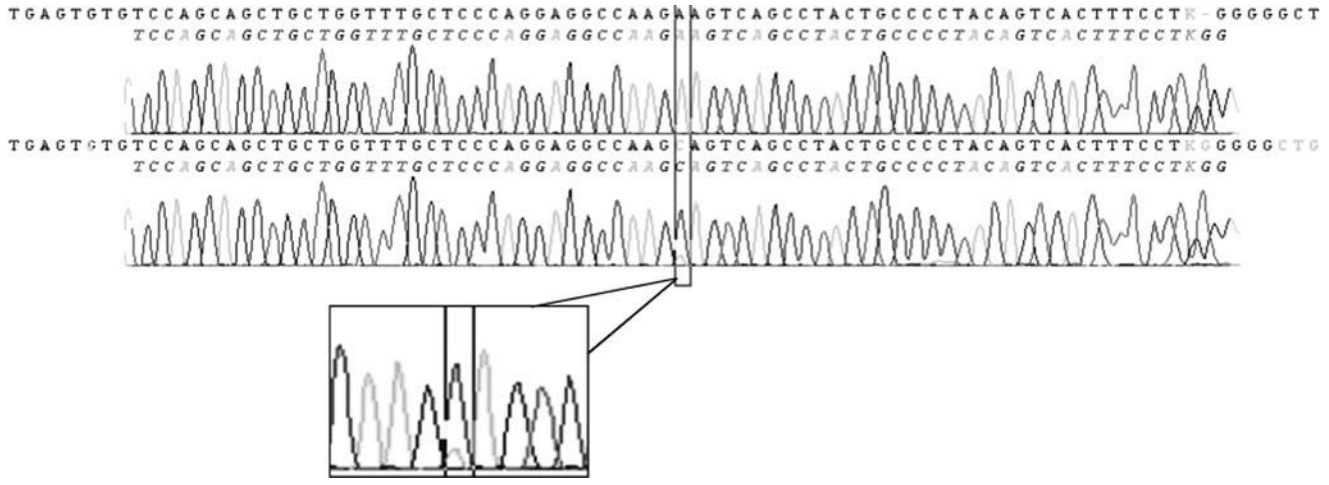
Fig. 1



Results of high-resolution melting (HRM) analysis for the rs2072671 polymorphism. HRM technology, generally used for prescreening before sequencing, is able to detect any change in the DNA sequence. It uses intercalating fluorescent dyes that emit light when binding to the minor groove of duplex DNA. After amplification of a sequence, a melting program is launched, which includes a progressive increase in temperature, thus breaking double-stranded DNA links. During this run, the cycler records the decay of light signal, as dyes do not fluoresce anymore as a result of DNA being denatured. The melting temperature T_m, defined as the temperature at which 50% of the double-stranded DNA is denatured, is determined. A change in the T_m is a reflection of a change in the DNA sequence. Represented here is the relative fluorescence signal versus temperature for the 79 A/A genotype (dark curve with higher fluorescence signal and T_m=89.4°C), the 79 C/C genotype (curve with T_m=89.9°C), and the 79 A/C genotype (c). Lymphocyte DNA was wild type for 79 A/C (light curve with higher fluorescence signal and T_m=89.4°C); however, a heterozygote was evidenced when liver DNA was analyzed (light curve with lower fluorescence signal).

and treatment was discontinued. Once the patient had recovered from the toxicities, rituximab–solumedrol–endoxan was administered instead of continuing the initial CYVE protocol, with manageable thrombopenia. Given the observed toxicities, we hypothesized that marked intolerance to the CYVE regimen was due to cytarabine and CDA impairment being greater than initially thought. Because CDA is primarily synthesized by liver, the donor genotype, rather than the recipient CDA status, should have been used to tailor cytarabine dosing. Consequently, a complementary genetic investigation of the patient's liver was then undertaken. HRM analysis confirmed the recipient's wild-type genotype for lymphocytic DNA, but the liver DNA was heterozygosis for rs2072671 (Fig. 1). Sanger sequencing was carried out to clarify these conflicting results. Results obtained from liver DNA were quite surprising, as we evidenced a homozygote for rs2072671 (C/C genotype) with an A contamination (Fig. 2). This suggests either ongoing cell rearrangement in the liver between donor hepatocytes and recipient hepatocytes or, alternatively, liver reverse chimerism after an allogenic graft [4–6]. Both hypotheses could explain the observed discrepancies in this patient's genotype, depending on the origin of the DNA (i.e. liver vs. lymphocytes). To better understand this case and to fully confirm the fact that the liver donor was mutated on the *CDA* gene, a liver biopsy taken directly from the donor was then retrospectively subjected to HRM analysis, followed by Sanger sequencing. These new genotypic investigations of the donor liver before engraftment and not after grafting confirmed that the donor's DNA was actually homozygous for the 79 C/C genotype,

Fig. 2



Sanger sequencing of CDA exon 1 of both lymphocytic and liver DNA. This widely used method includes in-vitro replication, during which chain-terminating dideoxynucleotides are randomly incorporated into DNA in place of A, T, G, and C bases. Each deoxynucleotide analog emits a specific light signal when incorporated and stops DNA elongation. The cycler reads light signals after each incorporation, thus revealing the DNA sequence. Each peak stands for a DNA base: A, T, G, and C. The first sequence (at the top) has been obtained from patient lymphocyte DNA, with a clear A/A genotype for the 79 A/C position. However, on the second sequence (at the bottom), which resulted from liver DNA sequencing, a C/C genotype is evidenced, with an A signal, confirming results obtained from high-resolution melting analysis. This surprising finding may be explained by an ongoing cell rearrangement in the liver between donor hepatocytes and recipient hepatocytes or, alternatively, by a liver reverse chimerism after allogenic grafting. CDA, cytidine deaminase.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

whereas the recipient was definitely wild type for this variant. This contradictory triple genotype reflects the complexity of picturing a patient's genetic profile once transplantation has been performed. Here, the recipient carried no germline polymorphisms on her *CDA* gene, the donor was homozygous mutated, and 3 years after transplantation, tissue rearrangement was apparently ongoing in the liver, leading eventually to an intermediary-deficient phenotype. Although hepatocyte chimerism is a frequently observed event in allografts, the role of hepatocytes and their becoming is still unclear. We evidenced here that cell rearrangement or chimerism in the liver may lead to impairment in the enzymatic background of the patient, thus deteriorating her ability to dispose of drugs properly. On the basis of these novel findings, CYVE treatment was resumed with further reduction in dosing (i.e. 50%) and close monitoring, with good tolerance. Next, the patient received an endoxan-based regimen, and she is in complete remission more than a year after completion of the treatment. Addressing pharmacogenetic issues is a rising concern in clinical oncology, as germinal genetic polymorphisms (e.g. affecting *DPYD*, *UGT1A1*, and *TPMT* genes) may explain poor clinical outcome because of changes in patients' capacity for metabolic disposition of major anticancer agents [7–9]. Here, this case report highlights the fact that after liver transplantation it is critical to obtain a complete picture of all the existing germinal genotypes (i.e. recipient + donor) to better forecast the ability of the patient to metabolize anticancer agents.

Acknowledgements

Serdjebi C was in charge of manuscript drafting and writing, data analysis, and genotype and phenotype analysis. Ciccolini J was in charge of manuscript writing, data analysis, and phenotype analysis. Fina F was in charge of genotype analysis and data analysis. Delarue A and Verschuur A were in charge of data collection and analysis. Lacarelle B and Ouafik LH were in charge of data analysis and manuscript drafting. André N was in charge of data collection, data analysis, and manuscript drafting and writing.

Conflicts of interest

Patent owners: Joseph Ciccolini and L'Houcine Ouafik: Method for assessing the ability of a patient to respond or to be safely treated by a nucleoside-based therapy. US Patent # US20130011392A1 January 2013. For the remaining authors there are no conflicts of interest. Cindy Serdjebi received a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), grant #FDM20120624035.

References

1 Ciccolini J, Dahan L, André N, Evrard A, Duluc M, Blesius A, *et al.* Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J Clin Oncol* 2010; **28**:160–165.
2 Ciccolini J, Evrard A, M'Batchi L, Pourroy B, Mercier C, Iliadis A, *et al.* CDA deficiency as a possible culprit for life-threatening toxicities after cytarabine plus 6-mercaptopurine therapy: pharmacogenetic investigations. *Pharmacogenomics* 2012; **13**:393–397.
3 Evrard A, Lacarelle B, Ciccolini J. Severe or lethal toxicities with nucleosidic analogs: time for action. *Pharmacogenomics* 2013; **14**:227–230.
4 Aini W, Miyagawa-Hayashino A, Ozeki M, Tsuruyama T, Tamaki K, Uemoto S, Haga H. Frequent hepatocyte chimerism in long-term human liver allografts independent of graft outcome. *Transpl Immunol* 2013; **28**:100–105.
5 Idilman R, Erden E, Kuzu I, Ersoz S, Karasu Z, Karayalcin K, *et al.* Recipient-derived hepatocytes in sex-mismatched liver allografts after liver transplantation: early versus late transplant biopsies. *Transplantation* 2004; **78**:1647–1652.
6 Sun Z, Williams GM. Host stem cells repopulate liver allografts: reverse chimerism. *Chimerism* 2011; **2**:120–122.
7 Henriette Tanja L, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Pharmacogenetics in chemotherapy of colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; **23**:257–273.
8 Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin* 2009; **59**:42–55.
9 Lee SY, McLeod HL. Pharmacogenetic tests in cancer chemotherapy: what physicians should know for clinical application. *J Pathol* 2011; **223**:15–27.

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

III INFLUENCE DU STATUT CDA SUR L'ISSUE CLINIQUE DU SUJET ÂGÉ ATTEINT D'HÉMOPATHIE MALIGNE TRAITÉ PAR AZACYTIDINE (Articles III et IV)

La CDA est l'enzyme-clé du métabolisme de plusieurs analogue nucléosidiques, dont l'azacytidine. L'influence du statut CDA sur l'issue clinique des patients traités par gemcitabine a été très largement étudiée : en effet, nous savons qu'une diminution de l'activité CDA augmente le risque d'apparition de toxicités sévères sous gemcitabine, et qu'à l'inverse, une augmentation de l'activité CDA peut réduire les chances de rémission lors d'un traitement par gemcitabine. En revanche, il existe à ce jour très peu de données cliniques sur l'influence du phénotype CDA sur le profil d'efficacité et de tolérance lors d'un traitement par azacytidine [276].

Nous reportons trois cas cliniques mettant en évidence une étroite corrélation entre le statut CDA et l'issue clinique chez des patients traités dans le cadre d'hémopathies malignes par azacytidine. Le premier article relate le premier cas mondial de décès toxique sous azacytidine corrélé à une déficience CDA avérée. La seconde publication met en évidence l'importance du statut CDA pour les patients traités par azacytidine à travers deux cas cliniques de patients aux phénotypes et génotypes opposés.

1 DÉCÈS TOXIQUE CHEZ UN PATIENT CDA-DÉFICIENT

Nous reportons ici le cas d'un patient de 60 ans traité par azacytidine dans la prise en charge d'un syndrome myélodysplasique. Présentant plusieurs paramètres permettant de classer ce patient comme à haut-risque d'évoluer vers une leucémie myéloïde aiguë, les cliniciens ont ainsi décidé de traiter celui-ci par 6 cures d'azacytidine selon un protocole standard (75 mg/m²/jour pendant 7 jours, tous les 28 jours). Un mois après la première cure, démarrée en juin 2014, la seconde cure a dû être repoussée à cause des toxicités hématologiques, consécutives à la première cure (anémie, neutropénie et thrombopénie de grade 4). La deuxième cure a donc démarré avec un retard de 14 jours. Le mois suivant, la troisième cure a dû être de nouveau repoussée de 7 jours à cause de nouvelles toxicités hématologiques. Cinq jour après le début de la troisième cure, le patient a été hospitalisé d'urgence pour sepsis fébrile, anémie de grade 2, thrombopénie, neutropénie et leucopénie de grade 4. Malgré la mise sous antibiothérapie et fongicides, le patient est décédé six semaines après la prise en charge du sepsis, soit 121 jours après la première cure d'azacytidine.

Le profil de toxicité affiché lors des deux premières cures était cohérent avec ce qui peut être retrouvé avec ce type de traitements. En revanche, les toxicités les plus sévères sont apparues lors de la troisième cure, bien que généralement celles-ci apparaissent lors des deux premières cures. La durée totale de l'anémie, la neutropénie et la thrombopénie a été supérieure à 50 jours ici, une durée anormalement élevée.

Une déficience en CDA pouvant être associée à une diminution de la détoxification de l'azacytidine, des analyses *post-mortem* ont été réalisées à partir de prélèvements réalisés avant le décès du patient. Ainsi, le statut CDA a été étudié selon deux approches : fonctionnelle d'une part, en évaluant la fonctionnalité enzymatique de la CDA du patient, et d'autre part, en recherchant le polymorphisme c.79A>C généralement associée à une diminution de l'activité CDA. À l'issue de ces analyses, une déficience sévère en CDA a pu être mise en évidence (patient à 1,29 *versus* 3,4 U/mg dans la population de référence), même si le profil génétique du patient a révélé un statut sauvage pour le polymorphisme recherché.

Ce premier cas mondial de décès toxique sous azacytidine conséquent à une déficience sévère en CDA suggère que le statut fonctionnel CDA pourrait être un biomarqueur de l'apparition de toxicités sous azacytidine chez les patients atteints de syndrome myélodysplasiques. D'autres essais prospectifs sont nécessaires pour confirmer ces résultats, mais ce report de cas plaide pour une évaluation *a priori* du statut CDA chez les patients traités par azacytidine.

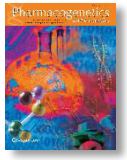


Figure 22. Article III

PUBLICATION III

FIGURE 22

Lethal toxicity after administration of azacytidine : implication of the cytidine deaminase-deficiency syndrome

Lethal toxicity after administration of azacytidine: implication of the cytidine deaminase-deficiency syndrome

Raphaelle Fanciullino[a,b,*], Cedric Mercier[c,*], Cindy Serdjebi[a], Yaël Berda[d], Frederic Fina[e], L'Houcine Ouafik[e], Bruno Lacarelle[a], Joseph Ciccolini[a] and Regis Costello[c]

Azacytidine, an antimetabolite with an original epigenetic mechanism of action, increases survival in patients diagnosed with high-risk myelodysplasic syndromes or acute myeloid leukemia with less than 30% medullar blasts. Azacytidine is a pyrimidine derivative that undergoes metabolic detoxification driven by cytidine deaminase (CDA), a liver enzyme whose gene is prone to genetic polymorphism, leading to erratic activity among patients. Clinical reports have shown that patients with the poor metabolizer (PM) phenotype are likely to experience early severe or lethal toxicities when treated with nucleosidic analogs such as gemcitabine or cytarabine. No clinical data have been available thus far on the relationships between CDA PM status and toxicities in azacytidine-treated patients. Here, we measured CDA activity in a case of severe toxicities with fatal outcome in a patient undergoing standard azacytidine treatment. Results showed that the patient was PM (i.e. residual activity reduced by 63%), thus suggesting that an impaired detoxification step could have given rise to the lethal toxicities observed. This case report calls for further prospective studies investigating the exact role that CDA status plays in the clinical outcome of patients treated with azacytidine. ***Pharmacogenetics and Genomics*** **25:317–321** **Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.**

Pharmacogenetics and Genomics 2015, **25**:317–321

Keywords: azacytidine, cytidine deaminase, pharmacogenetics, poor metabolizer, toxicity

[a]SMARTc Unit, Pharmacokinetics Laboratory, UMR_911 CRO2 AMU, [b]Pharmacy Unit, [c]Onco-Hematology Unit, [d]Hematology Laboratory, La Conception University Hospital of Marseille and [e]Transfer Oncology Laboratory, Nord University Hospital of Marseille, APHM, Marseille, France

Correspondence to Joseph Ciccolini, PharmD, PhD, Pharmacokinetics Laboratory, School of Pharmacy, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille 05, France
Tel: +33 491 835 509; fax: +33 491 835 567;
e-mail: joseph.ciccolini@univ-amu.fr

*Raphaelle Fanciullino and Cedric Mercier contributed equally to the writing of this article.

Received 20 January 2015 **Accepted** 6 March 2015

Myelodysplasic syndromes (MDS) are clonal disorders of hematopoietic stem cells characterized by ineffective hematopoiesis resulting in blood cytopenia and a high risk of progression to acute myeloid leukemia. MDS may be triggered by a variety of causes (i.e. previous chemotherapy), but are mainly age related, and therefore often diagnosed in frail or elderly patients [1]. Up to the last decade, because of the lack of effective therapies and owing to the age of most patients, supportive care was the main therapeutic option. On the basis of prognostic stratification, treatment may vary: patients with a lower risk of MDS can usually be treated for correction of cytopenias using erythropoiesis-stimulating agents or, in the case of patients with chromosome 5q deletion, with lenalidomide. In patients with a higher risk of MDS, treatments with azacytidine or decitabine could improve survival and quality of life. Azacitidine is an analog of pyrimidine nucleoside cytidine [2]. The antineoplasic activity of azacytidine is because of two mechanisms of action: incorporation into nucleic acids and DNA hypomethylation. Azacytidine is generally well tolerated compared with standard cytotoxics. However, myelosuppression can sometimes be severe, but is usually transient, and most patients recover before their next course or require a dose delay in up to one-third of the cases [3].

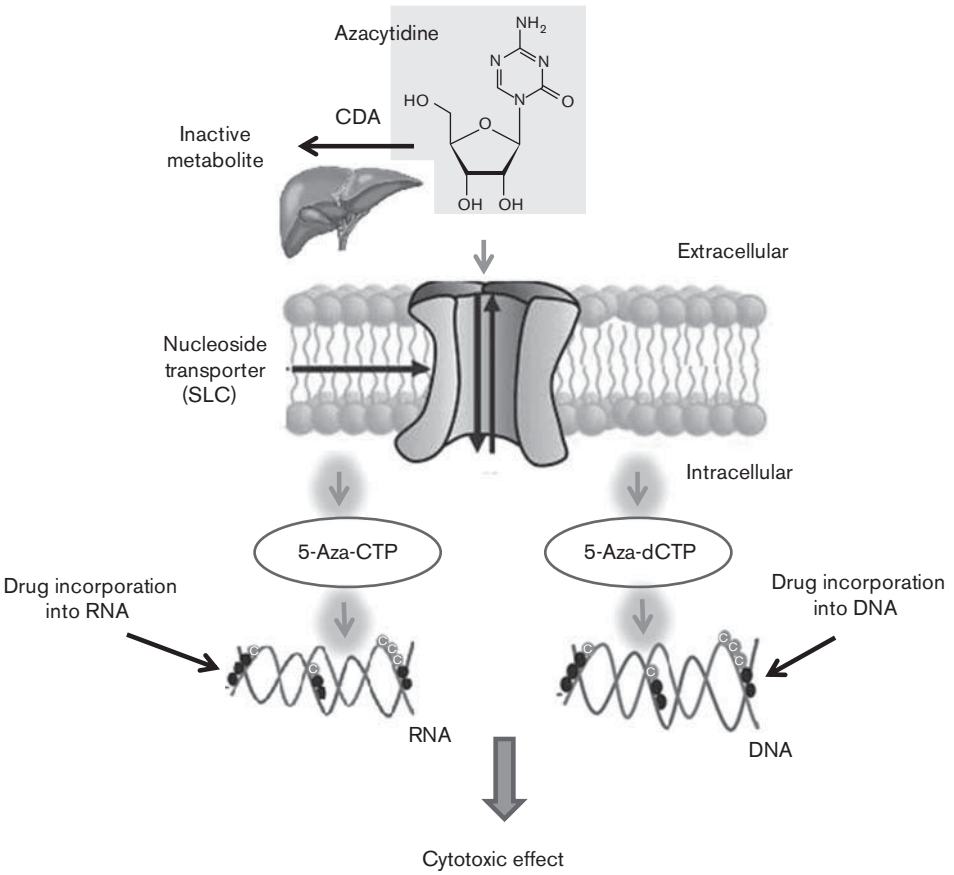
Azacytidine drug metabolism and pharmacokinetics is dependent on renal function and cytidine deaminase (CDA) activity, a liver enzyme that detoxifies the drug by deamination (Fig. 1). The *CDA* gene is known to be highly polymorphic, and CDA deficiency has been studied extensively as a risk factor for life-threatening toxicities with a variety of nucleoside analogs [4]. To date, little is known about the role that CDA deficiency could play in the increased risk of toxicity in azacytidine-treated patients [5,6].

Here, we present a toxic-death case in a White MDS patient treated with standard azacytidine doses. The patient was a 60-year-old man admitted in our institution with respiratory incapacity and severe anemia (hemoglobin 5.8 g/dl). MDS was diagnosed after peripheral blood examination and bone marrow aspiration, and was classified as refractory anemia with excess of blasts (8% medullar blasts). The karyotype was complex and unfavorable (i.e. 42,XY,add(2)(q37),-4,del(5)(q31q34),-6,-7, add(9)(p11),add(15)(p11),-17,-21, + r[17]/46,XY[3]). This patient was subsequently classified as higher-risk

1744-6872 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000139

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of the article is prohibited.

Fig. 1



Azacytidine metabolism and mechanism of action. CDA, cytidine deaminase.

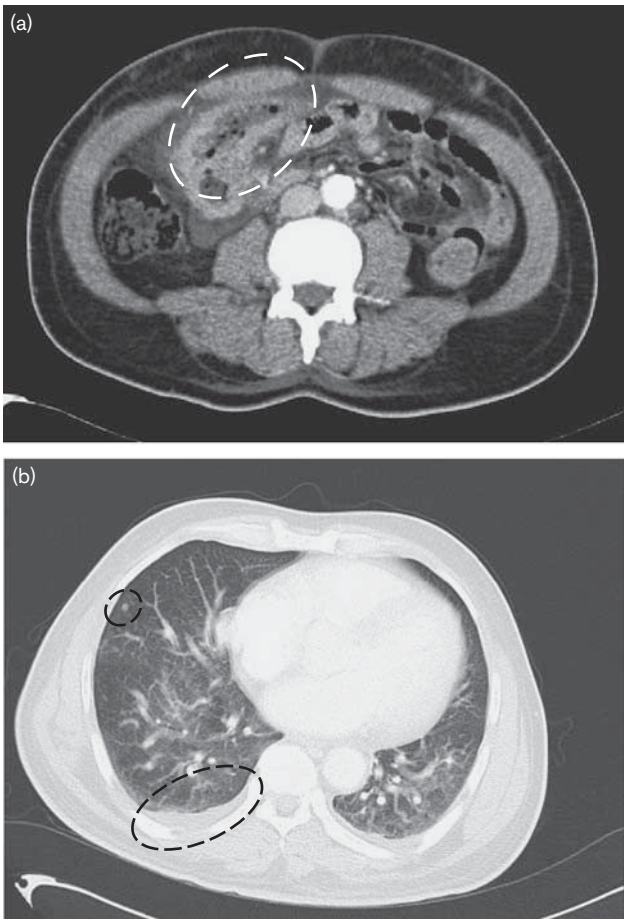
RAEB-1 according to the WHO's International Prognostic Scoring System. The patient was scheduled for a standard azacytidine six-course therapy (i.e. 7 days of administration at 75 mg/m^2/day every 28 days). Treatment started in June 2014. One month later, the second course had to be postponed because of long-lasting hematological toxicities (i.e. grade-4 neutropenia, grade-4 thrombocytopenia, grade-4 anemia). The second course was thus delayed for 14 days and administered at the standard dose. One month later, the third course had to be postponed for 7 days because of new long-lasting hematological toxicities (i.e. grade-4 neutropenia, grade-4 thrombocytopenia, grade-3 anemia). Before the third course started, the patient was hospitalized for coughing up blood. The third course was administered with the standard dosing but, after 5 days of treatment, the patient was admitted in emergency for sepsis with grade-2 anemia, grade-4 thrombocytopenia, grade-4 leukopenia, and grade-4 neutropenia.

The patient presented with severe sepsis with fever, shivers, and oxygen desaturation. Scanner examination showed bilateral pleural infiltrates and infectious colitis (Fig. 2). Hemocultures were found to be negative. A broad-spectrum antibiotic treatment (i.e. aminoside + B-lactamine + macrolide) and liposomal antifungal amphotericin B were administered, but apyrexia was only achieved after 3 weeks. Two days later, the patient was febrile again and developed a respiratory distress syndrome associated with grade-3 mucositis. The patient then experienced melena and hypotension, with fungal-positive expectorations, grade-4 aplasia, and severe sepsis that led to death 6 weeks after admittance of the patient for initial sepsis. Figure 3 shows the time course of all the previously described events.

Hematologic events during treatment were consistent with underlying MDS and previous reports of azacitidine treatment. Proportionately more patients experienced anemia, thrombocytopenia, neutropenia, and/or other hematologic events during the first 1–2 azacytidine treatment cycles compared with later cycles [3]. After the third course, nadir values for hematologic parameters (hemoglobin, platelets, and absolute neutrophil count) occurred on the fifth day. Anemia, neutropenia, and thrombocytopenia lasted for 50 days.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of the article is prohibited.

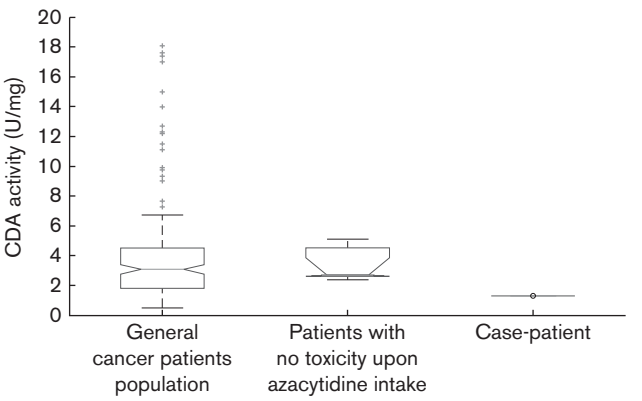
Fig. 2



Colitis with thickening of the digestive lining (a) and pneumocystis with pleural infiltrate (b). Dashed lines show pathological findings.

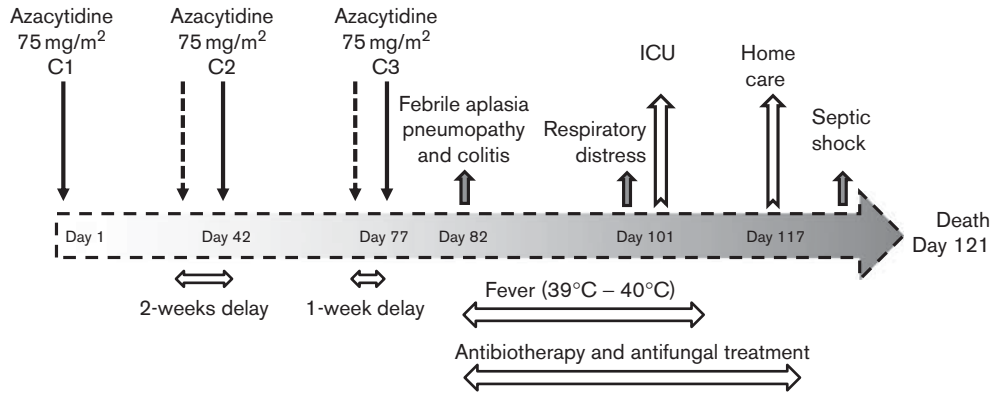
Because CDA deficiency could be a condition associated with impaired ability to detoxify azacytidine, post-mortem examinations were performed on residual blood samples withdrawn previously and stored as part of the routine care of the patient. CDA status was established following two distinct strategies: a phenotypic-based analysis to measure residual CDA activity in serum as a surrogate for liver activity [7] plus genetic investigation to screen for the canonical polymorphisms (i.e. *79A > C*) associated with CDA deficiency. Because the CDA**2* variant has repeatedly been associated with changes in clinical outcome with nucleosidic analogs, our genetic investigations focused on this polymorphism [8]. Briefly, to establish the CDA phenotype, 20 µl of serum was incubated overnight with cytidine before spectrophotometric analysis as described previously [7], whereas the *CDA*2* allelic variant was searched by High-resolution melting analysis [7]. Phenotypic investigation showed a CDA activity of 1.29 U/mg (Fig. 4), a value 63%

Fig. 4



CDA activity in the case-patient and comparison with CDA values usually recorded in our institute in adult cancer patients and in a subset of azacytidine patients with no severe toxicities. CDA, cytidine deaminase.

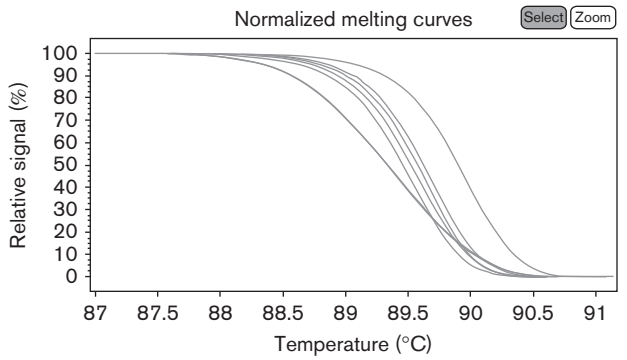
Fig. 3



Time-course of life-threatening toxicities after standard azacytidine administration in the CDA PM patient. CDA, cytidine deaminase; PM, poor metabolizer.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of the article is prohibited.

Fig. 5



High-resolution melting analysis for the 79A > C variant for the patient. The left curve shows the heterozygous standard and the right curve shows the homozygous standard. The four light curves in the middle represent two wild-type standards and the patient was analyzed in duplicate.

lower (i.e. 1.29 vs. 3.4 U/mg) than the mean values usually recorded in adult patients with cancer in our institute [7] and 61% lower (i.e. 1.29 vs. 3.3 U/mg) than the mean values recorded in 10 patients of the unit with no severe toxicities upon azacytidine intake. On the basis of these values, the patient was considered CDA deficient. Further genotypic investigations focused on the *79A > C* genotype and showed that this patient had the wild-type allelle (Fig. 5).

The azacytidine prescribing information suggests dose adjustments for hematologic toxicity. Nonetheless, because of the basic hematological status of patients with MDS, treatment is usually carried out with transfusion support and monitoring for risks associated with neutropenia (e.g. sepsis). In a previous phase-3 study, treatment discontinuation after severe hematological toxicities was necessary in 3–9% of azacytidine patients, depending on the regimen [9]. Usually, dose reductions are required only very rarely and dose delays should occur only under exceptional circumstances – such as sepsis – and not because of hematologic adverse events, thus highlighting the difficulty in managing the efficacy/hematological toxicity balance in MDS patients. Typical azacytidine-related toxicities are grades 3 or 4 leukopenia (43% of patients), granulocytopenia (58%), and thrombocytopenia (52%) [10], but further meta-analysis studies have reported much higher (i.e. > 75%) figures [11]. When first administered following an aggressive regimen (e.g. 150 up to 225 mg/m^2), azacytidine caused 6% of toxic deaths [12]. Using an FDA-approved regimen (75 mg/m^2/day), life-threatening toxicities (i.e. sepsis) have still been reported in 29% (range: 19–39%) of patients [11], thus underlining how maintaining an acceptable efficacy/toxicity balance with azacytidine can be challenging at the bedside. Genetic polymorphism leading to CDA deficiency is a condition that has been investigated extensively as a predictive marker for toxicity with widely prescribed gemcitabine and, to a lesser extent, with cytarabine and capecitabine [5]. As a nucleosidic analog, azacytidine is deaminated by CDA and deficient patients are thus theoretically at risk of experiencing life-threatening toxicities. Establishing CDA status can be either performed using standard single nucleotide polymorphism-candidate or gene-candidate approaches or by measuring CDA activity serum as a surrogate for liver CDA activity. To date, only a couple of genetic variants (i.e. *79A > C*, *208G > A*, *– 31delC*) have been associated with either the poor metabolizer or the ultrarapid metabolizer phenotype [8, 13,14]. However, genotype-to-phenotype relationships are not clear cut and ethnicity, epigenetic regulation, and the role of transcription factors remain to be fully elucidated [7,15]. Conversely, functional testing for CDA is a rapid and univocal strategy that provides a direct insight into the ability or not of a given patient to metabolize CDA substrates. Little data thus far have been collected on the role that dysregulated CDA could play in the clinical outcome in patients treated with azacytidine. In a recent clinical report, Mahfouz *et al.* [16] have found that CDA activity was sex dependent and that worse clinical outcome with azacytidine (i.e. reduced overall survival, whereas no data on disease-free survival or response were made available) was observed in individuals with high CDA activity. Despite the fact that this relationship was expected and in full agreement with other reports showing that CDA ultrarapid metabolizer patients are less likely to respond to nucleosidic analogs [17], the reported sex effect was never observed in any of the many studies carried out by other groups on CDA activity [13,18], and surprisingly, no impact of CDA deficiency on azacytidine toxicity was reported by the authors. In a pilot study investigating on the impact that CDA could exert on the clinical outcome of MDS patients treated with nucleosidic analogs, we found that CDA deficiency was associated with more severe toxicities, including in azacytidine patients [5]. Here, our investigations focused on the search for CDA deficiency in a patient who experienced life-threatening and eventually lethal toxicities with standard azacytidine, despite repeated treatment discontinuations. Long-lasting severe hematological toxicities with sepsis and eventually multiorgan failure were the cause of death. The CDA phenotype was retrospectively assessed on serum already collected as part of routine patient care. Germline genotype was next assessed from spare blood samples after the patients' relatives provided authorization. Our results showed that this patient had markedly reduced CDA activity (i.e. – 63%) compared with the standard values usually recorded in adult patients. The search for the associated polymorphism (i.e. *CDA*2* variant) was negative, a finding that is not surprising because genotype-to-phenotype relationships with CDA have been not entirely elucidated as yet [17] and because in clinical practice, routine screening for

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of the article is prohibited.

CDA deficiency in patients with gemcitabine is carried out primarily on a phenotypic basis. With respect to the role that CDA plays in azacytidine pharmacokinetics and the nature of the toxicities observed, this case strongly suggests a direct causality link between CDA-deficient status and azacytidine-related toxic death. Overall, this report suggests that CDA deficiency could be a major risk factor in patients scheduled for standard azacytidine therapy, and that preliminary testing for CDA could help to reduce this risk through appropriate dose-tailoring strategies. Because the development of companion testing and biomarker-based medicine in oncology is now increasing in trend, this clinical report advocates performing prospective clinical trials to confirm the exact role that CDA status could play as a marker in the efficacy/toxicity balance of azacytidine in MDS patients.

Acknowledgements

Conflicts of interest

Joseph Ciccolini and Cedric Mercier own a patent on CDA testing (Method for assessing the ability of a patient to be safely treated by a nucleoside analog-based chemotherapy: US20130011392A1). For the remaining authors there are no conflicts of interest.

References

1 Meers S. The myelodysplastic syndromes: the era of understanding. *Eur J Haematol* 2014. [Epub ahead of print].

2 Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *Oncologist* 2005; **10**:176–182.

3 Santini V, Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Silverman LR, List A, *et al.* Management and supportive care measures for adverse events in patients with myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Eur J Haematol* 2010; **85**:130–138.

4 Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, André N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing–time for a change? *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **8**:439–444.

5 Fanciullino R, Serdjebi C, Mollard S, Costello R, Ouafik L, Ciccolini C, Mercier C. Cytidine deaminase deficiency and severe toxicities upon azacytidine intake: Clinical observations and experimental evidences. Proceedings of AACR 104th Annual Meeting; 6–10 April 2013; Washington, DC; abstract 2208.

6 Serdjebi C, Milano G, Ciccolini J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014. [Epub ahead of print].

7 Ciccolini J, Dahan L, André N, Evrard A, Duluc M, Blesius A, *et al.* Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J Clin Oncol* 2010; **28**:160–165.

8 Giovannetti E, Laan AC, Vasile E, Tibaldi C, Nannizzi S, Ricciardi S, *et al.* Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; **27**:720–725.

9 Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, *et al.* International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 2009; **10**:223–232.

10 Raj K, Mufti GJ. Azacytidine (Vidaza(R)) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Ther Clin Risk Manag* 2006; **2**:377–388.

11 Xie M, Jiang Q, Xie Y. Comparison between decitabine and azacitidine for the treatment of myelodysplastic syndrome: a meta-analysis with 1392 participants. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015; **15**:22–28.

12 Quagliana JM, O'Bryan RM, Baker L, Gottlieb J, Morrison FS, Eyre HJ, *et al.* Phase II study of 5-azacytidine in solid tumors. *Cancer Treat Rep* 1977; **61**:51–54.

13 Caronia D, Martin M, Sastre J, de la Torre J, García-Sáenz JA, Alonso MR, *et al.* A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Clin Cancer Res* 2011; **17**:2006–2013.

14 Yonemori K, Ueno H, Okusaka T, Yamamoto N, Ikeda M, Saijo N, *et al.* Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin Cancer Res* 2005; **11**:2620–2624.

15 Mercier C, Raynal C, Dahan L, Ortiz A, Evrard A, Dupuis C, *et al.* Toxic death case in a patient undergoing gemcitabine-based chemotherapy in relation with cytidine deaminase downregulation. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**:841–844.

16 Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahem Q, Gu X, Visconte V, Tabarroki A, *et al.* Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. *Clin Cancer Res* 2013; **9**:938–948.

17 Serdjebi C, Seitz JF, Ciccolini J, Duluc M, Norguet E, Fina F, *et al.* Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. *Pharmacogenomics* 2013; **14**:1047–1051.

18 Ciccolini J, Peters GJ, Giovannetti E. Gender, cytidine deaminase, and 5-aza/decitabine – letter. *Clin Cancer Res* 2013; **19**:3105.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. Unauthorized reproduction of the article is prohibited.

2 DEUX DESTINS OPPOSÉS POUR UN MÊME TRAITEMENT

L'azacytidine étant un analogue pyrimidique dépendant de la CDA pour sa détoxification, les variations génétiques affectant le gène *CDA* sont susceptibles de modifier la capacité des patients à détoxifier cet agent anti-cancéreux. En particulier, les substitutions c.79A>C et c.208G>A ont été très souvent associées à une diminution de l'activité enzymatique de la CDA tandis que la délétion c.-33_-31delC sur le promoteur a été associée à une augmentation de l'expression de la CDA.

Dans ce second article traitant de l'azacytidine, actuellement en révision mineure chez *Pharmacogenomics*, nous reportons les cas de deux patients, tous deux atteints de pathologies hématologiques malignes, et traités par azacytidine à la dose de 75 mg/m²/jour, pendant 7 jours, tous les 28 jours, jusqu'à progression de la maladie ou apparition de toxicités sévères. Malgré un traitement commun, les deux patients ont développé deux réponses complètement opposées, l'un étant en rémission complète après avoir déclaré de très sévères toxicités, et l'autre en situation d'échec thérapeutique. Ces deux résultats cliniques tout à fait contradictoires nous ont amenés à mieux étudier le statut CDA des patients, qui pourrait constituer un facteur expliquant ces différences.

Le statut CDA a donc été évalué par deux approches : l'une fonctionnelle, consistant à mesurer l'activité de la CDA par spectrophotométrie, et l'autre génétique, visant à établir le génotype des patients pour les polymorphismes c.79A>C et c.-33_-31delC par analyse HRM.

Le premier patient, âgé de 84 ans, a reçu de l'azacytidine pour une leucémie myéloïde aiguë. Après la première cure, le patient développe des toxicités digestives, respiratoires et hématologiques (pancytopénie) très sévères. Après une aplasie de 30 jours malgré la mise sous facteurs hématopoïétiques de croissance, les cliniciens ont décidé d'arrêter le traitement par Vidaza®. Un mois plus tard, le patient était en rémission complète. Le phénotypage de la CDA a révélé que le patient était PM avec une activité de 1.79 U/mg, soit 50% plus basse que la moyenne enregistrée dans notre CHU (3.4 U/mg), et que ce déficit était associé au génotype homozygote C/C du polymorphisme c.79A>C.

Le second patient, quant à lui âgé de 80 ans et traité pour une leucémie myélomonocytaire chronique, a reçu de l'azacytidine associée à de l'hydroxyurée. Après deux cures complètes, aucune réponse n'est observée : à l'inverse, la pathologie a progressé. Les investigations menées sur ce patient ont montré que le patient était homozygote pour la délétion c.-33_-31delC, conduisant ainsi à une activité CDA trois fois plus importante que celle habituellement retrouvée (c.-à-d. 10.08 U/mg *versus* 3.4 U/mg).

Ces deux cas cliniques relatent le traitement de deux patients aux statuts CDA diamétralement opposés conduisant à deux issues cliniques contraires. Dans le premier cas, les toxicités très sévères inattendues engendrées par le traitement ont été associées à une rémission complète du patient en une seule cure, appuyant le fait que la diminution de l'activité CDA a surexposé le patient à l'agent anticancéreux. À l'inverse, le second patient a pu recevoir deux cures complètes de traitement sans présenter aucune toxicité, ni aucune efficacité, suggérant là aussi que le statut CDA, d'activité supérieure à la normale, a contribué à une sur-détoxification de l'azacytidine, et donc à une diminution de l'efficacité du traitement. Bien que devant faire l'objet d'études de confirmation sur des effectifs plus conséquents, ces cas suggèrent que le statut CDA et sa dérégulation pourraient avoir un impact majeur chez les patients traités par azacytidine.



Leucémie myéloïde aigüe

Syndrome myélodysplasique

AZACYTIDINE 75 mg/m²/j pendant 7 jours consécutifs tous les 28 jours

Rémission complète après une cure

Échec thérapeutique

INVESTIGATIONS RÉTROSPECTIVES SUR LE STATUT CDA

Activité CDA = 1,79 U/mg
Homozygote pour c.79A>C

Activité CDA = 10,08 U/mg
Homozygote pour c.-33_-31delC

Figure 23. Article IV

PUBLICATION IV

FIGURE 23

Yin and yang of cytidine deaminase roles in clinical response to azacitidine: a pharmacogenetics tale

Fwd: Pharmacogenomics - peer-reviewer's comments

From: **Sarah Jones** <s.jones@futuremedicine.com>
Date: 2015-08-28 12:49 GMT+02:00
Subject: Pharmacogenomics - peer-reviewer's comments
To: joseph.ciccolini@univ-amu.fr

Dear Dr Ciccolini,

I hope this e-mail finds you well. I am delighted to inform you that I have now received feedback from all of the independent peer reviewers on your manuscript for *Pharmacogenomics*.

I have attached a document titled '**peer review report'**. Please find included in the report:

- **Peer reviewer comments** (please outline your response to the peer review comments in the peer review report, i.e., listing the changes you have made, or your justification for any comments you have decided not to incorporate in a point by point manner)
- Information regarding *Future Medicine* **color charges**
- Information regarding *Future Medicine* **permissions**
- A link to the *Future Medicine* **author guidelines**
- A list of **authors and affiliations** – to be checked for accuracy

In addition, please also find attached a **copy of your manuscript** that was sent to the peer reviewers, which includes line numbers.

I would appreciate it if you could ensure that all of the above sections are addressed and completed before you send back the peer review report, along with your revised manuscript (in a separate document with highlighted or track changes) . I would be very grateful if you could submit by the 11th September. Please let me know if this is not suitable and we can discuss rescheduling.

If you have any questions or problems at all, please do not hesitate to contact me.

I would appreciate it if you could **email me to confirm that you have received this email**.

I look forward to hearing from you.

Kindest regards,

Sarah

Sarah Jones
Commissioning Editor
Future Medicine

part of future science group
Unitec House, 2 Albert Place, London, N3 1QB, UK
+44 (0)20 8371 6090 | www.futuremedicine.com

Interested in a **FREE TRIAL** to one of our journals? Contact info@futuremedicine.com quoting EML213X.

See your article online in as little as 6 weeks. Contact me to find out more about our accelerated publication service.

Future Medicine Ltd, Unitec House, 2 Albert Place, London, N3 1QB, UK (registered in England & Wales, No: 4059017); VAT No: GB 833 0029 67

YIN AND YANG OF CYTIDINE DEAMINASE ROLES IN CLINICAL RESPONSE TO AZACITIDINE IN THE ELDERLY: A PHARMACOGENETICS TALE

Word Count (main text only): 1365

Abstract

Azacitidine is a mainstay for treating haematological disorders. Azacitidine is metabolized by cytidine deaminase (CDA), coded by a highly polymorphic gene. Here we present two patients with opposite clinical outcomes after azacitidine treatment. First, an acute myeloid leukemia patient showed life-threatening toxicities, but outstanding complete remission, after a single round of azacitidine. Further investigations showed that this patient was *CDA 79A>C* homozygous with a deficient phenotype. Next, a chronic myelomonocytic leukemia patient displayed complete lack of response despite several cycles of azacitidine. This patient had a rapid-deaminator phenotype linked to the *-31delC* deletion.

CDA polymorphisms lead to opposite clinical outcomes in patients with myelodysplastic syndromes treated with azacitidine, thus suggesting that CDA status could help to forecast clinical outcome.

Keywords: azacitidine, cytidine deaminase, efficacy, toxicity, genetic polymorphism, myelodysplastic syndromes

.

Introduction

Demethylating agent azacitidine is indicated for treating frail patients with myelodysplastic syndromes who are not eligible for hematopoietic stem cell transplantation. In particular, azacitidine is now a mainstay in Acute Myeloid Leukaemia (AML) patients, including in the elderly [1-3]. Additionally, chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a clonal disorder of hematopoietic stem cells [4] whom treatment is still challenging with dismal prognosis and 20 months median survival; and azacitidine has recently shown significant efficacy in CMML patients, making this drug an interesting option in this disease [5]. Standard dosing and scheduling of azacitidine is 75 mg/m² daily over one week, administered as 28-days cycles, until disease progression or when severe toxicities occur. Drug-induced myelosuppression can sometime be severe with 30% of patients delaying treatment [6]. Age is a risk-factor because 13% of toxicity-related treatment discontinuation and 8% of fatal outcomes have been described in the elderly [7]. Azacitidine pharmacokinetics primarily depends on cytidine deaminase (CDA), the liver enzyme that detoxifies the drug by deamination. *CDA* gene is highly polymorphic, and CDA deficiency has been extensively studied as a risk for life-threatening toxicities with a variety of nucelosidic analogs such as gemcitabine, cytarabine [8,9] or azacitidine [10,11]. Of note, two opposite CDA status can be found [9, 12], depending on the underlying genetic polymorphisms: deficiency syndrome (i.e., with 79A>*C* or *208G>A* polymorphisms) or conversely CDA rapid-deaminator phenotype (i.e., with –*31delC* promoter deletion). Here, we present two CMML and AML elderly patients treated with standard azacitidine. Both patients showed outstanding clinical outcomes (i.e., life-threatening toxicities with complete response for one, and complete lack of response for the other one). Genetic and phenotypic investigations were therefore conducted on CDA as a possible culprit for the cases.

Report of Cases

Case-1: The first patient was a caucasian 84 years old man hospitalized for AML6 with haemoglobin 5.5 d/dL, leukocytes 3.54 G/L with 22% blasts, and platelets 40 G/L. After a first azacitidine cycle, this patient developed pancytopenia, acute respiratory distress, severe diarrhoea, grade-4 mucositis, aplasia and sepsis. Broad-spectrum antibiotherapy, and blood transfusion were initiated. Aplasia lasted 30 days, despite G-CSF support and symptomatic treatment. Despite the fact that azacitidine was discontinued after this only cycle, one month later complete remission was observed (i.e., 3% blast count with normal medullar activity, haemoglobin 9.5 d/dL, leukocytes 4.19 G/L with no blasts and platelets 223 G/L). To

understand this outstanding response, CDA status was investigated retrospectively following a double strategy. First, phenotype was established using a functional test by measuring spectrophotometrically secreted CDA activity in serum as a surrogate for CDA activity in liver [13]. Next, search for canonical genetic polymorphisms associated with CDA deficiency in caucasians (i.e., CDA 79A>C) was performed by high-resolution melting analysis (HRM). In this patient, CDA residual activity in serum was 1.74 U/mg, a value 50% lower than mean CDA activities usually recorded in our institution (Figure 1). Screening for genetic polymorphisms affecting CDA gene showed that this patient was homozygous indeed for the 79A>C polymorphism (rs2072671, Figure 2A).

Case-2: The second patient was a caucasian 80 years old man with CMML-1, displaying favourable IPSS but with rapid increase of WBC associated with thrombocytopenia aggravation. Patient was standardly treated with azacytidine and hydroxyurea. After 2 cycles of administration, no response was observed with increased peripheral blood counts up to 183 G/L. CMML progression was further characterized by hyperleukocytosis and acquisition of new cytogenetic abnormalities. This lack of efficacy led to stopping the treatment. Using the same methodology than described above, the patient was phenotyped as ultra-deaminator (CDA activity at 10.08 U/mg, i.e. 194% higher than mean CDA values, Figure 1). Next, search for genetic polymorphisms associated with CDA rapid-deaminator status (i.e., deletion on CDA promoter -31delC[12]) was performed by high-resolution melting analysis. HRM analysis confirmed that the ultra-metabolizer status observed in this second patient was associated with the homozygous deletion on –31delC (rs3215400, Figure 2B).

Discussion

Genetic polymorphisms affecting drug-metabolizing enzymes in the liver have been associated with increased risk for treatment-related toxicities for decades. Changes in DPYD, UGT1A1, or TPMT status are frequently reported as culprits for either severe or lethal toxicities with fluoropyrimidines, irinotecan or mercaptopurine, respectively, and screening for these polymorphisms is in full line with the current paradigm of precision medicine in oncology [14]. Cytidine deaminase (CDA) is the pivotal enzyme implicated in the liver disposition of a variety of nucleosidic analogs and to date, genetic polymorphisms affecting CDA gene have been extensively investigated with gemcitabine [8], although several clinical reports suggest that this could be an issue with capecitabine and cytarabine as well [15, 16]. CDA is implicated in the detoxification step of azacitidine, a cytotoxics with epigenetic mechanism of action that is widely used to treat a variety of myelodysplastic syndromes. Age

has been identified as a risk-factor for life-threatening toxicties with azacitidine [7], which can be an issue because myelodysplastic syndromes show more frequently in the elderly. In this respect, developing strategies to secure the administration of azacitidine in frail patients is a rising concern. Because no biomarker has been identified this far with this drug, identifying the possible causes for inter-individual variability in drug exposure should help to forecast changes in clinical outcome. Among the variety of endogenous and exogenous factors likely to interfere with drug disposition and distribution in the body, genetic polymorphisms affecting CDA could be critical determinants.

