

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

CNRS UMR 6239 GICC

THÈSE présentée par :

Yoann POINTREAU

soutenue le : 14 Décembre 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Pharmacologie

**Etude des sources de variabilité de
l'efficacité et des effets indésirables du
cetuximab chez les patients traités pour un
carcinome épidermoïde de la tête et du
cou**

THÈSE dirigée par :

Mr PAINTAUD Gilles, PU-PH Professeur, université François – Rabelais de Tours
Mr CALAIS Gilles, PU-PH Professeur, université François – Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

Mr COQUEREL Antoine, PU-PH Professeur, université de Caen Basse-Normandie
Mr GUIGAY Joël, PU-PH Professeur, université Nice Sophia Antipolis

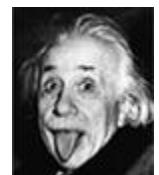
JURY :

Mr PAINTAUD Gilles, PU-PH Professeur, université François – Rabelais de Tours
Mr CALAIS Gilles, PU-PH Professeur, université François – Rabelais de Tours
Mr COQUEREL Antoine, PU-PH Professeur, université de Caen Basse-Normandie
Mr GUIGAY Joël, PU-PH Professeur, université Nice Sophia Antipolis
Mr SIMON Nicolas, PU-PH Professeur, université d'Aix-Marseille

A Delphine, pour ton soutien sans faille sans
lequel rien n'aurait été possible.

« La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre »

Albert EINSTEIN



Mathématicien, Physicien, Scientifique (1879 - 1955)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Antoine Coquerel et le Pr Joël Guigay d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Recevez ici la marque de ma considération et de mon profond respect.

Je tiens à remercier le Pr Nicolas Simon d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail de thèse. Recevez ma profonde considération.

Je remercie le Pr Gilles Paintaud pour m'avoir soutenu tout au long de ces années de doctorat et de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Gilles, merci pour ton soutien, tes encouragements répétés, ta disponibilité ainsi que pour les longues heures que tu as passé à lire les articles et la thèse. Reçois ici la marque de ma sympathie et de mon profond respect.

Je remercie Gilles Calais, le courant est passé entre nous dès notre rencontre nous menant vers une collaboration humaine et scientifique constructive et néanmoins amicale. Vous m'avez toujours soutenu dans ce travail de thèse et m'avez renouvelé à plusieurs reprises votre confiance et ce, malgré mon départ de votre service où une carrière universitaire pouvait m'attendre. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

De très sincères remerciements à Nicolas Azzopardi sans qui ce travail n'aurait certainement pas vu son aboutissement. Ta disponibilité, tes explications, tes encouragements, tes connaissances partagées m'auront permis d'aboutir au travail fourni.

Je remercie également David Ternant. David, tu m'as donné les premières explications sur les principes de la modélisation pharmacocinétique. D'abord obscurs, tu as su m'éclairer et me guider dans ce travail.

Je remercie le Pr Hervé Watier. Hervé, tu auras été mon premier contact et tu auras su me diriger vers Gilles Paintaud. D'un projet initialement « limité » à l'approche pharmacocinétique, nos échanges auront permis d'élargir les réflexions autour du cetuximab. Tu m'auras permis de reprendre des travaux engagés afin de les mener plus loin.

Un grand merci à Theodora Angoulvant. Theo, merci pour ta rigueur et les échanges que nous aurons eu. Merci aussi pour tes encouragements au cours du temps.

Merci aussi à Claire Fréneaux qui aura contribué à la mise au point du test prédictif des chocs anaphylactiques au cetuximab. J'ai pu ensuite reprendre la main et élargir la réflexion autour de cette thématique puis l'appliquer aux patients du service. Bon vent pour la suite.

Un grand merci aux équipes de recherches que j'ai rencontré au fil des années, aux médecins, aux thésards et à l'ensemble des techniciennes.

Un grand merci à l'équipe de la CORad, médecins, manipulateurs, techniciens, physiciens, secrétaires, infirmières, aides-soignantes, ASH, diététicienne, psychologues, cadres pour leur sympathie et leur soutien au long de nos années de collaboration. Bonne route à tous.

Merci à mes collègues du Mans pour m'avoir encouragé à poursuivre ce travail malgré nos emplois du temps chargés.

Une pensée particulière pour les ami(e)s et leurs conjoint(e)s avec qui j'ai partagé les bancs du Lycée, de la faculté de médecine ou avec qui j'ai travaillé sur des projets : Vincent, Céline, Nico, Julien, Hélène, Jérôme, Claire, Alexandre, Caro, Laure, Jean Biz, Seb Albert.

Un grand merci aux internes pour les stages et les moments partagés, tant professionnels qu'humains. Une pensée spéciale pour Amandine pour ces encouragements et sa disponibilité.

A ma famille et ma belle-famille, merci pour votre soutien depuis ces nombreuses années dans ma vie personnelle et professionnelle et merci d'avoir toujours été à mes côtés. Bien sûr, j'ai une pensée spéciale et émue pour mon beau-père Jackie qui nous a quitté le 21 septembre 2015 †.

Enfin, à Delphine, Léa et Axel. Delphine, ton soutien sans faille depuis ces nombreuses années a fait de moi ce que je suis actuellement. Tu as toujours été à mes côtés et nous avons déjà fait la preuve de la solidité de notre couple. Léa et Axel en sont le fruit. J'ai bien conscience que ces derniers mois ont été difficiles pour vous et que j'ai manqué de disponibilité. Ce travail de thèse accompli, je vais pouvoir me consacrer davantage à notre vie de famille. Je t'aime. Je vous aime.

Résumé

Le cetuximab (CTX) est un anticorps monoclonal anti-EGFR indiqué dans les cancers ORL dont les modalités de prescription pourraient être améliorées. Après chimiothérapie d'induction (étude Tremplin), en comparaison au cisplatine, il était moins toxique mais sans améliorer la préservation laryngée. À la première injection, le CTX peut déclencher un choc anaphylactique lié à la préexistence d'IgE anti- α Gal. Des tests prédictifs détectant ces IgE ont été développés et réalisés chez 41 patients avec une sensibilité et une valeur prédictive négative de 100%. La relation entre concentrations sériques et efficacité/toxicité a été étudiée chez 34 patients. La pharmacocinétique a été décrite à l'aide d'un modèle combinant des mécanismes d'élimination non saturable (CL) et saturable (k_0). La clairance globale du CTX, reflet de l'exposition des patients, était reliée aux survies sans progression et globale (SG). Le grade de radiodermite était associé à la SG. Une simulation pharmacocinétique suggère, qu'en comparaison à l'injection standard de CTX, une injection toutes les trois semaines entraînera des AUC proches mais des concentrations résiduelles différentes.

Mots clés

Cetuximab, cancers ORL, anaphylaxie, IgE anti- α Gal, pharmacocinétique, toxicité, survie, relation dose-réponse.

Résumé en anglais

Cetuximab (CTX) is an anti-EGFR monoclonal antibody approved in head and neck cancer, for which prescription modalities may be improved. After induction chemotherapy (Tremplin study), compared to cisplatin, CTX was less toxic but did not improve larynx preservation. During first infusion, CTX can induce an anaphylaxis reaction due to the presence of preexisting anti- α Gal IgE. Predictive assays detecting these IgE were developed and tested in 41 patients, with sensitivity and negative predictive values of 100%. Relationship between serum concentrations and efficacy/toxicity was studied in 34 patients. CTX pharmacokinetics was described using a model combining non-saturable (CL) and saturable (k_0) eliminations. Global clearance, which reflects patient exposure, was related to progression free and overall (OS) survivals. Severe radiation dermatitis was also associated with OS. A pharmacokinetic simulation suggests that, in comparison to standard CTX infusion, an infusion every three weeks will lead to similar AUC but to different residual concentrations.

Keywords:

Cetuximab, head and neck cancers, anaphylaxis, anti- α Gal IgE, pharmacokinetics, toxicity, survival, dose-response relationship.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	<i>vii</i>
<i>Résumé</i>	<i>ix</i>
<i>Résumé en anglais</i>	<i>xi</i>
<i>Table des matières</i>	<i>xiii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>xix</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xxi</i>
<i>Abréviations</i>	<i>xxv</i>
<i>Publications et manuscrits de la thèse (et autres publications dans la thématique)</i>	<i>xxvii</i>
<i>Cheminement de la thèse : de la clinique à la biologie et l'espoir d'un retour à la clinique</i>	1
1. INTRODUCTION	3
1.1. Généralités sur les cancers des VADS.....	5
1.1.1. Epidémiologie.....	5
1.1.2. Anatomopathologie.....	6
1.1.3. Topographie et classifications.....	6
1.1.4. Traitements.....	8
1.1.4.1. Maladie locorégionale / Maladie métastatique.....	8
1.1.4.2. Stratégies et modalités thérapeutiques.....	9
1.2. Anticorps monoclonaux thérapeutiques et cas particulier du cetuximab...13	13
1.2.1. Anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	13
1.2.2. Mode d'action du cetuximab.....	16
1.2.3. Indications et posologie du cetuximab.....	18
1.2.4. Effets indésirables du cetuximab.....	19
1.2.5. Méthodes de mesure des concentrations sanguines des anticorps monoclonaux.....	20
1.2.5.1. Généralités.....	20
1.2.5.2. Cas du cetuximab.....	22
1.3. Réactions à la perfusion d'anticorps thérapeutiques et cas particulier du cetuximab (Rôle des IgE anti- α 3Gal).....	23
1.3.1. Réactions à la perfusion.....	23
1.3.1.1. Généralités.....	23
1.3.1.2. Clinique et gradation.....	24
1.3.1.3. Mécanismes et immunogénicité.....	27
1.3.1.4. Prévalence.....	28
1.3.2. Cas du cetuximab.....	30
1.3.2.1. Circonstances.....	30
1.3.2.2. Incidence.....	30
1.3.2.3. IgE et anti- α 3Gal.....	32
1.3.2.3.1. Généralités et mécanismes.....	32
1.3.2.3.2. Facteurs influençant la production d'IgE anti- α 3Gal.....	35
1.3.2.3.3. Relation avec le cetuximab.....	36
1.3.3. Prise en charge du choc et mesures de précautions.....	42
1.4. Pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques.....	44