In this brief report we evidenced two opposite CDA status in two different caucasian patients showing totally contradictory clinical outcomes, both being treated with standard azacitidine for myelodysplastic syndromes. In the AML patient, CDA deficiency led to extremely severe toxicities including long-lasting aplasia and sepsis, but associated with outstanding complete remission. Of note, azacitidine is normally not expected to achieve such striking response in elderly patient, especially after only a single round of treatment [17,18]. This clinical observation is consistent with the hypothesis that *79A>C* genetic polymorphism and reduced CDA activity increased azacitidine exposure, thus leading to higher efficacy eventually. The relationship between CDA deficiency and increase in both toxicities and efficacy has been mostly evidenced with gemcitabine to date [19] and the exact relevance of the *79A>C* polymorphism the clinical outcome of patients treated nucleosidic analogs remains widely debated [20]. In the CMML patient, conversely, CDA rapid-deaminator status and *-31delC* genotype led to treatment failure despite two complete cycles (i.e., up to 14 injections) of azacitidine. Beside, no toxicities were observed either, an observation consistent with the hypothesis that high CDA activity probably detoxified most of the injected drug, thus impairing its efficacy while sparing patient from drug-related toxicity. To date, the relationship between CDA rapid-deaminator phenotype and treatment failure has been solely demonstrated with gemcitabine [21] and our present data strongly suggest that this could be an issue with azacitidine as well. Developing strategies to individualize dosing is a rising trend in clinical oncology. Biomarker-based medicine is mostly based upon the determination of genetic or molecular abnormalities at the tumor level, thus helping decision-making for treatment choices. To date, no such predictive markers have been described with widely prescribed azacitidine. Here, we show that germinal polymorphisms could be as important as somatic mutations to ensure a better efficacy/toxicity balance of this drug at bedside. Most patients with myelodysplastic syndromes scheduled for azacitidine treatment are elderly (median age range 65 to 75 years). In this respect, developing adaptive dosing strategies using CDA status as a covariate to tailor azacitidine dosing could help to ensure a better

safety when administrating this drug to frail populations. The limitations of this case series include a small sample size of 2 patients only and the fact that CDA status has been recorded retrospectively. To address these limitations, we aim to further investigate prospectively the potential of CDA status determination in larger cohort of patients scheduled for azacitidine treatment.

Future Perspectives

This brief report highlights how clinical outcome in azacitidine-treated patients could be strongly impacted by CDA genetic polymorphisms. In particular, this report suggests that beside genetic or molecular abnormalities at the tumor level, constitutive genetic polymorphisms affecting drugs pharmacokinetics could be used as biomarkers to personalize medicine. Further studies are warranted to confirm prospectively the relevance of CDA status as a biomarker to optimize the administration of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes, i.e. through adaptive dosing strategies based upon CDA genotype or phenotype to be used as covariate in a dosing algorithm. Beside the issue of securing the administration of azacitidine in the elderly, the recent approval of an oral form of azacitidine in paediatrics should prompt the physicians to screen for genetic polymrophisms prior to administrating this drug into children.

Executive Summary:

- Azacitidine is now a mainstay for treating myelodysplastic syndromes in the elderly.
- Azacitidine is a drug whom liver disposition depends on a deamination step driven by cytidine deaminase (CDA).
- *CDA* gene is highly polymorphic yielding opposite phenotypes (i.e., deficiency or ultra-deaminator syndromes).
- Opposite phenotypes have opposite impact on clinical outcome in azacitidine patients.
- Preliminary determination of CDA status should help to individualize treatment.

References

1. Kaur I, Constance JE, Kosak KM, Spigarelli MG, Sherwin CMT. An extensive PK, metabolic and toxicological review of elderly patients under intensive CT for AML. http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/.

2. Al-Ali HK, Jaekel N, Niederwieser D. The role of hypomethylating agents in the treatment of elderly patients with AML. *J Geriatr Oncol*. 5(1):89-105 (2014).

3. Wang ES. Treating acute myeloid leukemia in older adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 5(1):14-20 (2014).

4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Lyon. *IARC Press* (2008).

5. Germing U, Neukirchen J. How to treat patients with CMML? *Leuk Res.* 37(6):605-606 (2013).

6. Santini V, Fenaux P, Mufti G, *et al.* Management and supportive care measures for adverse events in patients with myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Eur J Haematol*. 85(2):130–138 (2010).

7. Seymour J, Fenaux P, Silverman L, *et al.* Effects of azacitidine compared with conventional care regimens in elderly (≥ 75 years) patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 76(3): 218–227 (2010).

8. Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, André N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing--time for a change? *Nat Rev Clin Oncol.* 8(7):439-444 (2011).

9. Serdjebi C, Milano G, Ciccolini J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 13:1-8 (2014). * : this review encapsulates the clinical data made available regarding the impact of CDA genetic polymorphism on the efficacy/toxicity of a variety of nucleosidic analogs.

10. Fanciullino R, Serdjebi C, Mollard S, *et al.* Abstract 2208- Cytidine deaminase deficiency and severe toxicities upon aza-cytidine intake: Clinical observations and experimental evidences. *Clin Cancer Res.* 73:2208 (2013).

11. Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahem Q, *et al.* Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. *Clin Cancer Res.* 19(4):938-948 (2013).

12. Caronia D, Martin M, Sastre J, *et al.* A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Clin Cancer Res.* 17(7):2006-2013 (2011). **: this study shows for the first time that the -31delC

deletion on the CDA promoter is associated with decreased activity and impact on clinical outcome.

13. Ciccolini J, Dahan L, André N, *et al.* Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J Clin Oncol.* 28(1):160-165 (2010). **: this study shows how a simple surrogate test for establishing CDA status allows to sort patients on their probability to experience or not severe toxicities upon gemcitabine.

14. André F, Ciccolini J, Spano JP, *et al.* Personalized medicine in oncology: where have we come from and where are we going? *Pharmacogenomics* 14(8):931-9 (2013).

15. Ciccolini J, Evrard A, M'Batchi L, *et al.* CDA deficiency as a possible culprit for life-threatening toxicities after cytarabine plus 6-mercaptopurine therapy: pharmacogenetic investigations. Pharmacogenomics13(4):393-7 (2012).

16. Dahan L, Ciccolini J, Evrard A, *et al.* Sudden death related to toxicity in a patient on capecitabine and irinotecan plus bevacizumab intake: pharmacogenetic implications. J Clin Oncol. 30(4):e41-4 (2012).

17. Lao Z, Yiu R, Wong GC, Ho A. Treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia with azacitidine results in fewer hospitalization days and infective complications but similar survival compared with intensive chemotherapy. *Asia Pac J Clin Oncol.* 11(1):54-61 (2015).

18. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, *et al.* Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 10(3): 223–232 (2009).

19. Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M, *et al.* Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. 23(3):670-7 (2012).

20. Giovannetti E, Tibaldi C, Falcone A, *et al.* Impact of cytidine deaminase polymorphisms on toxicity after gemcitabine: the question is still ongoing. *J Clin Oncol*. 28(14):e221-2 (2010).

21. Serdjebi C, Seitz JF, Ciccolini J, *et al.* Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. Pharmacogenomics. 14(9):1047-51 (2014).

Figure 1

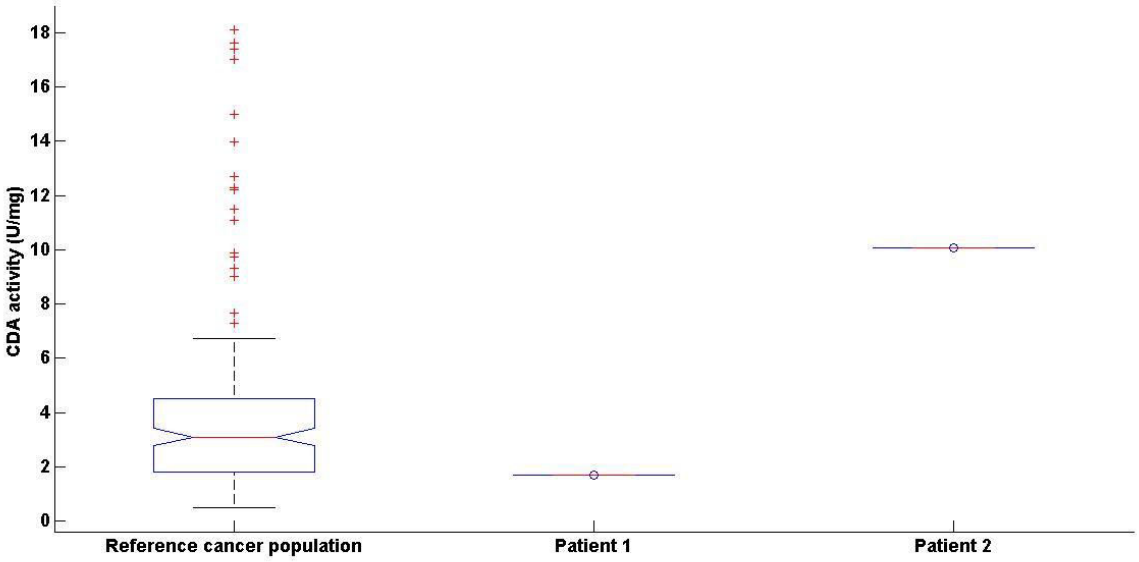


Figure 1 : CDA Phenotypic analysis of the patients. Patient 1 (AML) who displayed life-threatening toxicities with complete remission after a single round of azacitidine is considered as CDA deficient, whereas Patient 2 (CMML) who had no toxicities and progressive disease despite 2 cycles of azacitidine is considered as rapid-deaminator.

Figure 2

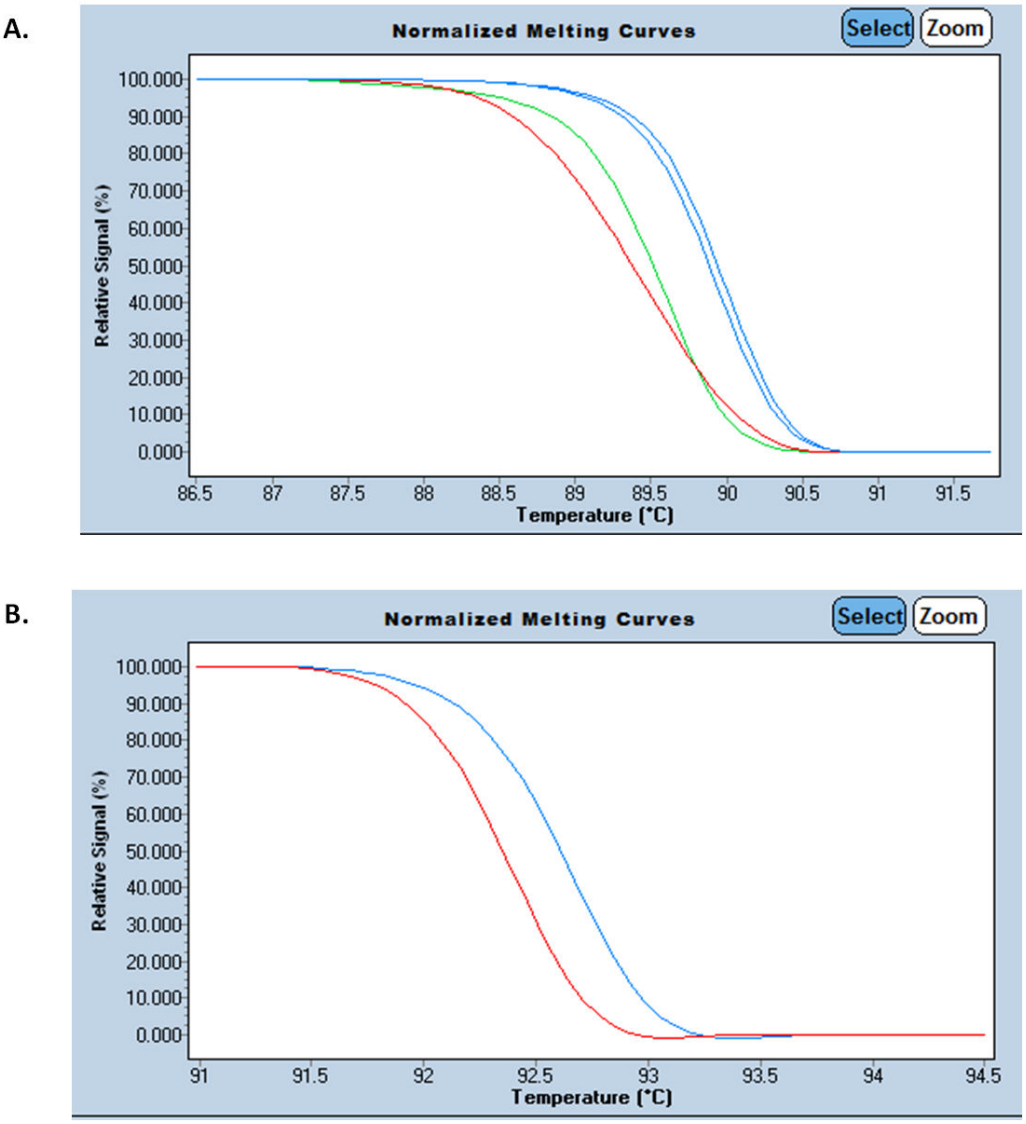


Figure 2. HRM analysis of *CDA* polymorphisms in patients with hematological disorders. **A.** HRM analysis for 79A>C (rs2072671) in the AML patient. The right double curve stands for the homozygous mutated standard and the patient, whereas the parallel curve in the middle represents the wild-type standard. The third curve on the left stands for the heterozygous standard. **B.** HRM analysis for -31delC (rs3215400) in the CMML patient The left curve represents the wild type standard and the curve on the right is the melting curve of the patient. The data suggest that the patient carry the homozygous mutated genotype.

IV INFLUENCE DU STATUT CDA SUR LES TOXICITÉS ET LA PHARMACOCINÉTIQUE CHEZ LES PATIENTS TRAITÉS PAR GEMCITABINE SEULE OU EN ASSOCIATION (Articles V, VI et VII)

Dans cette quatrième section, nous étudions plus en profondeur la relation qu'il existe entre le statut CDA et les thérapies à base de gemcitabine. À travers les trois articles suivants, nous étudions le rôle du statut CDA, évalué par deux approches différentes et complémentaires que sont l'approche fonctionnelle et le génotypage, sur l'issue clinique (efficacité/toxicité) des patients traités par gemcitabine. Nous décrivons également la pharmacocinétique de la gemcitabine et de son métabolite grâce au développement d'un modèle de pharmacocinétique de population.

1 STATUT UM CDA ET ÉCHEC THÉRAPEUTIQUE SOUS GEMCITABINE

La gemcitabine constitue un agent anti-cancéreux incontournable dans la prise en charge des cancers du pancréas et des voies biliaires, malgré une efficacité limitée en monothérapie. Le métabolisme de la gemcitabine étant très fortement dépendant de la CDA, une diminution de l'activité enzymatique de celle-ci est associée à une augmentation du risque de développer des toxicités sévères pour les patients. En théorie, les patients au statut UM au regard de la CDA présentent, eux, un risque plus élevé d'échappement thérapeutique par sous-exposition à la chimiothérapie. Cette étude préliminaire visait à évaluer si les patients avec un phénotype UM ont plus de risque d'échapper à un traitement par gemcitabine.

Cette étude-pilote rétrospective a regroupé 40 patients traités par gemcitabine dans le cadre de la prise en charge de cancers du pancréas avancés. Les patients recevaient tous la gemcitabine en perfusion d'une heure à la dose de 1000 mg/m², seule ou en association à l'oxaliplatine selon les recommandations en vigueur. La réponse thérapeutique à 3 mois était évaluée selon les critères RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) usuels. Le statut CDA a été établi après mesure de l'activité enzymatique par spectrophotométrie et recherche de deux polymorphismes (c.79A>C et c.208G>A) par analyse HRM.

Chez les 40 patients, 8 (20%) ont été identifiés comme UM. D'autre part, la CDA était significativement plus élevée chez les patients ayant progressé que chez les patients dont la maladie était contrôlée, suggérant un manque d'efficacité de la gemcitabine par diminution de l'exposition des patients au médicament. De plus, les patients avec une activité CDA élevée ont également présenté moins de toxicités que les autres patients. Aucun patient ne portait de

variant pour le polymorphisme c.208G>A, alors que 47% des patients étaient hétérozygotes pour la variant c.79A>C, avec cependant aucune conséquence sur l'activité CDA.

Cette étude-pilote a été réalisée sans restriction d'inclusion, chez des patients traités par différentes thérapies à base de gemcitabine afin d'éprouver la pertinence d'évaluer le statut CDA dans des conditions cliniques réelles. Les premières données issues de l'étude sur une petite cohorte de patients suggèrent que l'activité CDA peut constituer un marqueur d'efficacité sous gemcitabine, et que la surcapacité des patients à métaboliser un médicament est un facteur à prendre en compte dans l'individualisation des traitements. Il aurait été intéressant de rechercher la délétion c.-33_-31delC sur le promoteur, responsable d'une augmentation de l'expression de la CDA, mais ce n'était pas possible au moment de l'étude.



X40 patients atteints d'adénocarcinome pancréatique avancé

Traitement par GEMCITABINE 1000mg/m²
seule ou en association

GÉNOTYPAGE & PHÉNOTYPAGE CDA

> 6 U/mg

< 6 U/mg

EFFICACITÉ (RECIST) + TOXICITÉ (NCI-CTC)

Figure 24. Article V

PUBLICATION V

FIGURE 24

Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen

Background: Gemcitabine is a mainstay in the treatment of biliary and pancreatic cancers, with limited efficacy in most settings. The gemcitabine elimination pattern is primarily driven by deamination in the liver by CDA. CDA is affected by genetic polymorphisms, leading to marked variations in activity and, subsequently, to erratic drug plasma exposures in patients administered with standard dosage. CDA deficiency has been a rising concern with gemcitabine since several studies have proven that poor metabolizer patients experience life-threatening toxicities upon drug intake. In theory, ultrarapid metabolizer (UM) patients should be conversely at risk of treatment failure, although thus far few studies have addressed this issue in digestive oncology. **Patients & methods:** A pilot study was conducted on 40 pancreatic cancer patients, all treated with gemcitabine-based therapy. CDA status was primarily established on a phenotypic basis determined by measurement of residual CDA enzymatic activity in serum. Additionally, a search for c208G>A and c79A>C polymorphisms was carried out. **Results:** No patients carrying c208G>A polymorphisms were found, and only heterozygous c79A>C patients were observed. Eight out of the 40 patients (i.e., 20%) were identified as UM, with CDA activities over 6 U/mg. CDA activity was significantly different between progressive disease patients and patients with controlled disease (8.4 vs 3 U/mg; $p < 0.001$). Conversely, fewer gemcitabine-related severe toxicities were observed in UM patients. **Conclusion:** This pilot study strongly suggests that UM patients are nearly five-times more likely to have progressive disease than patients with normal or low CDA activities, and that beside molecular events at the tumor level, upstream deregulations affecting drug disposition should be taken into account.

Original submitted 12 March 2013; Revision submitted 3 May 2013

KEYWORDS: cytidine deaminase ▪ efficacy ▪ gemcitabine ▪ genetic polymorphism ▪ pancreatic cancer

Cindy Serdjebi[1,2], Jean-François Seitz[3], Joseph Ciccolini*[1,2], Muriel Duluc[3], Emmanuelle Norguet[3], Frédéric Fina[1], Bruno Lacarelle[2], L'Houcine Ouafik[1] & Laetitia Dahan[3]

[1]Transfer Oncology Laboratory, Nord University Hospital of Marseille, Inserm S_911 CRO2, Aix-Marseille University, Marseille, France
[2]Clinical Pharmacokinetics Laboratory, La Timone University Hospital of Marseille, Inserm S_911 CRO2, Aix-Marseille University, Marseille, France
[3]Digestive Oncology Unit, La Timone University Hospital of Marseille, APHM, France
**Author for correspondence: joseph.ciccolini@univ-amu.fr*

Gemcitabine remains a mainstay for treating patients with pancreatic cancer, despite limited efficacy. Understanding resistance to gemcitabine is therefore an issue, and several studies have focused on tumor-level impaired drug transport (i.e., hENT1, hCNT3), lack of activation towards active metabolites, high intratumoral catabolism, polymorphisms affecting the ribonucleotide reductase target or hedgehog-related changes in tumor stroma [1]. At the constitutional level, genetic polymorphisms affecting the gene coding for CDA, the enzyme responsible for the deactivation of gemcitabine into inactive deoxyfluorodeoxyuridine in the liver, has been a rising concern because it has been associated with increased risk of severe toxicities [2,3]. The *CDA* gene is affected by several genetic polymorphisms, leading to marked variations in function ranging from quasi null activity (poor metabolizer [PM] patients) to increased activity (ultrarapid metabolizer [UM] patients). Several SNPs have been identified as putatively responsible for CDA deficiency (i.e., c79A>C, rs2072671 [2] and c208G>A, rs60369023 [3]). Conversely, it has recently been hypothesized that the deletion at the -31 position in the promoter region (rs3215400) could be associated with increased CDA expression [4], although contradictory results have been published ever since [5,6]. Genotype-to-phenotype relationships with CDA have been widely debated [7–9]. However, it has been repeatedly demonstrated by independent groups that patients with impaired CDA always present a higher risk of severe and sometimes lethal toxicities upon gemcitabine-based treatment [7,10,11]. Of note, when studying the general distribution of CDA activities among patients, a subset display CDA activities markedly higher (i.e., >6 U/mg) than the rest of the population [7]. In theory, these rapid deaminator patients (also known as UMs) should over-metabolize standard gemcitabine, and thus be prone to treatment failure because of the resulting low drug concentrations. In this preliminary study, we measured CDA activities in a group of patients with pancreatic cancer

Future Medicine part of fsg

scheduled for gemcitabine-based therapy, so as to test the hypothesis that UM status could be associated with treatment failure.

Patients & methods

Patients & sampling

Patients included this study were hospitalized in the Digestive Oncology Unit of La Timone University Hospital of Marseille, France, between October 2005 and October 2008. Patients were treated for advanced biliary pancreatric cancers and infused for 1 h with a standard dose of 1000 mg/m² of gemcitabine alone (23 patients) or in combination, mostly with oxaliplatin (seven patients) and sorafenib (five patients). Responses were monitored at 3 months following standard RECIST criteria. All patients had a single 2-ml blood sample withdrawn out of the gemcitabine infusion. Serum fraction and cell pellet were then stored at -80°C until analyzed. Written informed consent was obtained prior to sampling.

CDA genetic polymorphisms screening

We screened c79A>C and c208 G>A polymorphisms on the *CDA* gene after standard DNA isolation from whole-blood cells. The assay was performed using high-resolution melting quantitative PCR technology, based on the determination of the melting temperature of double-stranded DNA saturated with fluorophores. The PCR and the analysis were carried out using the LightCycler 480® technology (Roche, France).

CDA functional status determination

CDA status was evaluated by measuring residual enzymatic activity in serum by using a previously developed test [7,10]. Briefly, CDA activity was measured using an *ex vivo* procedure carried out from 20 µl of serum. Patient samples were incubated overnight with cytidine, and subsequent release of ammonium was measured spectrophotometrically using a microplate reader. CDA activity was expressed as U/mg proteins, and based upon a previous population study performed on 226 adult patients with cancer, UM profile was defined as individuals displaying CDA activities >6 U/mg [Ciccolini J, Unpublished Data].

Results

Patients

A total of 40 adult Caucasian patients (19 females/21 males; 61 ± 11 years old) were included in this study. Among the patients, 11 showed progressive disease (PD; 26%), six showed partial responses and the remaining 23 displayed stable disease. All patients were sampled for both genotypic and phenotypic determination of CDA status.

CDA genetic polymorphisms screening

No patient was homozygous for the c79A>C polymorphism, whereas 19 out of 40 (47%) were found to be heterozygous. No patients bearing the c208G>A polymorphism were found in this subset (data not shown). Genetic status for c79A>C (e.g., wild-type and heterozygous) had no impact on CDA activities (data not shown).

CDA phenotype & clinical outcome

Mean CDA activity in the 40-patient subset was 4.5 ± 3.9 U/mg (range: 0.8–17), median: 3.4 U/mg. There was no difference in CDA activities between this 40-patient subset and a previously published reference population (3.9 ± 3.6 U/mg, n = 226; p = 0.46 Rank Sum test). Eight out of 40 patients (20%) were identified as UM, with residual serum CDA activity ≥6 U/mg. Six out of these eight patients (i.e., 75%) showed PD. Conversely, only five out of 32 patients (i.e., 16%) not identified as UM had PD (Table 1). CDA activity was significantly different between PD patients (8.4 U/mg) and patients with controlled disease (3 U/mg; p < 0.001, Mann–Whitney Rank Sum test; Table 2). One-way ANOVA confirmed that CDA was different between PD patients and both partial response and stable disease patients (p < 0.05). The proportion of patients with PD was five-times higher in UM patients than in non-UM patients (Table 1 & Figure 1). Furthermore, monitoring of treatment-related side effects showed that severe toxicities (i.e., grade 3 and above, Common Toxicity Criteria [CTC] grading) were primarily neutropenia (non-UM: 18%; UM: 12.5%), leukopenia (non-UM: 18%; UM: 12.5%), thrombopenia (non-UM: 3.1%; UM: 0%) and diarrhea (non-UM: 3.1%; UM: 0%).

Discussion

Moving towards personalized medicine is an ongoing story in clinical oncology. Numerous attempts to identify biomarkers likely to be used for anticipating the clinical outcome of anticancer drugs have been published [12]. Despite limited efficacy, gemcitabine is the backbone of most regimens in patients with pancreatic cancer [13], and even the latest therapeutic innovations

such as nab-paclitaxel must be used in association with this nucleoside analog [14]. Most studies attempting to identify causes for low gemcitabine efficacy have focused on molecular deregulations in tumors, and a variety of changes affecting drug transport, intratumoral activation and interaction with ribonucleotide reductase have already been identified as possible causes for this lack of efficacy, both *in vitro* and in patients. Here, our aim was to investigate whether, aside from molecular and genetic events at the tumor level, upstream deregulation affecting drug disposition could also play a role in the clinical outcome of gemcitabine. To this end, we have developed a simple and rapid surrogate test to establish a patient's constitutional CDA status from a single blood sample. This test was initially developed and validated as a predictive tool to identify PM patients, because several clinical reports have demonstrated that impaired CDA function was predictive of life-threatening toxicities with gemcitabine. However, we had observed previously that in addition to the PM individuals with reduced CDA activity, a subset of patients displayed CDA activities much higher than the average values and thus could be considered as rapid deaminator or UM patients [7]. To date, it has been demonstrated that being an UM patient was associated with a risk of lethal toxicities upon capecitabine intake [15], because CDA is a critical step in the activation process of capecitabine to 5-fluorouracil in the liver. In theory, whereas PM patients are prone to be overexposed with subsequent increased toxicities with gemcitabine, UM patients are conversely likely to be underexposed, with eventual reduced efficacy. Our pilot study was designed to test this hypothesis, and strongly suggests that there is indeed a markedly higher proportion of PD patients in the subset of patients displaying higher CDA activities. Genotype studies have been undertaken and have failed to provide any clinically relevant additional information. Of note, it was not possible during this study to search for the -del31C polymorphism in the promoter region of the *CDA* gene, which has recently been described as possibly driving overexpression of the enzyme [4]. Unfortunately, this polymorphism was not yet known when genotyping our patients, and owing to the 100% mortality rate in pancreatic cancer and the fact that no spare DNA was available, it was not possible to further search for this deletion. However, because clinical relevance of our functional approach has been repeatedly demonstrated [7], including the sorting of patients with contradictory *CDA* genotypes [6,15], we believe that, despite the lack of additional genetic data to support the UM phenotype, the relationship we have evidenced between UM patients and poor clinical outcome with gemcitabine is of major interest. Because of the small number of patients, both stabilized and responding patients were grouped as 'controlled disease' prior to statistical analysis. Still, it was not possible to run a standard χ^2 test, therefore Mann–Whitney testing and further one-way ANOVA were used instead. These tests confirmed that CDA activities were different between patients with PD and patients with controlled disease. Our data are in agreement with the study by Tibaldi *et al.* in patients with non-small-cell lung cancer [16] and with the study by Bengala *et al.* in pancreatic cancer patients [17]. However, in our study CDA status was measured using a simplified surrogate test, requiring only 20 µl of serum, and a simple analytical procedure, whereas CDA testing was previously based upon more complex and time-consuming chromatographic methods. Besides the issue of differences in efficacy depending on CDA status, our pilot study also suggests that UM patients were less likely to undergo severe gemcitabine-related toxicities than patients with normal or reduced CDA activity, an observation fully consistent with the role CDA plays in the detoxification pattern of this drug. This finding is fully in line with our previous clinical reports showing that the lower the CDA activity, the higher the risk of experiencing life-threatening toxicities upon gemcitabine intake [7]. Although these findings should be replicated in larger

Table 1. Disease status according to the ultrarapid metabolizer versus non-ultrarapid metabolizer status in CDA.

	UM (>6 U/mg)	Non-UM (<6 U/mg)
Patients	8 (20)	32 (80)
Progressive disease	6 (75)	5 (16)
Stable disease	1 (12.5)	22 (68)
Partial response	1 (12.5)	5 (16)

All values are presented as n (%).
UM: Ultrarapid metabolizer.

Table 2. Residual CDA activity according to the disease status.

	PD	PR	SD	Controlled (PR + SD)
Patients (n)	11	6	23	29
CDA (U/mg)	8.4	3.0	3.0	3.0
Standard deviation	5.2†‡	2†‡	1.9†‡	1.9‡

CDA activities were found to be significantly higher in patients with progressive disease.
†$p < 0.05$ (one-way ANOVA with Dunnet's multiple comparison testing).
‡$p < 0.001$ (Mann–Whitney test).
PD: Progressive disease; PR: Partial response; SD: Stable disease.

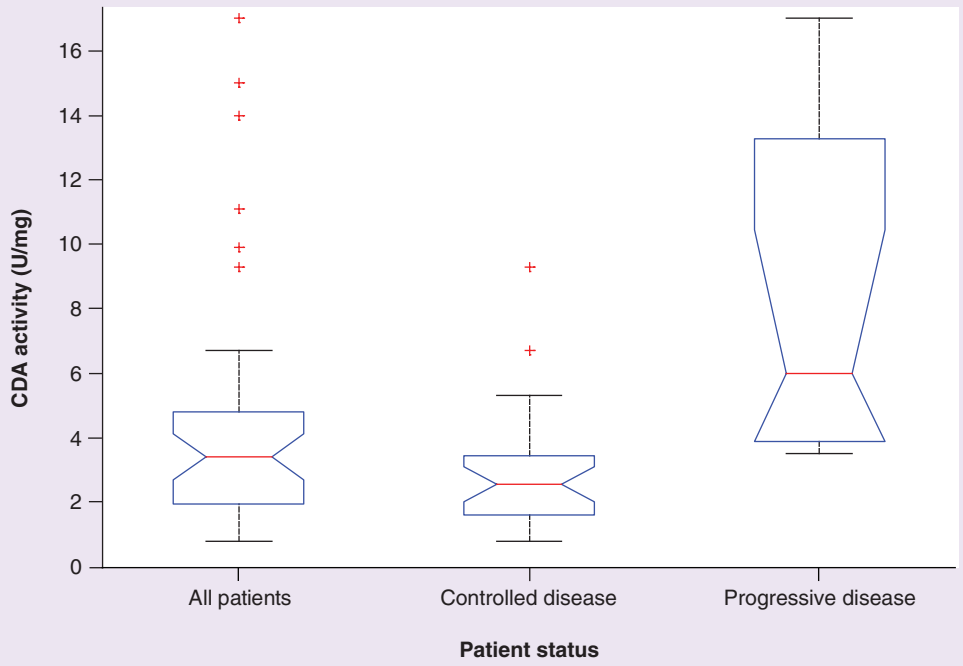


Figure 1. CDA activity according to disease status in patients.

studies for confirmation, preliminary observations collected from a small subset of patients (i.e., 40 individuals) suggest that beside critical pharmacogenomic issues at the tumor level, constitutive deregulations and erratic pharmacokinetics could also be a major concern for explaining gemcitabine low efficacy. Unlike deregulations at the tumor level (e.g., loss of hENT1 or hCNT3 expression) that leave few options other than stopping gemcitabine, identifying constitutive deregulation affecting CDA and subsequently drug pharmacokinetics could be next used as part of an adaptive dosing strategy [16].

Future perspective

Gemcitabine is a widely prescribed antimetabolite, and several studies in the past have identified a variety of molecular and genetic changes in the tumors associated with a decrease in anticancer efficacy. In this pilot study, we have observed that regardless of tumor characteristics, CDA activity and in particular UM status found in 20% of patients is associated with a small chance of clinical benefit from gemcitabine. Although larger, controlled studies are required to further confirm the imputability of treatment failure to, at least in part, CDA UM profile, this preliminary report advocates for the development of pretherapeutic testing at the bedside of patients scheduled for gemcitabine-based regimen. In the future, an algorithm should help to tailor gemcitabine dosage (i.e., increasing drug dosage in UM patients, and decreasing it in PM patients), so as to ensure maximum efficacy while reducing the risk of toxicity.

Executive summary

- The antimetabolite gemcitabine is widely prescribed in clinical oncology, primarily for treating pancreatic cancer.
- It is fully acknowledged that gemcitabine efficacy remains limited, and therefore that pancreatic cancer still presents a dismal prognosis.
- Gemcitabine pharmacokinetics are erratic, and deregulations affecting CDA, the liver enzyme responsible for its metabolism to an inactive metabolite, could have an impact on treatment efficacy.
- In this preliminary study, we investigated whether patients displaying CDA ultrarapid metabolizer status had a worse clinical outcome upon gemcitabine treatment, as compared with patients with normal or low CDA activities.
- It was found that patients with higher CDA activities were five-times more at risk of having progressive disease than patients with normal or low CDA activities.
- Although preliminary, this article suggests that beside molecular and genetic events affecting gemcitabine efficacy at the tumor level, upstream, constitutional deregulations impacting on drug disposition and pharmacokinetics should be screened so as to better anticipate clinical response and to personalize treatments in pancreatic cancer.

Disclosure

This work was presented, in part, at the ASCO-GI Meeting, Orlando, FL, USA, 2010 (Abstract e14558).

Financial & competing interests disclosure

J Ciccolini, M Duluc, LH Ouafik and J-F Seitz (Aix Marseille University, APHM,) are listed as coinventors of the CDA functional test described in this study (patent US 20130011392 A1 published on 10 January 2013). C Serdjebi received a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), grant # FDM20120624035 The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

References

1 Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, Andre N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing – time for a change? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8(7), 439–444 (2011).

2 Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E *et al.* Correlation of *CDA*, *ERCC1*, and *XPD* polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 14(6), 1797–1803 (2008).

3 Yonemori K, Ueno H, Okusaka T *et al.* Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin. Cancer Res.* 11(7), 2620–2624 (2005).

4 Caronia D, Martin M, Sastre J *et al.* A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand–foot syndrome. *Clin. Cancer Res.* 17(7), 2006–2013 (2011).

5 Ciccolini J, Evrard A, Lacarelle B. A *CDD* polymorphism as predictor of capecitabine-induced hand–foot syndrome – letter. *Clin. Cancer Res.* 18(1), 317 (2012).

6 Ciccolini J, Evrard A, M'Batchi L *et al.* CDA deficiency as a possible culprit for life-threatening toxicities after cytarabine plus 6-mercaptopurine therapy: pharmacogenetic investigations. *Pharmacogenomics* 13(4), 393–397 (2012).

7 Ciccolini J, Dahan L, Andre N *et al.* Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J. Clin. Oncol.* 28(1), 160–165 (2010).

8 Mercier C, Dahan L, Ouafik L, Andre N, Ciccolini J. Letter to the editor: pharmacokinetics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer patients: impact of the 79A>C cytidine deaminase polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66(9), 959–960 (2010).

9 Giovannetti E, Tibaldi C, Falcone A, Danesi R, Peters GJ. Impact of cytidine deaminase polymorphisms on toxicity after gemcitabine: the question is still ongoing. *J. Clin. Oncol.* 28(14), e221–e222; author reply e223–e225 (2010).

10 Mercier C, Raynal C, Dahan L *et al.* Toxic death case in a patient undergoing gemcitabine-based chemotherapy in relation with cytidine deaminase downregulation. *Pharmacogenet. Genomics* 17(10), 841–844 (2007).

11 Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR *et al.* Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J. Clin. Oncol.* 25(1), 32–42 (2007).

12 Andre F, McShane LM, Michiels S *et al.* Biomarker studies: a call for a comprehensive biomarker study registry. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8(3), 171–176 (2011).

13 O'Reilly EM. Adjuvant therapy for pancreas adenocarcinoma. *J. Surg. Oncol.* 107(1), 78–85 (2013).

14 von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ *et al.* Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a Phase I/II trial. *J. Clin. Oncol.* 29(34), 4548–4554 (2011).

15 Dahan L, Ciccolini J, Evrard A *et al.* Sudden death related to toxicity in a patient on capecitabine and irinotecan plus bevacizumab intake: pharmacogenetic implications. *J. Clin. Oncol.* 30(4), e41–e44 (2012).

16 Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M *et al.* Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* 23(3), 670–677 (2012).

17 Bengala C, Guarneri V, Giovannetti E *et al.* Prolonged fixed dose rate infusion of gemcitabine with autologous haemopoietic support in advanced pancreatic adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 93(1), 35–40 (2005).

2 ESSAI CLINIQUE PROSPECTIF FFCD-1004

Tous les exemples précédents constituent autant de preuves que le statut CDA, déterminé par une approche fonctionnelle ou génotypique, pourrait être un biomarqueur de la toxicité mais également de l'efficacité des traitements par certains analogues nucléosidiques. Toutefois, ces essais étaient monocentriques, rétrospectifs, et de ce fait, présentent un niveau de preuve médiocre.

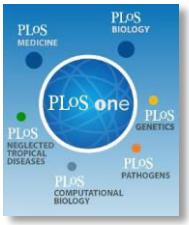
De nombreuses études se sont penchées sur l'influence du statut CDA sur l'issue clinique des patients. Mais, à l'heure actuelle, les données existantes restent contradictoires et n'ont pas permis d'établir des recommandations claires quant à la conduite à tenir en cas de traitement par analogues nucléosidiques dépendant de la CDA dans leur profil ADME. Les recherches menées jusqu'alors n'ont pas entièrement étudié de façon globale et intégrative les relations qu'il peut exister entre les statuts fonctionnel et génétique de la CDA, la pharmacocinétique et l'issue clinique chez les patients traités par gemcitabine. Ici, nous avons réalisé une étude multicentrique prospective visant à étudier l'influence d'une déficience en CDA sur l'apparition des toxicités mais également sur la pharmacocinétique de la gemcitabine et de son métabolite, de façon prospective et dans un cadre multicentrique.

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la capacité du statut CDA à prédire l'apparition de toxicités hématologiques sévères et précoces sous gemcitabine. Les objectifs secondaires étaient d'évaluer la capacité de ce même statut à prédire l'apparition des toxicités non hématologiques sévères et précoces ainsi que l'apparition des toxicités hématologiques sur l'ensemble du traitement. D'autre part, nous voulions étudier la pharmacocinétique de la gemcitabine et de son métabolite, ainsi qu'étudier les relations entre le génotype et l'activité CDA. Enfin, nous avons également exploré le potentiel rôle pronostic de la CDA.

Cet essai multicentrique prospectif a été réalisé chez des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique réséqué, éligibles à un traitement adjuvant par gemcitabine en monothérapie, à la dose de 1000 mg/m². Les toxicités ont été gradées selon le NCI-CTC (*National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Effect*). Le statut CDA a été évalué chez l'ensemble des patients par une mesure fonctionnelle de l'activité enzymatique par spectrophotométrie, et par la recherche du polymorphisme c.79A>C par analyse HRM (**Annexe 4**). Une étude pharmacocinétique a été proposée aux patients, lors de la première administration de gemcitabine, selon un protocole d'échantillonnage limité (*Limited sampling strategy* LSS) : un prélèvement avant perfusion, à la fin de la perfusion, ainsi que 90 et 120 minutes après la fin de la perfusion. Pour mesurer les taux plasmatiques de gemcitabine et de dFdU, une méthode par LC-MSMS a été développée et validée spécifiquement dans ce but (**Annexe 5**).

Cent vingt patients ont été inclus dans cet essai, provenant de 31 centres différents, localisés en France. Vingt-cinq patients ont déclaré des toxicités hématologiques sévères et précoces (THSP), 5 patients étaient PM pour la CDA (4.3%), dont seulement un avec des THSP. Tous les patients possédaient une CRP inférieure à 20 mg/L (sans influence *a priori* sur l'activité CDA) et l'activité CDA n'était pas significativement différente chez les patients ayant présenté des THSP, et ceux qui ont bien toléré le traitement. D'autre part, l'apparition des toxicités ne semblait pas non plus être corrélée à la présence du polymorphisme c.79A>C, et l'activité CDA était similaire entre les patients mutés (homozygotes et hétérozygotes) et les non-mutés. L'étude pharmacocinétique de la gemcitabine et de son métabolite a permis de mettre en évidence une grande variabilité inter-individuelle en terme d'exposition. Enfin, l'âge et le stade de la maladie au diagnostic ont été identifiés comme marqueurs pronostiques de la survie globale chez les patients, alors que le statut CDA n'avait aucune influence sur la survie globale.

Cet essai clinique est la première étude prospective à examiner l'influence du statut CDA depuis les phénomènes génétiques, jusqu'à l'issue clinique en passant par l'exposition des patients sous gemcitabine. Malgré une cohorte de 120 patients, un nombre insuffisant de patients PM pour la CDA a été inclus, conduisant ainsi à la possibilité de réaliser des tests statistiques de puissance suffisante. En effet, seulement 4,3% des patients étaient PM contre 7% attendus, selon les données rétrospectives recueillies dans la littérature ou dans notre propre institution. L'absence de significativité de cet essai souligne la difficulté de prouver l'utilité clinique de la mise en pratique d'un test pharmacogénétique, visant à stratifier les patients selon leur capacité métabolique pour individualiser les thérapies.



X120 patients atteints d'adénocarcinome pancréatique réséqué

Traitement par GEMCITABINE 1000mg/m²
+
Dosage de la gemcitabine et dFdU par LC-MSMS

PHÉNOTYPAGE CDA

GÉNOTYPAGE *CDA*

c.79A>C

<1,3 U/mg | >1,3 U/mg | HMZ | HTZ | WT

TOXICITÉ (NCI-CTC)

Figure 25. Article VI

PUBLICATION VI

FIGURE 25

FFCD-1004 clinical trial: impact of cytidine deaminase activity on clinical outcome in gemcitabine-monotherapy treated patients

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

FFCD-1004 Clinical Trial: Impact of Cytidine Deaminase Activity on Clinical Outcome in Gemcitabine-Monotherapy Treated Patients

Cindy Serdjebi[1]*, Johan Gagnière[2], Jérôme Desramé[3], Francine Fein[4], Rosine Guimbaud[5], Eric François[6], Thierry André[7], Jean-François Seitz[8], Carole Montérymard[9], Dominique Arsene[10], Julien Volet[11], Abakar Abakar-Mahamat[12], Thierry Lecomte[13], Véronique Guerin-Meyer[14], Jean-Louis Legoux[15], Gaël Deplanque[16], Pierre Guillet[17], Joseph Ciccolini[1], Côme Lepage[18], Laetitia Dahan[8]

1 SMARTc, CRO2 INSERM UMR S_911, Marseille, France, **2** University Hospital of Clermont Ferrand, Clermont Ferrand, France, **3** Center Jean Mermoz, Lyon, France, **4** University Hospital of Besançon, Besançon, France, **5** University Hospital of Toulouse, Toulouse, France, **6** Center Antoine Lacassagne, Nice, France, **7** University Hospital of Saint-Antoine and Pierre et Marie Curie, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France, **8** University Hospital of La Timone, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Marseille, France, **9** Fédération Francophone de Cancérologie Digestive FFCD, Dijon, France, **10** University Hospital of Caen, Caen, France, **11** University Hospital of Reims, Reims, France, **12** University Hospital of Nice, Nice, France, **13** University Hospital of Tours, Tours, France, **14** University Hospital of Angers, Angers, France, **15** Regional Hospital of Orleans, Orleans, France, **16** St Joseph Hospital, Paris, France, **17** Hospital of Toulon, Toulon, France, **18** University Hospital of Dijon, Dijon, France

* cindy.serdjebi@univ-amu.fr

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Serdjebi C, Gagnière J, Desramé J, Fein F, Guimbaud R, François E, et al. (2015) FFCD-1004 Clinical Trial: Impact of Cytidine Deaminase Activity on Clinical Outcome in Gemcitabine-Monotherapy Treated Patients. PLoS ONE 10(8): e0135907. doi:10.1371/journal.pone.0135907

Editor: Robert K Hills, Cardiff University, UNITED KINGDOM

Received: April 29, 2015

Accepted: July 27, 2015

Published: August 26, 2015

Copyright: © 2015 Serdjebi et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Cindy SERDJEBI received two grants from the Fondation pour la Recherche Médicale: FDM20140629931 and FDM20120624035. Furthermore, the clinical study was supported by the Fédération Francophone de Cancérologie Digestive (www.ffcd.fr/). The organization participated in study design, data collection and analysis, and preparation of the manuscript.

Abstract

Purpose

Because cytidine deaminase (CDA) is the key enzyme in gemcitabine metabolism, numerous studies have attempted to investigate impact of CDA status (i.e. genotype or phenotype) on clinical outcome. To date, data are still controversial because none of these studies has fully investigated genotype-phenotype CDA status, pharmacokinetics and clinical outcome relationships in gemcitabine-treated patients. Besides, most patients were treated with gemcitabine associated with other drugs, thus adding a confounding factor. We performed a multicenter prospective clinical trial in gemcitabine-treated patients which aimed at investigating the link between CDA deficiency on the occurrence of severe toxicities and on pharmacokinetics, and studying CDA genotype-phenotype relationships.

Experimental design

One hundred twenty patients with resected pancreatic adenocarcinoma eligible for adjuvant gemcitabine monotherapy were enrolled in this study promoted and managed by the Fédération Francophone de Cancérologie Digestive. Toxicities were graded according to National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 4. They were considered severe for grade ≥ 3, and early when occurring during the first eight weeks of treatment. CDA status was evaluated using a double approach: genotyping for 79A>C and

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

functional testing. Therapeutic drug monitoring of gemcitabine and its metabolite were performed on the first course of gemcitabine.

Results

Five patients out of 120 (i.e., 4.6%) were found to be CDA deficient (i.e., CDA activity <1.3 U/mg), and only one among them experienced early severe hematological toxicity. There was no statistically significant difference in CDA activity between patients experiencing hematological severe toxicities (28.44%) and patients who tolerated the treatment (71.56%). CDA genetic analysis failed in evidencing an impact in terms of toxicities or in CDA activity. Regarding pharmacokinetics, a wide inter-individual variability has been observed in patients.

Conclusion

This study, which included only 4.6% of CDA-deficient patients, failed in identifying CDA status as a predictive marker of toxicities with gemcitabine. A lack of statistical power because of smoothing effect of CDA variability as compared with real life conditions could explain this absence of impact.

Trial Registration

ClinicalTrials.gov NCT01416662

Introduction

Gemcitabine is an antimetabolite drug widely prescribed to treat various types of cancer, from solid tumors to hematological disorders such as pancreatic adenocarcinoma, non-small cell lung cancer, sarcoma or lymphoma, alone or in combination with others cytotoxics such as capecitabine, nab-paclitaxel or oxaliplatin [1–5]]. Since identification of cytidine deaminase (CDA) as the key enzyme involved in the metabolic pathway of gemcitabine in the early 90's [6], many studies have been conducted to try to better understand whether changes in CDA activity could impact on efficacy and toxicity of gemcitabine-based regimen [7] The existing wide inter-individual variability in CDA activity allows patients to be sorted into 3 categories: poor metabolizers (PM), defined with a reduced CDA activity (CDA<1.3 U/mg), ultra-deaminators (UM), individuals with an increased CDA activity (>6 U/mg) and patients with a normal CDA phenotype (extensive metabolizers, EM) showing a median activity of 3.2 in adults and 3.4 U/mg in children [8].

This marked variability among activities is partly linked to genetic and epigenetic polymorphisms [9]. *CDA* is indeed a highly polymorphic gene [10], with synonymous variations in intron with little consequence on the phenotype to non-synonymous non-sense polymorphisms leading to a truncated protein [11]. Some of these variations have been well studied with respect to clinical outcome upon gemcitabine intake. Among them, the non-synonymous rs2072671 encodes for a substitution of a lysine into a glutamine because of a replacement of the adenine by a cytosine in position 79 in the coding sequence. According to Micozzi et al. [12], this modification in the amino-acid sequence does not impact on the catalytic event. Many studies have been performed to establish clear correlation between this polymorphism and CDA phenotype [7]. To date, Giovannetti et al. and Baker et al. correlated the wild type

genotype (*A/A* encoding for Lys27Lys enzyme) with a lower mean CDA activity [11, 13, 14] while our team did not clearly evidence a link between CDA genotype and functionality with respect to cytidine deamination [8]. Very recently, the impact of *79A>C* polymorphism on the response and hematological toxicities in gemcitabine-treated patients has been studied in a meta-analysis, encapsulating 6 studies performed in 2013 [15]. This meta-analysis suggested that the *A/A* genotype seems to be a protective factor with respect to incidence of severe anemia, whereas the *C/C* genotype did not show a significant impact on the response rate in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with gemcitabine.

A decrease in CDA activity leads to a decrease of gemcitabine clearance. We already evidenced an overexposure to gemcitabine due to CDA deficiency in mice treated with gemcitabine [8]. Many published studies in human have confirmed these results, reporting a decrease in gemcitabine clearance correlated with either a given *CDA* genotype [15, 16] or reduced deamination function [7, 8, 17]. Conversely, we have shown that UM pancreatic cancer patients (i.e., CDA activity $>$ 6 U/mg) were 5-times more likely to have progressive disease upon gemcitabine intake, as compared with patients with normal CDA status [18]. Despite the lack of pharmacokinetic support in this study, this may be explained by an over-elimination of gemcitabine by the CDA hyperactivity, thus resulting in lack of efficacy.

To date, none of these studies fully investigated genotype-phenotype-pharmacokinetics and clinical outcome relationships with gemcitabine. Such a study would highlight how genetic events could influence the functional activity of CDA, thus confirming that CDA status is a predictive factor of a decrease in gemcitabine clearance, with consequently a higher incidence of severe toxicity. Here, we performed a prospective clinical trial in gemcitabine-treated patients with resected pancreatic cancer which aimed at investigating the impact of CDA deficiency on the occurrence of toxicities and on pharmacokinetics, but also to better understand CDA genotype-phenotype relationships. This study was promoted and managed by the Fédération Francophone de Cancérologie Digestive (FFCD).

Patients & Methods

Objectives

The main objective of this trial was to evaluate the ability of CDA to predict the occurrence of early severe hematological toxicity upon gemcitabine. The secondary objectives were to evaluate the capability of CDA to predict the occurrence of early severe non hematological toxicities, and the hematological toxicities induced by gemcitabine overall the treatment, to evaluate the impact of CDA activity on pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite, and to study CDA genotype-phenotype relationships. An exploratory analysis was planned to study if CDA could be a prognostic factor and a marker for gemcitabine efficacy.

Patients and treatment

Adult patients with resected pancreatic adenocarcinoma (R0: resection for cure or R1: microscopic residual tumor) were included from 31 French clinical centers in this study. Main non-inclusion criteria were metastatic or locally advanced disease, presence of infectious syndrome, and previous chemotherapy (within the ten years before inclusion). All patients were eligible for adjuvant gemcitabine-monotherapy as follows: 30-minutes IV-infusion of 1000 mg/m^2 every week for 3 consecutive weeks followed by one week off for 6 courses. Demographic (e.g age, sex weight, body surface area), clinical (e.g. tumor size, localization, and tumor classification using TNM, disease grade, World Health Organization (WHO) status, resection margin) and biological data (e.g. data about liver, renal and cardiac functions, whole blood count) were collected prior and during treatment. Toxicities were graded according to the National Cancer

Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 4. Toxicities were considered as severe for grade ≥ 3, and early when they occurred during the first eight weeks of treatment. Written informed consent was provided prior enrolment in accordance with the Declaration of Helsinki and this study was approved by local ethical committee (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée 1) in January 2011. The authors confirmed that all ongoing and related trials for this drug are registered: trial was registered at the ANSM as 2010-022987-11 and on the clinicaltrial.gov website in June 2011. The patients were recruited between July 2011 and June 2013 with a 2-years follow-up (**Fig 1**, **S1 Checklist** **and** **S1 Protocol**).

Determination of CDA status

CDA status was evaluated using a double approach: a phenotypic assay and a genetic analysis. Blood samples (one dry tube and one EDTA tube for evaluation of CDA activity and genotyping test, respectively) were collected from patients prior to treatment. Seric fraction was isolated after centrifugation of the dry tube, whereas lymphocyte DNA was extracted from the EDTA tube using EZ1 DNA Blood Kit (Qiagen). DNA and seric fraction was then conserved at -20 and -80°C respectively until analysis. CDA activity was evaluated using a previously developed method, already used in a routine clinical practice in our hospital [8]. Briefly, as CDA is physiologically responsible for the deamination of cytidine by releasing ammonium, patients serum were incubated overnight ex vivo with cytidine and the quantity of released ammonium was measured by visible spectrophotometry. Seric proteins amount was also assayed using Pierce method as CDA activity is finally expressed with respect to the seric proteins amount. Patients were considered as PM when their CDA activity was $\leq$1.3 U/mg, a threshold previously determined from our retrospective study [8]. As *CDA* rs2072671 SNP (i.e. 79A>C) is the most common non-synonymous exonic variant found in the Caucasian population [12], we screened for this genetic polymorphism in the cohort, using High Resolution Melting (HRM) analysis on LightCycler480. After amplification of each patient DNA in duplicate, the melting curve (from 70° to 95°C) was compared to standards in order to establish the genotype.

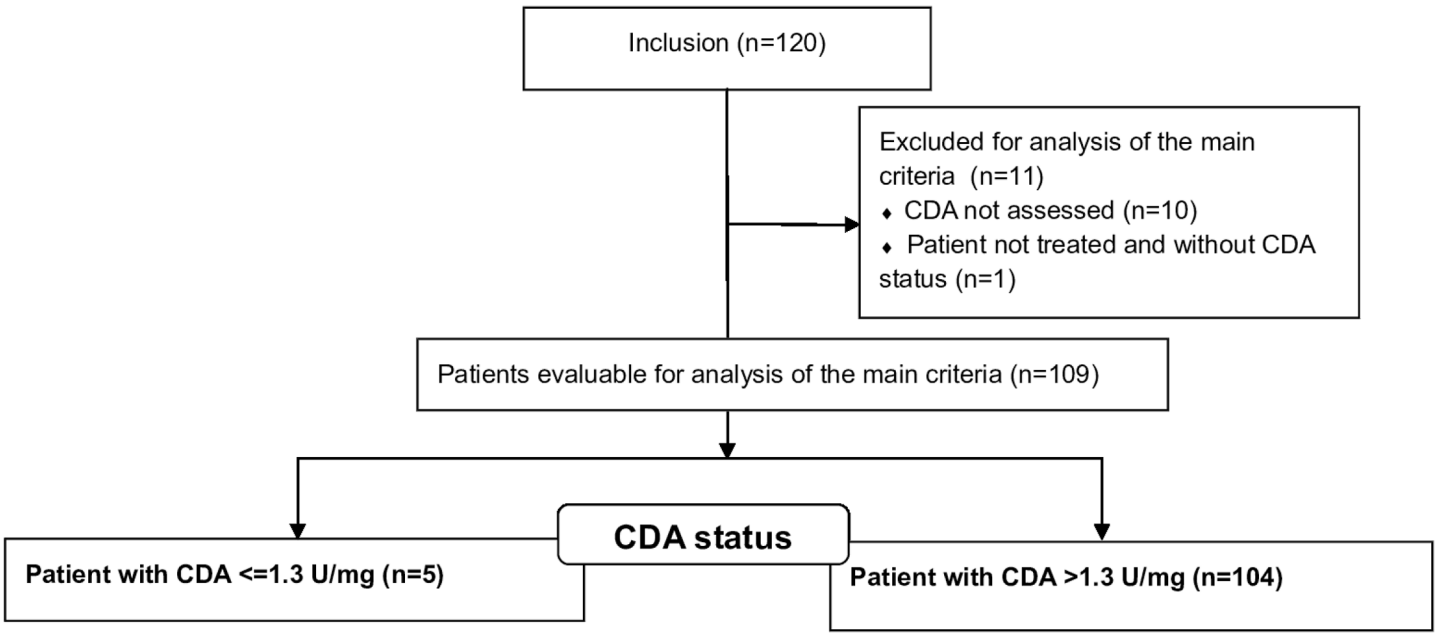


Fig 1. Consort flowchart of the primary objective in the FFCD-1004 clinical trial.

doi:10.1371/journal.pone.0135907.g001

Gemcitabine and dFdU therapeutic drug monitoring (TDM)

A pharmacokinetic study was performed. It consisted in sampling patients during the first round of gemcitabine administration to evaluate circulating plasma levels of both gemcitabine and its inactive metabolite dFdU. Blood samples were collected before starting the infusion, at the end and 30 and 90 minutes after the end of infusion in EDTA tube containing tetrahydrouridine (THU) to prevent *in silico* deamination by CDA. Plasma fraction was immediately isolated after centrifugation and aliquots were stocked at -80°C until analysis. Gemcitabine and dFdU were simultaneously measured using LC-MSMS assay, adapted from by Zhou et al. [19], and validated according to European Medicines Agency (EMA) and Food and Drug Administration (FDA) guidelines. Briefly, 50 μl of drug-free plasma and 500 μl of precipitating solution containing acetonitrile and internal standard (abacavir ABC) are added to a 50-μl test sample. After vortex-mixing for 90 sec, samples were centrifuged during 10 minutes at 14 000 rpm at room temperature. The supernatant was then dry evaporated under a gentle stream of nitrogen at 45°C and the residue was dissolved in 600 μl of reconstitution solvent (5 mM ammonium acetate + 0.1% formic acid) by vortex-mixing for 15 sec. Then, samples were transferred into 96-well plate before analysis.

Chromatographic separations of gemcitabine, dFdU and ABC were performed on an UPLC system (Waters UPLC-TQD), using an Acquity UPLC HSS T3 column (1.8 μm x 2.1 x 100mm, Waters) maintained at 40°C. The mobile phase was composed of an acetate buffer (5 mM ammonium acetate, 0.1%, formic acid) as aqueous phase and an organic phase composed of acetonitrile. A 5 μl-volume sample was injected and eluted with a gradient of aqueous and organic phases at a constant flow rate of 0.250 ml/min for a total run time of 6 minutes. A Waters tandem quadrupole detection system with an electrospray ionization (ESI) source operating in positive mode for gemcitabine and ABC and negative mode for dFdU was used to obtain mass and product ion spectra (MS and MS-MS). MassLynx software version 4.1 was used for data acquisition and processing. Mass transitions of *m/z* 264.05 -> 112.05, 287.10 -> 191.10 were optimized for gemcitabine and ABC, respectively. For dFdU, two transitions have been used: 263.05 -> 111.05 for quantification and 263.05 -> 219.95 for qualification.

The resulting pharmacokinetics data were analyzed using pharmacokinetics software KineticPro (WGroup, France). Bayesian estimation was used to estimate individual pharmacokinetics parameters and to simulate plasma exposure of patients, based on previously published pharmacokinetic parameters [20].

Statistical analysis

The main objective of the trial was to evaluate the capability of CDA to predict the occurrence of early severe hematological toxicity upon gemcitabine. In order to bring out a positive likelihood ratio of CDA more than 3.5 (H_1), objective reached when sensitivity is more than 70% and specificity is more than 80% with an α risk of 5% and a power of 80%, 107 patients had to be included. With an estimated 10% of lost-to-follow-up patients or patients not treated, 120 patients were finally included. The probability of severe hematological toxicity without CDA knowledge was estimated at 12.5%, based on retrospective published data [8]. Primary criterion, safety secondary endpoints (i.e., overall toxicities and non-hematological ones) and exploratory analyses were done on the set of patients receiving at least one dose of gemcitabine and with a CDA fully evaluable status. The primary criterion was measured with positive and negative likelihood ratios, sensitivity and specificity, and the positive and negative predictive values (with their 95% confidence intervals). Time to event endpoints (e.g time to grade 3–4 hematological (or non-hematological) toxicity appearance as-well-as overall survival) were estimated using Kaplan-Meier method. A series of clinical parameters measured at the

Table 1. Patients' characteristics.

Clinical characteristics	Clinical characteristics subgroups	Number of patients (%) N = 120
Sex	male	74 (61.7%)
	female	46 (38.3%)
Age	median	66.72
	minimum	30.6
	maximum	84.9
WHO performance status	0	46 (38.3%)
	1	68 (56.7%)
	2	6 (5.0%)
Tumor localization	head	96 (80.0%)
	body	8 (6.7%)
	tail	11 (9.2%)
	head and body	1 (0.8%)
	head and tail	1 (0.8%)
	body and tail	3 (2.5%)
Disease grade (TNM classification)	T1/T2	24 (20.0%)
	T3/T4	96 (80.0%)
	N+	84 (70.0%)
Resection margin	R0	106 (88.3%)
	R1	14 (11.7%)

doi:10.1371/journal.pone.0135907.t001

inclusion were evaluated as prognostic factors on the overall survival in a univariate and a multivariate analyses. We also tested the influence of 79A>C genotype on incidence of severe toxicities using Chi^2-test. In this aim, we gathered the heterozygous and homozygous mutated patients as "mutated" patients' status.

Results

Patients and clinical outcome

One hundred and twenty patients have been included in this prospective study, from 31 different French centers, with a mean age of 65.8 years (sd 10.05) and a sex ratio of 1.61 (Table 1). One hundred and nineteen patients (99.9%) have received at least one dose of gemcitabine.

The median survival was 29.08 months [95% CI, 25.1 to NA], with 6-months and 12-months survival rates of 95.8 and 79.82%, respectively. In terms of toxicity, 25 (23%) patients declared early severe hematological toxicities, 20 (18%) displayed other early severe toxicities. Maximal gemcitabine caused-toxicities during treatment are summarized in Table 2.

CDA status

One hundred and nine and ninety-two patients were analyzable for CDA phenotyping and genotyping tests, respectively. Five patients out of 109 (i.e. 4.6%) were found to be PM and one patient (i.e. 0.9%) displayed CDA activity greater than 6 U/mg (UM). Among the CDA-deficient patients, only one experienced early severe hematological toxicities. Median CDA activity was not significantly different between patients who had early severe toxicities and patients with no such toxicities (2.35 vs 2.25 respectively $p>0.05$, Table 3). In the same manner, with respect to severe hematological and non-hematological toxicities all over the treatment, CDA activity was also similar when comparing patients with toxicities and patients with no toxicities. Age and disease stage at the diagnostic were both correlated with overall survival in

Table 2. Maximal gemcitabine-caused toxicities over treatment.

Types of toxicity	Subtypes of toxicity	No. of patients (%)	
Toxicity grades		Grades 1–2	Grades 3–4
Hematological	Anemia	110 (92.4%)	5 (4.2%)
	Leucopenia	81 (68.1%)	9 (7.6%)
	Neutropenia	64 (53.8%)	30 (25.2%)
	Thrombopenia	62 (52.1%)	1 (0.8%)
Non hematological	Nausea	65 (54.6%)	1 (0.8%)
	Vomiting	33 (27.7%)	0 (0%)
	Diarrhea	66 (55.5%)	1 (0.8%)
	Asthenia	90 (75.6%)	3 (2.5%)

doi:10.1371/journal.pone.0135907.t002

univariate and multivariate analysis (Table 4), whereas no influence of CDA activity could be evidenced neither on the overall survival (p = 0.28 in univariate analysis).

Studying CDA genotype showed that 59.8% of patients displayed the 79A>C polymorphism. No correlation was evidenced between this CDA genotype and occurrence of toxicities, whether hematological or not, and CDA activity was similar in mutated patients group and the non-mutated patients group (p = 0.61).

Pharmacokinetic study

A total of 39 out of the 120 patients (33%) initially involved in the clinical trial were enrolled in the additional pharmacokinetic study (Fig 2). Administration protocol was not strictly respected for 9 patients (infusion time superior to 45 minutes) and kinetics were not complete

Table 3. Toxicities during treatment according to CDA activity (n = 109).

	No. of patients with severe hematological toxicities in the first eight weeks of treatment (%)		
	no	yes	p-value
n	84	25	
CDA median activity	2.25	2.35	p = 0.87
Q1-Q3	1.80–2.80	1.89–3.32	
CDA $\leq$ 1.3 U/mg *vs.* > 1.3 U/mg	4 (4.76%) *vs.* 80 (95.24%)	1 (4%) *vs.* 24 (96%)	p = 0.99
Total	84 (100%)	25 (100%)	109 (100%)
	No. of patients with severe hematological toxicities all over the treatment (%)		
	no	yes	p-value
CDA median activity	2.25	2.35	p = 0.67
Q1-Q3	1.78–2.82	1.89–3.11	
CDA $\leq$ 1.3 U/mg *vs.* > 1.3 U/mg	4 (5.13%) *vs.* 74 (94.87%)	1 (3.23%) *vs.* 30 (96.77%)	p = 0.99
Total	78 (100%)	31 (100)	109 (100%)
	No. of patients with severe non hematological toxicities all over the treatment (%)		
	no	yes	p-value
CDA median activity	2.215	2.3	p = 0.15
Q1-Q3	1.73–3.02	1.99–2.82	
CDA $\leq$ 1.3 U/mg *vs.* > 1.3 U/mg	5 (6.41%) *vs.* 73 (93.6%)	0 (0%) *vs.* 31 (100%)	p = 0.32
Total	78 (100%)	31 (100%)	109 (100%)

doi:10.1371/journal.pone.0135907.t003

Table 4. Median overall survival according to different criteria.

Clinical criteria		Median overall survival (months)		95% CI
Age	<65 y.o *vs*. ≥*65 y.o*	34.4 *vs*. 26.5	p = 0.0253	[25.7-NA] *vs*. [20.9–31.3]
Disease stage	T1-T2 *vs*.T3-T4	31.3 *vs*. 29	p = 0.0408	[25.1—NA] *vs*. [20.9—NA]

doi:10.1371/journal.pone.0135907.t004

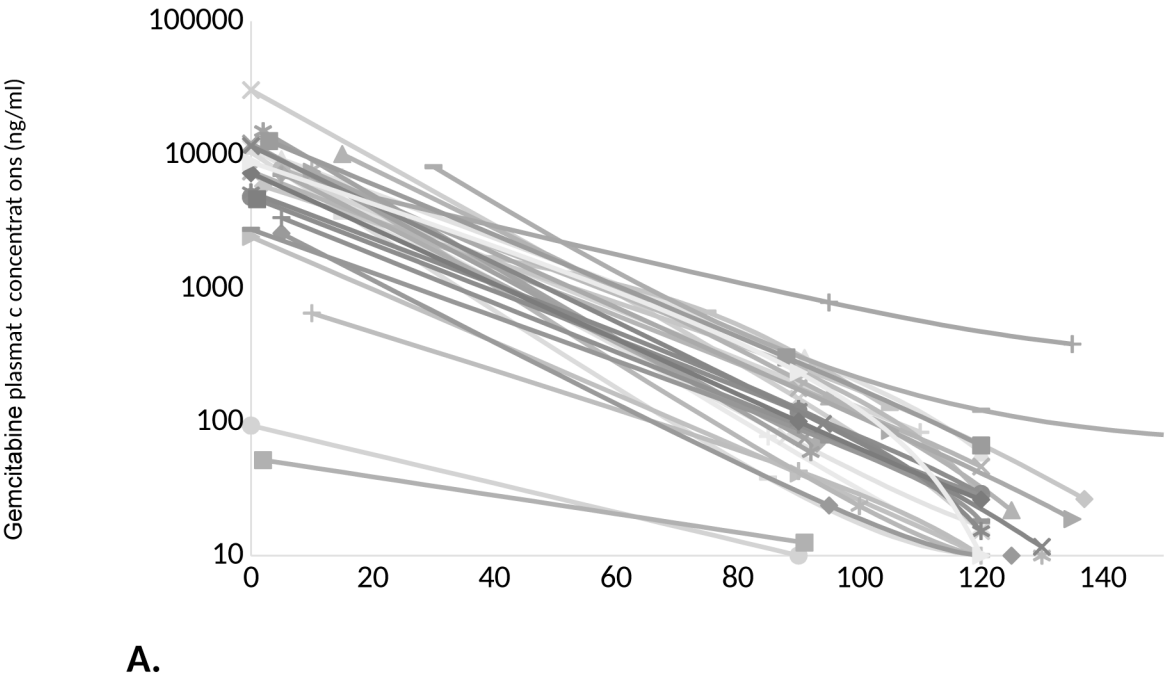


Fig 2. Pharmacokinetics profiles of gemcitabine (A) and its metabolite (B) overtime during the first round of gemcitabine administration in pancreatic adenocarcinoma cancer patients. Patients have been sampled before infusion, at the end, and 90 and 120 minutes after ending the infusion. A wide inter-individual variability is observed, either for gemcitabine or for dFdU.

doi:10.1371/journal.pone.0135907.g002

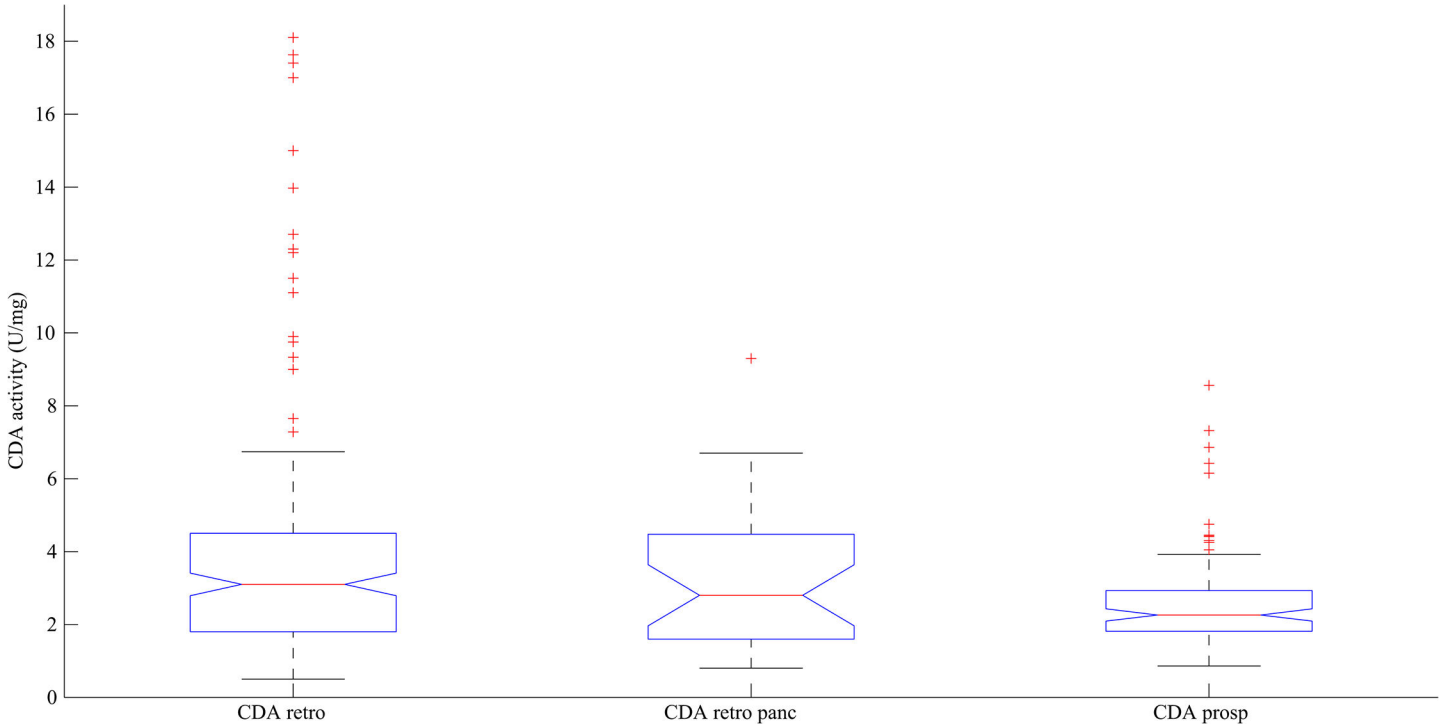


Fig 3. Boxplots of CDA activity in prospective compared to retrospective study. CDAretro stands for CDA activity in gemcitabine-treated patients for various types of cancers in the retrospective study. The boxplot in the middle represents CDA activity in the subgroup of gemcitabine-monotherapy patients in the retrospective study. CDA activities of patients from the prospective study are represented in the boxplot on the right. Isolating gemcitabine-monotherapy treated patients leads to a smoothing effect in CDA activity variability.

doi:10.1371/journal.pone.0135907.g003

for 2 patients. Among patients with a carefully-driven administration protocol, gemcitabine plasma concentrations ranged from 19.8 to 2.77 μg/ml at end of infusion and AUC from $1.23x10^5$ to $4.80x10^8$ ng/ml*min, thus evidencing a wide inter-individual variability in gemcitabine exposure in patients.

Discussion

Developing and implementing new tests in a routine clinical practice allowing to stratify patients according to their characteristics has become a rising trend. To date, many pharmacogenomic tests are available to ensure a better response with respect to the treatment in patients. Additionally, some pharmacogenetic assays are recommended to be performed prior to the start of treatment, such as TMPT for azathioprine or 6-mercaptopurine [21]. Regarding to CDA, since evidence has been made that it is the key enzyme involved in gemcitabine deactivation, many studies focused on CDA status and toxicities or pharmacokinetics relationships. All studies are consistent with the fact that an impairment in CDA functionality leads to gemcitabine overexposure caused by a decrease in gemcitabine liver clearance. However, with respect to the *79A>C* SNP, available data are not consistent, when not conflictual [14, 22–24]. The discrepancies in CDA pharmacogenetic studies partly explain why there is still no recommendation for testing CDA at bedside before initiating gemcitabine-treatment. Thus, ensuring a better tolerance of gemcitabine and a better management of toxic risk in patients treated with gemcitabine depends only on the goodwill on the medical team, and on the availability of a surrogate CDA test in the institute. Here, we proposed a prospective study to confirm whether CDA status could be a predictive factor of toxicities in patients under gemcitabine-based

treatment. The originality of this study was to address the issue of genotype, phenotype, pharmacokinetics and clinical outcome. The study confirmed the wide inter-individual variability in pharmacokinetics, already described elsewhere [8, 25]. Regarding to CDA, unfortunately, no association between *CDA* genotype nor CDA phenotype and toxicity was evidenced here. This absence of significant association between CDA and toxicity could be explained by the surprisingly weak proportion of CDA-deficient patients in this study. Indeed, the design of this study was inspired from a previous one [8], involving unselected patients treated with gemcitabine alone or in combination for various types of cancers. In this previous retrospective study involving routine patients of our institute, 10% of individuals were PM according to CDA and we showed that patients with decreased CDA activity were significantly more at risk to experience severe toxicities. However, this was not confirmed in the subgroup of pancreatic cancer patients treated with gemcitabine only, suggesting a lack of statistical power. In this new study, variability of CDA was found to be considerably reduced when compared to the first trial, but comparable to the retrospective pancreatic patients subgroup (Fig 3). Only 4.59% of patients displayed CDA deficiency, thus preventing to perform any statistical test. This low incidence of CDA deficiency may be explained by a smoothing effect due to performing a clinical trial with overselected patients. Similarly, only 0.9% of patients displayed UM phenotype, while 14% were found in the previous study [18]. Here, drastic inclusion criteria used to meet the requirements of a prospective trial apparently had a negative impact on CDA natural variability.

To summarize, this prospective study failed in identifying CDA as a predictive marker of toxicities under gemcitabine treatment. A lack of statistical power because of smoothing effect of CDA variability as compared with real life conditions could explain this.

Supporting Information

S1 Checklist. TREND statement checklist.
(PDF)

S1 Protocol. Protocol of the FFCD-1004 clinical trial.
(PDF)

Acknowledgments

We sincerely thank all the patients and their families, the investigators, the CRGA team and the Fédération Francophone Cancérologie Digestive. The Fédération Francophone de Cancérologie Digestive also thank the Ligue Nationale Contre le Cancer for its grant.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LD JC JFS CM CL. Performed the experiments: CS JC. Analyzed the data: CS CM JFS JC LD. Contributed reagents/materials/analysis tools: CS JC. Wrote the paper: CS JC CM LD. Included patients: JG JD FF RG EF TA JFS DA JV AAM TL VGM JLL PG LD CL GD. Read, commented on, and approved the manuscript: CS JG JD FF RG EF TA JFS CM DA JV AAM TL VGM JLL GD PG JC LD.

References

1. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol. 1997; 15(6):2403–13. Epub 1997/06/01. PMID: 9196156
2. Jones OP, Melling JD, Ghaneh P. Adjuvant therapy in pancreatic cancer. World journal of gastroenterology: WJG. 2014; 20(40):14733–46. Epub 2014/10/31. doi: 10.3748/wjg.v20.i40.14733 PMID: 25356036

3. Kroep JR, Giaccone G, Tolis C, Voorn DA, Loves WJ, Groeningen CJ, et al. Sequence dependent effect of paclitaxel on gemcitabine metabolism in relation to cell cycle and cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cell lines. British journal of cancer. 2000; 83(8):1069–76. Epub 2000/09/20. PMID: 10993656
4. Thota R, Pauff JM, Berlin JD. Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. Oncology (Williston Park). 2014; 28(1):70–4. Epub 2014/04/02.
5. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, et al. nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. J Natl Cancer Inst. 2015; 107(2). Epub 2015/02/02.
6. Bouffard DY, Laliberte J, Momparler RL. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. Biochemical pharmacology. 1993; 45(9):1857–61. Epub 1993/05/05. PMID: 8494545
7. Serdjebi C, Milano G, Ciccolini J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs, in press. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2014.
8. Ciccolini J, Dahan L, Andre N, Evrard A, Duluc M, Blesius A, et al. Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. J Clin Oncol. 2010; 28(1):160–5. Epub 2009/11/26. doi: 10.1200/JCO.2009.24.4491 PMID: 19933910
9. Collins AR. Molecular epidemiology in cancer research. Molecular aspects of medicine. 1998; 19 (6):359–432. Epub 1999/07/01. PMID: 10385877
10. www.ensembl.org. 2014.
11. Baker JA, Wickremsinhe ER, Li CH, Oluyedun OA, Dantzig AH, Hall SD, et al. Pharmacogenomics of gemcitabine metabolism: functional analysis of genetic variants in cytidine deaminase and deoxycytidine kinase. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2013; 41(3):541–5. Epub 2012/12/12.
12. Micozzi D, Carpi FM, Pucciarelli S, Polzonetti V, Polidori P, Vilar S, et al. Human cytidine deaminase: a biochemical characterization of its naturally occurring variants. International journal of biological macromolecules. 2014; 63:64–74. Epub 2013/11/05. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.10.029 PMID: 24183806
13. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008; 14(6):1797–803. Epub 2008/03/19.
14. Giovannetti E, Laan AC, Vasile E, Tibaldi C, Nannizzi S, Ricciardi S, et al. Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008; 27(6):720–5. Epub 2008/07/05. doi: 10.1080/15257770802145447 PMID: 18600531
15. Li H, Wang X. The impact of CDA A79C gene polymorphisms on the response and hematologic toxicity in gemcitabine-treated patients: A meta-analysis. The International journal of biological markers. 2014; 29(3):224–32. Epub 2014/02/22.
16. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, Kikura-Hanajiri R, Hasegawa R, Maekawa K, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. J Clin Oncol. 2007; 25(1):32–42. Epub 2006/12/30. PMID: 17194903
17. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JH. Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. The oncologist. 2011; 16(6):820–34. Epub 2011/06/03. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0259 PMID: 21632461
18. Serdjebi C, Seitz JF, Ciccolini J, Duluc M, Norguet E, Fina F, et al. Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. Pharmacogenomics. 2013; 14(9):1047–51. Epub 2013/07/11. doi: 10.2217/pgs.13.93 PMID: 23837479
19. Zhou J, Gao S, Zhang F, Jiang B, Zhan Q, Cai F, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of seven commonly used anticancer drugs in human plasma. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2012; 906:1–8. Epub 2012/09/11. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.07.033 PMID: 22959676
20. Jiang X, Galettis P, Links M, Mitchell PL, McLachlan AJ. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in patients with cancer: effect of oxaliplatin and infusion rate. British journal of clinical pharmacology. 2008; 65(3):326–33. PMID: 17961191
21. http://www.pharmgkb.org. 2014
22. Maring JG, Wachters FM, Slijfer M, Maurer JM, Boezen HM, Uges DR, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer patients: impact of the 79A>C cytidine deaminase polymorphism.

Eur J Clin Pharmacol. 2010; 66(6):611–7. Epub 2010/03/10. doi: 10.1007/s00228-010-0799-0 PMID: 20213492

23. Ludovini V, Floriani I, Pistola L, Minotti V, Meacci M, Chiari R, et al. Association of cytidine deaminase and xeroderma pigmentosum group D polymorphisms with response, toxicity, and survival in cisplatin/gemcitabine-treated advanced non-small cell lung cancer patients. Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2011; 6(12):2018–26. Epub 2011/11/05.

24. Fitzgerald SM, Goyal RK, Osborne WR, Roy JD, Wilson JW, Ferrell RE. Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. Hum Genet. 2006; 119 (3):276–83. Epub 2006/02/01. PMID: 16446974

25. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, Hasegawa R, Saito Y, Ueno H, et al. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: impact of genetic polymorphisms. Clin Pharmacokinet. 2010; 49(8):549–58. Epub 2010/07/09. doi: 10.2165/11532970-000000000-00000 PMID: 20608756

3 PHARMACOCINÉTIQUE DE POPULATION DE LA GEMCITABINE ET DU DFDU SELON UNE STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE LIMITÉ ET ÉTUDE DES COVARIABLES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES

Les pharmacocinétiques de population de la gemcitabine et de son métabolite ont été étudiées dans le cadre de l'essai FFCD-1004. L'objet de ce travail était de décrire la pharmacocinétique de la gemcitabine et de son métabolite à partir d'une stratégie LSS et d'étudier l'influence de covariables, notamment le statut CDA, sur les paramètres pharmacocinétiques déterminés.

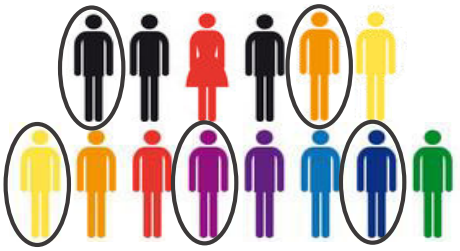
Pour cette étude, 44 patients issus de l'essai clinique FFCD-1004 ont été inclus. Afin de pouvoir identifier les paramètres individuels et de population à partir d'un nombre maximal de 4 échantillons, les temps de prélèvements optimaux ont été déterminés à l'aide du logiciel de pharmacocinétique individuelle KineticPro®. Les concentrations plasmatiques de gemcitabine et dFdU ont été mesurées par LC-MSMS et l'analyse pharmacocinétique des données obtenues a été réalisée sur le logiciel de modélisation à effets non linéaires mixtes Monolix®. Une analyse des covariables a également été réalisée, testant ainsi l'influence de l'âge, du sexe, du poids, de la BSA, BMI, les taux de créatinine sériques, l'activité CDA et le génotype pour le polymorphisme c.79A>C. Nous avons également recherché s'il existait une corrélation entre les paramètres pharmacocinétiques identifiés et la survenue de toxicités hématologiques sévères, précoces ou non.

Parmi les 44 patients souhaitant participer à l'étude pharmacocinétique, 38 ont pu être analysés. Analysés séparément, la gemcitabine et le dFdU étaient décrits par un modèle monocompartimental respectivement, avec une erreur additive pour les deux composés. Lors de l'analyse simultanée, un premier modèle de base bicompartimental a été utilisé pour décrire au mieux les observations (volume de distribution et clairance de la gemcitabine, valeurs typiques V1 = 45L et Cl1 = 4,03 L/min ; volume de distribution et clairance de la dFdU, valeurs typiques V2 = 36L et Cl2 = 0,226 L/min). L'analyse des covariables a permis de retenir la créatinine sérique comme covariable de l'élimination de la gemcitabine et la BSA comme influençant le volume de distribution du dFdU. En revanche, ni la CDA, appréhendée par son activité ou son génotype, ni la survenue de toxicités n'ont été associées aux paramètres pharmacocinétiques, notamment de la gemcitabine. Ce résultat inattendu peut s'expliquer par le fait que notre étude n'a pas inclus de patients déficients en CDA, limitant probablement l'impact des variations d'activité CDA retrouvées au sein de l'échantillon, ainsi que par le faible nombre de patients et de prélèvements.

En conclusion, nous avons réussi à déterminer les paramètres pharmacocinétiques de population et individuels de la gemcitabine et de son métabolite en utilisant une stratégie d'échantillonnage limité. L'analyse pharmacocinétique de la gemcitabine et de son métabolite a montré qu'un modèle bicompartimental décrivait au mieux les observations. La surface corporelle et les taux de créatinine sériques sont respectivement corrélés au volume de distribution du métabolite et à la clairance de la gemcitabine. Enfin, l'activité CDA semble ne pas avoir d'influence sur la pharmacocinétique de la gemcitabine quand la déficience n'est pas avérée, et ce après vérification que la CRP de nos patients n'était pas un facteur de confusion dans la détermination de l'activité CDA (CRP < 20 mg/l).

L'article suivant a été rédigé en vue d'une soumission auprès de la revue *Clinical Pharmacokinetics.*





X120 patients atteints d'adénocarcinome pancréatique réséqué



Inclusion de 44 patients traités par gemcitabine 1000 mg/m²

PRÉLÈVEMENTS SANGUINS
T0, T35min, T120 min et T150min
+
PHÉNOTYPAGE CDA
+
GÉNOTYPAGE *CDA*
+
RECUEIL DE DONNÉES BIOLOGIQUES ET CLINIQUES
+
TOXICITÉ (NCI-CTC)

Dosage gemcitabine et dFdU simultané par LC-MSMS



ANALYSE PHARMACOCINÉTIQUE DE POPULATION SUR MONOLIX®



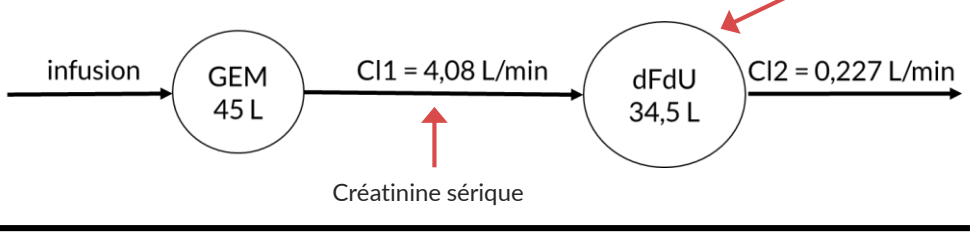


Figure 26. Article VII

PUBLICATION VII

FIGURE 26

Simultaneous population pharmacokinetic analysis of gemcitabine and its inactive metabolite dFdU using a limited sampling strategy

Simultaneous population pharmacokinetic analysis of gemcitabine and its inactive metabolite using a limited sampling strategy

Cindy SERDJEBI[1], Florence GATTACCECA[2], Madani RACHID[1], Laetitia DAHAN[3], Athanassios ILIADIS[1], Jean-François SEITZ[3], Bruno LACARELLE[1], Joseph CICCOLINI[1]

1. SMARTc, CRO2, UMR S_911, Aix-Marseille University
2. IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, ICM, Université de Montpellier
3. Digestive Oncology Unit, La Timone Hospital, AP-HM

ABSTRACT

Since the approval of gemcitabine, pharmacokinetics (PK) of gemcitabine and its inactive metabolite dFdU has been well studied through various studies, from a descriptive approach to a compartmental approach. However, all these studies used a lot of samples to identify and estimate PK parameters of gemcitabine, with a great amount of data. The aim of this work is to describe the PK of gemcitabine and dFdU, using a limited sampling strategy (LSS) and to study influence of covariates on PK parameters, including CDA status.

Forty four patients from the FFCD-1004 clinical trial have been enrolled. In order to identify PK and individual PK parameters with precision using a maximum of 4 samples per patient, optimal sampling times have been calculated using the individual PK software KineticPro®. Gemcitabine and dFdU plasma concentrations have been measured by LC-MSMS and the population PK analysis has been performed on Monolix®. A part of this work also consisted in testing biological and clinical parameters, such as weight, age, sex, body surface area, body mass index, serum creatinine levels, cytidine deaminase (CDA) activity and CDA genotype as covariates of the model. A correlation between PK parameters and occurrence of severe hematological toxicities has also been investigated.

Among the enrolled patients, 38 have been analyzed. When analyzed separately, gemcitabine and dFdU were both best described by a one-compartment model, with an additive error. The simultaneous analysis, the base model was consistent with the separate analysis: a two-compartment model best describe the observations (volume of distribution and clearance of gemcitabine, typical values V1 = 45L and Cl1 = 4.03 L/min ; volume of distribution and clearance of dFdU, typical values V2 = 36L et Cl2 = 0.226 L/min). Covariates testing showed that serum creatinine levels was a covariate of gemcitabine clearance, and BSA was evidenced as a covariate of the volume of distribution of dFdU. However, neither CDA, evaluated by a genotype or a phenotype approach, nor the occurrence of toxicities have been correlated with PK parameters, especially gemcitabine. These unexpected findings may be explained by the absence of CDA-deficient patients, thus probably limiting the impact of variations in CDA enzymatic activity, and also by a small number of patients and data.

As a conclusion, we succeeded in estimating population and individual PK parameters of gemcitabine and dFdU using a LSS. PK analysis showed that a two-compartment model best described the observations, with an additive error for both compounds. BSA and serum creatinine levels were respectively correlated with the volume of distribution of dFdU and the clearance of gemcitabine. Here, CDA activity did not influence the PK of gemcitabine when deficiency is not proven.

Introduction

Gemcitabine (2'-2' difluorodeoxycytidine, dFdC) is a major fluoropyrimidine analog, widely prescribed, and belongs to the class of antimetabolites cytotoxic drugs. Gemcitabine - alone or in combination - is approved to treat a variety of cancers, including pancreatic adenocarcinoma. DFdC is a pro-drug successively phosphorylated by nucleoside kinases into its active forms gemcitabine diphosphate (dFdCDP) and gemcitabine triphosphate (dFdCTP). The diphosphorylated metabolite inhibits the ribonucleotide reductase, responsible for the synthesis of triphosphorylated nucleotides for DNA replication. The triphosphorylated form is integrated to DNA instead of the normal dCTP nucleotide, resulting in chain termination. Additionally, cellular apoptosis is induced by accumulation of cytotoxic gemcitabine nucleotides which are also capable of interfering with RNA transcription [1]. Besides phosphorylation, approximately 90% of dFdC is directly deaminated and deactivated by cytidine deaminase (CDA) to form the inactive metabolite 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (dFdU) [2]. CDA is a phase I metabolizing enzyme synthetized in the liver, but ubiquitously expressed with a marked expression in mature granulocytes [3]. CDA is physiologically involved in cytidine deamination into uridine, which will be later implicated in RNA synthesis. *CDA* gene is highly polymorphic and a wide inter-patient variability has been observed on CDA activity [4], thus leading to variability in patients' exposure to gemcitabine.

Since its approval, pharmacokinetics (PK) of gemcitabine has been investigated extensively. Previous compartmental analyses of PK of gemcitabine and dFdU in cancer patients showed that both are best described by a two-compartment model [5,6], with a linear PK up to 1500 mg/m² of gemcitabine [7]. Some particular PK studies have also investigated the influence of several clinical and biological parameters, including CDA status, on the PK of gemcitabine [4,5,8]. Indeed, CDA deficiency may be responsible for higher exposure to gemcitabine due to a decrease of gemcitabine clearance, thus increasing the risk and severity of toxicities in patients. Sugiyama *et al.* have shown that clearance of gemcitabine is highly influenced by the presence of the 208G>A polymorphism (rs60369023), besides a proportionality between clearance and body surface area (BSA, [5]). However, this polymorphism is only present in Asian population, and the homozygous genotype has been only evidenced in two articles, concerning the same unique patient [5,9]. Data about the influence of the 79A>C polymorphism are still controversial. Although an decrease of gemcitabine clearance has been shown in the Sugiyama study [5], the impact on clinical outcome is still not clear [4,10–13]. Other covariates have also been identified, such as clearance of creatinine which influences the clearance of dFdU and BSA that has an impact on the volume of the central compartment of dFdU [6].

To date, all PK studies used numerous sampling points in order to build their PK model: at least 7 sampling times collected over 4 hours after infusion and until 12 or 13 sampling points

collected over 8, 48 and 192 hours [5,6,14,15]. This type of sampling protocol is not compatible with a clinical routine practice at bedside, as it is not patient-friendly.

The goals of this study were multiple. First, we conducted a PK analysis of gemcitabine and its metabolite dFdU using a limited sampling strategy (LSS). We wanted to evaluate whether our LSS could allow to accurately estimate patients' PK parameters and to identify relevant biological and clinical covariates. Second, we aimed at determining whether gemcitabine and dFdU PK parameters were correlated to the occurrence of toxicities under gemcitabine treatment.

Patients, material and methods

Patients and treatments

Patients included in this PK study were initially recruited as part of the French clinical trial FFCD-1004, which aimed at investigating the influence of CDA status on the incidence of early severe hematological toxicities in patients with pancreatic adenocarcinoma treated with gemcitabine-monotherapy in an adjuvant setting. FFCD-1004 trial was a multicenter and prospective study. Briefly, after resection of the pancreatic tumor, patients were treated by a 30-minutes intravenous infusion of gemcitabine 1000 mg/m², every week during three weeks followed by one rest-week. Patients enrolled in the FFCD-1004 were free to participate to the PK study. Patients' characteristics have been previously described [10].

Toxicities were assessed following the NCI-CTC Version 4 guidelines. Toxicities were considered as severe when they were grade 3-4, and early if they occurred during the two first courses of gemcitabine (8 weeks). Besides samples collected for the PK analysis, additional tubes were withdrawn to evaluate CDA status, using a double approach : genotyping for the 79A>C variant and measurement of CDA activity using a previously published method adapted in our laboratory [4].

All patients enrolled in the study signed free and informed consent, and FFCD-1004 trial was first approved by local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée 2) and by French health authorities (2010-022987-11).

Identifying optimal sampling time points

In order to respect ethical constraints, and aiming at using a protocol reproducible in a routine practice, it was decided to withdraw a maximum of 4 samples per patient, including a T0, used as sample-test for the assessment of the matrix effect in the development of the simultaneous assay of gemcitabine and dFdU. Tubes were collected during the first gemcitabine administration. Furthermore, the minimal sampling time after end of infusion was set to 5 minutes, the minimal

duration between two successive sampling time points was also set to 5 minutes, and the maximal duration of the sampling protocol was defined as 2 hours after the end of infusion.

The optimal sampling time points, which would allow us to better identify population and individual gemcitabine and dFdU PK parameters, were determined based using the model previously on published PK data from Jiang *et al.* [6] using the individual PK software KineticPro® (WGroup, France). Indeed, we used the estimates of gemcitabine parameters (intercompartmental clearance (Q_{gem}), systemic clearance (CL_{gem}), volume of distribution of central (Vc_{gem}) and periphal (Vp_{gem}) compartments) and between-subject variability from Jiang as settings for simulations in KineticPro®. We only focused on gemcitabine PK parameters to set the optimal sampling time points, since gemcitabine reflects the part of potentially active drug.

Gemcitabine and dFdU measurement by LC-MSMS

Samples for the PK analysis were collected in EDTA tubes, containing tetrahydrourine (THU), to prevent *in silico* deamination of gemcitabine into dFdU by plasmatic CDA. Tubes were immediately centrifuged before freezing isolated plasma fraction at -80°C until analysis.

A combined assay for both gemcitabine and dFdU was developed and validated specifically for FFCD-1004 [10], adapted from Zhou *et al.* [16]. Briefly, from a 50 µl test-sample, 50 µl of free-drug plasma and 500 µl of precipitating solution containing internal standard (IS abacavir) were added. After 90 seconds of vortex-mixing, samples were centrifuged for 10 minutes and supernatant was evaporated under a nitrogen gentle stream at 45°C. Dry residue was dissolved in 600 µl of mobile phase, which was an acetate buffer, and transferred into a 96-well plate. A volume of 5 µl of extracted sample was then injected and analyzed. Calibration curve ranged from 10 to 5000 ng/ml and 1 to 50 µg/ml for gemcitabine and dFdU respectively.

Population PK of gemcitabine and dFdU

Population PK analyses of gemcitabine and dFdU were performed using the non-linear mixed effects modeling (NLME) software Monolix 4.3.2® (Lixoft, Paris, France). As gemcitabine and dFdU have very similar molecular weight (i.e. 263 and 264 g/mol respectively), gemcitabine and dFdU concentrations were expressed in mg/l and considered equimolar, as the conversion into mol/l would not influence the results.

As linear PK has been described for gemcitabine up to 1500 mg/m², and since our patients were treated with gemcitabine at 1000 mg/m², linear compartment models were selected for this analysis. Gemcitabine and dFdU kinetics were first analyzed separately as to identify the structure of the best-fitting PK models : one-compartment and two-compartment models have been assessed for each compound. We also tested three types of residual error (additive, proportional or

combined). Then, the models selected from the previous step were used to fit the PK of both compounds simultaneously. As more than 90% of gemcitabine are converted into dFdU by CDA, we assumed that the metabolic fraction of dFdU (Fm) was equal to 1. We assumed that PK parameters were log-normally distributed, and inter-individual variability was initially set at 30%, expressed as standard deviation.

Model quality was assessed based on the relative value of AIC (*Akaike information* criterion), the accuracy of parameters estimations (<30% for parameters estimations and <25% for inter-individual variability [17]), goodness of fit plots. Robustness of the model has been checked by setting the initial value of each PK parameter to ± 20% of the original initial value.