1.4.1. Généralités.....	44
1.4.2. Mécanismes impliqués dans la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux.....	45
1.4.2.1. Absorption des anticorps monoclonaux.....	46
1.4.2.2. Elimination des anticorps monoclonaux.....	46
1.4.2.2.1. Captation par endocytose.....	46
1.4.2.2.2. Rôle du FcRn dans l'élimination et la distribution.....	46
1.4.2.2.3. Elimination après fixation sur la cible.....	48
1.4.3. Modélisation pharmacocinétique par approche non-compartimentale..	49
1.4.3.1. Aire sous la courbe.....	49
1.4.3.2. Demi-vie.....	50
1.4.3.3. Clairance.....	50
1.4.4. Modélisation pharmacocinétique par approche compartimentale.....	50
1.4.4.1. Modèle monocompartimental avec élimination d'ordre 1.....	51
1.4.4.2. Modèle bicompartmental avec constantes de transfert d'ordre 1...	52
1.4.4.3. Modèles avec élimination saturable.....	55
1.4.4.3.1. Modèle mécanistique TMDD.....	55
1.4.4.3.2. Élimination de type Michaelis-Menten.....	57
1.4.4.3.3. Élimination d'ordre 0.....	57
1.4.4.4. Principe de l'estimation des paramètres d'un modèle pharmacocinétique.....	58
1.4.4.4.1. Approche individuelle.....	59
1.4.4.4.2. Approche de population.....	59
1.4.5. Modélisation pharmacocinétique des anticorps monoclonaux.....	65
1.4.5.1. Dose-dépendance et élimination non-linéaire.....	66
1.4.5.2. Facteurs de variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique...66	66
1.4.5.2.1. Facteurs démographiques et biologiques.....	67
1.4.5.2.2. Immunisation.....	67
1.4.5.3. Pharmacocinétique des anticorps anti-EGFR.....	67
1.4.6. Relations dose-réponse et concentration-réponse du cetuximab.....	69
1.5. Principe de la simulation.....	70
2. MATERIELS-METHODES ET RESULTATS.....	71
2.1. Objectifs.....	73
2.2. Phase II randomisée TREMLIN.....	75
2.2.1. Chimiothérapie d'induction et préservation laryngée.....	75
2.2.2. Rationnel de l'essai TREMLIN et objectifs.....	79
2.2.3. Patients, traitements et méthodes.....	80
2.2.4. Résultats.....	84
2.2.5. Conclusion.....	86
2.3. Dépistage prétraitemen : Recherche des IgE anti- α 3Gal.....	87
2.3.1. Techniques de dosage des IgE anti- α 3Gal.....	87
2.3.2. Mise au point de l'analyse.....	89
2.3.2.1. Sélection de sérum tests.....	89
2.3.2.2. Mise au point du dosage.....	89
2.3.3. Résultats et comparaison du test développé au test commercial.....	93

2.3.3.1. Dans une cohorte de donneurs de sang.....	93
2.3.3.2. Dans la cohorte de patients ORL.....	96
2.3.4. Conclusion.....	100
2.4. Monitoring per-traitement : Pharmacocinétique.....	101
2.4.1. Définition de la population et des traitements.....	101
2.4.2. Mesure des concentrations sériques du cetuximab.....	104
2.4.3. Analyse de la pharmacocinétique du cetuximab.....	106
2.4.3.1. Outils informatiques.....	106
2.4.3.2. Choix de l'approche de modélisation.....	106
2.4.3.3. Choix du modèle structural et du modèle de variabilité interindividuelle.....	106
2.4.3.4. Choix du modèle d'erreur résiduelle.....	107
2.4.3.5. Sélection des covariables significatives.....	107
2.4.3.6. Résultats obtenus.....	108
2.4.4. Analyse des effets indésirables cutanéomuqueux et de la survie.....	115
2.4.4.1. Paramètres étudiés.....	115
2.4.4.2. Résultats obtenus.....	116
2.4.4.2.1. Survie sans progression.....	117
2.4.4.2.2. Survie globale.....	122
2.4.5. Conclusion.....	127
2.5. Simulation d'une administration de cetuximab toutes les 2 ou 3 semaines.....	129
2.5.1. Rappel.....	129
2.5.2. Méthode.....	130
2.5.3. Résultats obtenus.....	132
2.5.4. Conclusion.....	135
3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	137
4. CONCLUSION.....	145
5. BIBLIOGRAPHIE.....	149
6. PUBLICATIONS.....	165

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification générale T des tumeurs des VADS.

Tableau 2 : Classification générale N des tumeurs des VADS.

Tableau 3 : Classification générale par stades des tumeurs des VADS.

Tableau 4 : Principales manifestations cliniques des réactions à la perfusion.

Tableau 5 : Classification des réactions à la perfusion.

Tableau 6 : Comparaison des grades de gravité de l'anaphylaxie et du syndrome de libération cytokinique selon le NCI-CTCAE version 4.

Tableau 7 : Caractéristiques des réactions à la perfusion.

Tableau 8 : Incidence et circonstances de survenue des réactions sévères à la perfusion d'anticorps monoclonaux aux Etats-Unis [42].

Tableau 9 : Incidence des réactions à la perfusion d'anticorps monoclonaux rapportée dans les essais cliniques européens [42].

Tableau 10 : Expression de l'épitope α 3Gal, de l' α 1,3 galactosyltransférase (α 3GT) et des anti- α 3Gal chez les mammifères.

Tableau 11 : Caractéristiques des patients randomisés dans l'essai TREMLIN après chimiothérapie d'induction.

Tableau 12 : Caractéristiques des patients ayant présenté une réaction d'hypersensibilité grave au cetuximab et analysés en rétrospectif.

Tableau 13 : Récapitulatif des antigènes oligosaccharidiques utilisés pour la mise au point de la technique.

Tableau 14 : Concentrations d'IgE spécifiques (en kUA/L) mesurées dans les sérums après réaction d'hypersensibilité au cetuximab en fonction de l'antigène utilisé.

Tableau 15 : Mesure des IgE anti- α 3Gal dans une cohorte de donneurs de sang avec les tests développé (70BP) et commercial (bTG): Prévalence des IgE anti- α 3Gal IgE en fonction de l'âge, du sexe, du groupe sanguin et des marqueurs d'atopie (IgE Totale et Phadiatop[®]).

Tableau 16 : Caractéristiques de la cohorte ORL testée pour l'anaphylaxie.

Tableau 17 : Caractéristiques des deux tests dans la cohorte ORL testée pour l'anaphylaxie.

Tableau 18 : Répartition de la positivité ou de la négativité des 2 tests en fonction de la survenue ou non d'une réaction anaphylactique.

Tableau 19 : Caractéristiques de la cohorte de patients ORL inclus dans l'analyse pharmacocinétique du cetuximab.

Tableau 20 : Valeurs estimées des paramètres pharmacocinétique du cetuximab dans la cohorte des patients avec cancers des VADS.

Tableau 21 : Grades des toxicités chez les patients traités par radiothérapie pour un cancer localement avancé des VADS (N = 21).

Tableau 22 : Quantiles des distributions des AUC cumulées, de la clairance globale et des concentrations résiduelles à 84 jours en fonction de la posologie, pour 5 000 patients virtuels.

Liste des Figures

Figure 1 : Prise en charge des cancers épidermoïdes de la cavité buccale opérables.

Figure 2 : Prise en charge des cancers épidermoïdes de l'oropharynx opérables.

Figure 3 : Prise en charge des cancers épidermoïdes du larynx.

Figure 4 : Prise en charge des cancers épidermoïdes de l'hypopharynx.

Figure 5 : Traitement des carcinomes des VADS métastatiques.

Figure 6 : Structure générale d'une IgG1κ.

Figure 7 : Rôle de la portion Fc dans le mode d'action des anticorps se fixant sur un antigène membranaire.

Figure 8 : Différents degrés d'humanisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques.

Figure 9 : L'EGFR est constitué de trois domaines : un domaine intracellulaire qui possède une activité tyrosine kinase, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire subdivisé en quatre sous-domaines (I, II, III et IV).

Figure 10 : Principes des trois formes de technique ELISA.

Figure 11 : Incidence des réactions à la perfusion aux Etats-Unis pour différents anticorps monoclonaux et pour des agents antinéoplasiques conventionnels [11].

Figure 12 : Incidence des réactions à la perfusion de cetuximab en fonction des zones géographiques aux Etats-Unis [53].

Figure 13 : Comparaison des structures des antigènes de groupe sanguin A et B et de l'épitope α 3Gal - d'après une figure de Commins et al. [55].

Figure 14 : Noyau de base trimannosyle des N-Glycannes.

Figure 15 : Définition des trois types de N-Glycannes.

Figure 16 : Exemples d'antennes de glycanne (Antigènes A et B, épitope α 3Gal).

Figure 17 : Structure et glycosylation du cetuximab.

Figure 18 : Résultats du dosage des IgE anti-cetuximab dans le sérum de 76 patients et de 462 témoins - Reproduction de la figure 1 de l'article de Chung et al. [67].

Figure 19 : Concentrations d'IgE dirigées contre la molécule de cetuximab et ses différents fragments, contre le rituximab et contre les IgG de souris - d'après l'article de Chung et al. [67].

Figure 20 : Relation dose-concentration-effet d'un médicament.

Figure 21 : Rôle du FcRn dans la protection des IgG de la dégradation et dans leur transport bidirectionnel à travers la cellule endothéliale.

Figure 22 : Modèle à un compartiment où D est la dose de médicament administrée, V le volume de distribution.

Figure 23: Modèle à deux compartiments où D est la dose de médicament administrée, V1 et V2 les volumes de distribution, k10 la constante d'élimination d'ordre 1, k12 et k21 les constantes de distribution.

Figure 24 : Modèle à deux compartiments où D est la dose de médicament administrée, $V1$ et $V2$ les volumes de distribution, CL et Q les clairances d'élimination et de distribution.

Figure 25: Représentation d'un modèle TMDD où C est la concentration du médicament libre, R est la cible libre et RC est le complexe cible-médicament.

Figure 26 : Modèle à un compartiment avec élimination de type Michaelis-Menten.

Figure 27 : Clairance du médicament en fonction de sa concentration.

Figure 28 : Modèle de covariable.

Figure 29 : Visualisation de l'erreur résiduelle.

Figure 30 : Diagramme CONSORT de l'essai TREMLIN.

Figure 31 : Survie globale des patients répondeurs à la chimiothérapie d'induction dans l'essai TREMLIN.

Figure 32 : Principe du dosage des IgE spécifiques par la technique ImmunoCapTM.

Figure 33 : Corrélation entre les deux tests (bTG et 70BP) chez les donneurs de sang.

Figure 34 : Corrélation entre les deux tests (bTG et 70BP) chez les patients ORL.

Figure 35 : Étapes de la technique ELISA de dosage du cetuximab.

Figure 36 : Concentrations de cetuximab observées vs. concentrations prédictes chez quatre patients au moyen d'un modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0.

Figure 37 : Concentrations de cetuximab observées chez des patients traités pour cancer ORL vs. concentrations prédictes au moyen d'un modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0.

Figure 38 : Clairance d'élimination en fonction de la concentration de cetuximab.

Figure 39 : Survie sans progression (PFS) des 34 patients traités par cetuximab pour leurs cancers des VADS.

Figure 40 : Survie sans progression (PFS) des 34 patients selon le statut métastatique ou non des patients.

Figure 41 : Hazard ratio de la clairance globale du cetuximab sur la PFS des 34 patients.

Figure 42 : Survie sans progression (PFS) des 34 patients selon la clairance globale du cetuximab dichotomisée sur la médiane (0,747 L/jour).

Figure 43 : Survie sans progression (PFS) selon la radiodermite.