Age, sex, weight, body surface area (BSA), body mass index (BMI), serum creatinine levels, CDA activity and CDA genotype 79A>C (rs20726717) have been tested as covariates. All continuous covariates were log-transformed and centered to the median. We tested a linear model of the transformed covariates. For the categorical variable CDA genotype, three configurations have been explored: a score of 2 was attributed to patients carrying at least one mutated allele (A/C and C/C genotypes = 2 ; A/A genotype = 1); a score of 2 was attributed to patients with only the homozygous profile (C/C genotype = 2 ; A/C or A/A genotype = 1); a different score was attributed according to the different profiles (C/C genotype = 3 ; A/C genotype = 2 ; A/A genotype = 1). Each covariate was tested separately to assess its contribution to the model (*Likelihood ratio test LRT* p<0.05). Then, a full model was built, integrating all the statistically significant covariates. We eventually performed a stepwise backward elimination, consisting in removing the covariates which were not significantly contributing to the full model, starting with the less significant covariates. We also investigated the correlation between gemcitabine and dFdU PK parameters and the incidence of early severe hematological toxicities (ESHT, grade 3-4 hematological toxicities occurring during the first eight weeks of treatment), and the severe hematological toxicities occurring during the whole course of treatment (EST).

Results

Patients

A total of 44 patients participated to the PK study. Patients' characteristics of this subgroup were not different from the initial cohort [10] (*Student t test:* age p=0.703 ; weight p=0.641 ; BSA p=0.92 ; gemcitabine dose p=0.45; *Fisher test :* sex ratio p=0.45).

Optimal sampling time points

In order to accurately estimate population and individual gemcitabine PK parameters, three sampling time points have been proposed : T1=35min, T2=120min et T3=150min after starting the infusion.

Population PK analysis of gemcitabine and dFdU

Among the 44 collected kinetics, 5 have been removed because of the lack of sampling information, including sampling time. Two hundred and twenty nine gemcitabine or dFdU concentration observations were collected after LC-MSMS measuring, with 4 to 6 samples per patient. The PK protocol was not strictly respected, with a duration of infusion comprised between 30 and 110 min, the first sample being withdrawn between 0 and 40 minutes after the end of the infusion (30-115 min after the dose), and the last sampling time being comprised between 105 and 240 min after the end of the infusion (135-270 min after the dose).

A patient with inconsistent gemcitabine PK parameters has been identified during the building of gemcitabine PK model, with an estimated individual clearance for gemcitabine twice as high as the second highest value for the whole population, despite similar concentration values. Compared to other patients, this atypical patient had a specific feature: T1 sample was withdrawn at the exact stop time of a short 30 min-infusion (i.e.). We then suspected that this theoretical synchronization between the sampling time and the end of infusion, besides the fact that this sampling time occurred early, lead to a bad estimation of PK parameters of gemcitabine. To investigate the influence of the sampling time on the values of the PK parameters of this patient, we slightly delayed the time at which the theoretical T1 sample has been collected in this patient, thus from T30min to T32min, as it is unlikely that the end of infusion and withdrawal occurred at the very same moment. We then compared his individual parameters before and after modification of his T1 sampling time. The modification of his T1 sampling time reestablished normal values for gemcitabine clearance and distribution volume. As sampling time cannot be modified, this patient has been excluded from the analysis.

Separate analysis of kinetics of gemcitabine and dFdU alone showed that their PKs were best described by a one-compartment model, with an additive error for each compound (data not shown). When analyzed together, they were consistently described by a two-compartment model, parameterized with V1 (volume of distribution of gemcitabine), Cl1 (one-way clearance from gemcitabine to dFdU compartment), V2 (volume of distribution of dFdU), and Cl2 (dFdU clearance, **Figure 1)**. An additive error model best described the residual variability for both compounds in the combined model (**Table 1**).

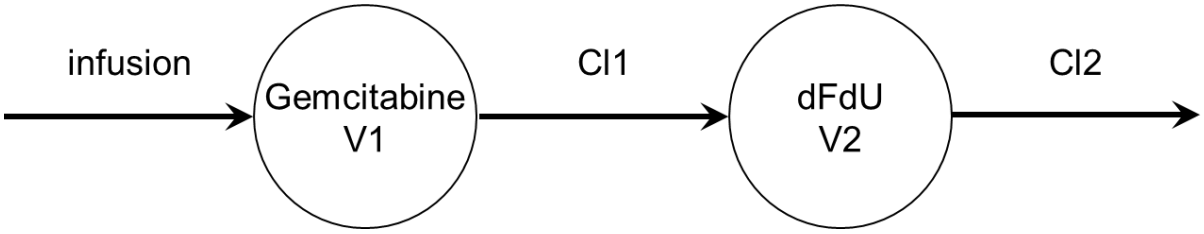


Figure 1. Compartmental representation of gemcitabine and dFdU PKs.
V1 = volume of distribution of gemcitabine ; Cl1 = clearance of gemcitabine ; V2 = volume of distribution of dFdU ; Cl2 = clearance of dFdU.

PK parameters		Estimated value [RSE%]	BSV [RSE%]
Gemcitabine			
	V1 (L)	45 [14%]	0.587 [20%]
	Cl1 (L/min)	4.03 [9%]	0.533[12%]
dFdU			
	V2 (L)	36 [7%]	0.358 [13%]
	Cl2 (L/min)	0.226[5%]	0.27 [15%]
Residual error			
	a1 (µg/mL)	0.0827 [10%]	
	a2 (µg/mL)	2.34 [13%]	

V1 = volume of distribution of gemcitabine; V2 = volume of distribution of dFdU; Cl1 = total clearance of gemcitabine; Cl2 = total clearance of dFdU; a1 = residual error for gemcitabine; a2 = residual error for dFdU

Table 1. Population PK parameters of gemcitabine and dFdU in the base model

Covariates	Gemcitabine PK parameters		dFdU PK parameters	
	V1	Cl1	V2	Cl2
Sex	NS	NS	0.0046	0.012
Age	NS	NS	NS	0.0072
Weight	NS	0.0031	0.022	0.039
BSA	NS	4.60^{E}-04	2.2^{E}-4	0.027
Creat	0.0021	3.50^{E}-05	NS	NS
CDA	NS	0.047	NS	NS

V1 = volume of distribution of gemcitabine; V2 = volume of distribution of dFdU; Cl1 = total clearance of gemcitabine; Cl2 = total clearance of dFdU; BSA = body surface area; Creat = serum creatinine levels; CDA = cytidine deaminase activity; NS = not significant (p>0.05)

Table 2. p-value of the Likelihood test ratio for covariate testing on pharmacokinetic parameters.

PK parameters	Estimated value [RSE%]	BSV [RSE%]	p-value
Gemcitabine			
V1 (L)	45 [14%]	0.578 [19%]	
Cl1 (L/min)	4.08 [7%]	0.434 [12%]	
b_Creat_Cl1 (µmol/L)	1.55 [24%]		3.1E-05
dFdU			
V2 (L)	34.5 [6%]	0.306 [14%]	
Cl2 (L/min)	0.227 [5%]	0.266 [15%]	
b_BSA_V2 (m^2)	2.3 [26%]		1.30E-04
Residual error			
a1 (µg/mL)	0.078 [10%]		
a2 (µg/mL)	2.32 [12%]		

V1 = volume of distribution of gemcitabine; V2 = volume of distribution of dFdU; b_BSA_V2 = body surface area action on V2; Cl1 = total clearance of gemcitabine; b_Creat_Cl1 = creatinine levels action on Cl1; Cl2 = total clearance of dFdU; a1 = residual error for gemcitabine; a2 = residual error for dFdU

Table 3. Population PK parameters of gemcitabine and dFdU in the final model.

During the first step of covariates selection, significant correlations were obtained between: sex and V2 and Cl2, age and Cl2, weight and BSA with V2, Cl1 and Cl2, creatinine levels with V1 and Cl1, and CDA activity with Cl1 (**Table 2**). All these relationships were included in a full model. After the backward elimination process, the final model included only relationships between creatinine levels (centered on the median 63.4 µmol/L) and Cl1, and between BSA (centered on the median 1.71 m^2) and V2 (**Table 3**), using the following equations:

$$Cl1_i = 4.03 \times \left(\frac{Creat_i}{63.4}\right)^{1.55} \times e^{\sqrt{BSV(Cl1),i}}$$

$$V2_i = 34.5 \times \left(\frac{BSA_i}{1.71}\right)^{2.3} \times e^{\sqrt{BSV(V2),i}}$$

Goodness-of-fit plots showed a slope close to 1 for both gemcitabine and dFdU on the observed *vs* predicted data plots, with a slight deviation during the time course on population plots for gemcitabine and for low concentrations for dFdU (**Figure 2**). Analysis of population weighted residuals showed that the median spline is close to zero for dFdU and gemcitabine, with a small deviation from the zero line for gemcitabine, especially for the high concentrations and also for small concentrations of dFdU (**Figure 3**).

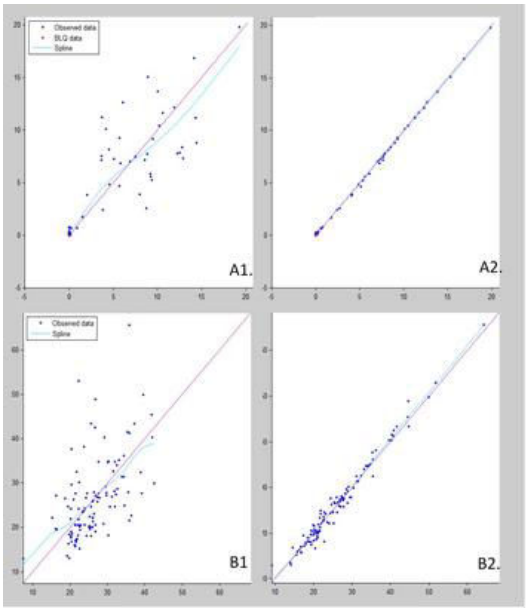


Figure 2. Final model: Plots of observed concentrations against predicted population (1) or individual (2) concentrations of gemcitabine (A) and dFdU (B).

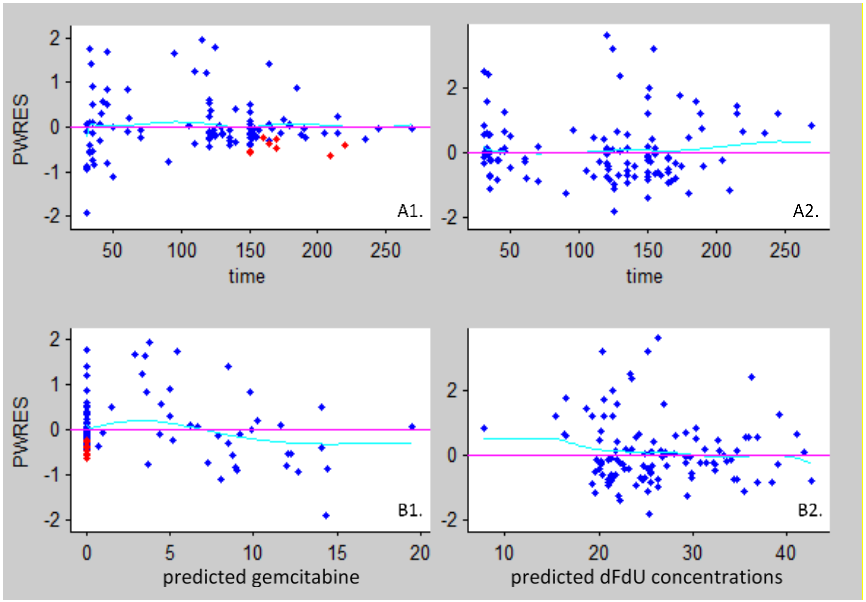


Figure 3. Population weighted residuals during the time course for gemcitabine (A1) and dFdU (A2) and population weighted residuals against predicted concentrations for gemcitabine (B1) and dFdU (B2).

We eventually explored the influence of gemcitabine PK parameters on the outcome of severe toxicities. Eleven patients out of 38 experienced severe hematological toxicities: 8 patients had early toxicities, among which 2 also had severe toxicities at a later stage. No significant correlation has been found between gemcitabine PK parameters and incidence of severe toxicities, neither had they occurred early nor during the whole treatment.

Discussion

In this study, we performed a population PK study in 39 patients with pancreatic adenocarcinoma, treated with gemcitabine-monotherapy in adjuvant setting. We succeeded in performing this analysis, using a limited-sampling strategy protocol, with the last sample withdrawn only 2 hours after ending the infusion.

We first calculated three sampling time points that would allow accurate estimations of gemcitabine and dFdU PK parameters, using KineticPro®: 35min, 120min and 150 min.

Combined PKs of gemcitabine and dFdU were best described by a two-compartment model, with an additive error model for both compounds. Using the LSS, we succeeded in describing gemcitabine and dFdU PKs, although the protocol was not strictly followed.

To date, few studies have investigated the population PK profiles of gemcitabine and its dFdU metabolite in patients. In two studies [5,6], two-compartment models best fitted to dFdC and dFdU PK. These discrepancies in model structures may be ascribed to the design of our study: three time points is not enough to evaluate two phases. In the above mentioned studies, samples were collected until 4 hours at least after gemcitabine infusion (up to 24h post-infusion for the study performed by Jiang [6]), and from 7 to 9 samples have been collected during this period of time. However, clearance and distribution volume for gemcitabine estimated by our model (4.08 L/min and 45 L) were consistent with those obtained by Jiang (2.7 L/min and 30 L). For dFdU, population clearance estimated by our model (0.227 L/) was in the same range as intercompartmental clearance (0.2 L/min) in Jiang's publication. This might be explained by the short duration of our study allowing the description of the first decrease phase only. The between subject variability estimated for both compounds in this analysis was in full line with those previously published [5,6], with a wider variability for gemcitabine (57.8 and 43.4% for V1 and Cl1 respectively) than for dFdU (30.6 and 26.6% for V2 and Cl2 respectively).

The goodness-of-fits and residual plots showed the satisfactory performance of our model. Population and individual observed *vs* predicted concentrations plots showed a spline line close to the identity line, reflecting the good precision of the predictions. For population weighted residual (PWRES) plots, the spline line was close to the zero line, showing an absence of bias. PWRES values ranged from -2 and 2, and were mostly comprised between -1 and 1, indicating a small residual error. Visual predictive checks have not been studied, as they are not informative when treatment and sampling protocols are not strictly respected [18]. We checked that inclusion or exclusion of the patient 8 in the final model did neither change the pharmacokinetic parameters significantly nor the conclusions.

In our study, additive error model best described residual error for both compounds, while others studies [5,6] used a proportional error model. This may be explained by the lower range of concentrations measured for gemcitabine and dFdU, as kinetics were observed for a shorter time.

Covariate analysis showed that creatinine levels and BSA were correlated with clearance of gemcitabine and volume of distribution of dFdU, respectively. Similar data have already been shown in the study of Jiang [6], where estimated creatinine clearance was significantly correlated with clearance of dFdU whereas BSA had a significant effect on the volume of distribution of the central compartment of dFdU and on the inter-compartmental clearance, as dFdU was there described by a two-compartment model. Here, serum creatinine levels were associated with the clearance of gemcitabine. This may be explained by the proportion of gemcitabine dose (<10%, [2]) eliminated in urine as unchanged form. Surprisingly, neither CDA activity nor CDA genotype was correlated with PK of gemcitabine. This is probably due to an absence of CDA deficient patients, as CDA activity ranged from 1.4 to 6.7 U/mg (threshold CDA deficient < 1.3 U/mg, [4]). Regarding toxicity, no link has been found between pharmacokinetic parameters and occurrence of severe toxicities, neither early nor during the whole treatment. This may be ascribed to a small number of patients and sparse data, which imply a lack of statistical power.

This study is the first PK study performed using a limited sampling strategy, allowing to estimate individual and population PK parameters for gemcitabine and dFdU. We found that BSA and creatinine levels were correlated with volume of distribution of dFdU and clearance of gemcitabine respectively. We showed that CDA activity does not influence gemcitabine PK when deficiency is not proven.

References

1. Abbruzzese JL, Grunewald R, Weeks EA, Gravel D, Adams T, Nowak B, et al. A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. J Clin Oncol. 1991;9:491–8.
2. Lilly E. Monography of Gemzar. 2006; Available from: www.gemzar.com
3. Micozzi D, Carpi FM, Pucciarelli S, Polzonetti V, Polidori P, Vilar S, et al. Human cytidine deaminase: a biochemical characterization of its naturally occurring variants. Int J Biol Macromol. 2014;63:64–74.
4. Ciccolini J, Dahan L, Andre N, Evrard A, Duluc M, Blesius A, et al. Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. J Clin Oncol. 2010;28:160–5.
5. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, Hasegawa R, Saito Y, Ueno H, et al. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: impact of genetic polymorphisms. Clin Pharmacokinet. 2010;49:549–58.
6. Jiang X, Galettis P, Links M, Mitchell PL, McLachlan AJ. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in patients with cancer: effect of oxaliplatin and infusion rate. Br. J. Clin. Pharmacol. 2008;65:326–33.
7. De Pas T, de Braud F, Danesi R, Sessa C, Catania C, Curigliano G, et al. Phase I and pharmacologic study of weekly gemcitabine and paclitaxel in chemo-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer. Ann Oncol. 2000;11:821–7.
8. Maring JG, Groen HJ, Wachters FM, Uges DR, de Vries EG. Genetic factors influencing pyrimidine-antagonist chemotherapy. Pharmacogenomics J. 2005;5:226–43.
9. Ueno H, Kaniwa N, Okusaka T, Ikeda M, Morizane C, Kondo S, et al. Homozygous CDA*3 is a major cause of life-threatening toxicities in gemcitabine-treated Japanese cancer patients. Br J Cancer. 2009;100:870–3.
10. Serdjebi C, Gagnière J, Desramé J, Fein F, Guimbaud R, François E, et al. FFCD-1004 clinical trial: Impact of Cytidine Deaminase activity on clinical outcome in gemcitabine-monotherapy treated patients. PloS one. In press.
11. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res. 2008;14:1797–803.
12. Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M, Leon LG, Incecco A D', Loosekoot N, et al. Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. Ann. Oncol. 2012;23:670–7.
13. Maring JG, Wachters FM, Slijfer M, Maurer JM, Boezen HM, Uges DR, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer patients: impact of the 79A>C cytidine deaminase polymorphism. Eur J Clin Pharmacol. 2010;66:611–7.
14. Dy GK, Suri A, Reid JM, Sloan JA, Pitot HC, Alberts SR, et al. A phase IB study of the pharmacokinetics of gemcitabine and pemetrexed, when administered in rapid sequence to patients with advanced solid tumors. Cancer Chemother. Pharmacol. 2005;55:522–30.
15. Shord SS, Faucette SR, Gillenwater HH, Pescatore SL, Hawke RL, Socinski MA, et al. Gemcitabine pharmacokinetics and interaction with paclitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Cancer Chemother. Pharmacol. 2003;51:328–36.
16. Zhou J, Gao S, Zhang F, Jiang B, Zhan Q, Cai F, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of seven commonly used anticancer drugs in human plasma. J Chromatogr B Anal. Technol Biomed Life Sci. 2012;906:1–8.
17. Byon W, Smith M, Chan P, Tortorici M, Riley S, Dai H, et al. Establishing Best Practices and Guidance in Population Modeling: An Experience With an Internal Population Pharmacokinetic Analysis Guidance. CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol. 2013;2:1–8.
18. Simon N, Romano O, Michel P, Pinçon C, Vasseur M, Lemahieu N, et al. Influence of infusion method on gemcitabine pharmacokinetics: a controlled randomized multicenter trial. Cancer Chemother. Pharmacol. 2015;
19. Sherwin CMT, Kiang TKL, Spigarelli MG, Ensom MHH. Fundamentals of population pharmacokinetic modelling: validation methods. Clin. Pharmacokinet. 2012;51:573–90.

V ÉTUDE GÉNÉTIQUE APPROFONDIE DE LA *CDA*

1 Introduction

Dans le cadre de l'étude FFCD-1004, une étude ancillaire a initialement été projetée : il s'agit du séquençage de la *CDA*, qui doit permettre de réaliser une étude haplotypique d'une part, et de tenter d'établir des relations génotype-phénotype, d'autre part.

Par manque de temps, mais également de matériel dédié pour réaliser cette étude en 2014-2015, nous vous présentons ici les travaux théoriques ainsi que la partie pratique qui ont d'ores et déjà été réalisés. Le projet consiste à séquencer le gène de la *CDA* à partir d'un séquenceur 454 GS Junior® (Roche Diagnostic) pour le séquençage ainsi qu'un Acces Array® (Fluidigm) pour la préparation des amplicons de la librairie, disponibles au Service de Transfert en Oncologie Biologique (STOB). Étant donné le budget qui nous a été alloué pour réaliser cette étude, un séquençage total du gène est impossible et nous avons donc choisi de sélectionner les variations génétiques à étudier, sur divers critères. Les variations ainsi sélectionnées nous ont permis de réaliser un découpage du gène, et de designer une trentaine d'amplicons de longueur variant entre 300 et 400 pb, adaptés à la technologie Roche, qui est la seule à permettre la lecture de grande séquence (1000 bases maximum). D'autre part, les prélèvements de sang total des patients de l'étude FFCD ont été extraits sur automate BioRobot EZ1® de Qiagen, afin de récupérer l'ADN génomique. Deux protocoles d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ont été mis au point pour permettre dans un premier temps l'amplification spécifique de chaque partie ciblée, suivie d'une amplification simultanée de tous les amplicons avec ajout d'identifiants patients. Les résultats générés doivent nous permettre de caractériser les variations génétiques de la *CDA* présentes chez des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique, de rechercher et d'identifier de nouvelles variations sur le gène, d'établir des haplotypes chez cette population de patients, et enfin d'attribuer un phénotype CDA à partir du génotype des patients (**Figure 27**).

2 PATIENTS, MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.(1) Patients et traitements

L'ensemble des patients ayant été inclus dans l'essai FFCD-1004 ont également participé à cette étude. Pour rappel, l'étude FFCD-1004 est une étude multicentrique prospective dont le but était de déterminer si le statut CDA pouvait être un facteur prédictif des toxicités hématologiques sévères et précoces chez les patients traités par gemcitabine en monothérapie pour un adénocarcinome pancréatique réséqué. Les patients étaient donc traités par gemcitabine à la dose

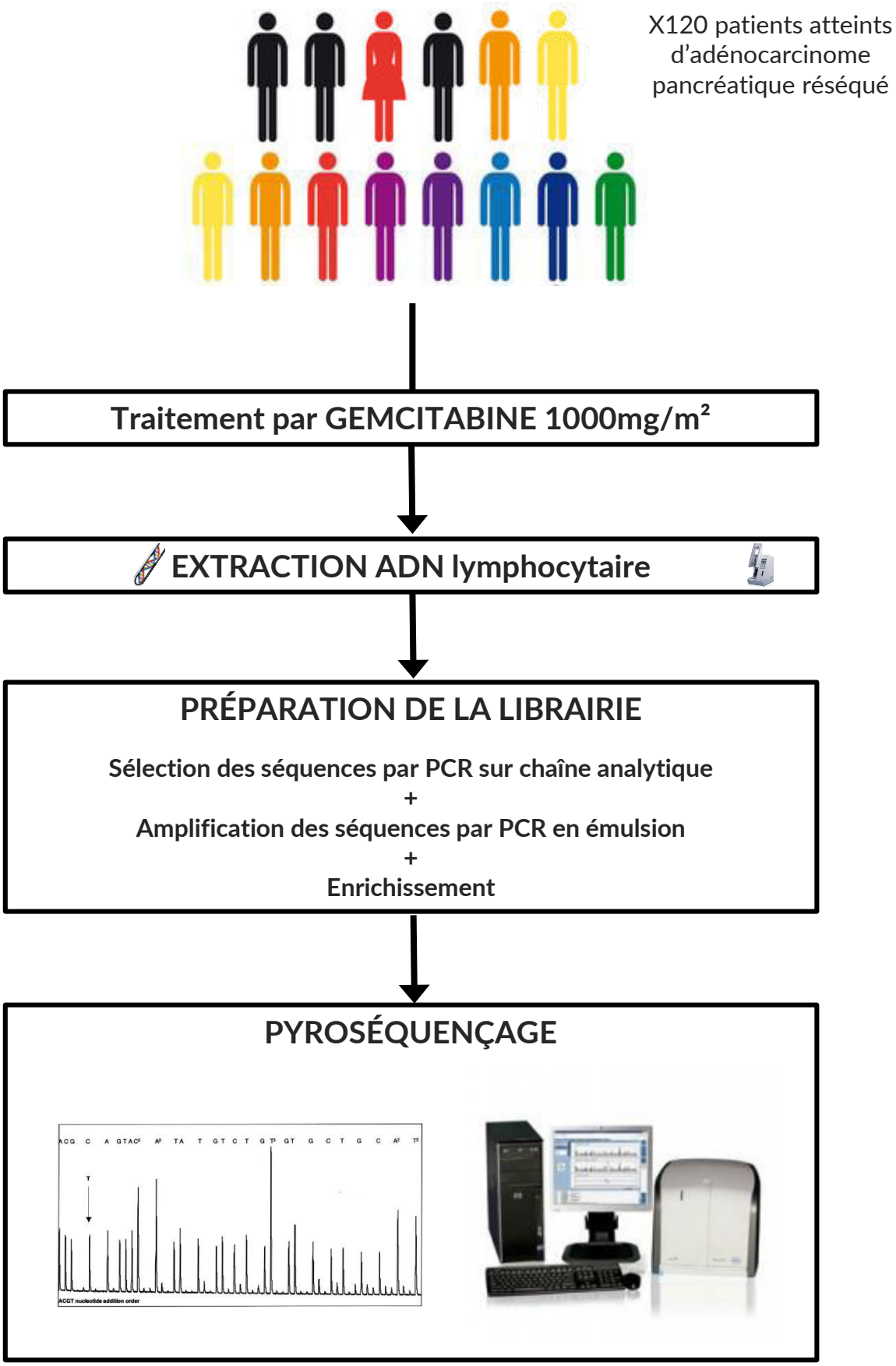


Figure 27. Projet Séquençage partiel de la CDA

de 1000 mg/m² en perfusion intraveineuse de trente minutes, après résection d'un adénocarcinome pancréatique (*cf* Publication VI).

2.(2) Extraction d'ADN génomique

Un prélèvement de sang total sur tube EDTA par patient a été réalisé avant la première administration de gemcitabine. L'ADN a été extrait grâce au kit EZ1 DNA Blood 200 µl, à partir d'une prise d'essai de 200 µl de sang total, permettant d'obtenir 200 µl de solution d'ADN génomique. L'ADN extrait a ensuite été dilué au 1/10^{e} dans de l'eau pour préparation injectable (ppi) et stocké à -20°C jusqu'à analyse.

2.(3) Sélection des polymorphismes à rechercher

Etant donné que le séquençage total du gène *CDA* est impossible, nous avons décidé de sélectionner les variations génétiques d'intérêt.

Dans un premier temps, nous avons recensé toutes les variations génétiques de la *CDA* figurant dans la base de données Ensembl [268], décrites au 1 janvier 2014, depuis la position génomique 20 588 948 à 20 618 908 sur le brin sens du chromosome 1. Ceci a permis de récupérer 1032 variations génétiques constitutionnelles (**Données supplémentaires S1** [317]). Pour chacune d'entre elles, nous avons récupéré plusieurs informations à partir de la base de données dbSNP [318] et attribué des scores permettant de classer les différentes catégories d'items entre elles (**Tableau 4**) :

- sa position par rapport à la séquence codante sur le brin sens.
- son numéro d'identification rs Ensembl.
- sa localisation structurale (par ordre d'importance décroissante) exon ; région de splicing ; région régulatrice du gène ; et upstream/downstream régions, régions 5' et 3'UTR, et introns simples.
- si la variation génétique entraîne une variation du codon et, le cas échéant, de la séquence protéique.
- les scores SIFT (si <0.05 modifications avec conséquences pathologiques) et PolyPhen (si proche de 1, modifications avec conséquences pathologiques), qui permettent d'attribuer une probabilité de pathogénicité de la variation de la séquence protéique.
- les variations génétiques en déséquilibre de liaison avec celle étudiée.
- la MAF, d'après le Projet *1000 Genomes Phase I population*.
- les molécules pour lesquelles une modification génétique de la *CDA* a été associée à un phénotype particulier, avec leurs références.

Tableau 4. Classification des variations génétiques de la *CDA* selon leur importance.

DNA position	Identification Number	Type	Region code	Modification of codon	Modification of protein sequence	SIFT score	PolyPhen score	Score SIFT+Polyphen	MAF 1000 Gen.	Frequency score	Data compil	Interest
c.-5050C>G	rs111779871	Upstream gene variant	1					ND	0.020	1	1/ND/1	0
c.-4047G>A	rs77948266	Upstream gene variant, Regulatory gene variant	2					ND	0.020	1	2/ND/1	1-1
c.-47C>T	rs375305584	5'UTR variant, Regulatory gene variant	2					ND		ND	2/ND/ND	2
c.-33C>T	rs201604880	5'UTR variant, Regulatory gene variant, Feature truncation	2					ND		ND	2/ND/ND	2
c.1A>G	rs200706553	Initiator codon variant, Regulatory region variant	2	ATG>GTG	Met1Val	0	0.43	1		ND	2/1/ND	3
c.343G>A	rs147533006	Missense variant	2	GTG, ATG	Val115Met	0.02	0.906	2		ND	2/2/ND	4
c.86C>A	rs141943457	Missense variant, Regulatory region variant	2	GCC, GAC	Ala29Asp	0	0.997	2		ND	2/2/ND	4
c.369G>A	rs139735135	Synonymous	2	ACG, ACA	Thr123	NA	NA	0		ND	2/0/ND	3
c.51G>A	rs142509571	Synonymous, Regulatory region variant	2	CAG, CAA	Gln17	NA	NA	0	0.214	2	2/0/2	3
c.324G>A	rs375001270	Synonymous, Regulatory region variant, Splice region variant	2	GAG, GAA	Glu108	NA	NA	0		ND	2/0/ND	3
c.324+956C>T	rs148751768	Intron variant	1					ND	0.001	1	1/ND/1	0
c.154+2561_154+2562insG	rs200655362	Intron variant, Feature elongation	1					ND	0.102	1	1/ND/1	0
c.154+5255delG	rs137982395	Intron variant, Feature truncation	1					ND	0.020	1	1/ND/1	0
c.154+37G>A	rs12059454	Intron variant, Regulatory region variant	2					ND	0.130	1	2/ND/1	1-1
c.154+729_154+730insA	rs35187698	Intron variant, Regulatory region variant, Feature elongation	2					ND		ND	2/ND/ND	2
c.155-7033delT	rs67069964	Intron variant, Regulatory region variant, Feature truncation	2					ND		ND	2/ND/ND	2
c.267-165A>T	rs72553954	Intron variant, Regulatory region variant, TF binding site	2					ND	0.014	1	2/ND/1	1-1
c.267-6C>T	rs149618257	Intron variant, Regulatory region variant, Splice region variant	2					ND	0.000	0	2/ND/0	1-0
c.*97T>C	rs1781459	3'UTR variant	1					ND		ND	1/ND/ND	0
c.*191_*192insC	rs71734620	3'UTR variant, feature elongation	1					ND	0.294	2	1/ND/2	0
c.*88delC	rs35163879	3' UTR variant, Feature truncation	1					ND		ND	1/ND/ND	0
c.*391A>G	rs12128671	Downstream region variant	1					ND	0.315	2	1/ND/2	0

Pathogenic variation	Exon variant	
	Splice region variant	
	Regulatory region variant	
	Intron variant	
	3'UTR variant	
	Up or downstream region variant	

Non synonymous	Pathogenic if near 0	Pathogenic if near 1
Synonymous	No pathogenic if near 1	No pathogenic if near 0

MAF=0.000 ou NA
MAF≥0.16
0.001≤MA

Nous avons ensuite gradé les différentes classifications afin de déterminer quelles variations il était le plus intéressant d'étudier :

- tout d'abord, un score a été donné selon la probabilité de pathogénicité d'après SIFT et Polyphen (ND : pas de score calculé, 0 pathogénicité peu probable, 2 pathogénicité d'après les deux logiciels, et 1 pour les résultats discordants)
- un score allant de 0 à 2 est attribué selon la région dans laquelle se trouve la variation génétique (0 région sans importance *a priori*, à 2 exon)
- enfin, un score a été également attribué selon la MAF (ND : pour les MAF non décrites, 0 pour les MAF nulles, 1 pour les MAF comprises entre 0 et 16% exclus, et 2 pour les MAF≥16%). La MAF-seuil de 16% a été calculée dans le but de vérifier le respect de l'équilibre de Hardy-Weinberg dans la population étudiée (**Annexe 6**). Les variations avec une MAF non décrites ainsi que celles supérieures à 16% ont retenu notre attention, puisque notre étude consiste notamment à tenter d'estimer les fréquences alléliques de ces variations, dont nous n'avons aucune information.

Enfin, nous avons finalement attribué un score final par rapport aux items définis précédemment, s'échelonnant de 0 à 4, relatant de l'intérêt pour la variation (**Tableau 4**). Seules les variations ayant un score compris entre 2 et 4 ont été gardées pour la suite de ce travail.

La suite a consisté à regrouper les différentes variations sélectionnées en amplicon d'ADN ne dépassant pas 400 pb environ, taille optimale pour le séquençage par 454 GS Junior®.

2.(4) Conception des amorces

L'étape suivante a consisté en la conception *in silico* des amorces permettant de sélectionner les régions d'intérêt sur notre gène. Pour cela, nous avons travaillé en étroite collaboration avec le STOB, à Marseille. Au cours de cette étape, nous avons choisi des amorces sens (S) et antisens (AS) à partir de la séquence complète du gène *CDA* extraite d'Ensembl [268]. La sélection des systèmes PCR les plus adaptés pour chaque région d'intérêt a été réalisée à l'aide des logiciels en ligne gratuits Primer3 et OligoAnalyzer [319,320], en sélectionnant, pour chaque système PCR, une grande portion du gène englobant plusieurs variations théoriquement regroupées au sein d'un même amplicon.

Les amorces doivent présenter une température de fusion (Tm, *Melting temperature*) comprise entre 58 et 60°C (Eq. X) pour une taille comprise entre 18 et 25 bases et dont la richesse en bases G et C varie entre 40 et 60%.

$$\mathbf{Tm} = \mathbf{4\ x\ (G + C) + 2\ x\ (A + T)} \qquad \mathbf{(1)}$$

Tableau 5. Avantages et inconvénients des différentes générations de séquençage [323].

	1ère Génération	2ème Génération	3ème Génération
Principe de séquençage	*Sanger*	Par synthèse (SBS) *« wash and scan »*	SBS, par dégradation lecture en temps réel
Nbre de molécule nécessaires pour produire un *read*	millions	milliers	unique
Volume réactionnel	µL	pL	fL
Coût	2,7 milliards de $	1000 – 2500 $	élevé
Temps séquençage d'un génome humain	13 ans	Quelques jours	Quelques jours
Taille des reads	moyen	court à moyen	Long
Output	faible	élevé	modéré
Taux d'erreur	faible	modéré à faible	élevé
Préparation des échantillons	simple	complexe	complexe ou simple
Analyses des données	simple	complexe car beaucoup de données *Reads* courts. Logiciels existants	complexe. Pas de logiciels

Si possible, les amorces sont choisies dans les introns encadrant l'exon d'intérêt ou les variations, sauf dans le cas où la taille de l'exon est trop importante.

De nombreuses séquences sont généralement proposées, et de ce fait, un tri est généralement nécessaire, basé sur les critères précédents mais également sur la probabilité qu'ont les oligonucléotides de se dimériser et de former des polymères d'amorces et/ou amorces/sondes, sans oublier les restrictions imposées par la zone à amplifier. Une fois le système PCR choisi, la spécificité théorique est testée par comparaison des séquences détectées à l'aide du programme BLASTN® version 2.2.2 (*Basic local alignment search tool nucleotide* [321]). La banque d'acides nucléiques est Genbank, « *homo sapiens* » [322].

De plus, en vue de créer la banque de clones pour analyse NGS, il est nécessaire de réaliser des PCR en multiplex permettant le séquençage simultané de nombreux amplicons et patients. Dans ce but, le STOB a conçu des amorces universelles, qui possèdent chacune une séquence unique de 10 bases (MID, *Multiplex identifier*), permettant d'identifier le patient. Lors de l'étape post-analytique, une étape de démultiplexage permet d'identifier chaque patient grâce aux MID, les amplicons étant eux alignés aux séquences de référence spécifiques de chaque amplicon.

2.(5) Pyroséquençage partiel de la *CDA*

La technique de pyroséquençage sur 454 GS Junior® est une technique issue de la deuxième génération de séquençage qui utilise les outils issus de la microfluidique. Cette méthode repose sur un principe différent du séquençage conventionnel de Sanger (**Tableau 5,** [323]). Nous vous présentons brièvement son principe sur cet appareil.

2.5.(1) Préparation de la librairie

Sélection des séquences par PCR

Les différentes régions d'intérêt à séquencer sont sélectionnées par PCR, grâce aux amorces conçues précédemment (amorces universelles + amorces *in silico*). Les récentes avancées en matière de microfluidique, notamment avec la mise au point d'automates performants capables de manipuler de très faibles volumes (de l'ordre du picolitre, Fluidigm Access Array System®) nous permettent d'amplifier toutes les régions sélectionnées chez l'ensemble de nos patients en une seule fois (principe du multiplexage, rendu possible grâce à l'utilisation des MID). La méthode utilisée est une méthode « pair-end » qui permet la lecture en sens et antisens de l'amplicon. Des séquences-adaptatrices, appelées adaptateurs A (brin S) et B (brin AS), sont rajoutées lors d'une deuxième PCR sur l'ensemble des séquences amplifiées pour tous les patients. Ces adaptateurs révèleront leur utilité dans une étape ultérieure, la PCR en émulsion (emPCR). À la fin de cette étape, nous obtenons des fragments d'ADN contenant la séquence d'intérêt, suivi des amorces

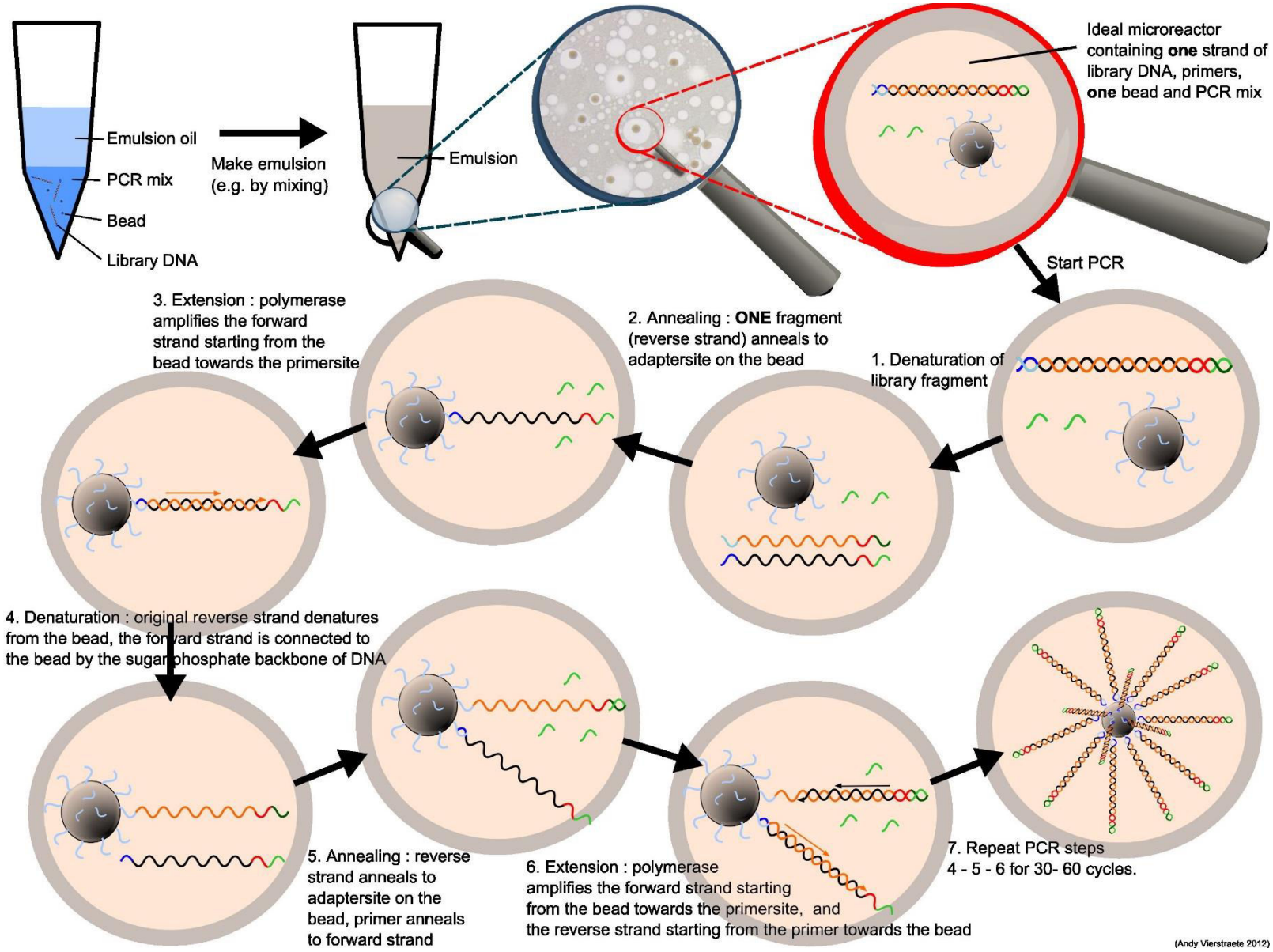


Figure 28. Principe de la PCR en émulsion [324].

conçues, auxquelles sont juxtaposés les MID, et enfin, les adaptateurs aux extrémités. Les différentes séquences sont ensuite réunies dans une seule et même solution.

PCR en émulsion emPCR

Cette étape est une étape-clé dans la préparation de la librairie. Elle permet d'amplifier de façon spécifique chacun des brins d'ADN issus des étapes précédentes et de les accrocher de manière covalente à des supports microfluidiques (billes de 21µm) qui serviront eux-mêmes de supports à la réaction de pyroséquençage.

Chaque bille est capable de reconnaître les séquences complémentaires d'un seul type d'adaptateurs (A ou B), grâce à un très grand nombre de récepteurs spécifiques à leur surface (**Figure 28,** [324]). Ces billes sont ensuite réparties dans des micro-gouttes d'eau dispersées dans de l'huile (émulsion de type eau dans huile) à raison d'une une bille par micro-goutte. Ainsi chaque goutte constitue un micro-réacteur, où sera amplifiée de façon spécifique une seule molécule d'ADN liée de manière covalente au support : on parle ainsi d'amplification clonale. En prenant l'exemple des billes B, au cours du premier cycle de PCR, l'amorce B associée au fragment d'ADN initial va assurer la synthèse de son brin complémentaire. Au cycle suivant, après dénaturation, la molécule d'ADN simple néo-synthétisée reste fixée sur la bille et va être utilisée pour la synthèse d'une autre matrice à partir de l'amorce A présente dans le milieu réactionnel. La molécule d'ADN simple brin de départ est quant à elle réutilisée par une autre amorce B fixée sur la bille.

Enrichissement de la librairie

Cette étape d'enrichissement de la librairie consiste à éliminer les billes ne portant pas de brin d'ADN à sa surface, afin de ne garder que celles ayant amplifié de façon clonale les différents brins d'ADN. Ces billes serviront ensuite de support au pyroséquençage. Pour ce faire, après dénaturation chimiques des brins d'ADN à la surface des billes, nous utilisons des amorces biotinylées et des billes magnétiques qui ne reconnaissent que les billes greffées à l'ADN. L'utilisation d'un support aimanté nous permet de récupérer les billes purifiées.

2.5.(2) Pyroséquençage et lecture

Le pyroséquençage est une technique de séquençage par synthèse, et se fait en *paired-end*, c'est-à-dire à partir des deux extrémités du fragment à séquencer, présentant l'avantage de détecter les variations structurelles, à type d'insertions/délétions, de mieux détecter les régions répétées et les erreurs d'alignement, réduisant ainsi le taux d'erreur de séquençage.

Le support de séquençage est une plaque PTP (*Pico titer plate*) sur laquelle se trouvent près de 300 000 puits, dont un tiers est utilisé comme contrôle qualité de la réaction de séquençage.

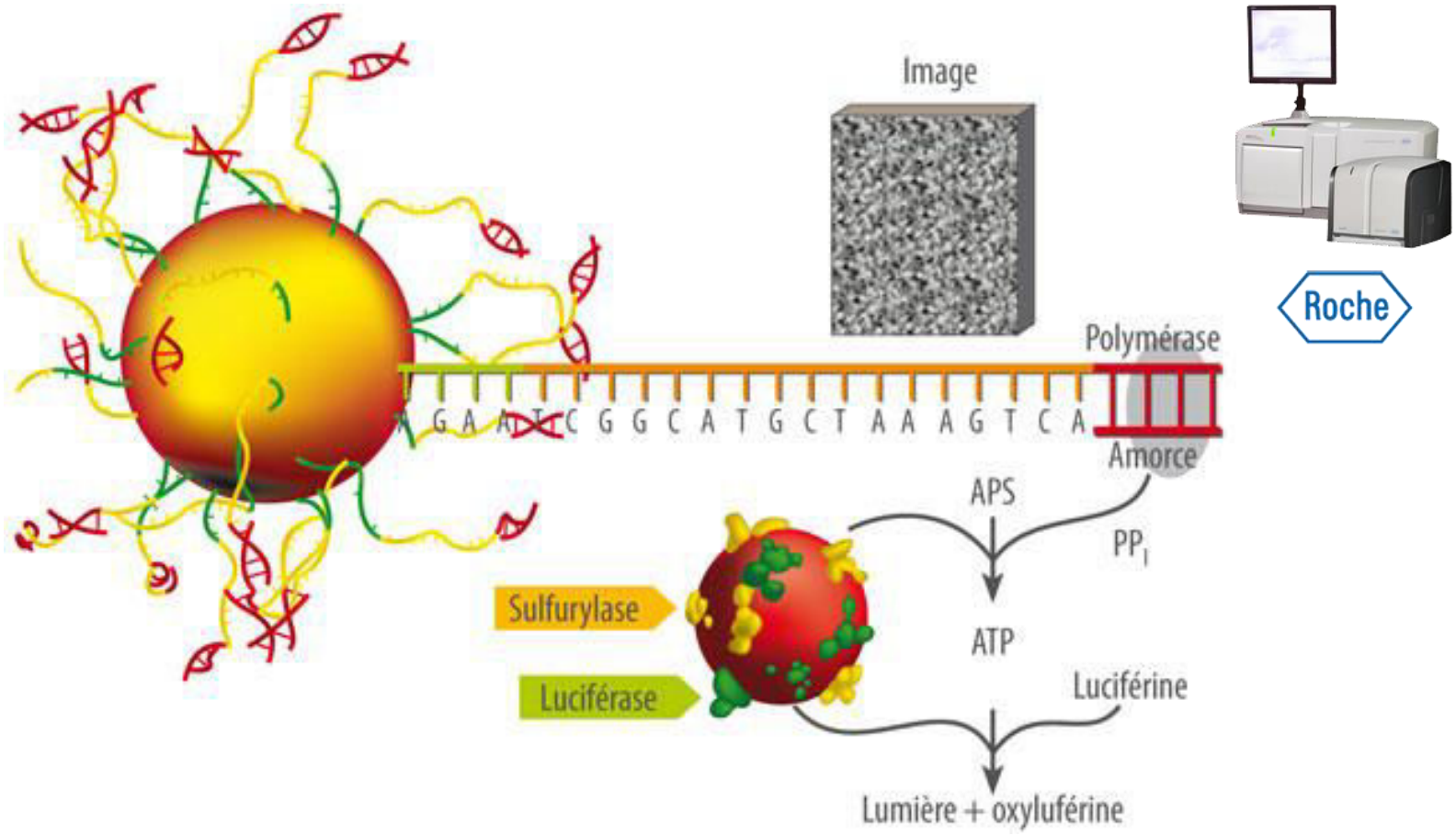


Figure 29. Principe du pyroséquençage sur la technologie 454 des laboratoires Roche® {325].

L'amorce se fixe sur l'extrémité libre du brin d'ADN. Lors du flow cycle, lorsqu'une base s'incorpore, il y a libération d'un pyrophosphate inorganique. Ce dernier va réagir avec l'ATPsulfurylase qui permet la production d'ATP. La luciférase utilise l'ATP pour oxyder la luciférine présente dans le milieu, la dégradant et produisant ainsi un signal lumineux, mesuré par un capteur CDD, signal proportionnel au nombre de nucléotides incorporés.

Ces puits constituent le milieu réactionnel de la réaction de pyroséquençage, et leur taille a ainsi été conçue pour ne recevoir qu'une seule bille. Par opposition au séquençage Sanger, le pyroséquençage réalise un séquençage par synthèse où les différents nucléotides (A, T, C, G) sont proposés de manière séquentielle et ce, plusieurs fois de suite définissant ainsi le *flow cycle*.

La séquence génétique est lue grâce à un signal lumineux émis lors de l'incorporation d'un ou plusieurs nucléotides lors de la synthèse du nouveau brin d'ADN (**Figure 29**, [325]. Toujours dans le cas des amorces B, l'amorce A est sert de base pour initier cette polymérisation. Lorsqu'un nucléotide est incorporé lors de l'élongation du brin d'ADN, il libère un pyrophosphate inorganique (PPi). Celui-ci sert alors de substrat à l'ATPsulphurylase, conduisant ainsi à la synthèse d'ATP. La luciférase présente dans le milieu utilise cet ATP récemment formé pour oxyder la luciférine, dégageant ainsi de la lumière. Enfin, le signal lumineux émis est capté par un capteur CDD (*Charge-Coupled Device*) et les résultats sont présentés sous forme d'un pyrogramme. Après incorporation de chaque nucléotide, l'apyrase présente dans le milieu élimine le surplus de bases, et le nucléotide suivant est ajouté et ainsi de suite.