Figure 44 : Survie sans progression (PFS) selon la mucite.

Figure 45 : Survie sans progression (PFS) selon l'intensité de la folliculite.

Figure 46 : Survie globale (OS) des 34 patients traités par cetuximab pour leurs cancers des VADS.

Figure 47 : Survie globale (OS) des 34 patients selon le statut métastatique ou non des patients.

Figure 48 : Hazard ratio de la clairance globale du cetuximab sur la survie globale des 34 patients.

Figure 49 : Survie globale (OS) des 34 patients selon la clairance globale du cetuximab dichotomisée sur la médiane (0,744 L/jour).

Figure 50 : Survie globale (OS) selon la radiodermite.

Figure 51 : Survie globale (OS) selon la mucite.

Figure 52 : Survie globale (OS) selon l'intensité de la folliculite.

Figure 53 : AUC du cetuximab simulées avec trois posologies différentes ayant la même dose cumulée sur trois semaines.

Figure 54 : Clairance globale du cetuximab simulées avec trois posologies différentes.

Figure 55 : Concentrations résiduelles à 84 jours du cetuximab simulées avec trois posologies différentes.

Abréviations

-2LL	-2Ln-vraisemblance
5-FU	5-Fluorouracile
α	Pente de décroissance de la phase de distribution d'un modèle bicompartimental
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AIC	Critère d'Information d'Akaïke
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AUC	Aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (<i>Area under the concentration-time versus curve</i>)
AUC_n	AUC normalisée à la dose
ASCO	American Society of Clinical Oncology
Asn	Asparaginase
β	Pente de décroissance de la phase d'élimination d'un modèle bicompartimental
BDL	Base De Langue
BSA	Body Surface Area = Surface Corporelle
C	Concentration de médicament
CE	Carcinome Epidermoïde
CELA	Carcinome Epidermoïde Localement Avancé
CEM	Carcinome Epidermoïde Métastatique
CL	Clairance systémique
CT	Chimiothérapie
CTX	Cetuximab
D	Dose
Da	Dalton : Unité de masse atomique $\approx 1,66054 \cdot 10^{-27}$ kg
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique. Aussi appelé HER1 ou c-ErbB-1 (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FO	Fonction Objective
HAMA	Human Anti-Mouse Antibodies
HPV	Human Papilloma Virus
HSI	HyperSensibilité Immédiate
HSR	Réactions d'HyperSensibilité
Ig	Immunoglobuline. Chez l'Homme, elles sont de classe A, D, E, G ou M : IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM
IMC	Index de Masse Corporelle
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
IV	Intraveineuse (administration)
JAK2	<i>Janus Kinase2</i>
k_{l0}	Constante d'élimination d'ordre 1 à partir du compartiment 1

k_{12}	Constante de transfert d'ordre 1 du compartiment 1 vers le compartiment 2
k_{21}	Constante de transfert d'ordre 1 du compartiment 2 vers le compartiment 1
k_a	Constante d'absorption d'ordre 1
k_{Da}	KiloDalton
k_t	Constante de transfert d'ordre 1 entre compartiments de transit
LA	Localement Avancé
MAPK	Kinases activées par des agents mitogènes (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MM	Michaelis-Menten
NCI CTCAE	National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Oto-Rhino-Laryngologique
OS	Survie globale (<i>Overall survival</i>)
PFS	Survie sans progression (<i>Progression-free survival</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase (<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)
PK	Pharmacocinétique (<i>Pharmacokinetics</i>)
PK-PD	Relation pharmacocinétique-pharmacodynamique (<i>Pharmacokinetic-Pharmacodynamic relationship</i>)
Q	Clairance de distribution
RCC	RadioChimiothérapie Concomitante
σ	Écart-type
SAG	Sillon AmygdaloGlosse
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
τ	Intervalle de temps entre deux administrations
T	Durée de la perfusion
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TGF α	Facteur de croissance transformant alpha (<i>Transforming growth factor-alpha</i>)
TK	Tyrosine kinase
TMDD	Elimination liée à la cible (<i>Target-mediated drug disposition</i>)
TV	Valeur typique d'un paramètre (<i>Typical value</i>)
$t_{1/2}$	Demi-vie. Dans le cas d'un modèle bicompartimental, $t_{1/2}\alpha$ = demi-vie de distribution et $t_{1/2}\beta$ = demi-vie d'élimination
UCNT	Undifferentiated Carcinoma Nasopharyngeal Type
V	Volume de distribution (V_{SS} , V_1 , V_2)
VADS	Voies Aéro-Digestives Supérieures

Publications et manuscrits de la thèse

- I. Lefebvre JL, **Pointreau Y**, Rolland F, Alfonsi M, Baudoux A, Sire C, de Raucourt D, Malard O, Degardin M, Tuchais C, Blot E, Rives M, Reyt E, Tourani JM, Geoffrois L, Peyrade F, Guichard F, Chevalier D, Babin E, Lang P, Janot F, Calais G, Garaud P, Bardet E.

Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMLIN randomized phase II study.

J Clin Oncol 2013; 31: 853-9.

- II. **Pointreau Y**, Commins SP, Calais G, Watier H, Platts-Mills TA.

Fatal infusion reactions to cetuximab: role of immunoglobulin e-mediated anaphylaxis.

Comment on “Fatal infusion reaction to cetuximab: the need for predictive risk factors and safer patient selection”.

J Clin Oncol 2012; 30: 334.

- III. **Pointreau Y**, Fréneaux C, Bejan-Angoulvant T, Watier H.

Anticorps thérapeutiques et réactions à la perfusion : cas de l'anaphylaxie au cetuximab et facteurs prédictifs.

In: Médecine personnalisé en cancérologie digestive – Vers un traitement à la carte. 2013; 193-206. Springer-Verlag editors, Paris, France.

- IV. **Pointreau Y**, Azzopardi N, Ternant D, Calais G, Paintaud G.

Cetuximab pharmacokinetics influences overall survival in head and neck cancer patients.

Manuscrit soumis

- V. **Pointreau Y**, Fréneaux C, Bejan-Angoulvant T, Ternant D, Calais G, Watier H.

Clinical usefulness of anti- α Gal IgE assays for cetuximab-mediated anaphylaxis in head and neck cancer.

Manuscrit rédigé.

- VI. **Pointreau Y**, Azzopardi N, Ternant D, Calais G, Paintaud G.

Influence of infusion intervals on cetuximab concentrations: a simulation study in head and neck cancers.

Manuscrit rédigé.

Autres publications en rapport avec la thématique de la thèse

Publications sur le cetuximab:

1- Guigay J, Fayette J, Dillies AF, Sire C, Kerger JN, Tennevet I, Machiels JP, Zanetta S, **Pointreau Y**, Bozec Le Moal L, Henry S, Schilf A, Bourhis J. *Cetuximab, docetaxel, and cisplatin as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a multicenter, phase II GORTEC study.*

Ann Oncol 2015; 26: 1941-7.

2- Modesto A, Faivre JC, Granel-Brocard F, Tao YG, **Pointreau Y**.

Evaluation and management of acute radiation dermatitis.

Cancer Radiother 2012; 16: 726.

Publications premier ou deuxième auteur sur les cancers de la tête et du cou :

1- Fayette J, **Pointreau Y**, Bourhis J, Lefebvre JL.

Squamous cell carcinoma of the hypopharynx and larynx: evidence-based care.

Bull Cancer 2014; 101: 438-44.

2- **Pointreau Y**, Atean I, Calais G.

How does TPF improve survival over PF?

Lancet Oncol 2011; 12: 420-1.

3- **Pointreau Y**, Atean I, Fayette J, Calais G, Lefebvre JL.

Induction chemotherapy in head and neck cancer: a new paradigm.

Anticancer Drugs 2011; 22: 613-20.

4- Lafond C, **Pointreau Y**, Debelleix C, Denis F, Calais G, Bourhis J, Thariat J.

Oropharyngeal cancer.

Cancer Radiother 2010; 14: S34-42.

5- Debelleix C, **Pointreau Y**, Lafond C, Denis F, Calais G, Bourhis JH.

Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: larynx and pharynx.

Cancer Radiother 2010; 14: 301-6.

6- Fesneau M, **Pointreau Y**, Chapet S, Martin L, Pommier P, Alfonsi M, Laguerre B, Feham N, Berger C, Garaud P, Calais G.

Concomitant chemoradiotherapy using carboplatin, tegafur-uracil and leucovorin for stage III and IV head-and-neck cancer: results of GORTEC Phase II study.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010; 76: 154-63.

7- **Pointreau Y**, Garaud P, Chapet S, Sire C, Tuchais C, Tortochaux J, Faivre S, Guerrif S, Alfonsi M, Calais G.

Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation.

J Natl Cancer Inst 2009; 101: 498-506.

8- **Pointreau Y**, Calais G.

Non surgical treatment approach for head and neck cancer.

Rev Prat 2006; 56: 1677-83.

Cheminement de la thèse : de la clinique à la biologie et l'espoir d'un retour à la clinique

La pratique clinique de la cancérologie des tumeurs des voies aéro-digestives supérieures (VADS) m'a permis très tôt d'utiliser le cetuximab au sein du service d'oncologie radiothérapie du CHRU de Tours; j'ai pu constater, notamment dans le cadre de l'essai TREMLIN, que certains patients faisaient des réactions aiguës à la première perfusion dont des chocs anaphylactiques et que d'autres le supportaient bien. Parmi ces derniers, les toxicités étaient variables mais l'efficacité l'était également avec des succès et des échecs aux traitements.

A partir de ces constatations éveillant ma curiosité, des questionnements sont naturellement venus et auront fini par déboucher sur une réflexion plus approfondie pour aboutir au projet de cette thèse de science.

Dans les résultats, après avoir rappelé les données de l'**essai TREMLIN** ayant fait l'objet d'un travail personnel important (collection et analyses des données puis participation active à la publication) mais également le sujet de ma soutenance de mémoire de DES en cancérologie, le texte de cette thèse aura le cheminement décrit ci-après :

Pourquoi certains patients font-ils des chocs à la première injection ? Cette question et surtout les éléments de réponse seront l'objet de la partie sur le **dépistage prétraitemen**t avec la recherche menée sur les IgE anti- α 3Gal par la mise au point d'un test prédictif (et sa comparaison à un test commercial) et de son application à deux cohortes (donneurs de sang et patients). L'étape suivante étant de revenir à la clinique en « dépistant » les patients à risque dans la pratique quotidienne, avant injection du cetuximab.

Pourquoi y a-t-il une différence d'efficacité/toxicité entre les patients ? Cette partie sera l'objet du **monitoring per-traitement** des patients recevant du cetuximab avec l'analyse pharmacocinétique et la recherche de facteurs influençant les données de survie. L'étape suivante étant de revenir à la clinique en « adaptant » la posologie du cetuximab aux paramètres individuels du patient.