3 RÉSULTATS

Un total de 95 échantillons a pu faire l'objet de l'extraction d'ADN. Les autres prélèvements ne remplissaient pas les critères permettant d'assurer une bonne qualité de l'ADN extrait à partir de notre technique sur automate EZ1® (aliquots de plasma ou sérum), ou les échantillons étaient tout simplement manquants. Pour chaque patient, un volume de solution d'ADN de 200 µl a été obtenu après extraction.

La classification que nous avons mise au point nous a permis de retenir 125 variations génétiques sur les 1032 recensées initialement. Après regroupement des variations sélectionnées et découpage du gène, nous avons obtenu 29 amplicons de 300 à 400 pb, élargissant le nombre de variations à étudier à 265 (**Données supplémentaires S1** [317]). Les séquences à étudier sont regroupées dans les **données supplémentaires S2** [317].

Le séquençage se fera dans un temps ultérieur à la soutenance de ces travaux, notamment dans le cadre d'un post-doctorat au sein du STOB.

DISCUSSION

En oncologie, le développement de la médecine personnalisée est devenu un enjeu capital pour assurer une meilleure prise en charge de la pathologie cancéreuse chez le patient et diminuer les coûts de cette prise en charge. Au niveau tumoral, la personnalisation des traitements passe essentiellement par la caractérisation des cibles pharmacologiques, notamment en mesurant leur expression, ou en vérifiant leur intégrité (présence de mutations), et a conduit à l'application généralisée du paradigme « un traitement unique pour une tumeur unique ».

Depuis l'identification des marqueurs prédictifs de la réponse au traitement selon les caractéristiques génétiques et moléculaires de la tumeur, la recherche de ces biomarqueurs s'est largement inscrite dans une pratique clinique de routine, permettant ainsi de stratifier les patients dans le but de choisir la meilleure stratégie thérapeutique à appliquer. Par exemple, un traitement par trastuzumab n'est envisagé que chez les patients porteurs d'un cancer du sein HER2 positifs, ou bien les anti-EGFR (cetuximab, panitumumab) ne sont pas indiqués chez les patients porteurs d'une mutation KRAS ou NRAS. Cette prise de conscience de la possibilité de stratifier les tumeurs selon leur profil génétique et moléculaire a permis une nette amélioration de la prise en charge des cancers, et a permis de choisir de façon plus fine la stratégie à adopter pour traiter les patients.

Outre les caractéristiques génomiques, l'étude des caractéristiques constitutionnelles du patient impactant sur le processus ADME constitue un second volet à prendre en considération lors de la mise en application de la médecine personnalisée [326]. En effet, ces traits peuvent également constituer des marqueurs prédictifs de réponse à un traitement, en termes d'efficacité et de toxicité. Parmi les exemples les plus connus, on retrouve l'UGT1A1, enzyme pour laquelle la présence de la variation génétique UGT1A1*28 va entraîner des modifications d'activité enzymatique, conduisant à un risque majeur de toxicités pour les patients traités par irinotécan à hautes doses (>250/m²). Bien connu également, le cas de la DPD, où une déficience sévère est fortement associée à l'augmentation d'un risque de toxicité sévère chez les patients traités par 5-FU ou capécitabine [326].

Les deux biomarqueurs précédents constituent des exemples de biomarqueurs prédictifs de l'apparition de toxicités sous cytotoxiques. Toutefois, leur recherche aujourd'hui n'est pas encore systématique. Actuellement, la prise en charge des cancers reste très largement dépendante de l'utilisation de ces agents cytotoxiques, et ce, malgré le nombre croissant de biothérapies et de thérapies ciblées approuvées dans diverses pathologies, notamment avec l'essor de l'immunothérapie. Parmi les cytotoxiques les plus largement utilisés, nous retrouvons la classe des analogues nucléosidiques, représentée par peu de composés, mais dont les indications sont multiples et variées. Ainsi, ces molécules, qui appartiennent à la famille des antimétabolites, sont

indiquées dans la prise en charge des tumeurs solides ainsi que des syndromes myélodysplasiques, aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant. Leur activité cytotoxique s'exerce de par leur capacité à générer de faux métabolites qui vont s'intégrer dans le processus de biosynthèse des acides nucléiques, aboutissant à une intégration dans les chaînes nucléiques, ADN et ARN. Tous les antimétabolites sont des pro-drogues fortement métabolisées au niveau hépatique et tumoral, les rendant particulièrement sensibles aux variations des activités enzymatiques.

Au-delà de leur similarité structurelle, certains analogues nucléosidiques (gemcitabine, azacytidine, et cytarabine) partagent également des toxicités communes. En effet, ces derniers sont responsables de toxicités de type hématologique et digestif, très fréquentes car touchant de façon aspécifique toutes les cellules en division rapide. L'apparition de ces toxicités, parfois létales, ainsi que leur prise en charge symptomatique, pouvant inclure un retard dans la poursuite du traitement du patient et/ou une réduction de la posologie de l'agent responsable des toxicités, constituent un frein à une prise en charge optimale du patient, et ainsi le risque de perte de chance face à la maladie augmente. Anticiper les toxicités dont sont responsables les analogues nucléosidiques constitue donc un défi capital pour améliorer la prise en charge des patients atteints de cancer.

Les analogues nucléosidiques partagent également une voie métabolique commune, où la CDA apparaît comme une enzyme majeure [327]. En effet, la CDA est responsable de la déamination des analogues pyrimidiques, conduisant ainsi à leur activation (capécitabine) ou bien à leur désactivation (gemcitabine, cytarabine, azacytidine) au niveau hépatique.

L'existence d'une variabilité constitutionnelle génétique et/ou phénotypique de la CDA a mené les chercheurs à s'intéresser aux relations entre le statut CDA et l'efficacité et la toxicité des analogues nucléosidiques chez les patients [36]. En particulier, à partir des années 2000s avec la montée de l'intérêt pour la pharmacogénétique constitutionnelle, beaucoup de groupes se sont attachés à étudier l'impact de la variabilité du statut CDA sur la pharmacocinétique des médicaments concernés et sur l'issue clinique chez les patients. Parmi les premiers, figurent les groupes de Danesi et Peters d'une part [39,275,328,329], et l'équipe de Sugiyama [37,38], qui ont été pionniers dans l'étude et l'appréhension du rôle et l'influence du statut CDA sur les toxicités déclarées par les patients traités notamment par gemcitabine.

Très tôt, notre laboratoire a acquis une expertise dans le phénotypage de la CDA, en adaptant une technique de dosage de l'activité enzymatique de la CDA par un essai spectrophotométrique à partir d'un échantillon sérique [36]. L'utilisation de cette méthode a permis notamment d'associer pour la première fois des cas de toxicités mettant en jeu le pronostic vital sous capécitabine [303] et gemcitabine [297,330] à une modification de l'activité CDA. Ces observations rétrospectives ont constitué un support à nos présents travaux, dont le but était

d'étudier plus en profondeur les relations qui existent entre le statut CDA, appréhendé par le génotype ou par son activité, et l'issue clinique en termes d'efficacité et de toxicité, chez les patients traités par analogues pyrimidiques dans le cadre de diverses pathologies cancéreuses.

Le premier travail de ce doctorat a consisté à évaluer et comparer deux techniques permettant de mesurer l'activité enzymatique de la CDA (Publication I). En effet, devant l'existence de nombreuses méthodes de phénotypage de la CDA à travers le monde, aucune étude à ce jour ne permettait de comparer ces techniques entre elles. Jusqu'alors, de nombreux essais enzymatiques ont été développés pour déterminer l'activité CDA dans les différents compartiments sanguins, utilisant la CLHP ou la spectrophotométrie. Les avantages et les inconvénients de ces techniques ont très souvent été débattus dans la littérature, notamment en termes de reproductibilité et de prédictivité. Ainsi, les cliniciens recherchaient un outil prédictif permettant de stratifier les patients dans le but d'optimiser leur chimiothérapie. Dans le but d'utiliser en routine un test robuste et fiable permettant de mesurer l'activité CDA, nous avons réalisé une étude de cross-validation, visant à déterminer quel compartiment sanguin devrait être utilisé pour phénotyper la CDA, et à comparer les deux techniques de dosage (CLHP de l'équipe de Peters versus spectrophotométrie utilisée au sein de notre laboratoire) en termes de robustesse, de facilité de mise en œuvre, et de coût. Cette étude a démontré qu'il existait une excellente corrélation entre les deux techniques lorsque les essais étaient réalisés à partir de sérum, et qu'il n'y avait aucune différence dans les taux de protéines mesurés lorsque la technique de Pierce était utilisée. Enfin, la technique spectrophotométrique entraîne un coût diminué par rapport à la technique chromatographique, d'une part en termes coût de réactifs, mais également par rapport au matériel qu'elle nécessite, qu'il est facile d'acquérir. Ces premiers travaux, réalisés dans deux laboratoires différents, à Amsterdam et Marseille, nous apportent une aide à l'interprétation sur les essais déjà réalisés jusqu'à aujourd'hui. Plus important encore, cet essai constitue un premier pas vers une harmonisation des méthodes de dosage de l'activité de la CDA. De plus, la détermination de l'activité enzymatique de la CDA par spectrophotométrie à partir du sérum en utilisant la cytidine comme substrat présente l'immense avantage de pouvoir déterminer le statut CDA a priori chez les patients, c'est-à-dire avant d'initier leur traitement.

Il existe cependant une limite à la mesure directe de l'activité enzymatique de la CDA : le phénomène inflammatoire. En effet, la CDA a été utilisée comme marqueur de l'inflammation chez des patient atteints de polyarthrite rhumatoïde [273,274]. D'autre part, la pratique en routine du phénotypage de la CDA nous a également amenés à observer qu'une augmentation de la CRP, marqueur principal de l'inflammation, entraînait une élévation de l'activité CDA, et ce dans des proportions variables d'un individu à l'autre. Ceci constitue donc un biais important lors de l'interprétation du statut CDA appréhendé par un phénotypage, et à l'heure actuelle, il n'existe

aucune étude qui permette de confirmer de façon certaine ce phénomène, ni ne l'explique de façon claire. La concentration de la protéine CDA dans les macrophages pourrait d'ores et déjà constituer un élément de réponse, mais une étude visant à confirmer ce phénomène devrait être menée, notamment pour permettre de corriger l'activité enzymatique CDA mesurée par rapport au taux de CRP chez les patients.

Dans un second temps, nous avons utilisé cette technique pour mettre en évidence la variabilité du statut CDA ainsi que ses conséquences sur l'issue clinique chez les patients. Ainsi, nous avons publié une série de case reports de toxicités chez des patients traités par différents analogues nucléosidiques.

La publication II relate du deuxième cas mondial de toxicités hématologiques sévères causées par une déficience avérée en CDA sous cytarabine. Le premier cas, déjà publié en 2012 par notre équipe, portait sur une patiente pédiatrique homozygote pour deux polymorphismes sur le gène CDA [301]. Ce nouveau cas ici portant sur une patiente transplantée hépatique, a été également particulièrement intéressant à étudier. En effet, outre la difficulté d'établir un phénotype à partir d'un profil génétique, il a souligné l'importance particulière qu'il faut accorder à l'origine de l'ADN permettant de dresser le génotype du patient, une problématique capitale chez les transplantés hépatiques. De plus, il vient renforcer l'idée selon laquelle le statut CDA constitutionnel est également relevant en terme de tolérance pour les patients traités par cytarabine. Un autre cas de ce type a pu être rapporté cette fois-ci chez un patient traité par azacytidine dans le cadre du traitement d'une leucémie myéloïde aiguë. En effet, nous avons démontré pour la première fois qu'une déficience sévère en CDA pouvait être responsable de toxicités létales sous azacytidine (Publication III). Toujours en lien avec un traitement par azacytidine, nous avons étudié de façon rétrospective le statut CDA chez deux patients traités pour des troubles hématologiques malins par le même protocole de chimiothérapie (Publication IV). Ces patients ont développé deux réponses complètement opposées : le premier patient avait une activité CDA de 1,79 U/mg et était porteur du génotype C/C pour le polymorphisme c.79A>C, et malgré de très nombreuses complications, ce patient a présenté une rémission complète après une seule et unique cure d'azacytidine. Le second individu, à l'inverse, homozygote pour le polymorphisme c.-33_-31delC et UM avec une activité CDA trois fois supérieure à la normale (10,08 versus 3,4 U/mg) n'a présenté aucune toxicité ni aucune amélioration biologique ni clinique malgré deux cures complètes. Cette publication montre bien l'importance clinique et l'intérêt de pouvoir déterminer le statut CDA a priori chez les patients traités par azacytidine, et l'ensemble de ces trois publications élargit le spectre d'analogues nucléosidiques dont les toxicités sont susceptibles d'être influencées par le statut CDA.

Concernant la gemcitabine, et devant l'augmentation croissante de données rétrospectives plaidant en faveur d'un lien putatif entre le statut CDA, déterminé par son génotype et/ou phénotype, et les toxicités sous cet agent anticancéreux [36–38], il était important d'investiguer plus en profondeur l'influence du statut CDA sur l'issue clinique chez les patients traités par cet agent anticancéreux. L'impact d'une augmentation de l'activité CDA sur l'efficacité des traitements par analogues pyrimidiques a été très largement étudié au niveau tumoral, mais peu d'études s'étaient concentrées sur l'influence d'une augmentation constitutionnelle de l'activité enzymatique de la CDA sur l'efficacité clinique. En effet, une exacerbation de l'activité fonctionnelle de la CDA pourrait conduire à une augmentation significative de la proportion d'analogues pyrimidiques immédiatement dégradée après administration, réduisant d'autre part la quantité de molécule active susceptible d'atteindre la tumeur.

Nous avons ainsi réalisé une étude rétrospective, incluant des patients traités par des protocoles de chimiothérapie différents mais contenant la gemcitabine seule ou en association, qui a démontré que le risque de progression de la pathologie était plus important (x5) chez les patients présentant un phénotype UM pour la CDA (Publication V). Ceci pourrait s'expliquer par une diminution significative de l'exposition des patients à la gemcitabine, causée par l'augmentation de la fonctionnalité enzymatique de la CDA. Ces travaux constituent à ce jour les seules données publiées sur l'effet d'une augmentation CDA sur l'efficacité clinique de la gemcitabine. Ainsi, détecter les augmentations constitutionnelles de la fonctionnalité de la CDA constitue également un défi majeur, dont l'enjeu clinique est au moins aussi important que d'anticiper les déficiences en CDA. Outre les toxicités causées par une déficience en CDA, il est donc important de détecter les patients au profil UM sous gemcitabine afin d'être en mesure de leur proposer une autre option thérapeutique pour traiter leur pathologie.

D'autre part, nous avons mené un essai clinique multicentrique prospectif visant à confirmer le rôle prédictif de la CDA dans l'apparition des toxicités sous gemcitabine (Publication VI). Contrairement aux études menées jusqu'alors, le but ici était de pouvoir investiguer le statut CDA, depuis l'identification de polymorphismes et la détermination de l'activité CDA, jusqu'à l'issue clinique chez les patients, en terme de toxicité, en passant par la caractérisation des paramètres pharmacocinétiques individuels et de population de la gemcitabine et de son métabolite. Pour éviter tout facteur de confusion lié à une polychimiothérapie, cette étude clinique a été réalisée chez des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique réséqué, seule pathologie pour laquelle un traitement par la gemcitabine en monothérapie est indiqué. Malgré une proportion attendue de 7 à 10% de patients au statut PM pour la CDA [36], cet essai n'a inclus que 4.6% de patients déficients, avec un effectif trop faible pour réaliser des analyses statistiques robustes. Cependant, le rôle prédictif du génotype CDA pour le variant c.79A>C a été étudié, et nous avons montré que

ce variant ne pouvait pas être considéré comme un biomarqueur prédictif de l'apparition de toxicités sous gemcitabine, une problématique encore largement débattue aujourd'hui [331].

Les pharmacocinétiques de la gemcitabine et de son métabolite ont également été étudiées au cours de ces travaux. Dans un premier temps, ils nous ont permis de constater qu'une identification des paramètres individuels et de population était possible à partir d'une stratégie d'échantillonnage limité. Ensuite, ce travail nous a permis de confirmer le rôle de la surface corporelle ainsi que des taux sériques de créatinine comme covariables de l'exposition à la gemcitabine et à son métabolite, comme décrit dans les travaux de l'équipe de Jiang [332]. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'influence du de l'activité CDA sur l'exposition des patients, certainement expliqué par le fait qu'aucun patient PM n'a participé à l'étude pharmacocinétique.

L'ensemble de ces travaux a permis de souligner plusieurs points. Tout d'abord, une harmonisation des techniques de dosage de l'activité CDA serait nécessaire pour accélérer le développement à large échelle d'un test prédictif de l'efficacité clinique et toxicité sous analogues nucléosidiques, et anticiper les demandes règlementaires des différentes autorités sanitaires. Ceci permettrait également de mieux interpréter les résultats provenant d'études différentes, en comparant les méthodes utilisées à une seule technique de référence.

Ensuite, s'il apparaît que le statut CDA pourrait constituer un facteur prédictif des toxicités sous analogues nucléosidiques, il pourrait également permettre de stratifier les patients selon leur probabilité de répondre à un traitement par cette famille d'antimétabolites. En effet, si la mise en évidence d'une déficience en CDA alerte le clinicien sur le risque de toxicités, ce dernier choisissant généralement de réduire la posologie pour limiter le risque, l'augmentation de l'activité CDA devrait conduire à une augmentation de la posologie pour assurer une exposition suffisante chez le patient traité. Or, ce message est difficile à faire entendre et à mettre en application en routine, en particulier parce que peu de conditions d'administration des médicaments prennent en compte l'existence de phénomènes intrinsèques au patient pouvant modifier l'issue clinique. Ainsi, il est difficile de faire accepter d'augmenter la posologie de gemcitabine chez les patients UM, à cause du risque de surtoxicité éventuelle, comme il est difficilement envisageable de demander une réduction posologique chez un patient PM, craignant que son traitement soit inefficace, particulièrement en onco-hématologie, où l'atteinte hématologique est recherchée pour traiter.

D'autre part, nos travaux ont illustré la difficulté de reproduire des résultats lors d'études prospectives, et ce malgré un rationnel fort issu de nombreuses études rétrospectives. En effet, les critères imposés lors de la réalisation d'essais cliniques prospectifs, notamment en favorisant généralement les patients avec un bon pronostic, limitant ainsi les associations de paramètres de

morbi-mortalité, diminue fortement la probabilité d'obtenir des cohortes représentatives du reste des patients. Ainsi, l'effet de lissage produit par la conduite de tels essais constitue un frein à la production de résultats probants.

Concernant la détermination du statut CDA par une approche génotypique, les données existantes restent contradictoires, et nos travaux, portant notamment sur le polymorphisme c.79A>C terminés, n'ont pas permis non plus de statuer clairement sur l'influence de la présence de certains polymorphismes sur l'activité CDA ou même sur leurs conséquences cliniques. À l'ère de l'avènement du séquençage NGS, certaines équipes étudient les associations pharmacogénétiques par les approches GWAS alors que d'autres privilégient une approche gène-candidat, la première technique balayant l'ensemble des gènes sans a priori et utilisant des techniques de séquençage haut-débit alors que la seconde repose sur une sélection rationnelle de gènes impliqués dans le processus ADME du médicament étudié. Les travaux que nous avons entamés reposent, eux, sur une approche gène-candidat, puisque nous avons choisi d'étudier le gène CDA impliqué dans le métabolisme des analogues nucléosidiques. Cependant, nous avons tout de même choisi d'utiliser une technique de séquençage haut-débit, la technologie 454 de Roche, nous offrant ainsi la possibilité de séquencer partiellement le gène CDA. Nous espérons que ces travaux actuellement en cours permettront d'apporter de nouvelles informations. Nous voulons notamment décrire les fréquences alléliques des variations génétiques concernées par notre séquençage, et établir des profils haplotypiques des patients, que nous corrélerons à une activité CDA.

Le but ultime de ces travaux est de générer des données qui seront utilisées pour la mise au point d'un modèle mathématique qui servira d'outils d'adaptation de posologie pour les cliniciens. En effet, la recherche clinique par une simple approche empirique présente des limites, notamment dans le choix des schémas thérapeutiques à étudier chez les patients, tant la diversité des schémas possible est large. Par exemple dans le cas des analogues nucléosidiques, il serait intéressant de pouvoir adapter les doses en fonction du statut CDA, appréhendé soit par une approche génotypique soit par l'approche phénotypique. Ainsi, le statut CDA, déterminé a priori, permettrait de guider les posologies à appliquer, assurant un minimum de toxicités chez les patients déficients tout en leur assurant une exposition maximale, et permettant d'atteindre la zone thérapeutique chez les patients au profil UM. Le modèle mathématique ainsi développé pourrait servir d'outil fondamental d'aide d'adaptation à la prescription pour les cliniciens. Des exemples concrets existent déjà actuellement, notamment dans la prise en charge des patients transplantés, où il existe en ligne un site internet dédié aux cliniciens permettant d'adapter la posologie d'immunosuppresseurs en fonction de la fonction rénale et d'autres paramètres. Il deviendrait très

intéressant de pouvoir faire de même en oncologie, où la prise en charge des patients est complexe et délicate compte-tenu de leur pathologie.

Cette démarche s'inscrit complètement dans la volonté des autorités sanitaires de développer et d'élargir l'application de la médecine personnalisée. En effet, en France, le dernier plan Cancer 2014-2019 a fait de la médecine personnalisée un axe majeur. Outre l'objectif 6 dont le but est de conforter l'avancée de la France dans la médecine personnalisée, particulièrement dans la caractérisation des tumeurs, le second objectif consiste à garantir la qualité et la sécurité de la prise en charge des patients, en réduisant les délais de traitement qui peuvent entraîner des pertes de chance, et en garantissant une prise en charge adaptées des patients nécessitant un traitement complexe. Tous nos travaux ont été menés pour participer à l'effort collectif de développement de la médecine personnalisée.

Même si les éléments apportés aujourd'hui par ces travaux ne constituent qu'un faible niveau de preuve, ils ont cependant généré de nouvelles données qui, outre la difficulté de reproduire des résultats forts autour de la CDA, supportent l'idée que le statut CDA pourrait constituer un biomarqueur génétique prédictif de l'issue clinique chez les patients traités par analogues nucléosidiques.),

Depuis les premières études réalisées sur la CDA constitutionnelle, il existe un large consensus indiquant qu'une déficience en CDA est une condition associé à une augmentation de la fréquence et de la gravité des effets indésirables sous la plupart des analogues nucléosidiques. Devant l'intérêt croissant pour la médecine de précision, intégrer le statut CDA comme covariable pour affiner les posologies proposées aux patients devient le prochain défi à relever. Ce but peut être atteint en intégrant des données sur le statut CDA, appréhendé par une approche phénotypique et/ou génotypique, un support pharmacocinétique et un monitoring pharmacodynamique rapproché (efficacité et toxicité), permettant le développement d'un modèle mathématique pharmacocinétique/pharmacodynamique dédié à la personnalisation des thérapies à base d'analogues nucléosidiques en fonction du statut CDA de chaque patient.

PUBLICATION VIII

Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs

EXPERT OPINION

1. Introduction
2. Cytidine deaminase
3. CDA variability and clinical outcome of nucleosidic analogs
4. Expert opinion

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/09/15
For personal use only.

Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs

Cindy Serdjebi, Gérard Milano & Joseph Ciccolini[†]
[†]*INSERM UMR_S911 Aix-Marseille University, SMARTc, CRO2, Pharmacokinetics Unit, Marseille, France*

Introduction: Nucleosidic analogs such as pyrimidine and purine derivatives are mainstay in the field of treating cancers, both in adults and in children. All these drugs act as antimetabolite compounds, that is, they interfere with the ability of cancer cells to synthesize the nucleosides or the nucleotides necessary for proliferation and progression. As with most cytotoxics, maintaining patients in their therapeutic window is challenging, and predicting changes in drug exposure is critical to ensure an optimal efficacy/toxicity balance.
Areas covered: Among the antimetabolites, a small but widely prescribed number of drugs (i.e., gemcitabine, capecitabine, cytarabine, azacytidine) share a same metabolic pattern driven by a liver enzyme, cytidine deaminase (CDA), coded by a gene displaying several genetic and epigenetic polymorphisms. Consequently, CDA activity is erratic, ranging from deficient to ultra-rapid deaminator patients, with subsequent impact on drug pharmacokinetics and pharmacodynamics eventually. This review provides an update on the variety of clinical studies and case-reports investigating on CDA status as a marker for clinical outcome in cancer patients treated with nucleosidic analogs.
Expert opinion: Whereas sorting patients on the basis of their *CDA* genotype remains tricky because of unclear genotype-to-phenotype relationships, developing functional strategies (i.e., phenotype-based status determination) could help to use CDA status as a biomarker for developing adaptive dosing strategies with nucleosidic analogs.

Keywords: adaptive dosing strategy, cytidine deaminase, nucleosidic analogs, pharmacogenetics

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. (2014) ***11****(5):665-672*

1. Introduction

Despite the ever-increasing number of targeted therapies and biotherapies approved in a variety of settings, cytotoxics remain the backbone of most anticancer regimen. In particular, the class of nucleoside analogs represented by few compounds is widely used to treat solid tumors or hematological disorders, both in children and in adults. As nucleoside analogs, these compounds act as antimetabolites, either inhibiting the ability of cancer cells to synthesize precursors of nucleic acids required to ensure sustained growth or directly interfering with DNA or RNA synthesis. Beside their structural similarity, some of these molecules such as gemcitabine, capecitabine, cytarabine or azacytidine also share a common metabolic pathway, in which cytidine deaminase (CDA) plays a major role [1]. Indeed, this enzyme, produced in the liver but also expressed in other tissues, catalyzes deamination of pyrimidine analogs, thus allowing either their deactivation (gemcitabine, cytarabine and azacytidine) or activation (capecitabine). CDA was first studied at the tumor level, because an elevated enzyme activity in tumors has been associated with possible resistance to cytarabine and poor clinical outcome [2,3]. As *CDA* gene displays

10.1517/17425255.2015.985648 © 2014 Informa UK, Ltd. ISSN 1742-5255, e-ISSN 1744-7607
All rights reserved: reproduction in whole or in part not permitted

RIGHTSLINK

Article highlights.

- Cytidine deaminase (CDA) is a ubiquitous enzyme, synthesized in the liver, responsible for the deamination of a variety of nucleosidic analogs widely prescribed in adult and pediatric oncology.
- CDA is coded by a gene known to be highly polymorphic. However, genotypes to phenotypes relationships are unclear with CDA.
- CDA status is associated with clinical outcome in patients treated with nucleosidic analogs (i.e., deficient individuals at risk of life-threatening toxicities).
- CDA status should be used as a covariate to tailor nucleosidic analogs dosing, as part of biomarker-based adaptive dosing strategy.

This box summarizes key points contained in the article.

additionally germinal polymorphisms, studying CDA variability shifted in the mid-2000's from tumors to whole patients and many studies have focused on the relationships between CDA status and efficacy and toxicity in patients with cancer [4]. This review proposes an update about deregulated germinal *CDA* and its role in treatment outcome and toxicity in patients treated with nucleosidic analogs.

2. Cytidine deaminase

Human CDA is an enzyme encoded by the 4-exons gene *CDA* located on the first pair of chromosomes (1p36.2-p35). CDA consists of 4 identical sub-units, all containing an essential zinc atom in the active site [5]. It is mainly synthesized in liver and placenta but high concentration of CDA is also found in mature neutrophils [5]. This enzyme is physiologically responsible for the deamination of cytidine and 2′-deoxycytidine into uridine and 2′-deoxyuridine, respectively. CDA is of major interest as it is subject to a wide inter-individual variability in term of activity. In this respect, several studies have been performed to screen mutations and polymorphisms affecting the *CDA* gene since the mid-70's, both at the tumor and the constitutional levels [6-10]. As of today, up to 1000 variations affecting the *CDA* gene have been evidenced (Ensembl). The most described polymorphisms are the two non-synonymous 79A>C (rs2072671) and 208G>A (rs60369023) substitutions and the synonymous 435C>T (rs1048977) variant gene [11-14]. Beside these polymorphisms in coding regions, many events have been described either in the promoter region such as the -31delC deletion (rs3215400) or -92A>G (rs602950, [14-18]) or in intronic [18] regions as described by Raynal *et al.* such as 154 + 37G>A polymorphism (rs12059454) [16]. These numerous variations lead to mixed and sometimes contradictory reported results in term of functional impact [19-21].

In this respect, developing phenotype-based strategy seems to be a better and a safer way to picture the actual CDA status in patients. To this end, two main *ex vivo* methods have been developed: one consists in evaluating CDA activity by measuring the metabolic ratio of gemcitabine with its metabolite in whole blood; the other method is based upon the measurement of residual CDA activity in serum. The first method consists of incubating gemcitabine with a diluted blood compartment extract and assesses gemcitabine and 2′,2′-difluorodeoxyuridine (dFdU) levels using chromatography combined or not with mass spectrometry. This method expresses CDA activity as a quantity of metabolite formed per unit of time. The second technique is based upon the measurement of ammonium released during cytidine conversion into uridine by CDA after incubation of serum. Ammonium concentration is assayed by spectrophotometry and CDA activity is expressed in the international unit [14,22,23]. Both techniques express final CDA activity according to seric protein levels, to take into account proteins level. In a retrospective clinical study led in a Caucasian population, CDA activity was evaluated in 120 adults and 30 children with cancer, all scheduled for a gemcitabine-based regimen. Median CDA activity was found to be 3.2 U/mg in adults and 3.4 U/mg in children, with activity ranging from 0.6 to > 18 U/mg. Three categories of patients were subsequently selected on the basis of their CDA activities: poor metabolizers (< 1.3 U/mg), ultra-rapid metabolizers (> 6 U/mg), and patients with a normal activity in between [20].

This wide inter-individual variability is only partly explained by genetic variations. As stated earlier, more than 1000 genetic variations (ref ensemble) have been noticed with several genetic polymorphisms identified as potentially responsible for this variability [14,16,24-27]. Among the most studied, *79A>C* substitution (*CDA**2, rs2072671) leads to lysine substitution into glutamine in position 27, which seems to do not affect the catalytic site. Ethnicity plays an important role in the repartition of allelic frequencies of this variant as minor allele frequency (MAF) ranges from 10% in African population to 35% in Caucasians, with a MAF of 15% in Asian population [3,28]. Consequences of this allelic variant are still controversial: a decrease of CDA activity has been measured for $Lys^{27}Lys$ variant [10,29] whereas others studies suggest no variation [20,30] or lower activity for $Gln^{27}Gln$ variant [31-33]. These differences may be partly explained by study design parameters, such as patient selection, ethnicity, and treatment regimens [34]. A recent work has been published, gathering data on CDA catalytic efficiency according to substrates, natural or synthetic [35]. This biochemical study, inspired from a previous work in 2012 by Baker *et al.* [32], highlights that catalytic efficiency of CDA enzyme is dependent on the genetic sequence encoding for the protein, but also dependent on the tested drugs. Indeed, an increase of CDA catalytic efficiency is to note for the CDA27Gln protein acting on natural cytidine analogs and cytarabine, but surprisingly CDA catalyzes less efficiently azacitidine, 6-azacitidine and fazarabine. This is also in accordance with Giovannetti *et al.* study [10] in which they tested for the CDA27Gln activity on gemcitabine and where a decrease of

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/09/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/09/15
For personal use only.

catalytic efficiency has been highlighted with such a substrate. Besides, another non-synonymous variant has also been well studied: *CDA*3* results from the substitution of alanine to threonine in position 70 because of *208G>A* replacement in the coding sequence. In this case, consequences of this variation are more univocal as researchers agree that a decrease of CDA activity is noticed for the protein encoded by *208 A/A* variant [24,28,35,36]. The biochemical study of the protein encoded by with variant, CDA with a threonine in position 70, displays a catalytic efficiency 100-fold lower than normal CDA with respect to every tested drugs [32]. Unlike *CDA*2*, which is found in every population in different proportions, *CDA*3* is not detected in Caucasians but only in African and Asian populations [35]. As of today, the clinical impact of *CDA*3* genotype has been repeatedly reported in Japanese patients only [28,36,37]. Furthermore, two main studies have been further performed by pyrosequencing *CDA* to establish MAF of *79A>C*, *208G>A* and *435C>T* in both Asian and Caucasian populations [17,38]. Few differences are observed in MAF of *435C*>T allelic variant when comparing the two populations, discrepancies appeared for the *79A>C* and *208G>A* variants. For the first single nucleotide polymorphism, twice as many individuals carry a wild-type genotype and a lower incidence of *C/C* genotype is noticed for Asians [17,38]. The disparity is even more marked for the rs60369023 variant as no individual, whether among African Americans, Chinese Americans, or Caucasians Americans, carried the minor allele A. Only 11 patients were heterozygous among over 400 Korean and Japanese patients and none of them had homozygosis [38]. These data confirm that screening for *208G>A* single nucleotide polymorphism only has a clinical meaning in Asian population. As previously stated, other genetic variations have been identified, but no study has established clear link between a given genotype and the resulting phenotype yet.

3. CDA variability and clinical outcome of nucleosidic analogs

3.1 Gemcitabine

Among pyrimidine analogs, gemcitabine is the most used by far, ranked the third anticancer agents prescribed worldwide. It is a cytidine analog, where hydroxyl on the ribose has been replaced by two fluorine atoms. Gemcitabine is still the backbone of regimen in pancreatic adenocarcinoma [39,40] and is widely prescribed to treat other solid tumors such as breast, bladder or non-small cell lung cancers [39-42]. Gemcitabine can be as well an attractive option to treat several hematological disorders such as acute leukemia [43]. After administration, gemcitabine undergoes a series of phosphorylation by deoxycytidine kinase (dCK) and thymidine kinase 2 in order to be incorporated into DNA under its active phosphorylated form dFdCTP [44]. But most of gemcitabine is detoxified by CDA into its inactive metabolite dFdU, with a Km = 96 µM [45]. As nearly 90% of gemcitabine are metabolized, variations in CDA activity have a marked impact on its pharmacokinetics. Indeed, our group showed in a murine model that a CDA deficiency, artificially achieved by co-injection of high doses of inhibitor tetrahydrouridine, increases gemcitabine exposure, simultaneously reducing circulating dFdU [20]. Consequently, monitoring of leucopenia in mice showed that whereas animals with normal CDA activity tolerated standard gemcitabine and underwent mild and transient leucopenia, deficient individuals had severe and eventually lethal toxicities [20], thus highlighting the correlation between CDA deficiency, overexposure to gemcitabine and increased risk of severe toxicities. To date, no other study has confirmed these data, neither in mice nor in humans. However, numerous studies and case studies in humans report a correlation between CDA deficiency and an increase of appearance of severe hematological toxicities with gemcitabine [10,20,26,46]. Of note, the first reported case of death due to toxicity in a patient undergoing gemcitabine–carboplatin therapy for ovarian cancer was published in 2007 [26]. Marked deficiency (i.e., CDA activity reduced by 75% compared with standard values) was evidenced with heterozygous *CDA*2* genotype. Subsequent comprehensive genetic investigations identified a new intronic mutation 154+37G>A in this patient, potentially at the origin of the severe toxicity [16]. On the other hand, similar to toxicity caused by gemcitabine overexposure because of CDA deficiency, patients with lower CDA activity also display higher response rate and longer overall survival [23]. In addition to the issue of patients with CDA deficiency, it has been observed that about 15% of the Caucasian adult population displays an ultra-rapid metabolizer profile [20]. In this respect, one can hypothesize that patients with high CDA activity will over-detoxify gemcitabine, thus reducing the chances to benefit from some clinical efficacy. To test this hypothesis, we conducted a pilot study involving 40 patients treated by gemcitabine-based regimens for pancreatic cancer [45]. We demonstrated that patients with CDA activity greater than 6 U/mg proteins were fivefold more at risk to have a progressive disease than other patients. As expected, these patients also displayed less toxicities than patients with normal or lower CDA activity, an observation fully in line with previous reports on CDA and gemcitabine-related toxicities. Overall, all these studies, conducted by independent groups and involving patients treated with gemcitabine for a variety of settings, demonstrate how CDA status greatly affects clinical outcome in patients undergoing gemcitabine-based treatments.

3.2 Azacitidine/decitabine

Azacitidine and its deoxy-derivative decitabine both are cytidine analogs with molecular epigenetic mechanism of action achieved by decreasing the methyltransferase DNMT-1 activity when incorporated into DNA after phosphorylation, resulting in hypomethylation of tumor DNA [27]. Their structure is very similar to cytidine but differ by some points: both derive from a triazine ring instead of a pyrimidine; decitabine

RIGHTSLINK

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/09/15
For personal use only.

contains deoxyribose and azacitidine is hydroxylayted on the 2′ position. The two compounds are used to treat myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia in adults [22,47]. Both drugs are rapidly deaminated by CDA into their inactive forms, with a $Km = 74.0$ for decitabine [5,35]. Few reports about impact of CDA status on treatment outcomes in patients treated with azacitidine/decitabine have been published. Mahfouz *et al.* published a study about CDA and azacytidine/decitabine treatment outcome in patients with a MDS [33]. They reported that homozygous *C/C* genotype for *CDA*2* leads to a decrease in CDA activity as suggested by Xu *et al.* [31], Baker *et al.* [32] and our team [4]. Additionally, they correlated this lack of activity with an overexposure to cytotoxic agents and a better clinical outcome in humans. Of note, they also evidenced a marked gender effect, women displaying weaker CDA activity than men, but this gender difference has been confirmed by none of the other groups investigating CDA dysregulations [20,48,49]. Additionally, our group has performed a pilot study on the impact of CDA deficiency on the clinical outcome of patients treated with azacytidine. Rather than improved efficacy, life-threatening toxicities have been reported [50]. All these results need to be confirmed in further studies so as to increase the level of evidence and to get a better picture about the exact role CDA plays in the clinical outcome of patients treated with azacytidine (increased efficacy, increased toxicity or both).

3.3 Cytarabine

Cytarabine (Ara-C), like other members of pyrimidine analogs, is an anti-metabolite agent widely prescribed in hematologic disorders, such as MDS, acute lymphoblastic and myeloid leukemia, at standard or high doses (induction protocols) in adults and children. Its structure is similar in every point to cytidine, but the ribose has been replaced by an arabinose. As azacytidine/decitabine, Ara-C acts during phase S after phosphorylation into Ara-CTP by dCK. The metabolic pathway of cytarabine is dependent on CDA, which catabolizes its deamination into inactive metabolite. Effects of reduced CDA activity due to genetic polymorphisms have been investigated on acute myeloid cells and on peripheral mononuclear cell lines treated with cytarabine [14,30]. An increase of cytotoxicity has been evidenced for cells carrying *79A>C* polymorphism, suggesting a better efficacy of cytarabine in patients having CDA27Gln. Additionally, a case-report about a child who displayed life-threatening toxicities under cytarabine and mercaptopurine treatment demonstrated that CDA deficiency and *79A>C* genotype was the culprit for the severe toxicities reported [4]. Interestingly, in this case report, the patient was found to bear two contradictory genotypes (i.e., *79A>C* and *–31delC*) and phenotype was the only way to sort her CDA status, thus highlighting how functional testing is critical with highly polymorphic *CDA*. Recently, our group has published another case-report about a young child with liver transplant who experienced life-threatening toxicities after cytarabine-containing regimen for Burkit lymphoma. Interestingly, lymphocyte DNA was wild-type for *CDA* genotype, whereas transplanted liver DNA was homozygous *C/C* for the *CDA*2* allele, thus explaining the toxicities encountered [27]. Despite the severe toxicities displayed, the deficient CDA status of the child provided her a benefit in regard to cytarabine efficacy, as she's in complete remission. Falk *et al.* evidenced a shorter overall survival associated with *CDA 79C/C* genotype, indicating that *79A>C* polymorphism may be used as a prognostic factor for patients with an AML [51]. With respect to *208G>A* polymorphism, its presence is correlated with a lower CDA activity and a higher sensitivity to cytarabine [3,52].

3.4 Capecitabine

As an oral form of 5-FU, capecitabine has been developed to be specifically activated in tumor by thymidine phosphorylase, so as to avoid toxicity due to cytotoxic effect on non-tumor cells [53]. Capecitabine is prescribed alone or in combination with irinotecan, cisplatin or docetaxel in colorectal (metastatic or resected), gastric and breast cancers. Unlike previous drugs, capecitabine derives from a purine base, substituted by an ester, a fluorine and a ribose. After absorption in the gastrointestinal tract, capecitabine undergoes a series of liver transformation before reaching the 5-FU state. Among the three enzymes involved in this pathway, CDA is the key enzyme responsible for the conversion of 5′-deoxy-5-fluorocytidine into 5′-deoxy-5-fluorouridine [54]. As CDA plays here a role in capecitabine activation, consequences of increased CDA activity should be opposite of what we previously described, thus leading to severe toxicities upon capecitabine intake by increasing 5-FU levels generated *in situ*. Morita *et al.* investigated the effect of elevated CDA expression and observed an enhancement in sensitivity to capecitabine when higher CDA activity is displayed [55]. However, few clinical data are available on CDA status effect on clinical outcome with capecitabine-treated patients. In 2009, we reported the first capecitabine-related life-threatening toxicity in a young woman [13]. In this case, the patient experienced early severe toxicities with fatal outcome after capecitabine intake. After evaluating CDA status, we found a twofold higher CDA activity compared to other patients, and it was hypothesized that severe toxicities were the consequence of a possible over-activation of prodrug capecitabine towards 5-FU. Relationship between CDA ultra-metabolizer status and severe toxicities in capecitabine-treated patients was confirmed by Caronia *et al.* [25]. They investigated the relationships between hand–foot syndrome and *CDA* polymorphisms. They finally evidenced that the deletion *-31delC* in the promoter may be responsible for a 5.7-fold increase of CDA expression by suppression of an E2F site, which plays a role in transcription modulation. Implication of the *-31delC* polymorphism, associated with a marked increase in CDA activity, was confirmed in a recent case report of toxic death after metastatic colorectal cancer patient treated with the bevacizumab–XELIRI combination [56].

RIGHTSLINK

Table 1. Conclusions of studies investigating the relationships between CDA and clinical outcome.

Drug	SNP	CDA genotype	Resulting CDA phenotype	Risk of toxicity	Efficacy	Pharmacokinetics	Ref.
		A/A	Decreased activity	Increased	Increased	-	[22]
		A/C	Decreased activity	Increased	-	-	[20]
	79A>C	A/C or C/C	Increased activity	-	-	-	[10]
		A/A or A/C	-	-	Increased	-	[15]
		A/A or A/C	-	Increased	-	-	[39]
		A/C or C/C	-	Increased	-	-	[24]
	154 + 37 G>A	A/A	Decreased activity	Increased	-	-	[19]
Gemcitabine			Decreased activity	Increased	-	High gemcitabine and low dFdU levels	[30]
	208G>A	A/A				Lower gemcitabine clearance	[29]
			-	Increased	-	Lower gemcitabine clearance	[17]
	-	-	Increased activity	Decreased	Decreased	-	[38]
			Decreased activity	-	Increased	-	[15]
Decitabine	79A>C	C/C	Decreased activity	-	-	-	[5]
	208G>A	A/A	Decreased activity	-	-	-	[5]
	-31delC	-/-	Increased expression of mRNA	Increased	-	-	[18]
Capecitabine	79A>C and -31delC	A/C and -/C	Increased activity	Increased	-	-	[49]
	-	-	Increased activity	Increased	-	-	[48]
				-	Increased	-	[47]
	79A>C	C/C	Decreased activity	Increased	-	-	[21,23]
				-	-	-	[2]
			Increased activity	-	-	-	[5]
Cytarabine	79A>C and -31delC	C/C and -/-	Decreased activity	Increased	-	-	[4]
	208G>A	A/A	Decreased activity	-	-	-	[5,25]
		A/A or A/G	-	-	Increased	-	[44]
	-	CDA*2A haplotype	-	Increased	-	-	[16]

CDA: Cytidine deaminase; dFdU: 2′,2′-difluorodeoxyuridine; SNP: Single nucleotide polymorphism.

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/09/15
For personal use only.

4. Expert opinion

Developing personalized medicine in oncology is now an irreversible trend. This can be achieved either by screening at the tumor level all the molecular and genetic abnormalities impacting on the sensitivity or lack of sensitivity to the scheduled drugs. To name but a few, HER2 expression, KRas or BRaf mutational status are biomarkers currently used now to help oncologists decide what is the best drug or drugs combination to be given to a patient. In addition to this, the now widely followed "one tumor equals one treatment" paradigm, identifying germinal abnormalities at the constitutional level is a complementary, although by far less publicized, strategy to achieve a more personalized use of anticancer agents at the bedside through dose tailoring methods [57]. Interestingly, CDA status first emerged as a concern at the tumor level in the mid-90's because elevated activities were correlated with lack of efficacy with nucleosidic analogs such as gemcitabine [45]. The rise of constitutional pharmacogenetics in the 2000s has prompted many groups next to investigate germinal polymorphisms affecting CDA function in the liver and their possible impact on drug pharmacokinetics and clinical outcome. The Danesi & Peters groups in Europe and the Sugiyama group in Japan have pioneered the path towards a better understanding of how dysregulated CDA was a culprit for severe toxicities in gemcitabine-treated patients. Additionally, our group has developed an expertise in CDA functional screening over the last few years, with landmark papers in the implication of CDA dysregulation on lethal toxicities. In particular, our group has been the first to publish clinical evidences about toxic death cases with capecitabine [13,56] and gemcitabine [26] subsequently to changes in CDA activity. Of note, conflictual data have been published about the exact role *CDA*2* or *CDA*3* genotype could play (**Table 1**, [19,21,58]). Despite this discrepancy about the actual relevance of genotype-based investigations, there is a wide consensus emerging from all the clinical reports published by independent groups, indicating CDA deficiency as a condition associated with the incidence of life-threatening toxicities with most nucleosidic analogs, regardless of the methodology

RIGHTSLINK

used. Because of the rise of precision medicine, integrating CDA status as a covariate to tailor drug dosing looks like the achievable step to be undertaken next. This can be accomplished by integrating investigations of CDA (i.e., genotype and phenotype), full pharmacokinetics support and pharmacodynamics (i.e., toxicity and efficacy) monitoring so as to build next a mathematical pharmacokinetics/pharmacodynamics model dedicated to personalize dosing according to CDA status of each individual.

Declaration of interest

C Serdjebi has received a grant from Fondation pour la Recherche Medicale FM20140629931. J Ciccolini has a patent US20130011392A1 on measurement of CDA activity. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript other than those disclosed.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, André N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing–time for a change? Nat Rev Clin Oncol 2011;8(7):439–44
2. Kirch HC, Schröder J, Hoppe H, et al. Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro. Exp Hematol 1998;26(5):421–5
3. Yue L, Saikawa Y, Ota K, et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. Pharmacogenetics 2003;13(1):29–38
4. Ciccolini J, Evrard A, M'Batchi L, et al. CDA deficiency as a possible culprit for life-threatening toxicities after cytarabine plus 6-mercaptopurine therapy: pharmacogenetic investigations. Pharmacogenomics 2012;13(4):393–7
• **First case report evidencing cytidine deaminase (CDA) deficiency as a cause of early severe toxicities upon cytarabine intake.**
5. Micozzi D, Carpi FM, Pucciarelli S, et al. Human cytidine deaminase: a biochemical characterization of its naturally occurring variants. Int J Biol Macromol 2014;63:64–74
•• **This publication highlights the differences in CDA activity according to CDA genotype.**
6. Schröder JK, Kirch C, Seeber S, Schütte J. Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. Br J Haematol 1998;103(4):1096–103
7. Teng YS, Anderson JE, Giblett ER. Cytidine deaminase: a new genetic polymorphism demonstrated in human granulocytes. Am J Hum Genet 1975;27(4):492–7
8. Fitzgerald SM, Goyal RK, Osborne WR, et al. Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. Hum Genet 2006;119(3):276–83
9. Gilbert JA, Salavaggione OE, Ji Y, et al. Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. Clin Cancer Res 2006;12(6):1794–803
10. Giovannetti E, Laan AC, Vasile E, et al. Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2008;27(6):720–5
•• **This publication gives a genotype phenotype correlation.**
11. Ludovini V, Floriani I, Pistola L, et al. Association of cytidine deaminase and xeroderma pigmentosum group D polymorphisms with response, toxicity, and survival in cisplatin/gemcitabine-treated advanced non-small cell lung cancer patients. J Thorac Oncol 2011;6(12):2018–26
12. Maring JG, Wachters FM, Slijfer M, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer patients: impact of the 79A>C cytidine deaminase polymorphism. Eur J Clin Pharmacol 2010;66(6):611–17
13. Mercier C, Dupuis C, Blesius A, et al. Early severe toxicities after capecitabine intake: possible implication of a cytidine deaminase extensive metabolizer profile. Cancer Chemother Pharmacol 2009;63(6):1177–80
• **First case report evidencing early severe toxicities upon capecitabine intake in a capecitabine-treated patient.**
14. Parmar S, Seeringer A, Denich D, et al. Variability in transport and biotransformation of cytarabine is associated with its toxicity in peripheral blood mononuclear cells. Pharmacogenomics 2011;12(4):503–14
15. Mahlknecht U, Dransfeld CL, Bulut N, et al. SNP analyses in cytarabine metabolizing enzymes in AML patients and their impact on treatment response and patient survival: identification of CDA SNP C-451T as an independent prognostic parameter for survival. Leukemia 2009;23(10):1929–32
16. Raynal C, Ciccolini J, Mercier C, et al. High-resolution melting analysis of sequence variations in the cytidine deaminase gene (CDA) in patients with cancer treated with gemcitabine. Ther Drug Monit 2010;32(1):53–60
17. Soo RA, Wang LZ, Ng SS, et al. Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. Lung Cancer 2009;63(1):121–7
18. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. J Clin Oncol 2007;25(1):32–42
19. Mercier C, Evrard A, Ciccolini J. Genotype-based methods for anticipating gemcitabine-related severe toxicities may lead to false-negative results. J Clin Oncol 2007;25(30):4855; author reply 4855-6
20. Ciccolini J, Dahan L, André N, et al. Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. J Clin Oncol 2010;28(1):160–5
•• **This publication showed gemcitabine overexposure with CDA deficiency in**

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/09/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/09/15
For personal use only.

mice and correlated it with a higher risk of toxicity in human.

21. Giovannetti E, Tibaldi C, Falcone A, et al. Impact of cytidine deaminase polymorphisms on toxicity after gemcitabine: the question is still ongoing. J Clin Oncol 2010;28(14):e221–2; author reply e223-5
22. Peters GJ, Honeywell RJ, Maulandi M, et al. Selection of the best blood compartment to measure cytidine deaminase activity to stratify for optimal gemcitabine or cytarabine treatment. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2014;33(4-6):403–12

• **This article cross-validated two assays to evaluate CDA activity in humans.**

23. Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M, et al. Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. Ann Oncol 2012;23(3):670–7
24. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, et al. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: impact of genetic polymorphisms. Clin Pharmacokinet 2010;49(8):549–58

•• **The group built a pharmacokinetic model, including genetic data as a covariate of gemcitabine clearance.**

25. Caronia D, Martin M, Sastre J, et al. A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. Clin Cancer Res 2011;17(7):2006–13
26. Mercier C, Raynal C, Dahan L, et al. Toxic death case in a patient undergoing gemcitabine-based chemotherapy in relation with cytidine deaminase downregulation. Pharmacogenet Genomics 2007;17(10):841–4
27. Serdjebi C, Ciccolini J, Fina F, et al. Recipient/donor contradictory genotypes with impact on drug pharmacogenetics after liver transplant: a deadly gift? Pharmacogenet Genomics 2014;24(10):527–9
28. Ueno H, Kaniwa N, Okusaka T, et al. Homozygous CDA*3 is a major cause of life-threatening toxicities in gemcitabine-treated Japanese cancer patients. Br J Cancer 2009;100(6):870–3
29. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res 2008;14(6):1797–803
30. Abraham A, Varatharajan S, Abbas S, et al. Cytidine deaminase genetic variants influence RNA expression and cytarabine cytotoxicity in acute myeloid leukemia. Pharmacogenomics 2012;13(3):269–82
31. Xu J, Zhou Y, Zhang J, et al. High incidence of severe neutropenia after gemcitabine-based chemotherapy in Chinese cancer patients with CDA 79A>C mutation. Clin Chim Acta 2012;413(15-16):1284–7
32. Baker JA, Wickremsinhe ER, Li CH, et al. Pharmacogenomics of gemcitabine metabolism: functional analysis of genetic variants in cytidine deaminase and deoxycytidine kinase. Drug Metab Dispos 2013;41(3):541–5
33. Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahem Q, et al. Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analogue half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. Clin Cancer Res 2013;19(4):938–48
34. Grepin R, Guyot M, Jacquin M, et al. Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. Oncogene 2012;31(13):1683–94
35. De Pas T, de Braud F, Danesi R, et al. Phase I and pharmacologic study of weekly gemcitabine and paclitaxel in chemo-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer. Ann Oncol 2000;11(7):821–7
36. Yonemori K, Ueno H, Okusaka T, et al. Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. Clin Cancer Res 2005;11(7):2620–4

•• **This is the first publication highlighting that 208G>A polymorphism is highly correlated with severe neutropenia in gemcitabine-treated patients.**

37. Ciccolini J, Evrard A, Lacarelle B. A CDD polymorphism as predictor of capecitabine-induced hand-foot syndrome–letter. Clin Cancer Res 2012;18(1):317
38. Sugiyama E, Lee SJ, Lee SS, et al. Ethnic differences of two non-synonymous single nucleotide polymorphisms in CDA gene. Drug Metab Pharmacokinet 2009;24(6):553–6

• **This article studied the allelic frequencies of CDA polymorphisms in Asian and Caucasian populations.**

39. Yardley DA. Gemcitabine and taxanes as a new standard of care in breast cancer. Clin Breast Cancer 2004;4(Suppl 3):S107–12
40. Sandler A, Ettinger DS. Gemcitabine: single-agent and combination therapy in non-small cell lung cancer. Oncologist 1999;4(3):241–51
41. Shelley MD, Jones G, Cleves A, et al. Intravesical gemcitabine therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): a systematic review. BJU Int 2012;109(4):496–505
42. Kroep JR, Giaccone G, Tolis C, et al. Sequence dependent effect of paclitaxel on gemcitabine metabolism in relation to cell cycle and cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cell lines. Br J Cancer 2000;83(8):1069–76
43. Kim TM, Kim S, Ahn YO, et al. Anti-cancer activity of gemcitabine against natural killer cell leukemia/lymphoma. Leuk Lymphoma 2014;55(4):940–3
44. Mini E, Nobili S, Caciagli B, et al. Cellular pharmacology of gemcitabine. Ann Oncol 2006;17(Suppl 5):v7–12
45. Serdjebi C, Seitz JF, Ciccolini J, et al. Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. Pharmacogenomics 2013;14(9):1047–51

•• **This article highlighted a higher risk of progressing with gemcitabine treatment when patients have a higher CDA activity.**

46. Farrell JJ, Bae K, Wong J, et al. Cytidine deaminase single-nucleotide polymorphism is predictive of toxicity from gemcitabine in patients with pancreatic cancer: RTOG 9704. Pharmacogenomics J 2012;12(5):395–403
47. Keating GM. Azacitidine: a review of its use in the management of

RIGHTSLINK

myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukaemia. Drugs 2012;72(8):1111–36

48. Joerger M, Burgers SA, Baas P, et al. Germline polymorphisms in patients with advanced nonsmall cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy: a prospective clinical study. Cancer 2012;118(9):2466–75

49. Ciccolini J, Peters GJ, Giovannetti E. Gender, cytidine deaminase, and 5-aza/decitabine–letter. Clin Cancer Res 2013;19(11):3105

50. Fanciullino R, Serdjebi C, Mollard S, et al. Abstract 2208: cytidine deaminase deficiency and severe toxicities upon azacytidine intake: clinical observations and experimental evidences. Proceedings: AACR 104th Annual Meeting 2013; 6 – 10 April 2013; Washington, DC. Cancer Res 2013;73(8):abstract nr 2208

51. Falk IJ, Fyrberg A, Paul E, et al. Decreased survival in normal karyotype AML with single-nucleotide polymorphisms in genes encoding the AraC metabolizing enzymes cytidine deaminase and 5'-nucleotidase. Am J Hematol 2013;88(12):1001–6

52. Xu PP, Chen BA, Feng JF, et al. Association of polymorphisms of cytosine arabinoside-metabolizing enzyme gene with therapeutic efficacy for acute myeloid leukemia. Chin Med J (Engl) 2012;125(12):2137–43

53. Schüller J, Cassidy J, Dumont E, et al. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol 2000;45(4):291–7

54. Miwa M, Ura M, Nishida M, et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. Eur J Cancer 1998;34(8):1274–81

55. Morita T, Matsuzaki A, Kurokawa S, Tokue A. Forced expression of cytidine deaminase confers sensitivity to capecitabine. Oncology 2003;65(3):267–74

56. Dahan L, Ciccolini J, Evrard A, et al. Sudden death related to toxicity in a patient on capecitabine and irinotecan plus bevacizumab intake: pharmacogenetic implications. J Clin Oncol 2012;30(4):e41–4

57. André F, Ciccolini J, Spano JP, et al. Personalized medicine in oncology: where have we come from and where are we going? Pharmacogenomics 2013;14(8):931–9

58. Mercier C, Dahan L, Ouafik L, et al. Letter to the editor: pharmacokinetics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer patients: impact of the 79A>C cytidine deaminase polymorphism. Eur J Clin Pharmacol 2010;66(9):959–60

Affiliation

Cindy Serdjebi[1], Gérard Milano[2] & Joseph Ciccolini[†1]
[†]Author for correspondence
[1]INSERM UMR_S911 Aix-Marseille University, SMARTc, CRO2, Pharmacokinetics Unit, UFR Pharmacie 27 Bd Jean Moulin 13385 Marseille, France
E-mail: joseph.ciccolini@univ-amu.fr
[2]OGC Nice, Alliance Riviera, Nice, France

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/09/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

COMMUNICATIONS ORALES & POSTERS

ESPT 2012 Sixth Conference : System Biology and Personalized Medecine Santorini
Prix du meilleur poster dans la session Pharmacogénétique
Severe toxicities in patients undergoing gemcitabine, ara-c, capecitabine, orazacytidine treatments: is deregulated cytidine deaminase the bad guy?
Cindy Serdjebi, Joseph Ciccolini, Alexandre Evrard, Cédric Mercier, Nicolas André, Laetitia Dahan, Gérard Milano, Jean-François Seitz, Bruno Lacarelle, and L'Houcine Ouafik.

ESPT 2013 Second Conference : From Cell to Clinic Lisbonne
Cytidine deaminase deficiency and severe toxicities upon aza-cytidine intake: Clinical observations and experimental evidences.
Raphaelle Fanciullino, Cindy Serdjebi, Severine Mollard, Regis Costello, L'Houcine Ouafik, Joseph Ciccolini, and Cedric Mercier

AACR 2014 Meeting San Diego: Abstract 5549
Recipient-donor contradictory genotype with impact on anticancer drug pharmacogenetics after liver transplant: A deadly gift
Cindy Serdjebi, Raphaelle Fanciullino, Frederic Fina, Arnaud Verschuur, Bertrand Roquelaure, Bruno Lacarelle, L'Houcine Ouafik, Joseph Ciccolini, and Nicolas André

36th EORTC-PAMM Winter Meeting 2015 Marseille : Abstract 20
Pharmacogenetics of gemcitabine: Where did we go wrong?
Cindy Serdjebi, Florence Gattacecca, Laetitia Dahan, Martina Schneider, Carole Monterymard, Jaïc Cario, Bruno Lacarelle, Jean-François Seitz, Joseph Ciccolini

JFHOD 2015 Paris : Abstract P269
Pharmacogénétique de la gemcitabine dans l'adénocarcinome pancréatique: Essai FFCD-1004
Cindy Serdjebi, Denis Pezet, Jérôme Desramé, Francine Fein, Rosine Guimbaud, Eric François, Thierry André, Jean-François Seitz, Carole Montérymard, Dominique Arsene, Julien Volet, Abakar Abakar-Mahamat A, Thierry Lecomte, Véronique Guerin-Meyer, Jean-Louis Legoux, Gaël Deplanque, Pierre Guillet, Joseph Ciccolini, Côme Lepage, Laetitia Dahan

AACR 2015 Meeting Philadelphia: Abstract 5479
FFCD 1004 Pharmacogenetics of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma : Where did we go wrong?
Cindy Serdjebi, Denis Pezet, Jérôme Desramé, Francine Fein, Rosine Guimbaud, Eric François, Thierry André, Jean-François Seitz, Carole Montérymard, Dominique Arsene, Julien Volet, Abakar Abakar-Mahamat A, Thierry Lecomte, Véronique Guerin-Meyer, Jean-Louis Legoux, Gaël Deplanque, Pierre Guillet, Joseph Ciccolini, Côme Lepage, Laetitia Dahan

SEVERE TOXICITIES IN PATIENTS UNDERGOING GEMCITABINE, ARA-C, CAPECITABINE, OR AZACYTIDINE TREATMENTS: IS DEREGULATED CYTIDINE DEAMINASE THE BAD GUY?



Cindy Serdjebi[1], Joseph Ciccolini[1], Alexandre Evrard[2], Cédric Mercier[1], Nicolas André[1], Laetitia Dahan[1], Gérard Milano[3], Jean-François Seitz[1], Bruno Lacarelle[1], and L'Houcine Ouafik[1]

[1] :Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (APHM) & Aix-Marseille Univ., U911 Cro2, Marseille;

[2] :CHU Carémeau, Nîmes; and [3] :C.A.L., Nice, France

SUMMARY

Nucleosidic analogs are frequently used alone or as part of combinations to treat a variety of solid tumors (pancreas, lung, breast, digestive, gynecoligical) and haematological disorders, both in adults and in children.

Cytidine deaminase (CDA) is an ubiquitous enzyme that proved to be highly polymorphic, with activities in patients ranging from poor metabolizer (PM) to rapid deaminator (UM). To date, deregulated CDA has been evidenced as a culprit for life-threatening toxicities with gemcitabine [1]. Little evidences have been gathered thus far about the possible role CDA could further play with other nuclosidic analogs.

PATIENTS & METHODS

Patients were all hospitalized at the La Timone University Hospital of Marseille or La Conception University Hospital of Marseille, France. Patients were selected on unusually severe, or unusually early (i.e., showing days after drug intake) toxicities when administered with a purine or a pyrimidine derivative. After written legal consent was obtained, pharmacogenetic testing was performed on CDA. When nucelosidic analogs were associated with other cytotoxics, further investigations focused on possible other genetic deregulations affecting the co-administered drugs (e.g., DPYD, UGT1A1, TPMT). Additional phenotypic testing was performed when necessary and/or when validated suitable techniques were made available.

Search for genetic variants on CDA, plus DPYD, TPMT, UGT1A1 and TYMS genes when required, was carried out by high resolution melting (HRM) using the Light Cycler technology (Roche, France) from a single blood sample with standard DNA extraction. Functional testing for CDA and DPD was performed additionally from a single blood sample.









Gene symbol	Polymorphism ID	Function
CDA	-31delC (promoter), rs3215400	5'UTR
	c79A>C (exon 1), rs2072671	Missense
	c.208G>A (exon2), rs60369023	Missense
	c.435C>T (exon4), rs1048977	Synonymous
DPYD	c.467T>A (exon5)	Stop Codon
	c.1679T>G (exon 13)	Missense
	IVS14+1G>A (exon14), rs3918290	Exon 14 skipping
	c.2846A>T (exon22)	Missense
UGT1A1	UGT1A1*28 (TA)6>(TA)7, rs8175347	5'UTR
TYMS	28-bp tandem repeat, rs34743033	5'UTR
	c.-58G>C, rs2853542	5'UTR
	1494del TTAAAG, rs34489327	5'UTR
TPMT	c,238G>C (exon 5), rs1800462	Missense
	c.460G>A (exon 7), rs1800462	Missense
	c.719A>G (exon 10), rs1142345	Missense

- **CDA phenotypic status**

Residual CDA activity in serum was evaluated spectrophotometrically after overnight incubation with cytidine as described in [1]. Patients with CDA < 2 U/mg of proteinswere regarded as PM, whereas patients with CDA > 6 U/mg of proteins were rapid deaminators (UM).

- **DPD phenotypic status**

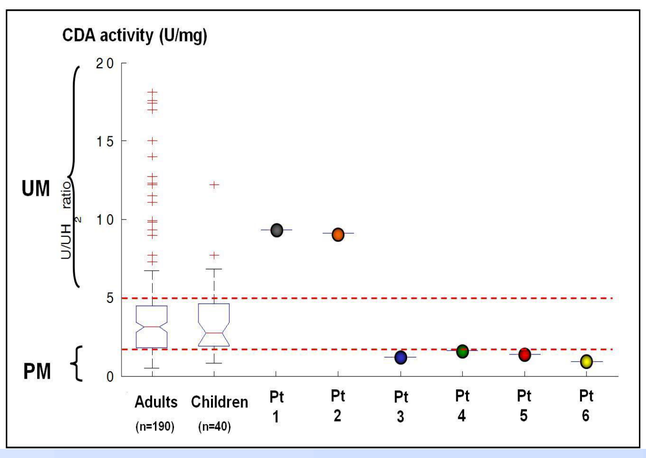
DPD activity was evaluated using a surrogate HPLC test based upon the measurement of endogenous U/UH2 ratio in plasma [2].

RESULTS

Patient #	Age Sex	Disease	Treatment	Toxicities	CDA activity *	CDA status**	CDA genotype	Other phenotypes	Other genotypes
1	19 F	Metastatic Corticosurrenaloma	**Capecitabine**	G4 Mucosities G4 Diarrhea	9,3	**UM**	not authorized	DPD OK	not authorized
2	56 M	mCRC	**Capecitabine** **Irinotecan** **Bevacizumab**	Pancytopenia Sepsis Toxic death	9,1	**UM**	Heterozygous for 79A>C and -13delC	DPD OK	DPYD checked UGT1A1 checked TYMS checked
3	84 F	Myelomonocytic Leukemia	**Aza-Cytidine**	Pancytopenia	1,2	**PM**	ongoing	N/A	N/A
4	7 F	Stage-III Lymphoma	**Cyclophosphamide** **6-MP** **Cytarabine**	Pancytopenia	1,6	**PM**	Homozygous for 79A>C and -del31C	N/A	TPMT checked
5	79 F	Leukemia	**Cytarabine**	G4 Mucosities + translocation, Death	1,4	**PM**	ongoing	N/A	N/A
6	74 F	Metastatic Vesical Cancer	**Gemcitabine** **+** **Carboplatin**	Pancytopenia Sepsis Toxic Death	0,9	**PM**	Heterozygous for 79A>C and c.246+37G>A	N/A	N/A

*: CDA activity expressed as U/mg **: UM = CDA > 5 U/mg; PM = CDA <2 U/mg

CDA phenotypic status.



All the 6 patients displayed abnormal CDA status (2UM, 4 PM).

Genotype (patients 2 & 4).

Gene	Polymorphism ID	Patient 2 genotype	Patient 4 genotype
CDA	-31delC	-/C	-/-
	79A>C	A/C	C/C
	208G>A	G/G	G/G
	435C>T	C/T	C/C
DPYD	464T>A	T/T	-
	1679T>G	G/G	-
	IVS14+1G>A	G/G	-
	2846A>T	A/A	-
TYMS	28-bp tand. Repeat	3R/3R	-
	-58G>C	G/C	-
	1494del TTAAAG	Obp/6bp	-
UGT1A1	(TA)6>(TA)7	(TA)6/(TA)6	-
TPMT	238G>C	-	G/G
	460G>A	-	G/G
	719A>G	-	A/A

Double Homozygoty for 79A>C and -31delC, with opposite effects on CDA levels. Functionnal testing helped to establish the actual CDA status.

6-MP is probably not involved in the toxicities.

Impaired 5-FU detoxification and impaired SN38 glucuronidation are probably not involved in the toxicities.

CONCLUSION & DISCUSSION

Genetic polymorphism affecting cytidine deaminase is a rising concern with gemcitabine, one of the most widely prescribed anticancer drug worldwide [1]. More than 40 polymorphisms have been described on the CDA gene, and measured CDA activities in cancer patients range from <0.5 up to > 15 U/mg. CDA is implicated as well in the liver activation of capecitabine, and in the liver detoxification of a variety of nucleosidic analogs such as cytarabine (Ara-C), azacytidine, clofarabine, fludarabine..

Here, we investigated whether dysregulations affecting CDA could be at the origin of unexpected severe and sometimes lethal toxicities with capecitabine, Ara-C, gemcitabine and azacytidine. Our data strongly suggest that rapid deaminator individuals (ie, patients with CDA UM status) are at risk of experiencing life threatening toxicities upon capecitabine intake [3], and that conversely, PM patients are at risk of experiencing severe /lethal toxicities when administered with Ara-C [4] or azacytidine .

Pre-therapeutic CDA testing should help to reduce the risk of drug-induced toxicities in patients given nucleosidic analogs.

[1] Ciccolini J, et al. Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. J Clin Oncol. 2010, 28(1):160-5.

[2] Ciccolini J, et al. A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. Ther Drug Monit. 2006, 28(5):678-85.

[3] Dahan L, et al Sudden death related to toxicity in a patient on capecitabine and irinotecan plus bevacizumab intake: pharmacogenetic implications. J Clin Oncol. 2012, 30(4):e41-4.

[4] Ciccolini J, et al. CDA deficiency as a possible culprit for life-threatening toxicities after cytarabine plus 6-mercaptopurine therapy: pharmacogenetic investigations. Pharmacogenomics. 2012, 13(4):393-7

Cytidine deaminase deficiency and severe toxicities upon azacytidine intake : Clinical observations and experimental evidences

Raphaëlle Fanciullino[1], Cindy Serdjebi[2], Joseph Ciccolini[2], Cédric Mercier[1], Régis Costello[1], Bruno Lacarelle[3] L'Houcine Ouafik[2]

[1] Hematologic Oncology Unit, La Conception University Hospital of Marseille France
[2]Transfert Oncology Unit Nord University Hospital of Marseille, Inserm S_911 CRO2
[3] Pharmacokinetics and Toxicology Unit La Timone University Hospital of Marseille, Inserm S_911 CRO2

Summary Cytidine deaminase (CDA) is an ubiquitous enzyme that proved to be highly polymorphic, with activities ranging from poor metabolizers (PM) to rapid deaminator (UM). To date, dysregulated CDA has been evidenced as a culprit for life-threatening toxicities with gemcitabine and cytarabine. On the other side, azacytidine is a nucleosidic analog used for treating a variety of hematologic malignancies. Azacytidine pharmacokinetics is dependent upon a liver detoxification step driven by CDA. Litlle evidences have been collected thus far about possible role erratic CDA could further play with azacytidine.



From bedside to bench….



… to bedside.



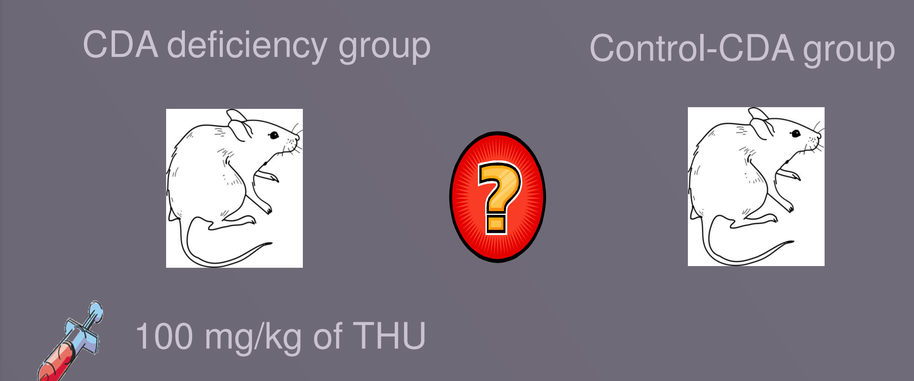
Patients, Material and Methods

Clinical observations: Patients showing severe/lethal toxicities were all treated with azacytidine at the Conception University Hospital of Marseille, France. CDA phenotype was evaluated retrospectively using an ex-vivo assay.

POC study: The hypothesis that CDA deficiency was responsible for toxicities upon azacytidine intake in patients was tested in rodents by comparing the effects of this drug in two groups of animals: CDA-deficient and CDA-control mice.
- CDA-deficiency group: 8 mice pre-treated with 100 mg/kg I.P. of tetrahydrouridine (THU) inhibitor were administered with 24 mg/kg of azacytidine I.P.
- CDA-control group: 8 mice received 24 mg/kg I.P. of azacytidine only.

Safety study: Neutrophils and lymphocytes were monitored by flow-cytometry before and over 10 days after treatment as a marker for hematological toxicity. Clinical monitoring was performed daily.

Pharmacokinetics study: Azacytidine blood levels were measured in animals at T15, 30, 60 min by HPLC-UV after acid precipitation.



Results

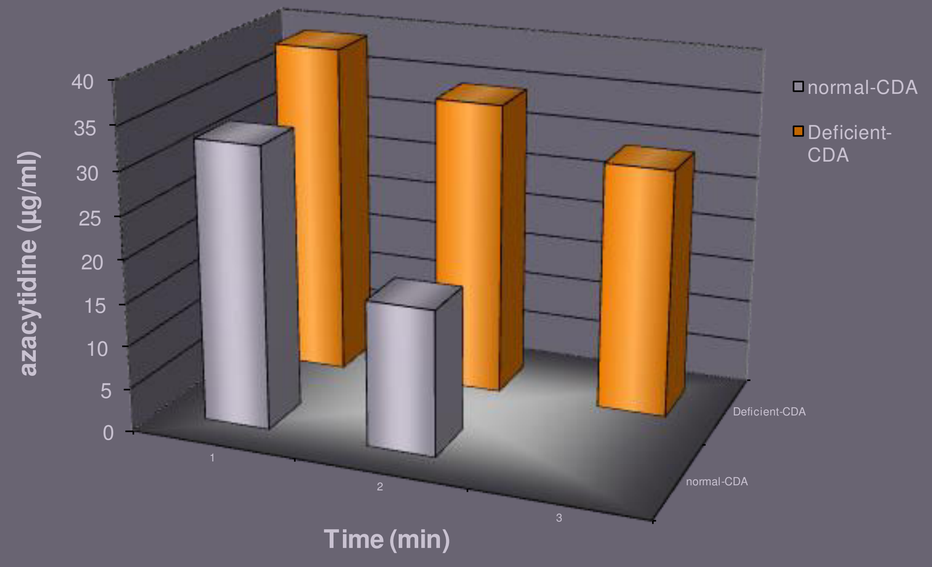
Clinical observations:

Sex	Age (years)	Diagnostic	n cure/ dose (d-	Total dose (mg)	CDA** (U/mg)	CRP (mg/L)	Toxicity	Outcome
F	82	CML	4/130	3640	1	38.3	Tricytopenia hemorragic syndrom rectorragia	Treatment stops*
F	85	MDS	3/150	3150	1.9	48.8	Tricytopenia	Dose reduction
F	81	AML	2/75	1050	2	ND	Tricytopenia	Posponement
F	61	AML	1/130	910	1.4	10.6	Septic shock	Toxic death

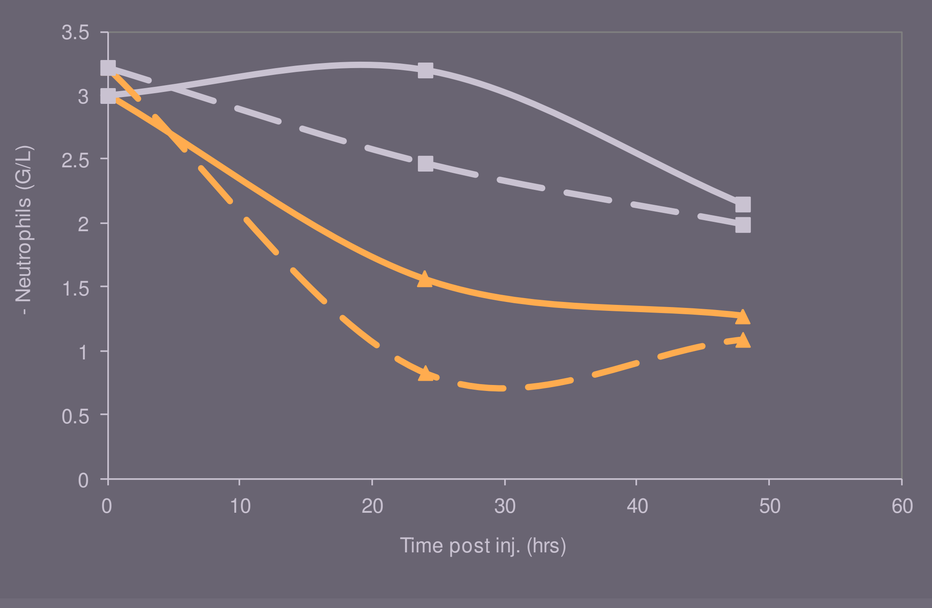
*Treatment was next switch to cytarabine with fatal outcome eventually.

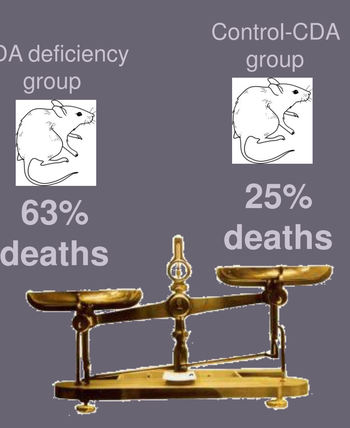
** Mean CDA activity in the reference population is 3.4 U/mg.

Pharmacokinetics study:



Up to +100% higher azacitidine plasma levels were observed in CDA-deficient mice





AZA-C dose	Control-CDA (n=8) 24 mg/kg	Deficient-CDA (n=8) 24 mg/kg
Diarrhea	none	severe
Hirsutism	none	marked
Prostration	none	over 24H
Death	2	5

Deeper neutropenia and lymphopenia were observed in CDA-deficient mice treated with azacytidine. Overall, more signs for severe toxicities were observed in CDA-deficient mice receiving azacytidine.

Conclusion CDA is implicated in the liver detoxification of a variety of nucleosidic analogs such as gemcitabine, azacytidine, cytarabine, clofarabine, fludarabine.
Here, we investigated whether dysregulations affecting CDA could be at the origin of unexpectedly severe, and sometimes lethal, toxicities with azacytidine in patients with hematological malignancies who all showed low CDA activities.
Our POC study in animals strongly support the hypothesis that CDA deficiency is a condition associated indeed with drug overexposure and subsequent severe toxicities upon azacytidine intake

Pre-therapeutic CDA testing should help to reduce the risk of drug-induced toxicities in patients given azacytidine.

Evrard A et al. **Pharmacogenomics**. 2013 Feb;14(3):227-30. Mahfouz RZ et al. **Clin Cancer Res**. 2013 Feb 15;19(4):938-948. Ciccolini J et al. **Pharmacogenomics**. 2012, 13(4):393-7 Ciccolini J et al. **J Clin Oncol**. 2010, 28(1):160-5.

Recipient-donor contradictory genotype with impact on anticancer drug pharmacogenetics after liver transplant: A deadly gift?

Cindy Serdjebi[1], Frédéric Fina[1], Arnaud Verschuur[2], Bruno Lacarelle[1], L'Houcine Ouafik[1], Joseph Ciccolini[1], Nicolas André[2]

[1]:Pharmacokinetics Unit, SMARTc, S_911, Aix-Marseille University, Marseille, France

[2] :Paediatric Oncology Unit, La Timone University Hospital of Marseille France

BACKGROUND

Cytosine arabinoside (Ara-C) is an antimetabolic agent used to treat a variety of hematologic cancers, including Burkitt lymphoma. As a pyrimidine analogue, its deactivation into uracil-arabinoside is mainly dependant on CDA, a liver enzyme that proved to be highly polymorphic. This polymorphism, partly explained by genetic causes, leads to activities ranging from poor metabolizer (PM) to rapid deaminator (UM), thus impacting on the ability of the patients to detoxify, or not, cytarabine.

We previously reported the case of a child bearing two homozygous mutation on her CDA gene and promoter (i.e., -del33C and 79A>C) and presenting with a PM phenotype, with life-threatening toxicities upon cytarabine intake.

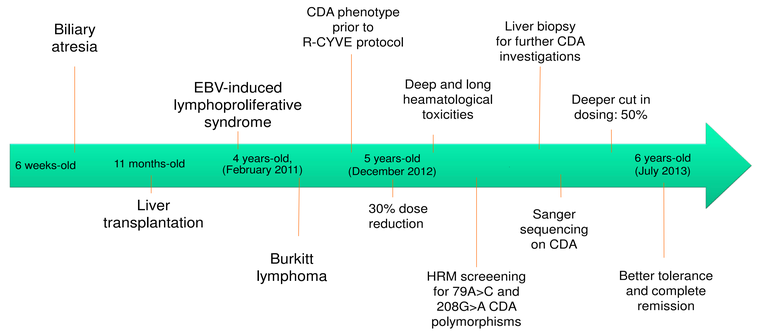
Here, we present the case of another child who experienced life-threatening toxicities after cytarabine administration with no mutation on her CDA gene but who had a liver transplant, thus suggesting that she might bear two contradictory genotypes.



PATIENT & METHODS

CLINICAL CONTEXT

Following a biliary atresia in her very early childhood, the patient received a liver transplant. In april 2012, she was diagnosed a EBV-induced lymphomatous cell proliferation, which evolved into Burkitt lymphoma. The patient was first treated with rituximab, cyclophosphamide, vincristine and doxorubicin with no signs of toxicity. The patient was next scheduled for HD cytarabine induction.

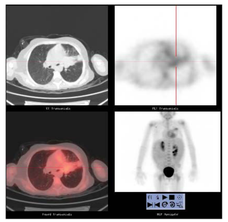


INVESTIGATING ON CDA

CDA status was primarily evaluated using a surrogate functional testing based upon the ex vivo measurement of CDA activity from serum (Ciccolini et al. 2010). Further genetic investigations are based upon SNP-candidate approaches using HRM analysis focusing on 79A>C, 208G>A, and extra-sequencing to confirm the genotypes. Initial genotype was carried out from patient's lymphocytes, and next from donor's liver before the graft and after the graft.

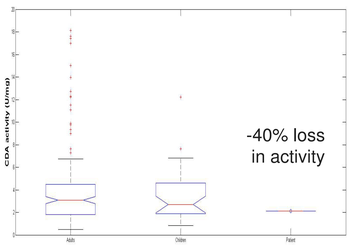
RESULTS

PATIENT CASE



CDA PHENOTYPE TESTING

Surrogate testing evidenced a mild CDA deficiency syndrome (CDA = 2.1 UI/mg, i.e -40% reduction as compared with usual values). Ara-C dosing was cut accordingly by 30%. Despite this cut in dosing, the patient displayed severe and life-threatening toxicities, i.e. febrile aplasia, septic shock, hemodynamic disorders, and neutropenic colitis.



CDA GENETIC ANALYSIS

HRM: Neither the patient nor the donor carried the 208G>A polymorphism. For the 79A>C polymorphism, the patient displays the same profile as the wild-type standard (red). However, DNA from patient's liver displayed a gene heterozygosity for the 79A>C substitution (yellow).
The second HRM analysis performed on paraffin sections collected from the graft confirmed the initial results.

Sanger sequencing: Sanger sequencing allows us to better understand this complex case. Patient's DNA from blood displayed a wild type profile whereas patient's DNA from liver displayed a homozygous C/C profile with a A contamination, which is probably a part of the host hepatocytes genotype, or possibly an ongoing chimerism in the liver between host and donor genotypes.

Final genotype interpretation: final genotype of the patient reads as following:

SAMPLE	CDA*2	
Lymphocytes	A/A	➡ Full dose
Donor liver	C/C	
Liver (post transplant)	C/C + A	➡ Cut dosing!

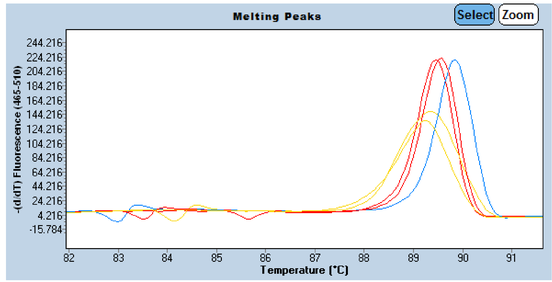


Figure2. HRM analysis for CDA*2 polymorphism

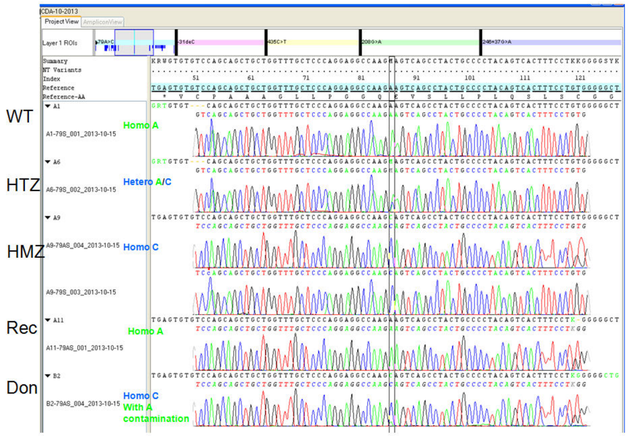


Figure3. Sanger sequencing on CDA exon 1

CONCLUSIONS

CDA is implicated in the liver detoxification of a variety of nucleosidic analogs such as gemcitabine, azacytidine, clofarabine, fludarabine, but also cytarabine.

This case-report confirm that our surrogate test is appropriate to detect global CDA deficiency from a single serum sample, even in patient with liver transplant. However, mild deficiency evidenced (i.e. -40% decrease in activity) led to a moderate cut in dosing (i.e., 30%) which proved to be not sufficient to avoid severe toxicities in this patient. Further genetic investigations revealed that the patient's liver was homozygous mutated on the CDA*2 allelic variant, thus requiring further (-50%) dose reduction.

To what extent CDA activity in the serum can actually match the level of deficiency in the liver can be questioned here, since normal CDA erythrocytic activity may have partly masked the underlying profound deficiency in the liver.

Despite this, initial CDA phenotypic testing helped, through a first dose reduction level, to spare this patient's life since full dose would probably have led to unrecoverable toxicities.

Overall, this case illustrated the complexity of picturing the exact genotype-to-phenotype relationships in patients with liver transplant, and fully confirm that pre-therapeutic CDA testing should help to reduce the risk of drug-induced toxicities in patients given cytarabine.

REFERENCES

Ciccolini J, Evrard A, M'Batchi L, Pourroy B, Mercier C, Iliadis A, Lacarelle B, Verschuur A, Ouafik L, André N. **CDA deficiency as a possible culprit for life-threatening toxicities after cytarabine plus 6-mercaptopurine therapy: pharmacogenetic investigations.** Pharmacogenomics. 2012 Mar;13(4):393-7.

Ciccolini J, Dahan L, André N, Evrard A, Duluc M, Blesius A, Yang C, Giacometti S, Brunet C, Raynal C, Ortiz A, Frances N, Iliadis A, Duffaud F, Seitz JF, Mercier C.
J Clin Oncol. **2010** Jan 1;28(1):160-5.
Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies.

Joseph.ciccolini@univ-amu.fr

Pharmacogénétique de la gemcitabine dans l'adénocarcinome pancréatique: Essai FFCD-1004

Serdjebi C (1), Pezet D (2), Desramé J (3), Fein F (4), Guimbaud R (5), François E (6), André T (7), Seitz JF (8), Montérymard C (9), Arsene D (10), Volet J (11), Abakar-Mahamat A (12), Lecomte T (13), Guerin-Meyer V (14), Legoux JL (15), Deplanque G (16), Guillet P (17), Ciccolini J (1), Lepage C (18), Dahan L (8)

(1) SMARTc, CRO2 INSERM UMR S_911, Marseille, (2) CHU Clermont Ferrand, (3) Jean Mermoz Lyon, (4) CHU Besançon, (5) CHU Toulouse, (6) CAC Nice, (7) Paris - La Pitié, (8) CHU Timone, AP-HM Marseille, (9) Dijon FFCD, (10) , CHU Caen, (11) CHU Reims, (12) CHU Nice, (13) CHU Tours, (14) CHU Angers, (15) CHU Orleans, (16) Parsi-St Joseph, (17) CH Toulon, (18) CHU Dijon

INTRODUCTION

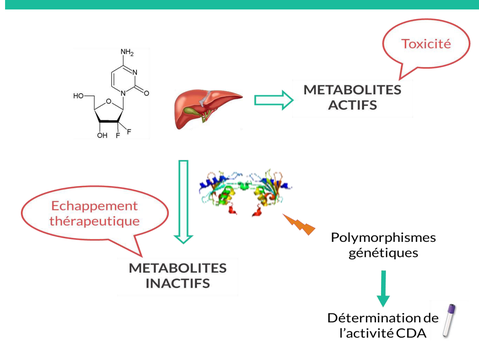
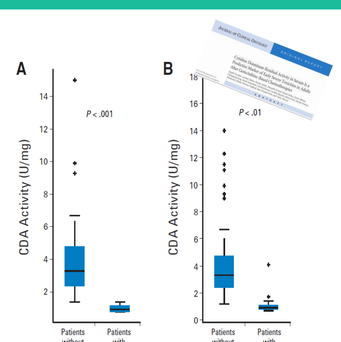


Figure1. Métabolisme de la gemcitabine

Le cancer du pancréas connaît une incidence croissante, avec plus de 11 000 nouveaux cas en France en 2012. Le traitement curatif reste la chirurgie, mais elle ne concerne qu'une minorité de patients. La chimiothérapie de référence dans la prise en charge de ces cancers reste la gemcitabine (GEM), utilisée en association ou en monothérapie.

La détoxification hépatique de la GEM est sous la dépendance d'une enzyme unique, la cytidine déaminase (CDA), qui fait l'objet d'un polymorphisme génétique, pouvant ainsi conduire à une variabilité fonctionnelle: statuts déficient (<3 U/mg) , normal et ultrarapide (>6U/mg). D'après des données rétrospectives générées par notre équipe (1) portant chez des patients traités par gemcitabine pour divers cancers, nous suggérons qu'un déficit en CDA pourrait être prédictif de l'apparition de toxicités sévères sous GEM, par défaut d'élimination conduisant à une surexposition plasmatique en gemcitabine (2).



PATIENTS & METHODES

120 patients atteints d'adénocarcinome pancréatique réséqué
Essai prospectif multicentrique national
Gemcitabine monothérapie (perfusion IV de 30 min de 1000mg/m²
3 semaines /4 x 6 mois en adjuvant)

Objectifs:

- **Principal: Evaluer la capacité de la CDA à prédire la survenue de toxicités hématologiques sévères (grade ≥ 3) et précoces (lors des 2 premiers cycles) induites par la GEM (H0 : Ratio de vraisemblance positif = 3,5).**
- Secondaires: Evaluer la capacité de la CDA à prédire la survenue de toxicités non hématologiques sévères et précoces, ou sur l'ensemble des cycles; évaluer l'impact de la CDA sur la pharmacocinétique de la GEM et de son métabolite; étudier les relations phénotype/génotype de la CDA; rechercher de nouvelles variations génétiques; étudier le rôle pronostique de la CDA.

Deux prélèvements sanguins ont été réalisés avant la première administration de GEM: un échantillon sérique permettant de mesurer l'activité de la CDA, et un échantillon de sang total pour rechercher la présence de la variation 79A>C (rs2072671), décrite comme étant responsable d'une perte de fonctionnalité enzymatique. Une étude pharmacocinétique optionnelle a été proposée aux patients, selon une stratégie de prélèvements limités (LSS), réalisée lors de la première administration de gemcitabine. Les toxicités ont été recueillies et gradées selon NCI-CTG v4.



Figure2. Schéma des différentes analyses réalisées chez le patient

RESULTATS

Données démographiques

- 119/120 patients ont reçu au moins une cure
- âge médian: 66,7 ans (IQR: 59,9-74,2)
- 96,88% dose protocolaire reçue sur 8 premières semaines de traitement

Données de tolérance

- 25 (23%) des patients ont présenté une toxicité hématologique sévère précoce (THSP)
- 20 (18%) des patients ont présenté une toxicité non hématologique sévère précoce (TNHSP)

Données sur le statut CDA

- 109 patients analysables
- activité de 0,86 à 8,56 U/mg
- activités moyenne et médiane: 2,61 et 2,26 U/mg
- 5 patients déficients (≤1,3 U/mg)
- 2 ultra-rapides (>6 U/mg)
- 92 patients génotypés : 37 WT, 41 HTZ, 14 HMZ

Données sur la PK de la gemcitabine et son métabolite dFdU

- 39 cinétiques analysables

Tableau 1. Caractéristiques des patients (*n*=120)

		No. de patients (%)
Sexe		
	homme	74 (61,7%)
	femme	46 (38,3%)
Age		
	median	66,72
	minimum	30,6
	maximum	84,9
Statut OMS		
	0	46 (38,3%)
	1	68 (56,7%)
	2	6 (5,0%)
Localisation tumeur		
	tête	96 (80,0%)
	corps	8 (6,7%)
	queue	11 (9,2%)
	tête et corps	1 (0,8%)
	tête et queue	1 (0,8%)
	corps et queue	3 (2,5%)
Stade maladie		
	T1/T2	24 (20,0%)
	T3/T4	96 (80,0%)
	N+	84 (70,0%)
Résection macroscopique		
	R0	106 (88,3%)
	R1	14 (11,7%)

Tableau2. Toxicités maximales causées par la GEM (n=119)

	No. de patients (%)	
	Grades 1-2	Grades 3-4
Hématologiques		
anémie	110 (92,4%)	5 (4,2%)
leucopénie	81 (68,1%)	9 (7,6%)
neutropénie	64 (53,8%)	30 (25,2%)
thrombopénie	62 (52,1%)	1 (0,8%)
Non hématologiques		
nausée	65 (54,6%)	1 (0,8%)
vomissement	33 (27,7%)	0 (0%)
diarrhée	66 (55,5%)	1 (0,8%)
asthénie	90 (75,6%)	3 (2,5%)

Tableau3. Médianes de survie selon différents critères

	Médiane de survie (mois)	
Etude	29,08	
< 65 ans / ≥ 65 ans	34,40	26,50
T1-T2 / T3-T4	31,30	29,00
Taux de survie 6 mois / 12 mois	95,80%	79,82%

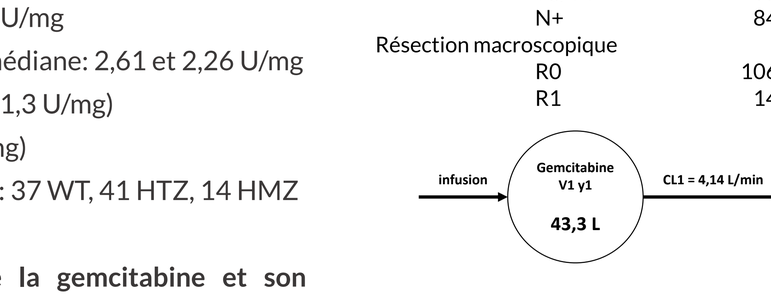


Figure. Modèle pharmacocinétique de population de la gemcitabine et son métabolite, et paramètres estimés

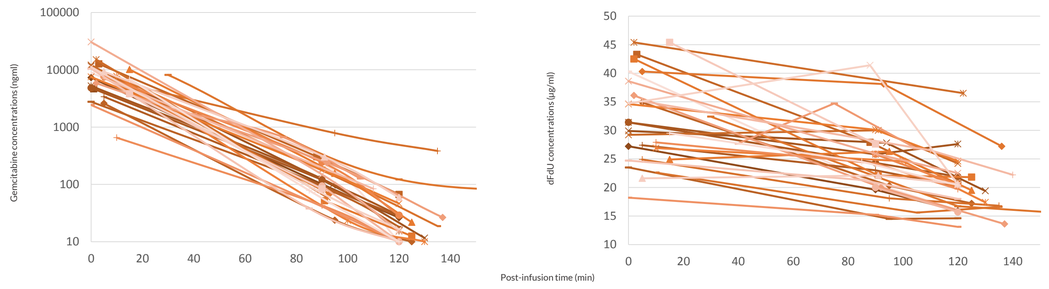


Figure4. Profils cinétiques de la gemcitabine et son métabolite

Tableau4. Toxicités en fonction du statut CDA (n=109)

	No. de patients avec THSP (%)		
	non	oui	
Activité CDA médiane	2,25	2,35	p= 0.87
CDA ≤ 1.3 U/mg	4 (3,67%)	1 (0,92%)	ND
CDA > 1.3 U/mg	80 (73,39%)	24 (22,02%)	
Total	84 (77,06%)	25 (22,94%)	109 (100%)

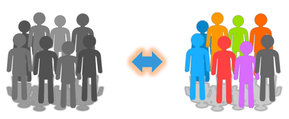
	No. de patients avec THS* (%)		
	non	oui	p
Activité CDA médiane	2,25	2,35	p=0,67
CDA ≤ 1,3 U/mg	4 (3,67%)	1 (0,92%)	ND
CDA > 1,3 U/mg	74 (67,89%)	30 (27,5%)	
Total	78 (71,56%)	31 (28,44)	109 (100%)

	No. de patients avec TNHS* (%)		
	non	oui	P
Activité CDA médiane	2,15	2,30	p=0,15
CDA ≤ 1,3 U/mg	5 (4,59%)	0 (0%)	ND
CDA > 1,3 U/mg	73 (66,97%)	31 (28,44%)	
Total	78 (71,56%)	31 (28,44%)	109 (100%)

THSP: toxicité hématologique sévère précoce
THS: toxicité hématologique sévère
TNHS: toxicité non-hématologique sévère

DISCUSSION & CONCLUSION

Cette étude prospective multicentrique ne confirme pas les données rétrospectives publiées . L'activité enzymatique de la CDA n'est pas corrélée à la survenue de toxicités sévères et précoces chez les patients traités par gemcitabine en monothérapie, et les analyses génétiques n'ont pas pu expliquer la variabilité en termes de toxicités. Les analyses de pharmacocinétique ne retrouvent pas de corrélation entre l'activité CDA et l'exposition plasmatique des patients. La non-significativité de l'essai s'explique par le fait que très peu de patients déficients en CDA ont été inclus (4.6% vs 12.5% dans l'étude rétrospective), soulevant l'effet de lissage de la variabilité inter-individuelle lors des essais cliniques.



REFERENCES & REMERCIEMENTS

Nous remercions les patients, les investigateurs, l'équipe du CRGA de la FFCD. La FFCD a bénéficié d'un financement de la part de la Ligue Contre le Cancer et Cindy Serdjebi a reçu une bourse doctorale de la part de la Fondation Pour la Recherche Médicale. 1. Ciccolini, Dahan, André et al. *J Clin Oncol*, 2010; 2. Tibaldi, Giovannetti, Vasile et al. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008.

FFCD 1004 Pharmacogenetics of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma : Where did we go wrong?