Pourquoi ne pas envisager des injections de cetuximab toutes les trois semaines plutôt que toutes les semaines chez les patients métastatiques recevant par ailleurs leurs chimiothérapies toutes les trois semaines ? Cette question sera l'objet de la description des analyses *in silico* avec les **simulations pharmacocinétiques**. L'idée à terme est d'améliorer le confort des patients en limitant leurs venues dans les établissements de santé.

Les trois approches autour du cetuximab étant différentes en termes de cohortes et de méthodologies, les objectifs généraux seront décrits en premier puis les éléments de matériels et méthodes seront rappelés directement avec les résultats pour chacun des trois grands thèmes.

1. INTRODUCTION

1.1. GENERALITES SUR LES CANCERS DES VADS

1.1.1. EPIDEMIOLOGIE

En 2012, les cancers des VADS ont représentés 686 328 nouveaux cas dans le monde dont 300 373 cancers des lèvres et de la cavité buccale, 156 877 cancers du larynx, 142 387 cancers du pharynx et 86 691 cancers du nasopharynx ; soit près de 5% des cancers dans le monde.

Les données épidémiologiques sont actualisées et consultables sur le site <http://globocan.iarc.fr> qui donne l'incidence, la mortalité et la prévalence à 5 ans des cancers dans le monde, par sexe et par pays.

Sa répartition n'est pas homogène en métropole. Ainsi les départements du Nord et de l'Ouest de la France ont une incidence plus élevée que les départements du Sud de la France. Au niveau européen, la France est le pays où l'incidence des cancers des VADS est parmi les plus élevées.

L'incidence est globalement en baisse grâce à la réduction de la consommation de tabac et d'alcool mais elle s'est récemment stabilisée en raison des cancers liés à l'infection virale à Human Papilloma Virus (HPV) notamment dans les cancers de l'oropharynx. Ces derniers ont globalement un meilleur pronostic et notamment une meilleure sensibilité à la radiothérapie et aux traitements systémiques.

Les cancers des VADS touchent encore actuellement plus fréquemment les hommes que les femmes avec un sex ratio de 9/1. Cependant, l'incidence est en augmentation chez les femmes et en diminution chez les hommes.

La mortalité liée à ces cancers chez l'homme a augmenté jusqu'à la fin des années 1970 et diminue depuis les années 1980 d'environ 5-6% par an (de façon variable selon les localisations et les méthodes d'estimation). Chez la femme, la mortalité est en faible diminution (entre 0 et 2%). La surmortalité masculine est de 6,1 pour les cancers du pharynx et de la cavité buccale et de 9,9 pour les cancers du larynx.

1.1.2. ANATOMOPATHOLOGIE

On distingue :

- Les lésions précancéreuses (leucoplasies et érythroplasies principalement). Il s'y associe un degré variable de kératose, d'hyperplasie ou de dysplasie. Le risque d'évolution vers une tumeur invasive est faible en cas de kératose (<5%) et plus élevé en cas d'hyperplasie ou de dysplasie (environ 15%). Il augmente avec la sévérité de la dysplasie.
- Les lésions invasives. Pour les tumeurs de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx, il s'agit de carcinomes épidermoïdes très majoritairement (>90%), de carcinomes à cellules géantes, de carcinomes lymphoépithéliaux et de carcinomes des glandes salivaires accessoires. Sur le plan histologique, il s'agit d'une prolifération épithéliale maligne reproduisant de manière plus ou moins fidèle l'épithélium malpighien. Le pathologiste précise le degré de différenciation tumorale (peu, moyennement ou bien différencié), ainsi que la variante histologique, parmi les types recensés par l'Organisation Mondiale de la Santé ou OMS (carcinome verruqueux, carcinome épidermoïde basaloïde, carcinome épidermoïde papillaire, carcinome à cellules fusiformes, carcinome épidermoïde acantholytique, carcinome adénosquameux). Pour les tumeurs du nasopharynx, on distingue 3 principaux types de tumeurs épithéliales malignes selon la présence de kératinisation (carcinomes non kératinisants comprenant les carcinomes indifférenciés (UCNT typique) et les carcinomes différenciés non kératinisants et les carcinomes épidermoïdes kératinisants et enfin les carcinomes épidermoïdes basaloïdes.

1.1.3. TOPOGRAPHIE ET CLASSIFICATIONS

L'anatomie de la sphère des VADS est complexe et comporte différentes unités qui peuvent chacune correspondre à la localisation des tumeurs primitives. Il est essentiel de reporter lors de l'endoscopie, systématique dans le cadre du bilan de ces tumeurs, les localisations tumorales sur un schéma anatomique simplifié.

On distingue globalement les tumeurs de la cavité buccale, de l'oropharynx, du nasopharynx, de l'hypopharynx et du larynx. Font aussi partie des tumeurs ORL les tumeurs cutanées de la face et des lèvres ainsi que les tumeurs des sinus de la face.

Le bilan initial associe également une description précise des aires ganglionnaires cervicales répondant à une classification internationale.

Les classifications sont complexes et spécifiques pour chaque localisation tumorale. Ne sont donc décrites ici que les grandes généralités des classifications (en dehors des cancers du nasopharynx non abordés).

Le schéma global de classification du stade T (Tableau 1) est commun à trois localisations (cavité buccale, oropharynx et hypopharynx), avec des stades T1, T2 et T3 séparés selon que la tumeur a un diamètre de 2 cm ou moins, entre 2 et 4 cm ou plus de 4 cm de plus grand diamètre.

Tableau 1. Classification générale T des tumeurs des VADS.

T0	Absence de tumeur primitive
T1	Tumeur \leq 2 cm de plus grand diamètre
T2	Tumeur >2 cm mais ≤ 4 cm de plus grand diamètre
T3	Tumeur > 4 cm de plus grand diamètre
T4	Adapté à chaque site selon l'envahissement des structures adjacentes

D'une manière générale, la distinction entre N0, N1 (un ganglion < 3 cm de diamètre), N2 (un ou plusieurs ganglions entre 3 et 6 cm) et N3 (ganglion > 6 cm de diamètre) est vraie pour toutes les localisations des carcinomes épidermoïdes des VADS (Tableau 2). Les cancers de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx, du larynx et les adénopathies cervicales de primitif inconnu seront décrits selon cette classification.

Tableau 2. Classification générale N des tumeurs des VADS.

N0	Pas de signe d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
N1	Métastase dans un seul ganglion lymphatique homolatéral ≤ 3 cm dans son plus grand diamètre
N2a	Métastase unique dans un seul ganglion homolatéral > 3 cm mais ≤ 6 cm
N2b	Métastases homolatérales multiples toutes ≤ 6 cm
N2c	Métastases bilatérales ou controlatérales ≤ 6 cm
N3	Métastase dans un ganglion > 6 cm dans son plus grand diamètre

La présence de métastase ou non classe les tumeurs M0 ou M1.

Sur la base de cette classification T, N et M, un regroupement par stades est possible (Tableau 3).

Tableau 3. Classification générale par stades des tumeurs des VADS.

Stade global	Stade T	Stade N	Stade M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1-3	N1	M0
IVA	T4a	N0-1	M0
	T1-3	N2	M0
	T4a	N2	M0
IVB	T4b	N0-2	M0
	tt T	N3	M0
IVC	tt T	tt N	M1

1.1.4. TRAITEMENTS

Les traitements feront suite au diagnostic initial précis intégrant la classification TNM du patient (panendoscopie, biologie, scanner cervicothoracique et selon les cas IRM et TEP-scanner) mais prendront aussi en compte son état général en intégrant ses comorbidités et son statut nutritionnel.

L'approche multimodale est fondamentale en cancérologie ORL et nécessite une parfaite collaboration entre chirurgiens, oncologues radiothérapeutes et oncologues médicaux. La discussion du traitement de chaque patient doit être conduite au sein des réunions de concertation pluridisciplinaire afin de définir la meilleure stratégie thérapeutique.

1.1.4.1. Maladie locorégionale / Maladie métastatique

En cas de maladie locorégionale même très évoluée, les traitements seront conduits à visée curatrice. Seront alors utilisées la chirurgie et/ou la radiothérapie (voir curiethérapie). Pendant la radiothérapie, pourront être associés de la chimiothérapie à base de sels de platine ou du cetuximab.

En cas de maladie métastatique d'emblée ou secondairement, le traitement reposera quasi exclusivement sur l'utilisation de traitements systémiques tels que la chimiothérapie et le cetuximab. L'objectif sera alors de prolonger la survie des patients avec un niveau de qualité de vie le meilleur possible.

1.1.4.2. Stratégies et modalités thérapeutiques

La chirurgie reste un standard dans la prise en charge de ces tumeurs (notamment de la cavité buccale), mais les autres armes thérapeutiques telles que la radiothérapie, la chimiothérapie ou encore les thérapies ciblées (actuellement correspondant uniquement au cetuximab) ont pris une part de plus en plus importante. Différentes stratégies sont envisagées selon le site tumoral, le stade et l'état général :

- chirurgie exclusive (ou radiothérapie) dans certaines tumeurs de petite taille
- chirurgie première puis radiothérapie adjuvante +/- chimiothérapie concomitante
- chimiothérapie première suivie d'une radiothérapie (parfois potentialisée)
- radiothérapie combinée ou non à un traitement systémique concomitant (chimiothérapie ou cetuximab) notamment en cas d'impossibilité chirurgicale.

Les figures suivantes (Figures 1, 2, 3, 4 et 5) synthétisent les principes généraux selon les localisations tumorales.

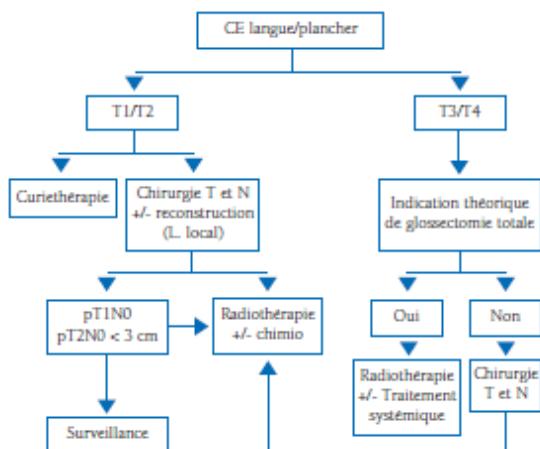


Figure 1. Prise en charge des cancers épidermoïdes de la cavité buccale opérables.