Serdjebi C (1), Pezet D (2), Desramé J (3), Fein F (4), Guimbaud R (5), François E (6), André T (7), Seitz JF (8), Montérymard C (9), Arsene D (10), Volet J (11), Abakar-Mahamat A (12), Lecomte T (13), Guerin-Meyer V (14), Legoux JL (15), Deplanque G (16), Guillet P (17), Ciccolini J (1), Lepage C (18), Dahan L (8)

(1) SMARTc, CRO2 INSERM UMR S_911, Marseille, (2) CHU Clermont Ferrand, (3) Jean Mermoz Lyon, (4) CHU Besançon, (5) CHU Toulouse, (6) CAC Nice, (7) Paris - La Pitié, (8) CHU Timone, AP-HM Marseille, (9) Dijon FFCD, (10) , CHU Caen, (11) CHU Reims, (12) CHU Nice, (13) CHU Tours, (14) CHU Angers, (15) CHU Orleans, (16) Parsi-St Joseph, (17) CH Toulon, (18) CHU Dijon

INTRODUCTION

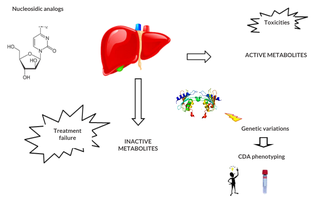


Figure1. Metabolism pathway of gemcitabine (1)

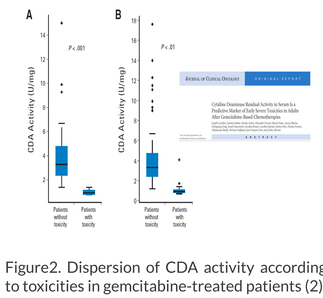


Figure2. Dispersion of CDA activity according to toxicities in gemcitabine-treated patients (2)

Pancreatic adenocarnicoma is a rising concern as more than 11 000 new cases have been diagnosed in France in 2012. Curative treatment remains surgery, but it only concerns a minority of patients. Chemotherapy gold standard in the management of this disease consists in gemcitabine (GEM)-based regimen, used alone or in combination.

As a nucleosid analog, gemcitabine pathway is primilarly driven by a unique liver enzyme, cytidine deaminase (CDA). Several genetic variations may occur on *CDA* gene, thus leading to a wide inter-individual variability in terms of enzymatic activity, allowing patients to be sorted as followed: poor metabolizers (PM, < 1.3 U/mg), the rapid deaminators (UM, > 6 U/mg) and the extensive ones with a normal activity (EM).

In 2010, we published a retrospective data to check whether CDA deficiency may be correlated with higher incidence of early severe toxicities (1). Thus, a strong correlation between PM CDA status and higher risk of severe toxicities has been evidenced in patients treated with nucleosidic analogs for various cancers, suggesting a gemcitabine overexposure due to lack of elimination (2). However, in pancreatic cancer patients subgroup treated with gemcitabine monotherapy, CDA was not significantly different in patients with severe toxicities compared to patients with no toxicities, due to low statistical power.

Here, we conducted a prospective study with a larger cohort of pancreatic cancer patients, treated by gemcitabine only to confirm or not the predictive role of CDA status in occurrence of early severe toxicities. We also tested the correlation between CDA genotype and toxicities and led a pharmacokinetic study.

METHODS

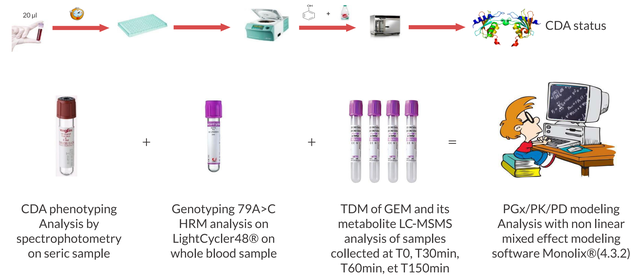
120 patients with resected pancreatic adenocarcinoma
Multicenter prospective clinical trial
Adjuvant gemcitabine-monotherapy
1000mg/m² 30 min-IV infusion
3 weeks /1 off for 6 months



Objectives:

- **Major: To evaluate ability of CDA status to be a predictive factor of early (occurring in the two first courses) severe (grade ≥ 3) hematological toxicities induced by GEM.**
- Minor: To evaluate ability of CDA status to be a predictive factor of early severe non hematological toxicities, and severe toxicities occurring all over the treatment; to evaluate CDA status impact on GEM and its metabolite pharmacokinetics; to study genotype/phenotype relationships, to screen for new genetic variations on *CDA* gene; to study the pronostic role of CDA.

Two blood samples were withdrawn prior to treatment to evaluate CDA status by a double approach: a seric sample for determination of CDA enzymatic activity and a blood sample to screen for 79A>C polymorphism (rs2072671), described as responible for a lack of activity. An optional pharmacokinetics study has been proposed to voluntary patients, according to a limited sampling strategy (LSS) and performed during the first GEM infusion. Toxicities have been collected and evaluated according to NCI-CTG v4.



CDA phenotyping Analysis by spectrophotometry on seric sample

Genotyping 79A>C HRM analysis on LightCycler48® on whole blood sample

TDM of GEM and its metabolite LC-MSMS analysis of samples collected at T0, T30min, T60min, et T150min

PGx/PK/PD modeling Analysis with non linear mixed effect modeling software Monolix®(4.3.2)

Figure3. Worklow of the different analyses performed in patients

RESULTS

Demographic data

- 119/120 patients received at least one course
- median age : 66,7 years (IQR: 59.9-74.2)
- 96,88% of protocol dosage received on the eight first weeks of treatment

Tolerance data

- 25 (23%) patients experienced ESHT
- 20 (18%) patients experienced ESNHT

Data on CDA status

- 109 processable patients
- activity ranging from 0.86 to 8.56 U/mg
- mean and median activities: 2.61 and 2.26 U/mg
- 5 PM patients (≤1.3 U/mg)
- 2 UM patients (>6 U/mg)
- 92 genotyped patients
- 37 WT, 41 HTZ, 14 HMZ

Data on GEM and its metabolite PK

- 39 processable kinetics

Table1. Patients' characteristics

		No. of patients (%)
Sex		
	male	74 (61.7%)
	female	46 (38.3%)
Age (years)		
	median	66.72
	minimum	30.6
	maximum	84.9
OMS status		
	0	46 (38.3%)
	1	68 (56.7%)
	2	6 (5,0%)
Tumor localization		
	head	96 (80.0%)
	body	8 (6.7%)
	tail	11 (9.2%)
	head & body	1 (0.8%)
	head & tail	1 (0.8%)
	body & tail	3 (2.5%)
Disease grade		
	T1/T2	24 (20.0%)
	T3/T4	96 (80.0%)
	N+	84 (70.0%)
Gross resection		
	R0	106 (88.3%)
	R1	14 (11.7%)

Table2. Maximal GEM-caused toxicities (n=119)

	No. of patients (%)	
	Grades 1-2	Grades 3-4
Hematological		
anemia	110 (92.4%)	5 (4.2%)
leucopenia	81 (68.1%)	9 (7.6%)
neutropenia	64 (53.8%)	30 (25.2%)
thrombopenia	62 (52.1%)	1 (0.8%)
Non hematological		
nausea	65 (54.6%)	1 (0.8%)
vomiting	33 (27.7%)	0 (0%)
diarrhea	66 (55.5%)	1 (0.8%)
asthenia	90 (75.6%)	3 (2.5%)

Table3. Median survival according to different criteria

	Median survival (months)	
Study	29.08	
< 65 y.o. / ≥ 65 y.o.	34.40	26.50
T1-T2 / T3-T4	31.30	29.00
Survival rate 6 months / 12 months	95.80%	79.82%

Table4. Toxicities according to CDA status (n=109)

	No. of patients with EHST (%)		
	no	yes	
Median CDA activity	2.25	2.35	p= 0.87
CDA ≤ 1.3 U/mg	4 (3.67%)	1 (0.92%)	
CDA > 1.3 U/mg	80 (73.39%)	24 (22.02%)	ND
Total	84 (77.06%)	25 (22.94%)	109 (100%)
	No. of patients with HST* (%)		
	no	yes	p
Median CDA activity	2.25	2.35	p=0.67
CDA ≤ 1.3 U/mg	4 (3.67%)	1 (0.92%)	
CDA > 1.3 U/mg	74 (67.89%)	30 (27.5%)	ND
Total	78 (71.56%)	31 (28.44)	109 (100%)
	No. of patients with NHT* (%)		
	no	yes	P
Median CDA activity	2.15	2.30	p=0.15
CDA ≤ 1.3 U/mg	5 (4.59%)	0 (0%)	
CDA > 1.3 U/mg	73 (66.97%)	31 (28.44%)	ND
Total	78 (71.56%)	31 (28.44%)	109 (100%)

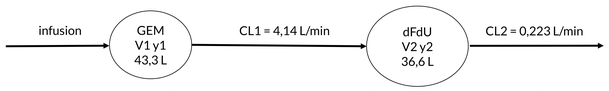


Figure5. Population pharmacokinetics model of GEM and its metabolite

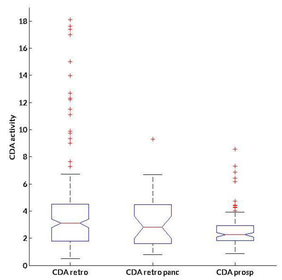
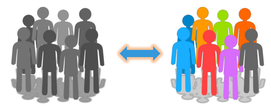


Figure4. Boxplots of CDA activity in retrospective VS prospective study

DISCUSSION & CONCLUSION



This multicenter prospective trial does not confirm the retrospective publsihed data. Neither enzymatic activity of CDA is correlated with experiencing early severe toxicities upon GEM intake, nor genetic analyses could explain discrepancies in toxicities. Data from pharmacokinetics analyses do not evidence a relationship bewteen CDA activity and GEM plasmatic exposure of patients. Absence of significativity in this study may be explained by a low number of PM patients (4.6% vs 12.5% in the retrospective study), highlighting the potential smoothing effect of inter-individual variability in clinical trial.

ACKNOWLEGDEMENT

We sincerely thank all the patients, the investigators, the RGA team and the FFCD. The FFCD received a grant from The Ligue Contre le Cancer and Cindy Serdjebi received a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale. 1. Ciccolini, Dahan, André et al. *J Clin Oncol*, 2010; 2. Tibaldi, Giovannetti, Vasile et al. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008.

ANNEXES

Annexe 1. Tableau des marqueurs pharmacogénomiques reconnus par la FDA et associés à des conditions de prescription [13].

Drug	Biomarker	Referenced Subgroup	Labeling Sections
Ado-Trastuzumab Emtansine	ERBB2	HER2 protein overexpression or gene amplification positive	Indications and Usage, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Afatinib	EGFR	EGFR exon 19 deletion or exon 21 substitution (L858R) positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Anastrozole	ESR1, PGR	Hormone receptor-positive	Indications and Usage, Adverse Reactions, Drug Interactions, Clinical Studies
Arsenic Trioxide	PML-RARA	PML-RARα translocation positive	Clinical Pharmacology, Indications and Usage
Bosutinib	BCR/ABL1	Philadelphia chromosome positive	Indications and Usage Adverse Reactions, Use in Specific Populations, Clinical Studies
Busulfan	BCR-ABL1	Philadelphia chromosome negative	Clinical Studies
Capecitabine	DPYD	DPD deficient	Contraindications, Warnings and Precautions, Patient Information
Ceritinib	ALK	ALK gene rearrangement positive	Indications and Usage, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Cetuximab	EGFR	EGFR protein expression positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
	KRAS	KRAS codon 12 and 13 mutation negative	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Cisplatin	TPMT	TPMT intermediate or poor metabolizers	Clinical Pharmacology, Warnings, Precautions, Adverse Reactions
Crizotinib	ALK	ALK gene rearrangement positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Dabrafenib	BRAF	BRAF V600E/K mutation positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies, Patient Counseling Information
	G6PD	G6PD deficient	Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Patient Counseling Information
Dasatinib	BCR/ABL1	Philadelphia chromosome positive;, T315I mutation-positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Denileukin Diftitox	IL2RA	CD25 antigen positive	Indications and Usage, Warnings and Precautions, Clinical Studies
Erlotinib	EGFR	EGFR protein expression positive	Clinical Studies
	EGFR	EGFR exon 19 deletion or exon 21 substitution (L858R) positive	Indications and Usage Dosage and Administration, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology Clinical Studies
Everolimus	ESR1	Estrogen receptor positive	Clinical Studies

Everolimus	ERBB2	HER2 protein overexpression negative	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Drug Interactions, Use in Specific Populations, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Exemestane	ESR1	Estrogen receptor positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Clinical Studies
	PGR	Progesterone receptor positive	Clinical Studies
Fluorouracil	DPYD	DPD deficient	Warnings
Fulvestrant	ESR1, PGR	Hormone receptor positive	Indications and Usage, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Ibrutinib	del (17p)	Chromosome 17p deletion positive	Indications and Usage, Clinical Studies
Imatinib	KIT	KIT protein expression positive, c-KIT D816V mutation negative	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Use in Specific Populations, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
	BCR-ABL1	Philadelphia chromosome positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Use in Specific Populations, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
	PDGFRB	PDGFR gene rearrangement positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Clincal Studies
	FIP1L1-PDGFRA	FIP1L1-PDGFRα fusion kinase (or CHIC2 deletion) positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Clinical Studies
Irinotecan	UGT1A1	UGT1A1*28 allele carriers	Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Clinical Pharmacology
Lapatinib	ERBB2	HER2 protein overexpression positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Adverse Reactions, Use in Specific Populations, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
	HLA-DQA1, HLA-DRB1	HLA-DQA1*0201 or -DRB1*0701 allele carriers	Clinical Pharmacology
Letrozole	ESR1, PGR	Hormone receptor positive	Indications and Usage, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Mercaptopurine	TPMT	TPMT intermediate or poor metabolizers	Clinical Pharmacology, Warnings, Precautions, Adverse Reactions, Dosage and Administration
Nilotinib	BCR-ABL	Philadelphia chromosome positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Adverse Reactions, Use in Specififc Populations, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
	UGT1A1	UGT1A1*28 allele homozygotes	Clinical Pharmacology
Obinutuzumab	MS4A1	CD20 antigen positive	Clinical Studies
Omacetaxine	BCR-ABL1	Philadelphia chromosome positive	Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Panitumumab	EGFR	EGFR protein expression positive	Clinical Pharmacology, Clinical Studies
	KRAS	KRAS codon 12 and 13 mutation negative	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Pertuzumab	ERBB2	HER2 protein overexpression positive	Indications and Usage, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies

Ponatinib	BCR-ABL1	Philadelphia chromosome positive; T315I mutation positive	Indications and Usage, Warnings and Precautions, Adverse Reactions, Use in Specific Populations, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Rasburicase	G6PD	G6PD deficient	Boxed Warning, Contraindications, Warnings and Precautions
	CYB5R1-4	NADH cytochrome b5 reductase deficient	Warnings and Precautions
Rituximab	MS4A1	CD20 antigen positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Adverse Reactions, Use in Specific Populations, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Tamoxifen	ESR1, PGR	Hormone receptor positive	Clinical Pharmacology, Indications and Usage, Precautions, Adverse Reactions, Medication Guide
	F5	Factor V Leiden carriers	Warnings
	F2	Prothrombin 20210A allele positive	Warnings
Thioguanine	TPMT	TPMT intermediate or poor metabolizers (deficient)	Warnings, Precautions, Dosage and Administration
Tositumomab	MS4A1	CD20 antigen positive	Indications and Usage, Clinical Pharmacology
Trametinib	BRAF	BRAF V600E/K mutation positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Adverse Reactions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies, Patient Counseling Information
Trastuzumab	ERBB2	HER2 protein overexpression positive	Indications and Usage, Warnings and Precautions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies
Tretinoin	PML/RARA	PML/RARα translocation positive	Clinical Pharmacology, Indications and Usage, Warnings
Vemurafenib	BRAF	BRAF V600E mutation positive	Indications and Usage, Dosage and Administration, Warning and Precautions, Clinical Pharmacology, Clinical Studies, Patient Counseling Information

SMARTc Laboratoire de Pharmacocinétique

Dosage des protéines sériques par la technique de Pierce

1-OBJET

Décrire la procédure du dosage des protéines sériques par la méthode de Pierce, dans le cadre du dosage de la cytidine déaminase sérique. Le dosage des protéines par la méthode de Pierce est basé sur l'interaction de deux molécules de BCA avec un ion cuivreux (Cu+) issu de la réaction d'un ion cuivrique (Cu2+) avec les protéines en milieu alcalin.
L'intensité de la réaction violette obtenue est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. Les taux des protéines des échantillons sont calculés par rapport à une courbe standard de BSA et exprimés en mg/20µl.

2-PARTICULARITES

- Dosage par spectrophotométrie.

3-GLOSSAIRE

- BCA : acide bicinchoninique
- BSA : albumine sérique bovine
- ED : eau distillée

4-CONTENU

3.1. L'échantillon

Nature de l'échantillon : sérum, recueilli sur tube sec centrifugé à 2500 rpm pendant 20 minutes à 4°C. 2 Aliquots de 100 µl permettant le dosage des protéines.

- *Avant analyse* : les tubes de sérum sont conservés dans le congélateur à -80°C.
- *Après analyse* : les tubes dosés sont archivés jusqu'à la fin de l'analyse à -80°C.

3.2. Réactifs

- **Colorant :** BC Assay UP40840A Interchim
  Acide bicinchonique (solution Interchim UP95424A) (Réactif A)
  Sulfate de cuivre (II) (solution Interchim UP95425A) (Réactif B)
  Réactif A + Réactif B = Réactif de Pierce (Réactif C)

3.3. Opérations de contrôle

3.3.1. Solutions standard

- **Protein Standard (Sigma P0914-10AMP) à 1 mg/ml :** La gamme est préparée extemporanément ou congelée à -20°C (1mois, aliquots de 150 µl).

Toute reproduction du document sans autorisation est interdite

*3.3.2. Obtention des droites d'étalonnage (**tubes eppendorf**)*

	Blanc	A	B	C	D	E	F	G	H	I	CQ 60	CQ 300	Patient et CQ J 1/10	Patient et CQ J 1/200
Conc. protéines (µg/ml)	***0***	***20***	***40***	***60***	***80***	***100***	***160***	***240***	***320***	***400***	***60***	***300***		
Eau distillée	**1000**	**980**	**960**	**940**	**920**	**900**	**840**	**760**	**680**	**600**	**940**	**700**	**180**	**380**
Solution BSA (1 mg/ml) µl	**0**	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**	**160**	**240**	**320**	**400**				
Protein Standard (2mg/ml) µl											**60**	**300**		
Patient pur µl													**20**	
Patient 1/10 µl														**20**

3.3.3. Contrôles de qualité

- **<u>CQ 60 µg/ml :</u>** 60 µl de Protein Standard + 940 µl d'ED. Les contrôles sont préparés extemporanément ou congelés à -20°C (1 mois aliquots de 120 µl).
- **<u>CQ 300 µg/ml :</u>** 300 µl de Protein Standard + 700 µl d'ED. Les contrôles sont préparés extemporanément ou congelés à -20°C (1 mois aliquots de 120 µl).

3.4. Méthodologie

3.4.1. Appareil et Conditions de lecture

- <u>Appareil</u> : Lecteur de microplaque spectrophotométrique Biotek
- <u>Logiciel</u> : Gen5.0
- <u>Lecture</u> : 540nm.

3.4.2. Procédure de dosage :

Mettre dans la plaque 96 transparente puits :

- 50 µl de prise d'essai pour les standards et les CQ 60 et CQ 300
- 25 µl de prise d'essai pour les échantillons patients et CQ Joseph (dilutions 1/200).
- Préparer extemporanément le réactif de Pierce (10 ml de réactif A + 200 µl de réactif B)
- Ajouter 200 µl du réactif de Pierce dans chaque puits, agiter.
- Recouvrir la plaque d'aluminium et laisser incuber 2h à température ambiante
- Lire l'absorbance à 540 nm sur le lecteur de microplaques (protocole CDA/Cindy)

SEULE LA VERSION ELECTRONIQ

Toute reproduction du document sans autorisation est interdite

3.4.3. Plan d'utilisation des standards, contrôles et échantillons :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	**STD1 0**	**STD2 20**	**STD3 40**	**STD4 60**	**STD5 80**	**STD6 100**	**STD7 160**	**STD8 240**	**STD9 320**	**STD10 400**	**CQ 60**	**CQ 300**
B	**STD1 0**	**STD2 20**	**STD3 40**	**STD4 60**	**STD5 80**	**STD6 100**	**STD7 160**	**STD8 240**	**STD9 320**	**STD10 400**	**CQ 60**	**CQ 300**
C												
D	CQ J	PAT1	PAT2	PAT3	PAT4	PAT5	PAT6	PAT7	PAT8	PAT9	PAT10	PAT11
E	CQ J	PAT1	PAT2	PAT3	PAT4	PAT5	PAT6	PAT7	PAT8	PAT9	PAT10	PAT11
F												
G	PAT12	PAT13	PAT114	PAT15	PAT16	PAT17	PAT18	PAT19	PAT20			
H	PAT12	PAT13	PAT114	PAT15	PAT16	PAT17	PAT18	PAT19	PAT20			

3.5. Interprétation technique de l'analyse

La courbe de calibration ainsi que les calculs des concentrations sont réalisés sur Gen5.0.
La valeur d'absorbance du blanc est soustraite à toutes les valeurs d'absorbance obtenues (X-STD1). La moyenne des duplicats est calculée, ainsi que leur écart-type et leur coefficient de variation. Les résultats sont statistiquement acceptables lorsque le CV est inférieur à 15% entre les duplicats, ainsi que lorsque la valeur des contrôles de qualité se trouvent dans un intervalle de ±15%.

3.6. Interprétation biologiques des résultats

Dosage dans le cadre d'un protocole de recherche évaluant l'activité enzymatique de la cytidine déaminase. Cette activité est pondérée par la quantité de protéines sériques. La quantité de protéines sériques s'estime par rapport à la courbe de calibration et s'exprime en quantité absolue dans 20 µl.

3.7. Archivage

Les résultats sont archivés dans le classeur MARRON « Etude FFCD-1004 :Manips ».

4-DOCUMENTS DE REFERENCE Néant

SEULE LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Toute reproduction du document sans autorisation est interdite

SMARTc Laboratoire de Pharmacocinétique

Dosage de l'activité enzymatique de la cytidine déaminase par spectrophotométrie

1-OBJET

Décrire la procédure du dosage de la cytidine déaminase, enzyme catalysant la déamination de la cytidine en uridine, en dégageant de l'ammonium. L'intensité de la réaction bleue obtenue après couplage du phénol avec l'ammonium est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm. L'activité de la CDA des échantillons est calculée par rapport à une courbe de calibration et est exprimée en U/mg de protéines.

2-PARTICULARITES

- Dosage par spectrophotométrie.

3-GLOSSAIRE

- CDA : cytidine déaminase
- ED : eau distillée

4-CONTENU

3.1. L'échantillon

Nature de l'échantillon : sérum, recueilli sur tube sec centrifugé à 2500 rpm pendant 20 minutes à 4°C. 3 Aliquots de 100 µl permettant le dosage de la CDA.

- *Avant analyse* : les tubes de sérum sont conservés dans le congélateur à -80°C.
- *Après analyse* : les tubes dosés sont archivés jusqu'à la fin de l'analyse à -80°C.

3.2. Réactifs

- **Tampon phosphate 0,07 M:** 953 mg de KH_2PO_4 + 994,7 mg de Na_2HPO4 qsp 100 ml d'ED. Ajuster le pH à 7,2 avec de NaOH (10N). Conservation 4 semaines à 4°C.
- **Solution tungstate de sodium 0,3 M :** 2,0 g de tungstate de sodium qsp 20 ml d'ED. Conservation 4 semaines à 4°C.
- **Solution phénol 0,133 M** : 12 g de phénol pur qsp 900 ml d'ED. Ajouter 60 mg de nitroprusside de sodium. Conservation à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 12 mois. A manipuler sous hotte aspirante.
- **Solution de soude 0,21 mM :** 8,4 g de NaOH qsp 1000 ml d'ED.
- **Solution d'hypochlorite 0,0135 M :** 12 ml de la solution du commerce d'hypochlorite à 13% dans 1 l de solution de soude 0,21 mM. Conservation 12 mois à 4°C.
- **Solution d'acide sulfurique 1 N :** Dilution au 1/36 de l'acide sulfurique 36N.

3.3. Opérations de contrôle

3.3.1. Solution standard

- **Solution de cytidine 2 mM :** 9,73 mg de cytidine qsp 20 ml de tampon phosphate. Conservation 4 semaines à -20°C (aliquots de 5 ml) et à 4°C pendant la durée de manipulation.

Toute reproduction du document sans autorisation est interdite

- **<u>Solution d'Ammonium 3,8 M :</u>** 102 mg de chlorure d'ammonium dans 500 µl d'ED. Conservation pendant 2 semaines à 4°C.

*3.3.2. Obtention des droites d'étalonnage (**tubes à hémolyse, réaliser la gamme à partir du point le plus concentré F, en dilutions en cascade au 1/2**)*

	Blanc	A	B	C	D	E	F
Activité CDA (UA)	***0***	***0,25***	***0,5***	***1***	***2***	***4***	***8***
Tampon phosphate (µl)	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**200**	**10 ml**
Solution chlorure d'ammonium (µl)							**10**
Point F						**200**	
Point E					**200**		
Point D				**200**			
Point C			**200**				
Point B		**200**					

3.3.3. Contrôles de qualité

Utilisation extemporanée d'un échantillon patient déjà évalué par cette technique.

3.4. Méthodologie

3.4.1. Appareil et Conditions de lecture

- <u>Appareil</u> : Lecteur de microplaque spectrophotométrique Biotek
- <u>Logiciel</u> : Gen5.0
- <u>Lecture</u> : 630 nm

3.4.2. Procédure de dosage :

Mettre dans la plaque 96 transparente puits :

- 20 µl de prise d'essai pour les standards (duplicats), les CQ et les patients (triplicats)
- Ajouter 80 µl de cytidine (sauf pour un réplicat de chaque patient et CQ).
- Homogénéiser les puits.
- Incuber pendant 16h à l'étuve à 37°C.
- Ajouter 80 µl de cytidine dans les blancs patients.
- Ajouter 40 µl de tungstate de sodium puis 40 µl d'acide sulfurique 1N (précipitation des protéines). Homogénéiser.
- Centrifuger 10 minutes à 4 000 g à température ambiante.
- Dans une autre plaque : transférer 25 µl de surnageant.
- Ajouter ***sous hotte*** 75 µl de phénol et 100 µl d'hypochlorite. Homogénéiser
- Incuber pendant 30 minutes à 37°C
- Lire l'absorbance à 630 nm sur le lecteur de microplaques (protocole CDA/Cindy)

SEULE LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Toute reproduction du document sans autorisation est interdite

3.4.3. Plan d'utilisation des standards, contrôles et échantillons :

Calibration, CQ et patients avant incubation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 0	STD 0		Bl pat1	Bl pat 2	Bl pat 3	Bl pat 4	Bl pat 5	Bl pat 6	Bl pat 7	Bl pat 8	Bl pat 9
B	STD 0,25	STD 0,25		Pat 1	Pat 2	Pat 3	Pat 4	Pat 5	Pat 6	Pat 7	Pat 8	Pat 9
C	STD 0,5	STD 0,5		Pat 1	Pat 2	Pat 3	Pat 4	Pat 5	Pat 6	Pat 7	Pat 8	Pat 9
D	STD 1	STD 1										
E	STD 2	STD 2										
F	STD 4	STD 4		Bl pat 10	Bl pat 11	Bl pat 12	Bl pat 13	Bl pat 14	Bl pat 15	Bl pat 16	Bl pat 17	Bl pat 18
G	STD 8	STD 8		Pat 10	Pat 11	Pat 12	Pat 13	Pat 14	Pat 15	Pat 16	Pat 17	Pat 18
H				Pat 10	Pat 11	Pat 12	Pat 13	Pat 14	Pat 15	Pat 16	Pat 17	Pat 18

3.5. Interprétation technique de l'analyse

La courbe de calibration ainsi que les calculs des concentrations sont réalisés sur Gen5.0.
La valeur d'absorbance du blanc est soustraite aux valeurs d'absorbance obtenues pour la calibration (X-STD1). La valeur d'absorbance du blanc de chaque patient est soustraite à la moyenne des duplicats patients. La moyenne des duplicats est calculée, ainsi que leur écart-type et leur coefficient de variation. Les résultats sont statistiquement acceptables lorsque le CV est inférieur à 15% entre les duplicats, ainsi que lorsque la valeur des contrôles de qualité se trouvent dans un intervalle de ±15%. Une série est validée lorsque la gamme d'étalonnage présente un r^2 >0.99. On pourra enlever un point de gamme pour répondre à ces critères. Le phénotype des CQ doit demeurer stable (maintien des statuts déficient, non déficient ou extensif).

3.6. Interprétation biologiques des résultats

Dosage dans le cadre d'un protocole de recherche évaluant l'activité enzymatique de la cytidine déaminase. Cette activité est pondérée par la quantité de protéines sériques. L'activité CDA sérique résiduelle s'estime comparativement à la gamme d'étalonnage (0 à 8 U.A.), et se pondère au final par la quantité de protéines (mg) mesurée précédemment et ramenée à une prise d'essai de 20 µl.
Au sein de la population adulte (n=100), l'activité médiane est de 3.8 U/mg (min : 0.6, max : 17 U/mg). Au sein de la population enfant, l'activité médiane est comparable aux valeurs adultes (3.2 U/mg, n=20). Aucun seuil de déficience associé à une surtoxicité n'ayant encore été établi en oncologie pédiatrique, les cut-off « adultes » (< 1 U/mg, <1.4 U/mg, >6 U/mg) sont utilisés.

-Déficience sévère en CDA:
Une activité CDA inférieure à 1 U/mg est associée à un risque maximal de surtoxicité sévère/mortelle sous gemcitabine administrée à dose standard (Mercier et al. Pharmacogenetics 2007, Mercier et al., J Clin Oncol 2007). Une forte réduction posologique ou l'abandon de la gemcitabine au profit d'un autre traitement est recommandé.

-Déficience en CDA-1 : une activité inférieure à 1.2 U/mg est associée avec un risque accru de développer une surtoxicité précoce sévère sous gemcitabine en monothérapie. Une réduction posologique en gemcitabine est recommandée.
-Déficience en CDA-2 : une activité inférieure à 1.4 U/mg est associée avec un risque accru de développer une surtoxicité précoce sévère sous gemcitabine en polythérapie. Une réduction posologique en gemcitabine est recommandée.

SEULE LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Toute reproduction du document sans autorisation est interdite

- Non déficience en CDA-1 : une activité supérieure à 1.4 U/mg et inférieure à 1.6 U/mg est associée avec un phénotype normal. Aucune correction posologique n'est recommandée comparativement au schéma de traitement initial.
- Extensivité en CDA-2 : une activité supérieure à 6 U/mg est associée à un risque d'achappement thérapeutique sous gemcitabine. Une intensification thérapeutique est recommandée.
- Extensivité en CDA : une activité supérieure à 6 U/mg est associée à un risque de toxicité sous capécitabine. Une réduction posologique est recommandée.

L'existence d'un syndrome inflammatoire lors du prélèvement (poussée évolutive, sepsis, etc…) tend à accroître l'activité CDA de façon artéfactuelle. Si un tel état est objectivé, les résultats du test doivent être interprétés avec précaution

3.7. Archivage

Les chromatogrammes, courbes de calibration et résumés des résultats sont archivés dans le classeur rouge « Pharmacogénétique de la CDA ».

4-DOCUMENTS DE REFERENCE Néant

SEULE LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Toute reproduction du document sans autorisation est interdite

Annexe 4. Mode opératoire pour la recherche du polymorphisme c.79A>C de la *CDA* par analyse HRM

CDA 79A>C
Light Cycler 480 : kit HRM Roche **79A>C**

du **08/10/2014** **par** **Cindy**

Manip. :

Type d'echantillon : ADN génomique

Vol. Ech. : 2.00 Volume Final 20 µl

Vol. MIX (µl) pour 1 echantillon : Volume total 18.00

MgCl2 2,2 mM

Master Mix 2X	10.00
ED stérile	4.34
MgCl2	2.06
Amorce S	0.80
Amorce AS	0.80

Nombre d'échantillons à techniquer : **n =** **10**

Vol. MIX (µl) pour la manip. :

MgCl2 2,2 mM

Master Mix 2X	100.00
ED stérile	43.40
MgCl2	20.60
Amorce S	8.00
Amorce AS	8.00

Conditions d'incubation : **Analyse HRM**

95 °C	**10**	**min**		
95 °C / 4,4°C	**10**	**sec**		**HRM 75°C 100s**
60°C / 2,2°C	**15**	**sec**	**X 45 cycles**	**70°C-95°C 0.02°C/s**
72 °C / 4,4°C	**30**	**sec**		

Réactifs:

Produits & Fournisseurs	Références	Numéro de lot	Date fabrication/ouverture
Master Mix			
MgCl2			
Eau stérile			
Amorces S 79A>C			
Amorces AS 79A>C			

AP-HM LBM **Service de Pharmacocinétique et de Toxicologie** **Pr. B. LACARELLE** **CHU TIMONE**	**05ANAP06M236A**
Dosage de la GEMCITABINE et de la difluorodeoxyuridine (dFdU) sur l'UPLC-TQD	
Date d'application : 2014-01-06 Version : **1**	Rédaction : SERDJEBI Cindy Validation : SOLAS Caroline Approbation : DEVICTOR Bénédicte

Décrire la procédure du dosage plasmatique de la gemcitabine (Gemzar®, dFdC) et de son métabolite, la difluorodéoxyuridine (dFdU) par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC/MS-MS) sur l'appareil UPLC-TQD.

1. PARTICULARITES

- Si nécessité de recaler les valeurs des masses (ex. : forte variation de température de la pièce), réaliser une infusion des solutions de gemcitabine, dFdU et étalon interne (*Cf.05GRMP02M167A*).
- Dosage dans le cadre d'un protocole de recherche clinique (FFCD-1004) : Dilution systématique au **1/20e des échantillons prélevés en fin de perfusion.**

2. L'ECHANTILLON

Nature de l'échantillon : Plasma, tube coaté avec de la tétrahydrouridine (THU)

- Prélèvement sur tube EDTA (bouchon violet)

- Avant analyse : les tubes de plasma sont conservés dans le **CVIII à -80°C**.
- Après analyse : 2 mois dans le congélateur **CVIII à -80°C**.

3. REACTIFS *(conservation 3 mois, R29)*

- **Phase mobile** (***extemporanée***)
  - *Phase aqueuse* **:** 0.335g d'acétate d'ammonium qsp 500ml d'eau MilliQ®.
  - *Phase organique* **:** Acénotrile.
- **Phase de rinçage :** Eau MilliQ/Acétonitrile (50/50 v/v) 45mn débit 0.25 ml/mn
- **Solution de précipitation avec étalon interne (EI)** :
  - 50 µl d'Abacavir à 100 µg/ml dans 10 ml d'acétonitrile

SEULE LA VERSION INFORMATIQUE FAIT FOI

4. OPÉRATIONS DE CONTRÔLE

4.1. SOLUTIONS STANDARDS

!! La quantité de standard à peser peut varier en fonction du lot : cf. ordinateur pièce 31

Concentrations des SM et SM CQ, solvant de dissolution, lieux de stockage et durée de conservation

	Gemcitabine	dFdU	Abacavir
Conc. SM, mg/ml	**1mg/ml**	**1 mg/ml**	**1 mg/ml**
Methanol	X		
Stockage poudre standard	R29	R29	A3
Stockage SM aliquotée	C15	C15	CVI
Conservation SM	1 an		

4.2. OBTENTION DROITES D'ÉTALONNAGE *(extemporanées)*

Les solutions filles (SF) à 0.1, 1, 10 et 100 ng/µl sont obtenues par dilution en cascade au 1/10ème (50 µl dans 450 µl puis 100 µl dans 900 µl) dans l'eau MilliQ/méthanol (50/50) le jour de la préparation des calibrants.

	CAL 1	CAL2	CAL3	CAL4	CAL5	CAL6	CAL7	CAL8
Gemcitabine ng/ml	**10**	**20**	**50**	**100**	**500**	**1000**	**2500**	**5000**
µl	20 µl sol 0.1ng/µl	40 µl sol 0.1 ng/µl	10 µl sol 1ng/µl	20 µl sol 1ng/µl	10 µl sol 10 ng/µl	20 µl sol 10 ng/µl	50 µl sol 10 ng/µl	10 µl sol 100 ng/µl
dFdU µg/ml	**0.5**	**1**	**2**	**5**	**10**	**20**	**50**	
µl	10 µl sol 10 ng/µl	20 µl sol 10 ng/µl	40 µl sol 10 ng/µl	10 µl sol 100 ng/µl	20 µl sol 100 ng/µl	40 µl sol 100 ng/µl	10 µl sol 1000 ng/ml	
Plasma blanc, µl	**170**	**140**	**150**	**170**	**170**	**140**	**140**	**190**

4.3. CONTROLES DE QUALITE *(extemporanés)*

A partir des SM CQ à 1 mg/ml de Gemcitabine et 1 mg/ml de dFdC (C15).

	CQ B	CQ M	CQ H
Gemcitabine, ng/ml	**20**	**200**	**2000**
µl	40 µl sol à 0.1ng/µl	40 µl sol à 1 ng/µl	40 µl sol à 10 ng/µl
dFdU, µg/ml	**1**	**10**	**20**
µl	20 µl sol à 10 ng/µl	20 µl sol à 100 ng/µl	40 µl sol à 100 ng/µl
Plasma blanc, µl	**140**	**140**	**120**

SEULE LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

5. METHODOLOGIE

5.1. APPAREIL, CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES ET DU SPECTROMETRE DE MASSE

- Appareil : LC-MSMS UPLC-TQD (Waters). Pas de procédure substitutive, en cas de panne, les dosages seront en attente jusqu'à réparation.
- Colonne : ACQUITY UPLC HSS T3 1.8µm 2.1x100mm (Rf 1860003539, Waters)

Mise en condition de la chaîne UPLC :

- Mettre en place les phases mobiles et phases de rinçage de l'injecteur
  - *Phase aqueuse :* ***voie A2***
  - *Phase organique :* ***voie B2***
  - *Weak wash: Eau/acétonitrile 80/20 (v/v)+0.1% acide formique*
  - *Stong Wash: Méthanol+ 0.1% acide formique*
- Ouvrir les méthodes suivantes :
  - MS Tune : **Gemcitabine**
  - Inlet Method : **Gemcitabine**
  - MS Console : ***cf. 05GRMP02M172A*** (fonctionnement UPLC/TQD)

5.2. PROCEDURE D'EXTRACTION

Dans des microtubes eppendorf, mettre :

- **50 µl de plasma** (blanc, CAL1 à 8, CQs et échantillon patients)
- **50 µl de plasma blanc**
- **0.5 ml** de la solution précipitante contenant l'EI
- Vortexer 90s
- Centrifuger 10 mn à 14 000 rpm
- Récupérer 550µl de la phase supérieure dans des tubes à hémolyse de 5 ml
- Evaporer au bain marie sous courant d'azote
- Reprendre le résidu sec par 600 µl de phase aqueuse de phase mobile
- Vortexer
- Transférer dans les puits de la plaque de l'injecteur
- Injecter 5 µl

Bottle	File name	Sample type	File text	Dilution	MS Tune file	MS File	Inlet File	Inj Vol	Conc Gemci/ dFdU
Plateau (position 1 ou 2)	Date_1 puis incrémenter	Analyte ou CQ ou Standard	Saisie Libre	Saisir le facteur de dilution	**Gemcitabine**	**Gemcitabine**	**Gemcitabine ISO**	**5 µl**	Saisir conc. standards et CQs

6. INTERPRETATION TECHNIQUE DE L'ANALYSE

Les critères de validité d'une série sont présentés dans la procédure 05ANAP07M003A.

- Non détectable (ND), si aucun pic visible ou concentration < limite de quantification (LOQ)

SEULE LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

	Gemcitabine	dFdU
LOQ	**10 ng/ml**	**0.5 µg/ml**

- Calcul réalisé sur le logiciel Masslynx (05GRMP02M172A) : charger la méthode **'Gemcitabine.mdb'.**

- Impression des résultats : pour n'imprimer que les chromatogrammes des molécules dosés, aller dans la page de *'process'* :

  - File
  - Report format
  - Onglet: sample report
  - Cocher : Select
  - Clic Compound
  - Sur la partie gauche choisir les molécules à imprimer
  - Clic « add » pour les inclure dans la partie droite

7. INTERPRETATION BIOLOGIQUE DES RESULTATS

Les résultats obtenus seront analysés ultérieurement, dans le cadre d'un protocole de recherche.

8. DOCUMENT DE REFERENCE

- Zhou J. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of seven commonly used anticancer drugs in human plasma J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012 Oct 1;906:1-8. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.07.033. Epub 2012 Aug 18
- Vainchtein et al. Validated assay for the simultaneous determination of the anti-cancer agent gemcitabine and its metabolite 2',2'-difluorodeoxyuridine in human plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2007;21(14):2312-22.
- Kirstein MN. et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of gemcitabine and 2',2'-difluorodeoxyuridine in plasma and tissue culture media j chromatogr b analyt technol biomed life sci. 2006 may 1;835(1-2):136-42. Epub 2006 apr 11.

SEULE LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI

Annexe 6. Calcul de la MAF minimale d'un allèle permettant de vérifier le respect de l'équilibre d'Hardy-Weinberg chez une population de 120 patients

Nous souhaitons calculer la MAF minimale d'un allèle permettant de vérifier le respect de l'équilibre d'Hardy-Weinberg chez une population de 120 patients.

Soient ***p*** et ***q*** les fréquences **alléliques** d'un gène bi-allélique et p^2, q^2, et ***2pq*** les fréquences génotypiques des homozygotes sauvages, mutés et hétérozygotes, respectivement.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \qquad (1)$$

Nous souhaitons avoir un effectif minimum de 3 homozygotes mutés afin de pouvoir vérifier l'équilibre d'Hardy-Weinberg, qui utilise le test de Fisher (effectif minimum = 5, mais la correction de Yates nous permet de descendre à 3).
Nous obtenons alors une fréquence génotypique q^2 :

$$q^2 = \frac{n\,HMZm}{n\,pop} = \frac{3}{120} = 0.025 \qquad (2)$$

La fréquence allélique ***q*** est donc facile à déterminer :

$$q = \sqrt{\frac{n\,HMZm}{n\,pop}} = 0.158 \qquad (3)$$

Nous souhaitons donc étudier les variations génétiques dont la MAF est supérieure à 16%, afin de pouvoir travailler sur les différents profils tout en vérifiant le respect de l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

AUTRES TRAVAUX

1 COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

Bourse Roche Challenge en Oncologie Thoracique 2013 Aix-en-Provence
Accéleration métastatique et recherche des séquences optimales des combinaisons anti-angiogéniques/cytotoxiques : application à l'optimisation de l'association bevacizumab / carboplatine / paclitaxel dans le cancer bronchique non à petites cellules
Cindy Serdjebi, Joseph Ciccolini, Séverine Mollard, Sarah Giacometti, Christian Faivre, Fabrice Barlési, Dominique Barbolosi.

First international workshop on dose optimization strategies for targeted drugs – focus on oncolytics 2015 Amsterdam : Abstract 13
Marker of bevacizumab efficacy: Which place for the pharmacokinetics?
Cindy Serdjebi.

AACR 2015 Meeting Philadelphia: Abstract 4506
Computational-driven metronomics: application to gemcitabine in neuroblastoma-bearing mice.
Joseph Ciccolini, Eddy Pasquier, Aurelie Lombard, Sarah Giacometti, Christian Faivre, Raphaelle Fanciullino, Cindy Serdjebi, Dominique Barbolosi, Nicolas Andre.

2 PUBLICATIONS

Biodistribution, tumor uptake and efficacy of 5-FU-loaded liposomes: why size matters.
Raphaelle Fanciullino, Séverine Mollard, Florian Correard, Sarah Giacometti, Cindy Serdjebi, Athanassios Iliadis, Joseph Ciccolini Pharm Res. 2014 Oct;31(10):2677-84.

Pharmacogenetics and breast cancer management: current status and perspectives
Joseph Ciccolini, Raphaelle Fanciullino, Cindy Serdjebi, Gérard Milano. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2015 May;11(5):719-29.

Ang1 and Tie2 are predictive biomarkers for bevacizumab-letter
Joseph Ciccolini, Cindy Serdjebi, Dominique Barbolosi, Bruno Lacarelle, Fabrice Barlesi. Clin Cancer Res. 2015 Feb 15;21(4):934.

BIBLIOGRAPHIE

1. Allorge D, Loriot MA.[Pharmacogenetics or the promise of a personalized medicine: variability in drug metabolism and transport]. Ann Biol Clin Paris. 2004 Sep;62(5):499–511.
2. Aftimos PG, Barthelemy P, Awada A. Molecular biology in medical oncology: diagnosis, prognosis, and precision medicine. Discov Med. 2014 Feb;17(92):81–91.
3. March R. Pharmacogenomics: the genomics of drug response. Yeast. 2000 Apr;17(1):16–21.
4. American Cancer Society. Facts and figures. Atlanta: American Cancer Society. 2014.
5. National Cancer Institute. Dictionary of cancer terms. [Internet]. [cited 2015 Jun 7]. Available from:http://www.cancer.gov/dictionary?CdrD=56717
6. Mbatchi L. [Pharmacogénétique des xénorécepteurs PXR et CAR: implication dans la toxicité hématologique de la chimiothérapie à base de carboplatine et paclitaxel et dans la pharmacocinétique de l'irinotécan]. 2013.
7. Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. Metabolism. 2015 Mar;64(3 Suppl 1):S16–21.
8. Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. CA Cancer J Clin. 2009 Jan;59(1):42–55.
9. Hertz DL, Rae J. Pharmacogenetics of cancer drugs. Annu Rev Med. 2015;66:65–81.
10. Goldstein DA, Shaib WL, Flowers CR. Costs and effectiveness of genomic testing in the management of colorectal cancer. Oncol Williston Park. 2015 Mar;29(3):175–83.
11. Adamson RT. Biomarkers and molecular profiling in non-small cell lung cancer: an expanding role and its managed care implications. Am J Manag Care. 2013 Dec;19(19 Suppl):s398–404.
12. Patel JN. Application of genotype-guided cancer therapy in solid tumors. Pharmacogenomics. 2013 Dec 16;15(1):79–93.
13. Food and Administration. Table of pharmacogenomic biomarkers in drug labelling [Internet]. [cited 2015 Jul 6]. Available from: http://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm
14. Fondation ARC pour la recherche sur le cancer [Internet]. [cited 2015 Jun 25]. Available from: www.fondation-arc.org/Actualites/cancer-colorectal-metastatique-vers-un-remboursement-de-deux-tests-genetiques.html
15. INSERM. Définition d'un biomarqueur [Internet]. 2015 [cited 2015 Mar 30]. Available from: http://www.inserm.fr/dossiers-d-information/biomarqueur
16. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature. 1953 Apr 25;171(4356):737–8.
17. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature. 1977 Feb 24;265(5596):687–95.
18. Debré P, Le Gall J. Séquençage des génomes et médecine personnalisée: perspectives et limites [Internet]. [cited 2015 Apr 30]. Available from: http://www.academie-medecine.fr/publication100100244/
19. Savonarola A, Palmirotta R, Guadagni F, Silvestris F. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: role of mutational analysis in anti-cancer targeted therapy. Pharmacogenomics J. 2012 Aug;12(4):277–86.
20. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science. 1999 Oct 15;286(5439):487–91.
21. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. Annu Rev Med. 2006;57:119–37.
22. Vogel F. Modern probleme der Humangenetik. 1959.
23. Robert J, Le Morvan V, Giovannetti E, Peters GJ. On the use of pharmacogenetics in cancer treatment and clinical trials. Eur J Cancer. 2014 Oct;50(15):2532–43.
24. Sheffield LJ, Phillimore HE. Clinical use of pharmacogenomic tests in 2009. Clin Biochem Rev. 2009 May;30(2):55–65.
25. Shin J, Kayser SR, Langaee TY. Pharmacogenetics: from discovery to patient care. Am J Health Syst Pharm. 2009 Apr 1;66(7):625–37.
26. Davies SM. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and personalized medicine: are we there yet? Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2006;111–7.
27. Ikediobi ON. Somatic pharmacogenomics in cancer. Pharmacogenomics J. 2008 Oct;8(5):305–14.
28. Genetics Home Reference [Internet]. [cited 2015 May 19]. Available from: http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/genomicresearch/pharmacogenomics

29. Serdjebi C. [Médecine personnalisée & Oncologie: double expetise par génotypage et typage fonctionnel du CYP2D6 avant instauration d'une hormonothérapie adjuvante dans le traitement du cancer du sein non métastatique chez la femme non ménopausée]. 2011.
30. Arneth B, Shams M, Hiemke C, Hartter S. Rapid and reliable genotyping procedure for detection of alleles with mutations, deletion, or/and duplication of the CYP2D6 gene. Clin Biochem. 2009 Aug;42(12):1282–90.
31. Bouffard DY, Laliberte J, Momparler RL. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. Biochem Pharmacol. 1993 May 5;45(9):1857–61.
32. Chabner BA, Drake JC, Johns DG. Deamination of 5-azacytidine by a human leukemia cell cytidine deaminase. Biochem Pharmacol. 1973 Nov 1;22(21):2763–5.
33. Camiener GW, Smith CG. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. Biochem Pharmacol. 1965 Oct;14(10):1405–16.
34. Ho DH, Frei E 3rd. Clinical pharmacology of 1-beta-d-arabinofuranosyl cytosine. Clin Pharmacol Ther. 1971 Nov;12(6):944–54.
35. Hart JS, Ho DH, George SL, Salem P, Gottlieb JA, Frei E 3rd. Cytokinetic and molecular pharmacology studies of arabinosylcytosine in metastatic melanoma. Cancer Res. 1972 Dec;32(12):2711–6.
36. Ciccolini J, Dahan L, Andre N, Evrard A, Duluc M, Blesius A, et al. Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. J Clin Oncol. 2010 Jan 1;28(1):160–5.
37. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, Hasegawa R, Saito Y, Ueno H, et al. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: impact of genetic polymorphisms. Clin Pharmacokinet. 2010 Aug;49(8):549–58.
38. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, Kikura-Hanajiri R, Hasegawa R, Maekawa K, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. J Clin Oncol. 2007 Jan 1;25(1):32–42.
39. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res. 2008 Mar 15;14(6):1797–803.
40. Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M, Leon LG, D'Incecco A, Loosekoot N, et al. Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. Ann Oncol. 2012 Mar 1;23(3):670–7.
41. Ciccolini J, Fanciullino R, Serdjebi C, Milano G. Pharmacogenetics and breast cancer management: current status and perspectives. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2015 Feb 18;1–11.
42. Ciccolini J, Evrard A, Lacarelle B. A CDD polymorphism as predictor of capecitabine-induced hand-foot syndrome--letter. Clin Cancer Res. 2012 Jan 1;18(1):317.
43. Ciccolini J, Peters GJ, Giovannetti E. Gender, Cytidine Deaminase, and 5-Aza/Decitabine—Letter. Clin Cancer Res. 2013 Jun 1;19(11):3105–3105.
44. Patel JN, Mandock K, McLeod HL. Clinically relevant cancer biomarkers and pharmacogenetic assays. J Oncol Pharm Pr. 2014 Feb;20(1):65–72.
45. MacConaill LE, Van Hummelen P, Meyerson M, Hahn WC. Clinical implementation of comprehensive strategies to characterize cancer genomes: opportunities and challenges. Cancer Discov. 2011 Sep;1(4):297–311.
46. Nalejska E, Maczynska E, Lewandowska MA. Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. Mol Diagn Ther. 2014 Jun;18(3):273–84.
47. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. Nat Rev Cancer. 2009 Jul;9(7):489–99.
48. Voon PJ, Kong HL. Tumour genetics and genomics to personalise cancer treatment. Ann Acad Med Singap. 2011 Aug;40(8):362–8.
49. Felici A, Verweij J, Sparreboom A. Dosing strategies for anticancer drugs: the good, the bad and body-surface area. Eur J Cancer. 2002 Sep;38(13):1677–84.
50. Hertz DL, McLeod HL. Use of pharmacogenetics for predicting cancer prognosis and treatment exposure, response and toxicity. J Hum Genet. 2013 Jun;58(6):346–52.
51. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010 Sep;60(5):277–300.
52. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. Am J Hematol. 2014 May;89(5):547–56.
53. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. J Natl Cancer Inst. 1960 Jul;25:85–109.

54. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med. 1988 Oct 13;319(15):990–8.
55. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973 Jun 1;243(5405):290–3.
56. Erba HP. Molecular monitoring to improve outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: importance of achieving treatment-free remission. Am J Hematol. 2015 Mar;90(3):242–9.
57. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood. 2008 Dec 15;112(13):4808–17.
58. Smith DL, Burthem J, Whetton AD. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia. Expert Rev Mol Med. 2003 Nov;5(27):1–27.
59. McLaughlin J, Chianese E, Witte ON. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. Proc Natl Acad Sci U A. 1987 Sep;84(18):6558–62.
60. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science. 1990 Feb 16;247(4944):824–30.
61. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science. 1990 Mar 2;247(4946):1079–82.
62. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2009 Dec 10;27(35):6041–51.
63. Modugno M. New resistance mechanisms for small molecule kinase inhibitors of Abl kinase. Drug Discov Today Technol. 2014 Mar;11:5–10
64. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2009 Jun;23(6):1054–61.
65. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol. 2007 Nov;8(11):1018–29.
66. Apperley JF. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol. 2007 Dec;8(12):1116–28.
67. Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Abruzzese E, Paolini S, et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. Blood. 2009 Sep 3;114(10):2168–71.
68. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood. 2011 Aug 4;118(5):1208–15.
69. Miller GD, Bruno BJ, Lim CS. Resistant mutations in CML and Ph(+)ALL - role of ponatinib. Biologics. 2014;8:243–54.
70. Lau A, Seiter K. Second-line therapy for patients with chronic myeloid leukemia resistant to first-line imatinib. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2014 Jun;14(3):186–96.
71. Huang YT, Heist RS, Chirieac LR, Lin X, Skaug V, Zienolddiny S, et al. Genome-wide analysis of survival in early-stage non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2009 Jun 1;27(16):2660–7.
72. Zhang Y, Martens JW, Yu JX, Jiang J, Sieuwerts AM, Smid M, et al. Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer. Cancer Res. 2009 May 1;69(9):3795–801.
73. Chong CR, Janne PA. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. Nat Med. 2013 Nov;19(11):1389–400.
74. The National Center for Biotechnology Information. Gene : EGFR epidermal growth factor receptor [Homo sapiens (human)] [Internet]. [cited 2015 Mar 5]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956
75. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. Exp Cell Res. 2003 Mar 10;284(1):2–13.
76. Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. Biochem Soc Trans. 2003 Dec;31(Pt 6):1203–8.
77. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. Clin Cancer Res. 2006 Sep 15;12(18):5268–72.
78. Ozretic L, Heukamp LC, Odenthal M, Buettner R. The role of molecular diagnostics in cancer diagnosis and treatment. Onkologie. 2012;35 Suppl 1:8–12.
79. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol. 1995 Jul;19(3):183–232.
80. Chung C, Christianson M. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers: a systemic review of current

development, evidence, and recommendation. J Oncol Pharm Pr. 2014 Feb;20(1):11–28.
81. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci U A. 2004 Sep 7;101(36):13306–11.
82. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science. 2004 Jun 4;304(5676):1497–500.
83. Toschi L, Cappuzzo F. Understanding the new genetics of responsiveness to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. Oncologist. 2007 Feb;12(2):211–20.
84. Riely GJ, Politi KA, Miller VA, Pao W. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2006 Dec 15;12(24):7232–41.
85. Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, et al. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. Clin Cancer Res. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):839–44.
86. Socinski MA. The emerging role of biomarkers in advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer. 2010 May;11(3):149–59.
87. My Cancer Genome [Internet]. [cited 2015 Apr 26]. Available from: http://www.mycancergenome.org/
88. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. PLoS Med. 2005 Mar;2(3):e73.
89. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. Proc Natl Acad Sci U A. 2008 Feb 12;105(6):2070–5.
90. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F, McCoy J, Bemis L, Xavier AC, et al. Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. Ann Oncol. 2007 Apr;18(4):752–60.
91. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. Sci Transl Med. 2011 Mar 23;3(75):75ra26.
92. Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. Ann Oncol. 2001;12 Suppl 1:S3–8.
93. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. Biochim Biophys Acta. 1994 Dec 30;1198(2-3):165–84.
94. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987 Jan 9;235(4785):177–82.
95. de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, Holmes E, Di Cosimo S, Swaby RF, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. Lancet Oncol. 2014 Sep;15(10):1137–46.
96. Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, Tanner M, Jarvinen T, Rouas G, et al. HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. Clin Cancer Res. 2002 May;8(5):1107–16.
97. Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, Burris HA 3rd, Swanson P, Lopez T, et al. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2010 Apr 1;16(7):2205–13.
98. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J Clin Oncol. 2009 Apr 20;27(12):2091–6.
99. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2009 Aug 18;101(4):715–21.
100. Genecards [Internet]. [cited 2015 May 19]. Available from: http://www.genecards.org/
101. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2003 Jan;3(1):11–22.
102. Wang Y, Velho S, Vakiani E, Peng S, Bass AJ, Chu GC, et al. Mutant N-RAS protects colorectal cancer cells from stress-induced apoptosis and contributes to cancer development and progression. Cancer Discov. 2013 Mar;3(3):294–307.

103. Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: beyond KRAS mutations. Crit Rev Oncol Hematol. 2013 Jan;85(1):45–81.
104. Shen Y, Wang J, Han X, Yang H, Wang S, Lin D, et al. Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling ofKRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine. PLoS One. 2013;8(12):e81628.
105. Er TK, Chen CC, Bujanda L, Herreros-Villanueva M. Current approaches for predicting a lack of response to anti-EGFR therapy in KRAS wild-type patients. Biomed Res Int. 2014;2014:591867.
106. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. Lancet Oncol. 2013 Jul;14(8):749–59.
107. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010 Aug;11(8):753–62.
108. Di Bartolomeo M, Pietrantonio F, Perrone F, Dotti KF, Lampis A, Bertan C, et al. Lack of KRAS, NRAS, BRAF and TP53 mutations improves outcome of elderly metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, oxaliplatin and UFT. Target Oncol. 2014 Jun;9(2):155–62.
109. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. N Engl J Med. 2013 Sep 12;369(11):1023–34.
110. Russo AL, Borger DR, Szymonifka J, Ryan DP, Wo JY, Blaszkowsky LS, et al. Mutational analysis and clinical correlation of metastatic colorectal cancer. Cancer. 2014 May 15;120(10):1482–90.
111. Albino AP, Le Strange R, Oliff AI, Furth ME, Old LJ. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? Nature. 1984 Mar 1;308(5954):69–72.
112. Eskandarpour M, Huang F, Reeves KA, Clark E, Hansson J. Oncogenic NRAS has multiple effects on the malignant phenotype of human melanoma cells cultured in vitro. Int J Cancer. 2009 Jan 1;124(1):16–26.
113. Milagre C, Dhomen N, Geyer FC, Hayward R, Lambros M, Reis-Filho JS, et al. A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. Cancer Res. 2010 Jul 1;70(13):5549–57.
114. Fedorenko IV, Gibney GT, Sondak VK, Smalley KS. Beyond BRAF: where next for melanoma therapy? Br J Cancer. 2015 Jan 20;112(2):217–26.
115. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949–54.
116. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol. 1999 Sep;17(9):2745–51.
117. Queirolo P, Picasso V, Spagnolo F. Combined BRAF and MEK inhibition for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. Cancer Treat Rev. 2015 Jun;41(6):519–26.
118. Massey PR, Prasad V, Figg WD, Fojo T. Multiplying therapies and reducing toxicity in metastatic melanoma. Cancer Biol Ther. 2015 May 27;1–5.
119. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2011 Apr 1;29(10):1261–70.
120. Krasinskas AM. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. Pathol Res Int. 2011;2011:932932.
121. StudyBlue [Internet]. StudyBlue. [cited 2015 Jun 3]. Available from: https://www.studyblue.com/notes/note/n/handout-01/deck/11628289
122. Danenberg PV. Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy. Biochim Biophys Acta. 1977 Dec 23;473(2):73–92.
123. Danenberg PV. Pharmacogenomics of thymidylate synthase in cancer treatment. Front Biosci. 2004 Sep 1;9:2484–94.
124. Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, et al. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. J Clin Oncol. 1996 Jan;14(1):176–82.
125. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. Mol Cancer Ther. 2009 May;8(5):1000–7.
126. Berger SH, Jenh CH, Johnson LF, Berger FG. Thymidylate synthase overproduction and

gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. Mol Pharmacol. 1985 Nov;28(5):461–7.
127. Johnston PG, Drake JC, Trepel J, Allegra CJ. Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. Cancer Res. 1992 Aug 15;52(16):4306–12.
128. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. Pharmacol Rev. 2006 Dec;58(4):773–81.
129. Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ, et al. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. Cell. 1988 Oct 21;55(2):361–9.
130. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
131. Zheng WQ, Lu J, Zheng JM, Hu FX, Ni CR. Variation of ER status between primary and metastatic breast cancer and relationship to p53 expression*. Steroids. 2001 Dec;66(12):905–10.
132. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 2010 Jun;134(6):907–22.
133. Cardoso F, Harbeck N, Fallowfield L, Kyriakides S, Senkus E. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2012 Oct;23 Suppl 7:vii11–9.
134. Adam de Beaumais T, Jacqz-Aigrain E. Pharmacogenetic determinants of mercaptopurine disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. Eur J Clin Pharmacol. 2012 Sep;68(9):1233–42.
135. Schmiegelow K, Nielsen SN, Frandsen TL, Nersting J. Mercaptopurine/Methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical facts and fiction. J Pediatr Hematol Oncol. 2014 Oct;36(7):503–17.
136. Jourdil N, Fonrose X, Boulieu R, Stanke-Labesque F. [Therapeutic drug monitoring of 6-thioguanine nucleotides in inflammatory bowel disease: interest and limits]. Therapie. 2010 May;65(3):177–86.
137. Poli F, Piccolo G, Scalamogna M. Genetic polymorphisms influencing therapy and susceptibility to rejection in organ allograft recipients. BioDrugs. 2002;16(1):11–7.
138. Kopylov U, Ben-Horin S, Seidman E. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease. Ann Gastroenterol. 2014;27(4):304–12.
139. Murugesan R, Vahab SA, Patra S, Rao R, Rao J, Rai P, et al. Thiopurine S-methyltransferase alleles, TPMT*2, *3B and *3C, and genotype frequencies in an Indian population. Exp Ther Med. 2010;1(1):121–7.
140. Sanderson J, Ansari A, Marinaki T, Duley J. Thiopurine methyltransferase: should it be measured before commencing thiopurine drug therapy? Ann Clin Biochem. 2004 Jul;41(Pt 4):294–302.
141. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. J Natl Cancer Inst. 1999 Dec 1;91(23):2001–8.
142. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 1990 Jul 28;336(8709):225–9.
143. Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. Proc Natl Acad Sci U A. 1995 Feb 14;92(4):949–53.
144. Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. Proc Natl Acad Sci U A. 1997 Jun 10;94(12):6444–9.
145. Black AJ, McLeod HL, Capell HA, Powrie RH, Matowe LK, Pritchard SC, et al. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. Ann Intern Med. 1998 Nov 1;129(9):716–8.
146. Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, Cario G, Schrauder A, Zimmermann M, et al. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. JAMA. 2005 Mar 23;293(12):1485–9.
147. van den Akker-van Marle ME, Gurwitz D, Detmar SB, Enzing CM, Hopkins MM, Gutierrez de Mesa E, et al. Cost-effectiveness of pharmacogenomics in clinical practice: a case study of thiopurine methyltransferase genotyping in acute lymphoblastic leukemia in

Europe. Pharmacogenomics. 2006 Jul;7(5):783–92.
148. Relling MV, Klein TE. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. Clin Pharmacol Ther. 2011 Mar;89(3):464–7.
149. Yang SK, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, et al. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. Nat Genet. 2014 Sep;46(9):1017–20.
150. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, et al. Inherited NUDT15 Variant Is a Genetic Determinant of Mercaptopurine Intolerance in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol. 2015 Jan 26;JCO.2014.59.4671.
151. Liu CY, Chen PM, Chiou TJ, Liu JH, Lin JK, Lin TC, et al. UGT1A1*28 polymorphism predicts irinotecan-induced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma. Cancer. 2008 May 1;112(9):1932–40.
152. Mathijssen RHJ, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, et al. Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11). Clin Cancer Res. 2001 Aug 1;7(8):2182–94.
153. Iyer L, Hall D, Das S, Mortell MA, Ramirez J, Kim S, et al. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. Clin Pharmacol Ther. 1999 May;65(5):576–82.
154. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. N Engl J Med. 1995 Nov 2;333(18):1171–5.
155. Tukey RH, Strassburg CP, Mackenzie PI. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. Mol Pharmacol. 2002 Sep;62(3):446–50.
156. PharmGKB [Internet]. 2015 [cited 2015 May 11]. Available from: https://www.pharmgkb.org
157. Hall D, Ybazeta G, Destro-Bisol G, Petzl-Erler ML, Di Rienzo A. Variability at the uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter in human populations and primates. Pharmacogenetics. 1999 Oct;9(5):591–9.
158. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? Proc Natl Acad Sci U A. 1998 Jul 7;95(14):8170–4.
159. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. N Engl J Med. 2006 Sep 7;355(10):983–91.
160. Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2002 Jul;8(7):2286–91.
161. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karrison T, et al. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. Pharmacogenomics J. 2002;2(1):43–7.
162. Ceppi P, Volante M, Novello S, Rapa I, Danenberg KD, Danenberg PV, et al. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. Ann Oncol. 2006 Dec;17(12):1818–25.
163. Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, Bepler G, Sanchez JJ, Camps C, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res. 2004 Feb 15;10(4):1318–25.
164. Hazama S, Nagashima A, Kondo H, Yoshida S, Shimizu R, Araki A, et al. Phase I study of irinotecan and doxifluridine for metastatic colorectal cancer focusing on the UGT1A1*28 polymorphism. Cancer Sci. 2010 Mar;101(3):722–7.
165. Ramchandani RP, Wang Y, Booth BP, Ibrahim A, Johnson JR, Rahman A, et al. The role of SN-38 exposure, UGT1A1*28 polymorphism, and baseline bilirubin level in predicting severe irinotecan toxicity. J Clin Pharmacol. 2007 Jan;47(1):78–86.
166. Recommendations from the EGAPP Working Group: can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? Genet Med. 2009 Jan;11(1):15–20.
167. Seck K, Riemer S, Kates R, Ullrich T, Lutz V, Harbeck N, et al. Analysis of the DPYD gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in a cohort of Caucasian individuals. Clin Cancer Res. 2005 Aug 15;11(16):5886–92.
168. Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH. High prevalence of the IVS14 + 1G>A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene of patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity. Pharmacogenetics. 2002 Oct;12(7):555–8.

169. Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Raunio H, Fernandez-Salguero P, et al. Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. Genomics. 1998 Aug 1;51(3):391–400.
170. Koopman M, Venderbosch S, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Punt CJ. A review on the use of molecular markers of cytotoxic therapy for colorectal cancer, what have we learned? Eur J Cancer. 2009 Jul;45(11):1935–49.
171. Yu Z, Yang Q, Sun J, Zhen J. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity correlates with fluorouracil sensitivity in breast cancer. Exp Oncol. 2007 Sep;29(3):192–6.
172. Yang CG, Ciccolini J, Blesius A, Dahan L, Bagarry-Liegey D, Brunet C, et al. DPD-based adaptive dosing of 5-FU in patients with head and neck cancer: impact on treatment efficacy and toxicity. Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Jan;67(1):49–56.
173. Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, Evrard A, Boyer JC, Richard K, et al. Toxic death-case after capecitabine + oxaliplatin (XELOX) administration: probable implication of dihydropyrimidine deshydrogenase deficiency. Cancer Chemother Pharmacol. 2006 Aug;58(2):272–5.
174. Mercier C, Ciccolini J. Profiling dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with cancer undergoing 5-fluorouracil/capecitabine therapy. Clin Colorectal Cancer. 2006 Nov;6(4):288–96.
175. Zhang X, Li L, Fourie J, Davie JR, Guarcello V, Diasio RB. The role of Sp1 and Sp3 in the constitutive DPYD gene expression. Biochim Biophys Acta. 2006 May;1759(5):247–56.
176. Toffoli G, Cecchin E. Pharmacogenetics and stomach cancer: an update. Pharmacogenomics. 2007 May;8(5):497–505.
177. Li Q, Liu Y, Zhang HM, Huang YP, Wang TY, Li DS, et al. Influence of DPYD Genetic Polymorphisms on 5-Fluorouracil Toxicities in Patients with Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. Gastroenterol Res Pr. 2014;2014:827989.
178. Deenen MJ, Cats A, Sechterberger MK, Severens JL, Smits PH. Abstract 3606 : Safety, pharmacokinetics (PK), and cost-effectiveness of upfront genotyping of DPYD in fluoropyrimidine therapy. In 2011.
179. Ezzeldin HH, Diasio RB. Predicting fluorouracil toxicity: can we finally do it? J Clin Oncol. 2008 May 1;26(13):2080–2.
180. van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. Eur J Cancer. 2004 May;40(7):939–50.
181. van Staveren MC, Guchelaar HJ, van Kuilenburg AB, Gelderblom H, Maring JG. Evaluation of predictive tests for screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Pharmacogenomics J. 2013 Oct;13(5):389–95.
182. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. Cancer Res. 1993 Nov 15;53(22):5433–8.
183. van Kuilenburg AB, van Lenthe H, Zoetekouw L, Kulik W. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for rapid determination of dihydropyrimidine dehydrogenase activity. Clin Chem. 2007 Mar;53(3):528–30.
184. Lostia AM, Lionetto L, Ialongo C, Gentile G, Viterbo A, Malaguti P, et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 5-Fluorouracil degradation rate by intact peripheral blood mononuclear cells. Ther Drug Monit. 2009 Aug;31(4):482–8.
185. Fleming RA, Milano G, Thyss A, Etienne MC, Renee N, Schneider M, et al. Correlation between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral mononuclear cells and systemic clearance of fluorouracil in cancer patients. Cancer Res. 1992 May 15;52(10):2899–902.
186. Yoshikawa H, Ohno R, Kawashima K, Ueda R, Takeyama H. [Treatment for sepsis in hematological diseases with combined large-dosage antibiotics of two different groups, with special reference to the relation between clinical effects and drug-sensitivity of causative organisms (author's transl)]. Rinsho Ketsueki. 1977 Feb;18(2):110–7.
187. Van Kuilenburg AB, Van Lenthe H, Tromp A, Veltman PC, Van Gennip AH. Pitfalls in the diagnosis of patients with a partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Clin Chem. 2000 Jan;46(1):9–17.
188. Mattison LK, Ezzeldin H, Carpenter M, Modak A, Johnson MR, Diasio RB. Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency by using a novel 2-13C-uracil breath test. Clin Cancer Res. 2004 Apr 15;10(8):2652–8.
189. Ciccolini J, Mercier C, Evrard A, Dahan L, Boyer JC, Duffaud F, et al. A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. Ther Drug Monit. 2006 Oct;28(5):678–85.
190. Bi D, Anderson LW, Shapiro J, Shapiro A, Grem JL, Takimoto CH. Measurement of plasma uracil using gas chromatography-mass spectrometry in normal individuals and in patients receiving inhibitors of dihydropyrimidine dehydrogenase. J

Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000 Feb 11;738(2):249–58.
191. Ciccolini J, Gross E, Dahan L, Lacarelle B, Mercier C. Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? Clin Colorectal Cancer. 2010 Oct;9(4):224–8.
192. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guerin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, et al. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4):1105.
193. Zhou ZW, Wang GQ, Wan de S, Lu ZH, Chen YB, Li S, et al. The dihydrouracil/uracil ratios in plasma and toxicities of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. Chemotherapy. 2007;53(2):127–31.
194. Hahn RZ, Galarza AF, Schneider A, Antunes MV, Schwartsmann G, Linden R. Improved determination of uracil and dihydrouracil in plasma after a loading oral dose of uracil using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and porous graphitic carbon stationary phase. Clin Biochem [Internet]. 2015 May 1; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940841
195. van Staveren MC, Theeuwes-Oonk B, Guchelaar HJ, van Kuilenburg AB, Maring JG. Pharmacokinetics of orally administered uracil in healthy volunteers and in DPD-deficient patients, a possible tool for screening of DPD deficiency. Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Dec;68(6):1611–7.
196. Carlsson G, Odin E, Gustavsson B, Wettergren Y. Pretherapeutic uracil and dihydrouracil levels in saliva of colorectal cancer patients are associated with toxicity during adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol. 2014 Oct;74(4):757–63.
197. Di Paolo A, Danesi R, Ciofi L, Vannozzi F, Bocci G, Lastella M, et al. Improved analysis of 5-Fluorouracil and 5,6-dihydro-5-Fluorouracil by HPLC with diode array detection for determination of cellular dihydropyrimidine dehydrogenase activity and pharmacokinetic profiling. Ther Drug Monit. 2005 Jun;27(3):362–8.
198. Gamelin E, Delva R, Jacob J, Merrouche Y, Raoul JL, Pezet D, et al. Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008 May 1;26(13):2099–105.
199. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. Clin Pharmacokinet. 2009;48(11):689–723.
200. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. Lancet. 2011 Aug 27;378(9793):771–84.
201. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. Pharmacol Ther. 2007 Dec;116(3):496–526.
202. CYP2D6 allele nomenclature [Internet]. 2015. Available from: http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm
203. Hoskins JM, Carey LA, McLeod HL. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. Nat Rev Cancer. 2009 Aug;9(8):576–86.
204. Borges S, Desta Z, Jin Y, Faouzi A, Robarge JD, Philips S, et al. Composite functional genetic and comedication CYP2D6 activity score in predicting tamoxifen drug exposure among breast cancer patients. J Clin Pharmacol. 2010 Apr;50(4):450–8.
205. Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, et al. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. J Natl Cancer Inst. 2005 Jan 5;97(1):30–9.
206. Teft WA, Gong IY, Dingle B, Potvin K, Younus J, Vandenberg TA, et al. CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. Breast Cancer Res Treat. 2013 May;139(1):95–105.
207. Irvin WJ, Walko CM, Weck KE, Ibrahim JG, Chiu WK, Dees EC, et al. Genotype-Guided Tamoxifen Dosing Increases Active Metabolite Exposure in Women With Reduced CYP2D6 Metabolism: A Multicenter Study. J Clin Oncol. 2011 Aug 20;29(24):3232–9.
208. Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. Clin Pharmacol Ther. 2011 May;89(5):718–25.
209. Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, et al. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. Breast Cancer Res Treat. 2007 Jan;101(1):113–21.

210. Lorizio W, Wu AH, Beattie MS, Rugo H, Tchu S, Kerlikowske K, et al. Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. Breast Cancer Res Treat. 2012 Apr;132(3):1107–18.
211. Hertz DL, McLeod HL, Irvin WJ Jr. Tamoxifen and CYP2D6: a contradiction of data. Oncologist. 2012;17(5):620–30.
212. Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M, Pagani O, Tang W, Kammler R, et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. J Natl Cancer Inst. 2012 Mar 21;104(6):441–51.
213. Rae JM, Drury S, Hayes DF, Stearns V, Thibert JN, Haynes BP, et al. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. J Natl Cancer Inst. 2012 Mar 21;104(6):452–60.
214. Ratain MJ, Nakamura Y, Cox NJ. CYP2D6 Genotype and Tamoxifen Activity: Understanding Interstudy Variability in Methodological Quality. Clin Pharmacol Ther. 2013 Aug;94(2):185–7.
215. Nakamura Y, Ratain MJ, Cox NJ, McLeod HL, Kroetz DL, Flockhart DA. Re: CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial. J Natl Cancer Inst. 2012 Aug 22;104(16):1264; author reply 1266–8.
216. Callahan R, Campbell G. Mutations in human breast cancer: an overview. J Natl Cancer Inst. 1989 Dec 6;81(23):1780–6.
217. Dezentje VO, van Schaik RH, Vletter-Bogaartz JM, van der Straaten T, Wessels JA, Kranenbarg EM, et al. CYP2D6 genotype in relation to tamoxifen efficacy in a Dutch cohort of the tamoxifen exemestane adjuvant multinational (TEAM) trial. Breast Cancer Res Treat [Internet]. 2013 Jul 11; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842856 http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10549-013-2619-6.pdf
218. Ahmad A, Ali SM, Ahmad MU, Sheikh S, Ahmad I. Orally administered endoxifen is a new therapeutic agent for breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2010 Jul;122(2):579–84.
219. Nakajima M, Komagata S, Fujiki Y, Kanada Y, Ebi H, Itoh K, et al. Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. Pharmacogenet Genomics. 2007 Jun;17(6):431–45.
220. Ekhart C, Doodeman VD, Rodenhuis S, Smits PH, Beijnen JH, Huitema AD. Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. Pharmacogenet Genomics. 2008 Jun;18(6):515–23.
221. Jamieson D, Lee J, Cresti N, Jackson R, Griffin M, Sludden J, et al. Pharmacogenetics of adjuvant breast cancer treatment with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil. Cancer Chemother Pharmacol. 2014 Oct;74(4):667–74.
222. Tulsyan S, Agarwal G, Lal P, Mittal B. Significant role of CYP450 genetic variants in cyclophosphamide based breast cancer treatment outcomes: a multi-analytical strategy. Clin Chim Acta. 2014 Jul 1;434:21–8.
223. Petros WP, Hopkins PJ, Spruill S, Broadwater G, Vredenburgh JJ, Colvin OM, et al. Associations between drug metabolism genotype, chemotherapy pharmacokinetics, and overall survival in patients with breast cancer. J Clin Oncol. 2005 Sep 1;23(25):6117–25.
224. Jabir RS, Naidu R, Annuar MA, Ho GF, Munisamy M, Stanslas J. Pharmacogenetics of taxanes: impact of gene polymorphisms of drug transporters on pharmacokinetics and toxicity. Pharmacogenomics. 2012 Dec;13(16):1979–88.
225. Rizzo R, Spaggiari F, Indelli M, Lelli G, Baricordi OR, Rimessi P, et al. Association of CYP1B1 with hypersensitivity induced by taxane therapy in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. 2010 Nov;124(2):593–8.
226. Hertz DL, Motsinger-Reif AA, Drobish A, Winham SJ, McLeod HL, Carey LA, et al. CYP2C8*3 predicts benefit/risk profile in breast cancer patients receiving neoadjuvant paclitaxel. Breast Cancer Res Treat. 2012 Jul;134(1):401–10.
227. Huang CL, Yokomise H, Kobayashi S, Fukushima M, Hitomi S, Wada H. Intratumoral expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy. Int J Oncol. 2000 Jul;17(1):47–54.
228. Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. Clin Cancer Res. 1999 Apr;5(4):883–9.

229. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. Clin Cancer Res. 2000 Apr;6(4):1322–7.
230. Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Renee N, et al. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. Eur J Cancer. 1994;30A(10):1517–22.
231. Marechal R, Mackey JR, Lai R, Demetter P, Peeters M, Polus M, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1 and human concentrative nucleoside transporter 3 predict survival after adjuvant gemcitabine therapy in resected pancreatic adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2009 Apr 15;15(8):2913–9.
232. Rosmarin D, Palles C, Church D, Domingo E, Jones A, Johnstone E, et al. Genetic Markers of Toxicity From Capecitabine and Other Fluorouracil-Based Regimens: Investigation in the QUASAR2 Study, Systematic Review, and Meta-Analysis. J Clin Oncol. 2014 Apr 1;32(10):1031–9.
233. Thota R, Pauff JM, Berlin JD. Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. Oncol Williston Park. 2014 Jan;28(1):70–4.
234. Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz H-J, Ladner RD. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2014 May;11(5):282–98.
235. Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorsel CJ, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. Pharmacol Ther. 2000 Aug;87(2-3):227–53.
236. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. Nature. 1957 Mar 30;179(4561):663–6.
237. Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. Biochemistry (Mosc). 1974 Jan 29;13(3):471–81.
238. Pratt S, Shepard RL, Kandasamy RA, Johnston PA, Perry W 3rd, Dantzig AH. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. Mol Cancer Ther. 2005 May;4(5):855–63.
239. Sohn K-J, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kim Y-I. Effect of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on Chemosensitivity of Colon and Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil and Methotrexate. J Natl Cancer Inst. 2004 Jan 21;96(2):134–44.
240. Ciccolini J, Fina F, Bezulier K, Giacometti S, Roussel M, Evrard A, et al. Transmission of Apoptosis in Human Colorectal Tumor Cells Exposed to Capecitabine, Xeloda, Is Mediated via Fas 1 Supported in part by Nippon Roche, Japan and by Roche Oncologie, France. 1. Mol Cancer Ther. 2002 Sep 1;1(11):923–7.
241. Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. Biochim Biophys Acta. 2002 Jul 18;1587(2-3):194–205.
242. Desmoulin F, Gilard V, Malet-Martino M, Martino R. Metabolism of Capecitabine, an Oral Fluorouracil Prodrug:19F NMR Studies in Animal Models and Human Urine. Drug Metab Dispos. 2002 Nov 1;30(11):1221–9.
243. Fukunaga AK, Marsh S, Murry DJ, Hurley TD, McLeod HL. Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. Pharmacogenomics J. 2004 Jun 29;4(5):307–14.
244. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol. 1997 Jun;15(6):2403–13.
245. Jones OP, Melling JD, Ghaneh P. Adjuvant therapy in pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2014 Oct 28;20(40):14733–46.
246. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, et al. nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. J Natl Cancer Inst [Internet]. 2015 Feb;107(2). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25638248
247. Lilly E. Monography of Gemzar. 2006; Available from: www.gemzar.com
248. Résumé des Caractéristiques du Produit: Gemzar [Internet]. [cited 2015 Jun 26]. Available from: http://pi.lilly.com/us/gemzar.pdf
249. Santini V, Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Silverman LR, List A, et al. Management and supportive care measures for adverse events in patients with myelodysplastic syndromes treated with azacitidine*. Eur J Haematol. 2010 Aug;85(2):130–8.

250. Tanaka T, Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Morizane C, Hagihara A, et al. Prognostic Factors in Japanese Patients with Advanced Pancreatic Cancer Treated with Single-agent Gemcitabine as First-line Therapy. Jpn J Clin Oncol. 2008 Nov 1;38(11):755–61.
251. Lee J-O, Kim D-Y, Lim JH, Seo M-D, Yi HG, Oh D-Y, et al. Palliative chemotherapy for patients with recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation. J Gastroenterol Hepatol. 2009 May 1;24(5):800–5.
252. Celgene. Monography of Vidaza. 2012 [cited 2015 May 6]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000978/WC500050239.pdf
253. Pfizer. Monography of Cytosar. Available from: http://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10017036/f/201410/cytosar-non-annotated-pm-175940-E.pdf
254. Erba HP. Finding the optimal combination therapy for the treatment of newly diagnosed AML in older patients unfit for intensive therapy. Leuk Res. 2015 Feb;39(2):183–91.
255. Banque Claude Bernard: Cytarabine [Internet]. [cited 2015 Jun 22]. Available from: http://www.portailmedicaments.resip.fr/monographie.asp?cip=5828525
256. Nirenberg A. Managing hematologic toxicities: novel therapies. Cancer Nurs. 2003 Dec;26(6 Suppl):32S – 37S.
257. Montoya L. Managing hematologic toxicities in the oncology patient. J Infus Nurs Off Publ Infus Nurses Soc. 2007 Jun;30(3):168–72.
258. Navaratnam N, Sarwar R. An overview of cytidine deaminases. Int J Hematol. 2006 Apr;83(3):195–200.
259. Laliberte J, Momparler RL. Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning, and expression of its complementary DNA. Cancer Res. 1994 Oct 15;54(20):5401–7.
260. The National Center for Biotechnology Information. Protein : CDA Cytidine deaminase [Homo sapiens] [Internet]. [cited 2015 May 3]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAH54036.1
261. Teng YS, Anderson JE, Giblett ER. Cytidine deaminase: a new genetic polymorphism demonstrated in human granulocytes. Am J Hum Genet. 1975 Jul;27(4):492–7.
262. Vincenzetti S, Pucciarelli S, Carpi FM, Micozzi D, Polzonetti V, Natalini P, et al. Site directed mutagenesis as a tool to understand the catalytic mechanism of human cytidine deaminase. Protein Pept Lett. 2013 May;20(5):538–49.
263. Micozzi D, Carpi FM, Pucciarelli S, Polzonetti V, Polidori P, Vilar S, et al. Human cytidine deaminase: a biochemical characterization of its naturally occurring variants. Int J Biol Macromol. 2014 Feb;63:64–74.
264. Vincenzetti S, Cambi A, Neuhard J, Garattini E, Vita A. Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification, and characterization. Protein Expr Purif. 1996 Sep;8(2):247–53.
265. Cambi A, Vincenzetti S, Neuhard J, Costanzi S, Natalini P, Vita A. Identification of four amino acid residues essential for catalysis in human cytidine deaminase by site-directed mutagenesis and chemical modifications. Protein Eng. 1998 Jan;11(1):59–63.
266. Hosono H, Kuno S. The purification and properties of cytidine deaminase from Escherichia coli. J Biochem. 1973 Oct;74(4):797–803.
267. Ferraris D, Duvall B, Delahanty G, Mistry B, Alt J, Rojas C, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of fluorinated tetrahydrouridine derivatives as inhibitors of cytidine deaminase. J Med Chem. 2014 Mar 27;57(6):2582–8.
268. Ensembl : Transcript CDA-001 ENST00000375071 [Internet]. [cited 2015 May 6]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?g=ENSG00000158825;r=1:20588948-20618908;t=ENST00000375071
269. Ensembl : Transcript CDA-002 ENST00000461985 [Internet]. [cited 2015 Jun 5]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?t=ENST00000461985;r=1:20589086-20618903;g=ENSG00000158825
270. Kuhn K, Bertling WM, Emmrich F. Cloning of a functional cDNA for human cytidine deaminase (CDD) and its use as a marker of monocyte/macrophage differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 1993 Jan 15;190(1):1–7.
271. Chabner BA, Johns DG, Coleman CN, Drake JC, Evans WH. Purification and properties of cytidine deaminase from normal and leukemic granulocytes. J Clin Invest. 1974 Mar;53(3):922–31.
272. Kassimos D, Kirwan JR, Kyle V, Hazleman B, Dieppe P. Cytidine deaminase may be a useful marker in differentiating elderly onset rheumatoid arthritis from polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis. Clin Exp Rheumatol. 1995 Sep;13(5):641–4.
273. Thompson PW, Jones DD, Currey HL. Cytidine deaminase activity as a measure of

acute inflammation in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1986 Jan;45(1):9–14.
274. Richards DA, Sherwood RA, Ndebele D, Rocks BF. Determination of plasma cytidine deaminase activity by HPLC. Biomed Chromatogr. 1987;2(4):148–51.
275. Giovannetti E, Laan AC, Vasile E, Tibaldi C, Nannizzi S, Ricciardi S, et al. Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008 Jun;27(6):720–5.
276. Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahem Q, Gu X, Visconte V, Tabarroki A, et al. Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analogue half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. Clin Cancer Res [Internet]. 2013 Jan 3; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287564 http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2013/01/03/1078-0432.CCR-12-1722.full.pdf
277. Peters GJ, Honeywell RJ, Maulandi M, Giovannetti E, Losekoot N, Etienne-Grimaldi MC, et al. Selection of the best blood compartment to measure cytidine deaminase activity to stratify for optimal gemcitabine or cytarabine treatment. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2014 Apr 4;33(4-6):403–12.
278. Okamura T, Kigasawa K, Takeuchi T, Ohta C. Cytidine deaminase activity in abnormal pregnancy. Int J Gynaecol Obstet. 1993 Apr;41(1):53–60.
279. Serdjebi C, Seitz JF, Ciccolini J, Duluc M, Norguet E, Fina F, et al. Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. Pharmacogenomics. 2013 Jul;14(9):1047–51.
280. Raynal C, Ciccolini J, Mercier C, Boyer JC, Polge A, Lallemant B, et al. High-resolution melting analysis of sequence variations in the cytidine deaminase gene (CDA) in patients with cancer treated with gemcitabine. Ther Drug Monit. 2010 Feb;32(1):53–60.
281. Gilbert JA, Salavaggione OE, Ji Y, Pelleymounter LL, Eckloff BW, Wieben ED, et al. Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. Clin Cancer Res. 2006 Mar 15;12(6):1794–803.
282. Caronia D, Martin M, Sastre J, de la Torre J, Garcia-Saenz JA, Alonso MR, et al. A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. Clin Cancer Res. 2011 Apr 1;17(7):2006–13.
283. Ludovini V, Floriani I, Pistola L, Minotti V, Meacci M, Chiari R, et al. Association of cytidine deaminase and xeroderma pigmentosum group D polymorphisms with response, toxicity, and survival in cisplatin/gemcitabine-treated advanced non-small cell lung cancer patients. J Thorac Oncol. 2011 Dec;6(12):2018–26.
284. Fitzgerald SM, Goyal RK, Osborne WR, Roy JD, Wilson JW, Ferrell RE. Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. Hum Genet. 2006 Apr;119(3):276–83.
285. Abraham A, Varatharajan S, Abbas S, Zhang W, Shaji RV, Ahmed R, et al. Cytidine deaminase genetic variants influence RNA expression and cytarabine cytotoxicity in acute myeloid leukemia. Pharmacogenomics. 2012 Feb;13(3):269–82.
286. Steuart CD, Burke PJ. Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. Nature New Biol. 1971 Sep 22;233(38):109–10.
287. Momparler RL, Onetto N, Momparler LF, Gyger M, Leclerc JM, Rivard GE. Drug sensitivity test for patients with acute leukemia on high-dose ara-C therapy. Semin Oncol. 1985 Jun;12(2 Suppl 3):31–3.
288. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. Eur J Cancer. 1998 Jul;34(8):1274–81.
289. Neff T, Blau CA. Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. Exp Hematol. 1996 Sep;24(11):1340–6.
290. Kirch HC, Schroder J, Hoppe H, Esche H, Seeber S, Schutte J. Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro. Exp Hematol. 1998 May;26(5):421–5.
291. Yue L, Saikawa Y, Ota K, Tanaka M, Nishimura R, Uehara T, et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. Pharmacogenetics. 2003 Jan;13(1):29–38.
292. Chiba P, Tihan T, Eher R, Köller U, Wallner C, Göbl R, et al. Effect of cell growth and cell differentiation on 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine metabolism in myeloid cells. Br J Haematol. 1989 Apr;71(4):451–5.

293. Baines TJ, Clark A. Cytidine deaminase--a marker for pre-eclampsia? Ann Clin Biochem. 1985 Jul;22 (Pt 4):420–2.
294. Jones DD, Bahijri S, Roberts EL, Williams GF. Activity of serum cytidine deaminase during pregnancy. Br J Obstet Gynaecol. 1982 Apr;89(4):314–7.
295. Herbert KE, Scott DL, Perrett D. Determination of cytidine deaminase activity in synovial fluid by HPLC. J Pharm Biomed Anal. 1989;7(6):737–45.
296. James IT, Herbert K, Perrett D, Thompson PW. Determination of serum cytidine deaminase activity using ion-pair reversed-phase liquid chromatography. J Chromatogr. 1989 Oct 27;495:105–12.
297. Mercier C, Raynal C, Dahan L, Ortiz A, Evrard A, Dupuis C, et al. Toxic death case in a patient undergoing gemcitabine-based chemotherapy in relation with cytidine deaminase downregulation. Pharmacogenet Genomics. 2007 Oct;17(10):841–4.
298. Okazaki T, Javle M, Tanaka M, Abbruzzese JL, Li D. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. Clin Cancer Res. 2010 Jan 1;16(1):320–9.
299. Joerger M, Burgers JA, Baas P, Doodeman VD, Smits PH, Jansen RS, et al. Gene polymorphisms, pharmacokinetics, and hematological toxicity in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving cisplatin/gemcitabine. Cancer Chemother Pharmacol. 2012 Jan;69(1):25–33.
300. Fanciullino R, Mercier C, Serdjebi C, Berda Y, Fina F, Ouafik L, et al. Lethal toxicity after administration of azacytidine: implication of the cytidine deaminase-deficiency syndrome. Pharmacogenet Genomics. 2015 Jun;25(6):317–21.
301. Ciccolini J, Evrard A, M'Batchi L, Pourroy B, Mercier C, Iliadis A, et al. CDA deficiency as a possible culprit for life-threatening toxicities after cytarabine plus 6-mercaptopurine therapy: pharmacogenetic investigations. Pharmacogenomics. 2012 Mar;13(4):393–7.
302. Mercier C, Fanciullino R, Colle J, Venton G, Ivanov V, Sebahoun G, et al. Abstract 7075 : CDA status as predictive marker of aplasia duration and clinical outcome in AML patients receiving cytarabine based chemotherapy. ASCO Meeting 2015 [Internet]. ASCO Meeting 2015; [cited 2015 Jul 5]. Available from: http://meetinglibrary.asco.org/content/152527-156
303. Mercier C, Dupuis C, Blesius A, Fanciullino R, Yang CG, Padovani L, et al. Early severe toxicities after capecitabine intake: possible implication of a cytidine deaminase extensive metabolizer profile. Cancer Chemother Pharmacol. 2009 May;63(6):1177–80.
304. Carpi FM, Vincenzetti S, Ubaldi J, Pucciarelli S, Polzonetti V, Micozzi D, et al. CDA gene polymorphisms and enzyme activity: genotype-phenotype relationship in an Italian-Caucasian population. Pharmacogenomics. 2013 May;14(7):769–81.
305. Baker JA, Wickremsinhe ER, Li CH, Oluyedun OA, Dantzig AH, Hall SD, et al. Pharmacogenomics of gemcitabine metabolism: functional analysis of genetic variants in cytidine deaminase and deoxycytidine kinase. Drug Metab Dispos. 2013 Mar;41(3):541–5.
306. 1000 Genome Phase I populations Project [Internet]. [cited 2015 Jun 4]. Available from: www.1000genomes.org/data
307. Joerger M, Burgers SA, Baas P, Smit EF, Haitjema TJ, Bard MP, et al. Germline polymorphisms in patients with advanced nonsmall cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy: a prospective clinical study. Cancer. 2012 May 1;118(9):2466–75.
308. Li H, Wang X. The impact of CDA A79C gene polymorphisms on the response and hematologic toxicity in gemcitabine-treated patients: A meta-analysis. Int J Biol Markers. 2014 Jul;29(3):224–32.
309. Ding X, Chen W, Fan H, Zhu B. Cytidine deaminase polymorphism predicts toxicity of gemcitabine-based chemotherapy. Gene. 2015 Mar 15;559(1):31–7.
310. García-González X, Cortejoso L, García MI, García-Alfonso P, Robles L, Grávalos C, et al. Variants in CDA and ABCB1 are predictors of capecitabine-related adverse reactions in colorectal cancer. Oncotarget. 2015 Nov 2;6(8):6422–30.
311. Zhou J, Gao S, Zhang F, Jiang B, Zhan Q, Cai F, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of seven commonly used anticancer drugs in human plasma. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2012 Oct 1;906:1–8.
312. Soo RA, Wang LZ, Ng SS, Chong PY, Yong WP, Lee SC, et al. Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. Lung Cancer. 2009 Jan;63(1):121–7.
313. Erculj N, Kovac V, Hmeljak J, Franko A, Dodic-Fikfak M, Dolzan V. The influence of gemcitabine pathway polymorphisms on treatment outcome in patients with malignant mesothelioma. Pharmacogenet Genomics. 2012 Jan;22(1):58–68.

314. Zhou M, Wan H-Y, Gao B-L, Ding Y-J, Jun R-X. Genetic polymorphisms of XPD and CDA and lung cancer risk. Oncol Lett. 2012 Aug;4(2):247–51.
315. Mahlknecht U, Dransfeld CL, Bulut N, Kramer M, Thiede C, Ehninger G, et al. SNP analyses in cytarabine metabolizing enzymes in AML patients and their impact on treatment response and patient survival: identification of CDA SNP C-451T as an independent prognostic parameter for survival. Leukemia. 2009 Oct;23(10):1929–32.
316. Falk IJ, Fyrberg A, Paul E, Nahi H, Hermanson M, Rosenquist R, et al. Decreased survival in normal karyotype AML with single-nucleotide polymorphisms in genes encoding the AraC metabolizing enzymes cytidine deaminase and 5'-nucleotidase. Am J Hematol. 2013 Dec;88(12):1001–6.
317. Serdjebi C. Données supplémentaires [Internet]. Available from: https://drive.google.com/folderview?id=0B2tRKTAu5IPrfmVlc19SVFZmbjZDVS1XRHlwTmc4VXlYSkRUa09nNlVUTnZLbWQ4ZWZNUnM&usp=sharing
318. The National Center for Biotechnology Information. dbSNP [Internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
319. Primer3 [Internet]. Available from: http://primer3.ut.ee/
320. OligoAnalyzer [Internet]. Available from: http://eu.idtdna.com/calc/analyzer
321. The National Center for Biotechnology Information. Standard Nucleotide BLAST [Internet]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch
322. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389–402.
323. Formation NGS et Bioinformatique 2015. Formation NGS et Bioinformatique; 2015 Mar; Rouen.
324. Vierstreate A. Next Generation Sequencing for Dummies [Internet]. 2012. Available from: http://users.ugent.be/~avierstr/nextgen/Next_generation_sequencing_web.pdf
325. La Lettre du Cancérologue [Internet]. [cited 2015 Jul 31]. Available from: http://cancerologie.edimark.fr/publications/LON/la-lettre-du-cancerologue/parution:1964
326. Andre F, Ciccolini J, Spano JP, Penault-Llorca F, Mounier N, Freyer G, et al. Personalized medicine in oncology: where have we come from and where are we going? Pharmacogenomics. 2013 Jun;14(8):931–9.
327. Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, Andre N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing--time for a change? Nat Rev Clin Oncol. 2011 Jul;8(7):439–44.
328. Giovannetti E, Leon LG, Bertini S, Macchia M, Minutolo F, Funel N, et al. Study of apoptosis induction and deoxycytidine kinase/cytidine deaminase modulation in the synergistic interaction of a novel ceramide analog and gemcitabine in pancreatic cancer cells. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2010 Jun;29(4-6):419–26.
329. Giovannetti E, Tibaldi C, Falcone A, Danesi R, Peters GJ. Impact of cytidine deaminase polymorphisms on toxicity after gemcitabine: the question is still ongoing. J Clin Oncol. 2010 May 10;28(14):e221–2; author reply e223–5.
330. Dahan L, Ciccolini J, Evrard A, Mbatchi L, Tibbitts J, Ries P, et al. Sudden death related to toxicity in a patient on capecitabine and irinotecan plus bevacizumab intake: pharmacogenetic implications. J Clin Oncol. 2012 Feb 1;30(4):e41–4.
331. Ciccolini J, Dahan L, Andre N, Evrard A, Ouafik L, Duffaud F, et al. Reply to E. Giovannetti et al. J Clin Oncol. 2010 May 10;28(14):e223–5.
332. Jiang X, Galettis P, Links M, Mitchell PL, McLachlan AJ. Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in patients with cancer: effect of oxaliplatin and infusion rate. Br J Clin Pharmacol. 2008 Mar;65(3):326–33.