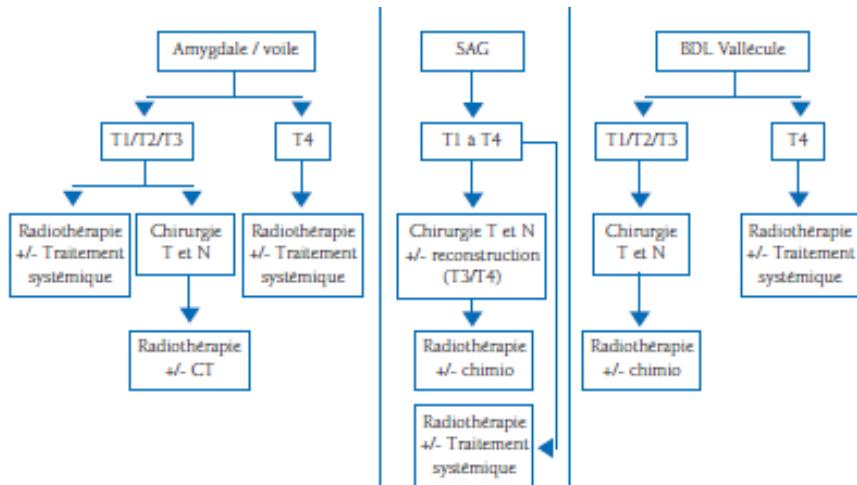


Figure 2. Prise en charge des cancers épidermoïdes de l'oropharynx opérables.

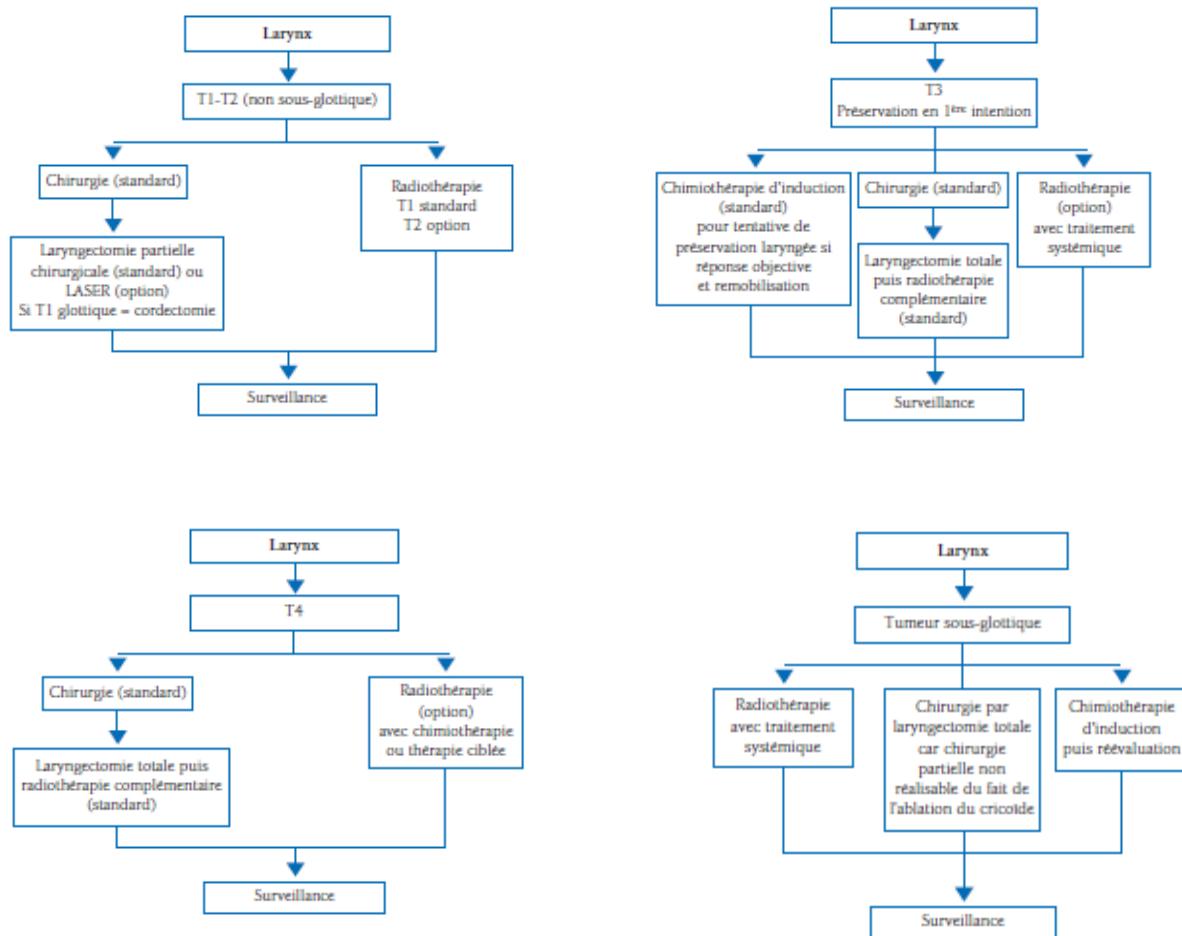
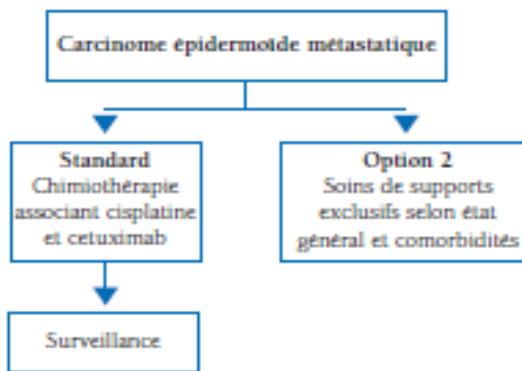
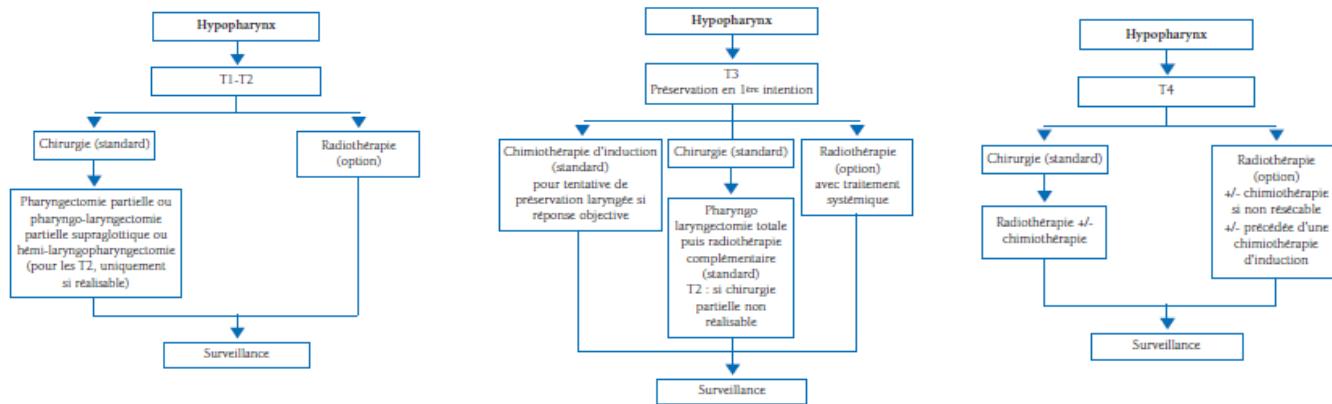


Figure 3. Prise en charge des cancers épidermoïdes du larynx.



1.2. ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES ET CAS PARTICULIER DU CETUXIMAB

1.2.1. ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES

Les anticorps sont des glycoprotéines également appelées immunoglobulines (Ig) qui sont produits exclusivement par les lymphocytes B.

Les anticorps thérapeutiques peuvent être classés en trois grands groupes : les Ig polyvalentes, les Ig polyclonales et les anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux recombinants, utilisés en thérapeutique depuis les années 1980, ont révolutionné la prise en charge de nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies inflammatoires et certaines maladies immunologiques. En 1975, Kohler et Milstein ont réussi à fusionner une cellule lymphoïde normale et une cellule myélomateuse pour créer un hybridome, lignée cellulaire immortelle capable de produire un anticorps monoclonal de manière durable [1]. Ces anticorps monoclonaux sont tous identiques et reconnaissent le même épitope sur un antigène. Aujourd’hui, la production industrielle d’anticorps monoclonaux repose sur la technologie de l’acide désoxyribonucléique recombinant et utilise le plus souvent des cellules de mammifères [2,3]. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés sont principalement des IgG1κ constitués de quatre chaînes polypeptidiques : la chaîne légère d’isotype κ (« L » pour *Light*, de 25 kDa) est constituée de deux domaines : un domaine variable (Vκ) et un domaine constant (Cκ) ; la chaîne lourde d’IgG1 (d’isotype γ1 ou « H » pour *Heavy*, de 50 kDa) est constituée de 4 domaines : un domaine variable (VH) et trois domaines constants « C » (CH1, 2 et 3) et d'une région charnière située entre les domaines CH1 et CH2. Chaque domaine est formé d'environ 110 acides aminés. Les domaines variables des chaînes lourdes et légères comportent chacun trois régions hypervariables, impliquées dans la spécificité de reconnaissance de l’antigène, en alternance avec des régions charpentes. Les domaines constants sont d’origine humaine et les domaines variables (VH et Vκ, « V », correspondant à l’extrémité N terminale et se fixant sur l’antigène) sont d’origine murine. La masse moléculaire totale est d'environ 150 kDa. La charnière comporte un site de clivage enzymatique par la papaïne qui permet de fragmenter l’anticorps monoclonal en deux fragments Fab se liant à l’antigène et un fragment cristallisable Fc, d'environ 50 kDa chacun.

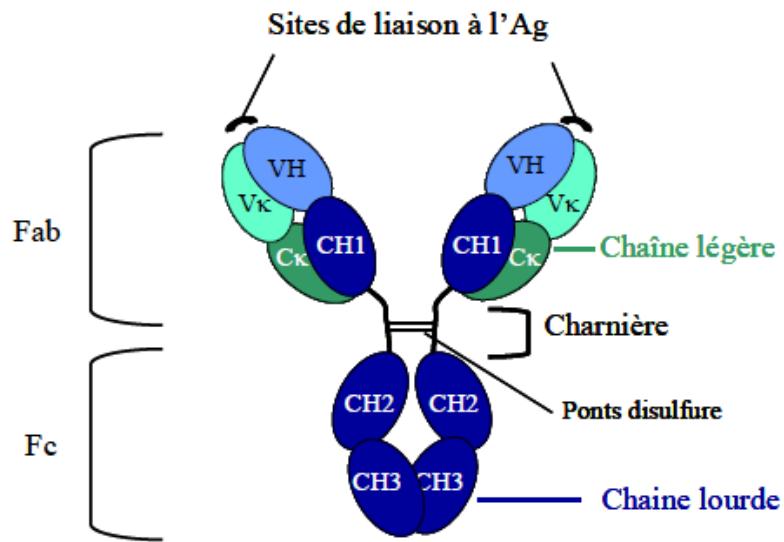


Figure 6. Structure générale d'une IgG1 κ - Les chaînes lourdes (H) sont représentées en bleu, les chaînes légères (κ) en vert. V : domaine variable, C : domaine constant.

La portion Fc a la capacité de fixer le complément (fraction C1q) et de recruter des cellules effectrices porteuses de récepteurs Fc γ R (Figure 7) [4].

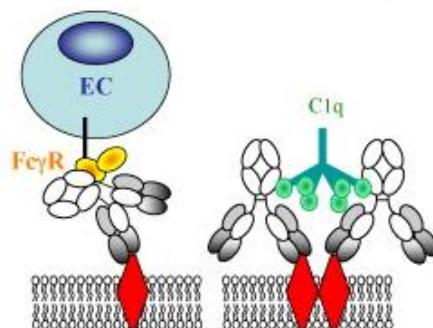


Figure 7. Rôle de la portion Fc dans le mode d'action des anticorps se fixant sur un antigène membranaire. Grâce à leur portion Fc, les IgG1 peuvent recruter des cellules porteuses de récepteurs Fc γ R ou la fraction C1q du complément [4].

Les premiers anticorps monoclonaux produits étaient intégralement murins. Trois inconvénients ont limité leur utilisation en thérapeutique [5] :

- Une élimination trop rapide de l'organisme, entraînant une faible efficacité.
- Une faible capacité de la portion Fc murine à recruter les cellules effectrices humaines ou à activer la voie classique du complément.
- Une forte immunogénicité avec la production rapide d'anticorps anti-anticorps thérapeutique chez tous les patients traités.

Les progrès en biotechnologie ont permis de développer des anticorps chimériques, puis humanisés et enfin totalement humains, pour tenter de pallier à ces inconvénients. Les anticorps chimériques comme le rituximab ou le cetuximab possèdent des régions variables murines et des régions constantes humaines. Pour les anticorps humanisés comme le bevacizumab ou le trastuzumab, seules les régions hypervariables sont d'origine animale. Enfin, les anticorps monoclonaux humains (panitumumab) ne possèdent aucune région animale (Figure 8).

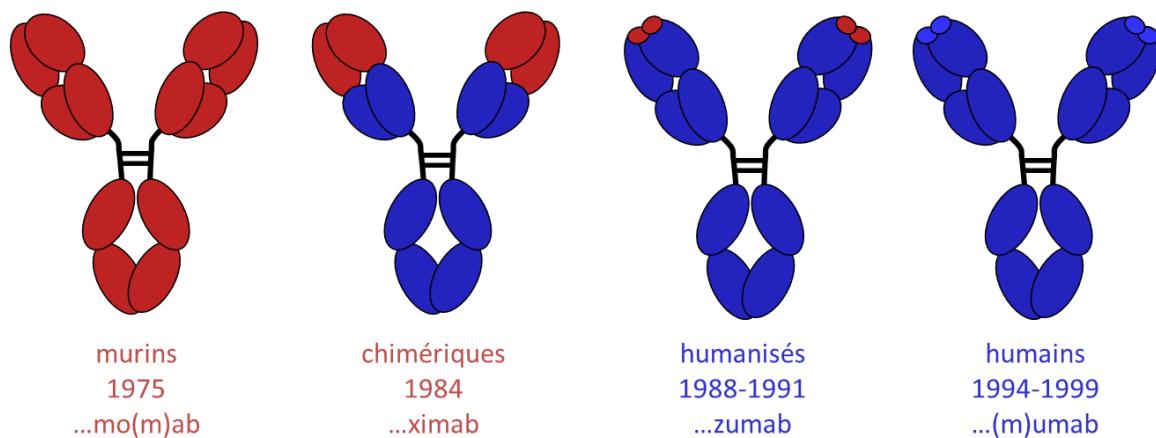


Figure 8. Différents degrés d'humanisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques. En rouge, les portions animales, en bleu, les portions humaines. -o- : murin ; -xi- : chimérique ; -zu- : humanisé et -u- : humain.

1.2.2. MODE D'ACTION DU CETUXIMAB

Le cetuximab a été mis sur le marché en 2004 sous le nom d'Erbxitux®. Il a été développé par ImClone® et est commercialisé en Europe par la société Merck KGaA® (Erbxitux®, Merck-Serono, Darmstadt, Allemagne). C'est un anticorps monoclonal chimérique de type IgG1κ.

L'EGFR (pour Epidermal Growth Factor Receptor, récepteur du facteur de croissance épidermique) est une glycoprotéine membranaire appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (TK) erbB. L'EGFR est physiologiquement exprimé par de nombreux types cellulaires dans les tissus épithéliaux, comme la peau ou les follicules pileux, et est surexprimé ou stimulé de manière excessive dans certains cancers [6]. En cas de suractivation, la voie de l'EGFR participe aux processus tumoraux en augmentant la croissance cellulaire, en favorisant la prolifération et en diminuant les mécanismes d'apoptose, mais aussi en stimulant l'angiogenèse et les processus d'invasion tumorale. Cette suractivation peut être induite par la surexpression de l'EGFR ou par l'apparition de mutations somatiques activatrices de molécules agissant en aval de l'EGFR (exemple : mutation de KRAS). Dans ce dernier cas, l'activation des voies de signalisation intracellulaire devient totalement indépendante de la fixation du ligand au récepteur [7,8]. À l'état physiologique, l'EGFR est présent à la surface des cellules majoritairement dans une conformation compactée. Une petite fraction d'entre eux se trouve sous forme relâchée, permettant la fixation des ligands comme l'EGF ou le TGFα sur les domaines I et III [9]. Cette fixation permet alors de démasquer le domaine II qui interagit avec le domaine II d'un autre récepteur de la superfamille des EGFR (Figure 9).

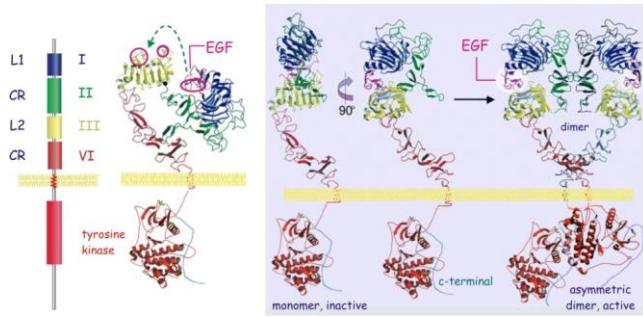


Figure 9: L'EGFR est constitué de trois domaines : un domaine intracellulaire qui possède une activité tyrosine kinase, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire subdivisé en quatre sous-domaines (I, II, III et IV). La fixation du ligand sur les sous-domaines I et III permet de démasquer le domaine II et donc la dimérisation avec un autre récepteur.

La dimérisation des récepteurs entraîne l'activation de leurs domaines tyrosine kinase intracellulaires. Plusieurs voies de transduction du signal sont alors activées [10]. La voie Ras/Raf-MAPK aboutit à l'activation de facteurs de transcription via ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), à l'origine de la prolifération cellulaire [11]. L'EGFR phosphorylé peut également activer la PI3 kinase (PI3K), qui mène à un signal anti-apoptotique [12]. L'EGFR possède également un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire via JAK2/STAT3 [13]. D'autres voies de signalisation sont impliquées dans l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse.

Le cetuximab se lie de façon spécifique et compétitrice à l'EGFR, avec une affinité plus grande que ses ligands naturels, et est donc un antagoniste de ce récepteur. Il se fixe sur le domaine III de l'EGFR, empêchant ainsi le démasquage du domaine II et donc la dimérisation des récepteurs. Après fixation, une internalisation du complexe cetuximab-EGFR a également été décrite [14]. De nombreuses études *in vitro* ont montré que le cetuximab inhibe ainsi des phénomènes d'angiogenèse et de prolifération cellulaire et qu'il entraîne une restauration de l'apoptose [15].

Le cetuximab agit avant tout en antagonisant l'EGFR, mais un autre mode d'action potentiel est lié à sa portion Fc déclenchant des mécanismes de cytotoxicité dépendante du complément et de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC), dirigées contre les cellules exprimant l'EGFR [16]. Une influence du polymorphisme du récepteur Fc γ RIIIA sur

l'efficacité du cetuximab dans le cancer colorectal métastatique est suspectée mais des données récentes semblent contredire cette hypothèse [17] et le rôle potentiel de l'ADCC.

1.2.3. INDICATIONS ET POSOLOGIE DU CETUXIMAB

Le cetuximab est indiqué dans le traitement des patients ayant un carcinome épidermoïde des VADS, en association avec la radiothérapie en cas de maladie localement avancée [18,19], ou en association avec la chimiothérapie à base de platine en cas de maladie récidivante et/ou métastatique [20].

Le cetuximab est également indiqué dans le traitement des patients ayant un cancer colorectal métastatique, en association avec une chimiothérapie, ou en monothérapie après échec d'un traitement à base d'oxaliplatine ou d'irinotecan ou en cas d'intolérance à l'irinotecan [21-25].

A l'inverse du cancer colorectal métastatique où le cetuximab a une utilisation restreinte aux tumeurs exprimant l'EGFR et ayant des gènes KRAS et NRAS de type sauvages (wild-type, environ 40% des tumeurs sont mutées) [26], toutes les tumeurs des VADS surexpriment l'EGFR et la recherche du statut RAS n'est pas recommandée compte tenu d'un taux de mutation de l'ordre de 3.5 à 6% seulement [27,28].

Dans ces deux indications, le cetuximab est injecté par voie intraveineuse (IV) toutes les semaines. La dose de charge recommandée est de 400 mg/m² pour la première perfusion qui se déroule sur deux heures. La dose de maintenance hebdomadaire est de 250 mg/m².

Dans le cancer colorectal métastatique, la chimiothérapie associée est administrée toutes les deux semaines alors que la posologie de l'Autorisation de mise sur le marché (AMM) du cetuximab est d'une injection hebdomadaire. Pour éviter au patient d'être hospitalisé toutes les semaines, l'injection d'une double dose (500 mg/m²) de cetuximab toutes les deux semaines est couramment pratiquée.

De nouvelles indications du cetuximab comme dans le traitement du cancer cutané sont également activement explorées [29]. Les données récentes présentées à l'ASCO 2015 semblent montrer un intérêt en association à la radiothérapie pour les cancers cutanés localement avancés non opérables [30].

Plusieurs essais de phase II et de phase III ont évalué l'intérêt du cetuximab en association à une chimiothérapie à base de sels de platine en 1^{ère} ligne de traitement de cancers bronchiques non à petites cellules, avancés ou métastatiques. Les résultats de ces essais montrent un

bénéfice modeste en termes de survie globale (OS pour Overall Survival) et de survie sans progression (PFS pour Progression-Free Survival), associé à une toxicité non négligeable. Ces données ne montrant pas de rapport bénéfice/risque suffisant, le cetuximab n'a pas obtenu d'AMM dans cette indication. De même, le cetuximab n'a pas démontré d'intérêt thérapeutique pour les cancers du col de l'utérus et du canal anal.

1.2.4. EFFETS INDESIRABLES DU CETUXIMAB

Les principaux effets indésirables du cetuximab sont cutanés (rash, folliculite, lésions unguérales ou péri-unguérales). Ces manifestations sont dues à l'inhibition de l'EGFR des cellules de l'épiderme, elles témoignent ainsi de l'activité du médicament. Ces réactions sont fréquentes mais le pronostic vital est rarement engagé. En revanche, les réactions à la perfusion, moins fréquentes, peuvent être fatales. Une réaction sévère impose l'arrêt immédiat et définitif du traitement par cetuximab et peut nécessiter un traitement d'urgence.

Les autres effets indésirables, bien que peu fréquents sont : asthénie, malaise, nausées, fièvre, céphalées, douleurs abdominales, constipation, diarrhée, anorexie, dyspnée, toux, prurit, stomatite, œdème, insomnie et hypomagnésémie.

1.2.5. METHODES DE MESURE DES CONCENTRATIONS SANGUINES DES ANTICORPS MONOCLONAUX

1.2.5.1. Généralités

Afin de pouvoir réaliser des études pharmacocinétiques, il faut disposer d'une technique analytique validée. La première étape de la validation est la sélection d'une méthode de dosage appropriée à l'analyte (ici, il s'agit d'un anticorps monoclonal) et à sa matrice (le sérum). Compte tenu de sa masse moléculaire élevée de 150 KDa, la mesure de sa concentration ne peut pas être réalisée avec les mêmes techniques que celles utilisées pour les médicaments «classiques» de masse plus faible. Par ailleurs, le sérum, matrice dans laquelle l'analyse est habituellement réalisée, contient de nombreuses protéines et notamment d'autres anticorps. La méthode de dosage doit donc permettre d'estimer des concentrations sériques d'anticorps monoclonaux pouvant être inférieures à 1 mg/L alors qu'ils sont mélangés avec des IgG1 endogènes ayant des concentrations de l'ordre de 9 g/L [31]. Plusieurs méthodes de dosage des anticorps monoclonaux sont décrites dans la littérature [32]. Elles ont été précédemment décrites dans les thèses des Docteurs Ternant et Azzopardi et sont reprises ci-après :

Résonance plasmonique de surface (BiaCore®) : Cette technique consiste à envoyer un faisceau de lumière monochromatique polarisée sur une puce sur laquelle un antigène-cible a été fixé, puis à mesurer les variations de l'angle de réflexion du faisceau dues à la modification de masse liée à la fixation antigène – anticorps. Cette méthode est très précise, mais trop lourde pour envisager son utilisation en routine [33].

Chromatographie : Ces méthodes sont prometteuses, car elles sont très rapides. Cependant, le développement est encore limité en raison de la matrice (le sérum) qu'il faut préalablement immuno-purifier.

Bio-analyses : Ces techniques permettent d'estimer les concentrations d'anticorps monoclonaux en mesurant leur activité biologique *ex vivo*. La variabilité des cellules cibles utilisées peut cependant poser des problèmes de reproductibilité, ce qui rend cette approche inadaptée en recherche clinique ou en suivi thérapeutique.

Immunoanalyses : Cet ensemble de techniques permet de quantifier les concentrations d'anticorps monoclonaux grâce à l'interaction antigène-anticorps. La méthode E.L.I.S.A. (ou

ELISA pour Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) [34], comme les méthodes précédemment citées, peut être utilisée sous plusieurs formes et est actuellement la référence. Parmi les principales méthodes ELISA, on peut citer (Figure 10) :

- ELISA directe : La détection directe utilise un anticorps marqué ou couplé à une enzyme qui reconnaît directement l'antigène fixé. Cette technique ne permet pas de quantifier l'anticorps mais est utilisée pour la coloration immuno-histochimique de tissus ou de cellules.
- ELISA indirecte : La détection indirecte est la plus utilisée et principalement pour le dosage des anticorps monoclonaux [35]. Dans ce cas, l'antigène fixé est reconnu par l'anticorps primaire que l'on veut doser. Un anticorps secondaire marqué ou couplé à une enzyme va ensuite reconnaître spécifiquement l'anticorps primaire.
- ELISA sandwich : Cette technique permet le dosage d'un antigène. Dans ce cas, un anticorps de capture, reconnaissant l'antigène à doser est fixé au fond du puits. L'antigène se fixe sur l'anticorps, puis un anticorps secondaire marqué ou couplé à une enzyme, reconnaît un autre épitope de l'antigène.

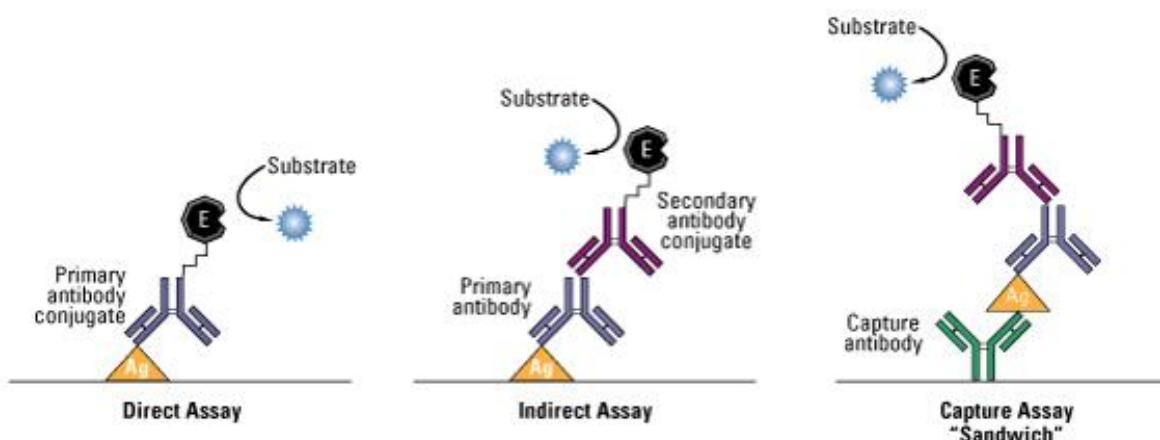


Figure 10. Principes des trois formes de technique ELISA.

Si elle n'est pas répétable et reproductible, la méthode de dosage devient une source d'imprécision et biaise de façon importante l'analyse pharmacocinétique.

1.2.5.2. Cas du cetuximab

Deux types de techniques de dosage ont été rapportées pour mesurer les concentrations sanguines de cetuximab chez l'Homme ou l'animal : les méthodes ELISA et la résonnance plasmonique de surface (BiaCore®). En routine, la méthode ELISA sera préférée. Les limites basses de quantification des méthodes ELISA sont de l'ordre de 0,1 mg/L et les étapes de validation ont été précédemment décrites [36].

1.3. REACTIONS A LA PERFUSION D'ANTICORPS THERAPEUTIQUES ET CAS PARTICULIER DU CETUXIMAB (RÔLE DES IGE ANTI- α 3GAL)

Bien que généralement mieux tolérés et moins toxiques que les médicaments anticancéreux conventionnels, les anticorps monoclonaux peuvent induire des effets indésirables et notamment des réactions d'hypersensibilité pouvant aller jusqu'à mettre en jeu le pronostic vital. Les mécanismes de ces réactions restent en général mal élucidés et les réactions graves peu prévisibles.

1.3.1. REACTIONS A LA PERFUSION

1.3.1.1. Généralités

Pratiquement tous les agents antinéoplasiques administrés par voie intraveineuse peuvent être associés à des réactions plus ou moins évocatrices d'hypersensibilité appelées "réactions à la perfusion". Les réactions à la perfusion ou d'hypersensibilité (HSR) sont définies par l'apparition d'une réaction clinique pendant ou dans l'heure suivant la fin de la perfusion. Ce terme est souvent imprécis et peut se résumer au terme de « choc ». Il regroupe la véritable réaction d'hypersensibilité de type I selon la classification de Gell et Coombs médiée par les IgE (anaphylaxie) mais également les réactions immunitaires de mécanisme moins précis encore appelées « syndrome de libération de cytokines ». L'anaphylaxie fait suite à une phase de sensibilisation, c'est-à-dire à l'introduction préalable dans l'organisme d'une substance étrangère provoquant la synthèse d'IgE. L'allergène va être pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes et présenté aux lymphocytes T CD4. Les lymphocytes T CD4 vont engendrer une réponse immunitaire de type Th2 en sécrétant des interleukines (principalement IL-4, IL-10 et IL-13) qui vont provoquer la commutation de classe et la synthèse d'IgE spécifiques de l'allergène par les lymphocytes B. Ces IgE vont se fixer par leur portion Fc au Fc ϵ RI (récepteur de haute affinité pour les IgE) des mastocytes et des polynucléaires basophiles [37]. Cette exposition initiale n'entraîne pas de symptômes. A l'occasion de la réintroduction de cette substance ou d'une substance proche, il y a libération de médiateurs vasoactifs puissants, c'est la phase de déclenchement. Les réactions anaphylactoïdes ressemblent par définition aux réactions anaphylactiques sans mise en évidence d'IgE ; elles font probablement intervenir des médiateurs capables de faire dégranuler des mastocytes, comme les anaphylatoxines libérées secondairement par l'action du complément. Toutes ces

réactions peuvent conduire au choc, c'est-à-dire à une insuffisance circulatoire aiguë qui retentit gravement sur la perfusion tissulaire en compromettant les échanges gazeux et énergétiques cellulaires, et qui nécessite une prise en charge en urgence.

1.3.1.2. Clinique et gradation

Les manifestations cliniques du « syndrome de libération de cytokines » et du choc anaphylactique véritable présentent des similarités, rendant difficile l'interprétation ; les principales manifestations cliniques de ces deux entités sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4. Principales manifestations cliniques des réactions à la perfusion.

	Principales manifestations cliniques de réaction à la perfusion
Cardiovasculaires	Douleur thoracique, palpitations, hypotension, tachycardie ou bradycardie, arythmie, œdème, ischémie, infarctus, arrêt cardiaque
Neurologiques	Céphalées, confusion, trouble de la conscience
Cutanéomuqueuses	Rash, prurit, urticaire, flush, angiœdème, œdème conjonctival
Digestives	Nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, ballonnements
Pulmonaires	Toux, dyspnée, congestion nasale, tachypnée, bronchospasme, sibilants, œdème laryngé, stridor, cyanose, syndrome de détresse respiratoire
Endocrinologiques	Sueurs, fièvre, impression de chaleur
Autres	Perte d'urine, fatigue, arthralgies, myalgies, anxiété, sensation de mort imminente

La gradation de la sévérité de ces symptômes se fait à l'aide de différentes classifications dont la plus utilisée est résumée dans le tableau 5.

Tableau 5. Classification des réactions à la perfusion.

Grade I (légère)	<ul style="list-style-type: none"> • Rougeur ou rash transitoires • Fièvre induite $< 38^{\circ}\text{C}$
Grade II (modérée)	<ul style="list-style-type: none"> • Rougeur ou rash • Urticaire • Dyspnée • Fièvre induite $\geq 38^{\circ}\text{C}$
Grade III (sévère)	<ul style="list-style-type: none"> • Bronchospasme symptomatique avec ou sans urticaire • Nécessité de médicaments par voie parentérale • Œdème ou angioœdème allergique • Hypotension
Grade IV (mettant en jeu le pronostic vital ou séquelles)	<ul style="list-style-type: none"> • Anaphylaxie (choc)
Grade V (décès)	<ul style="list-style-type: none"> • Décès

La classification internationale de référence est celle du NCI (CTCAE-CTCAE) version 4 qui se résume à trois grades pour l'anaphylaxie et qui doit être employée, bien que très peu différente de celle du tableau 5 qui reste davantage connue (Tableau 6) [38]. Cette même classification contient cinq grades pour le syndrome de libération de cytokines (Tableau 6).

Tableau 6. Comparaison des grades de gravité de l'anaphylaxie et du syndrome de libération cytokinique selon le NCI-CTCAE version 4.

	Syndrome de libération de cytokines	Anaphylaxie
Grade I	<ul style="list-style-type: none"> • Réaction légère • Ne nécessitant pas l'arrêt de la perfusion • Ne nécessitant aucun traitement 	<ul style="list-style-type: none"> • Non classé
Grade II	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessitant un traitement ou une interruption de la perfusion mais avec une réponse rapide à un traitement symptomatique (ex : antihistaminiques, AINS, morphiniques, remplissage intraveineux) • Traitement prophylactique pendant moins de 24 heures 	<ul style="list-style-type: none"> • Non classé
Grade III	<ul style="list-style-type: none"> • Prolongée (ex : absence de réponse rapide au traitement symptomatique et/ou à une brève interruption de la perfusion) • Réapparition des symptômes après amélioration initiale • Nécessitant une hospitalisation en raison de conséquences cliniques (ex : insuffisance rénale, infiltrats pulmonaires) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bronchospasme symptomatique ; avec ou sans urticaire • Nécessité d'un traitement parentéral • Œdème ou angioœdème lié à l'allergie • Hypotension
Grade IV	<ul style="list-style-type: none"> • Mise en jeu du pronostic vital • Nécessité d'une prise en charge en urgence 	<ul style="list-style-type: none"> • Mise en jeu du pronostic vital • Nécessité d'une prise en charge en urgence
Grade V	<ul style="list-style-type: none"> • Décès 	<ul style="list-style-type: none"> • Décès

Les caractéristiques de l'anaphylaxie et du syndrome de libération de cytokines sont comparées dans le tableau 7.

Tableau 7. Caractéristiques des réactions à la perfusion.

	Syndrome de libération de cytokines	Anaphylaxie
Contact antérieur	Non	Oui ou inconnu
Incidence	Haute	Faible
Atopie	Non	Oui ou non
Facteurs de risque	Taille tumorale (en particulier cellules cibles circulantes)	Inconnue
Survenue	Première perfusion	Première perfusion ou suivantes
Délai	Plusieurs minutes	Immédiat
Pré-tests biologiques	Non	Parfois
Retraitements	Possible	Non

1.3.1.3. Mécanismes et immunogénicité

Les réactions anaphylactiques nécessitent conceptuellement un contact préalable avec un antigène, suivi d'une réponse immunitaire et de la production d'IgE dirigées contre cet antigène, et allant se fixer par leur portion Fc sur les polynucléaires basophiles circulants et les mastocytes dans les tissus. Lors d'un nouveau contact avec l'antigène, le pontage des IgE déjà présentes sur les basophiles et les mastocytes déclenche une dégranulation de ces cellules, libérant des médiateurs dont l'histamine et des enzymes (tryptase, hyaluronidase, chymase...) et activant la production de médiateurs néoformés, tels que des leucotriènes.

L'histamine est la principale responsable de la réaction anaphylactique, par stimulation de récepteurs H1 (bronchoconstriction, vasodilatation, perméabilité capillaire) et H2 (sécrétion

d'acide gastrique et de mucus bronchique, augmentation du péristaltisme intestinal, vasodilatation artérielle pulmonaire et coronaire, effets chronotropes et inotropes positifs).

Le système immunitaire humain peut réagir aux anticorps d'origine murine comme à des antigènes étrangers et synthétiser des anticorps dirigés contre différents sites de l'anticorps monoclonal. Ainsi, il a été observé que 100 % des patients développent des anticorps contre un anticorps murin [39]. Ces anti-anticorps sont appelés HAMAs pour "Human Anti-Mouse Antibodies". On comprend dès lors aisément que les anticorps murins ne constituent pas le format d'anticorps idéal pour des injections répétées lors de traitements en oncologie [40]. L'évolution de la conception des anticorps thérapeutiques s'est donc orientée vers une humanisation des anticorps murins afin de réduire leur immunogénicité (Cf. supra Figure 8).

1.3.1.4. Prévalence

En dehors du rituximab, l'incidence des réactions à la perfusion des anticorps monoclonaux est la même que celle observée pour d'autres agents antinéoplasiques comme les taxanes et les dérivés du platine (Figure 11) [41].

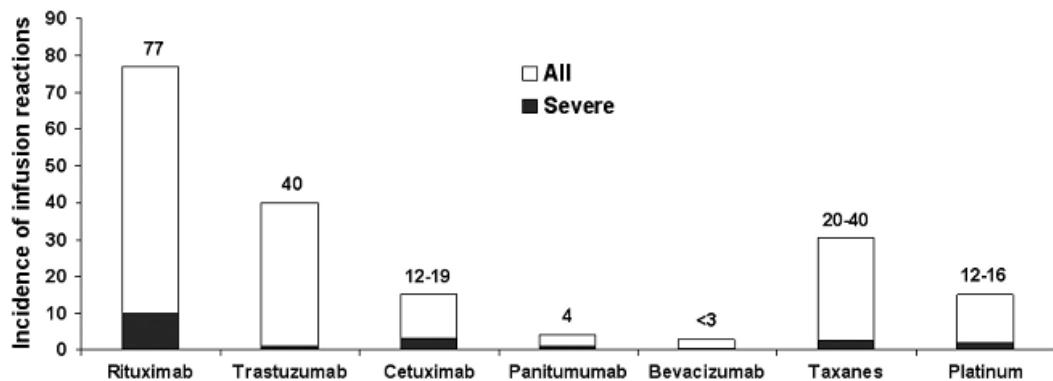


Figure 11. Incidence des réactions à la perfusion aux Etats-Unis pour différents anticorps monoclonaux et pour des agents antinéoplasiques conventionnels [41].

Aux Etats-Unis, les réactions à la perfusion sont relativement fréquentes, particulièrement lors de la première perfusion : 77 % pour le rituximab ; 40 % pour le trastuzumab ; 12 à 19 % pour le cetuximab et 4% pour le panitumumab. Ces réactions sont très souvent d'intensité faible à modérée. Les événements sévères sont rares avec une incidence inférieure à 5 % pour la plupart des anticorps. Ceux-ci surviennent principalement au cours de la première ou de la seconde perfusion (Tableau 8) [42]. Les décès dus à ces réactions restent exceptionnels [41,43].

Tableau 8. Incidence et circonstances de survenue des réactions sévères à la perfusion d'anticorps monoclonaux aux Etats-Unis [42].

Anticorps monoclonal	Type	Incidence des réactions à la perfusion de grades 3/4	Circonstances de survenue
Trastuzumab	IgG1 humanisée	< 1 %	la plupart à la première administration
Rituximab	IgG1 chimérique	7 %	80% lors de la première administration puis diminution lors des perfusions suivantes
Cétuximab	IgG1 chimérique	2 % - 5 %	> 90% dans les 15 premières minutes de la première administration
Panitumumab	IgG1 intégralement humaine	< 1 %	la plupart à la première administration
Bévacizumab	IgG1 humanisée	0,2 %	la plupart à la première administration

En Europe, comme aux Etats-Unis, les effets indésirables avec issue fatale (grade 5) sont exceptionnels (Tableau 9). Cependant, il existe de grandes différences dans les taux de réaction à la perfusion entre les différents essais européens. On ne sait pas si cette différence est due à des différences de sensibilité en fonction des régions géographiques, à des différences de prémédication ou à des différences de documentation et de déclaration des effets indésirables.

Tableau 9. Incidence des réactions à la perfusion d'anticorps monoclonaux rapportée dans les essais cliniques européens [42].

Anticorps monoclonal		Type de tumeur	Effectif	Réaction à la perfusion			Référence
				grade 1/2	grade 3/4	grade 5	
Chimérique	Cétuximab	Gastrique	52	0	0	1 (2 %)	Lordick 2007
		Œsophagien	32	0	0	0	Lordick 2008
		Colorectal	77	NR	5 (6 %)	0	Cluleanu 2008
		Colorectal	74	NR	1 (1 %)	0	Cluleanu 2008
		Gastrique	38	0	0	0	Pinto 2007
		Colorectal	43	6 (14 %)	1 (2 %)	0	Tabernero 2007
		Colorectal	49	NR	3 (6 %)	0	Arnold 2008
		Rectal	48	5 (10 %)	1 (2 %)	0	Rödel 2008
Humanisé	Matuzumab	Pancréatique	17	0	0	0	Graeven 2006
		Pulmonaire	18	1 (5 %)	0	0	Kollmannsberger 2006
	Trastuzumab	Varié	22	0	0	0	Vanhoefer 2004
		Mammaire	54	13,5 %	5,8 %	0	Joensuu 2006
		Mammaire	61	10 %	0	0	Joensuu 2006
		Mammaire	3388	NR	NR	0	Piccart 2005
	Bevacizumab	Mammaire	92	NR	1 (1 %)	0	Marty 2005
		Colorectal	197	15 (8 %)	6 (3 %)	0	Tol 2008
Intégralement humain	Panitumumab	Colorectal	56	NR	0	0	Gruenberger 2008
		Colorectal	229	1 (0,4 %)	0	0	Van Cutsem 2007
		Colorectal	176	1 (0,5 %)	0	0	Van Cutsem 2008
		Colorectal	903	4 (0,4 %)	0	0	Sienna 2008
		Colorectal	1097	3 (0,3 %)	0	0	Peeters 2008

Les réactions légères à modérées surviennent pendant ou peu de temps après la perfusion, principalement lors de la première perfusion du cetuximab. Environ 90 % des réactions sévères ont également lieu au cours de la première perfusion, principalement dans les premières minutes.

1.3.2.2. Incidence

Des réactions allergiques de type hypersensibilité immédiate (HSI) ont été décrites avec des fréquences de 1 à 10% chez les patients traités avec le cetuximab, dès la première injection [44], avec des fréquences encore plus élevées dans certaines zones géographiques aux Etats-Unis [45].

Des réactions sévères à la perfusion ont été retrouvées chez environ 3 % des patients traités par cetuximab pour un cancer colorectal [46,47] et chez 2 à 7 % des patients traités pour un cancer ORL [18,48,49]. Le fabricant du cetuximab indique une incidence globale de 3 % pour les réactions sévères à la perfusion, avec moins de 0,1 % de réactions fatales. Diverses études mettent en évidence des incidences du même ordre ou inférieures :

- en Europe, une étude de phase II pour le traitement du cancer colorectal menée sur 329 patients a mis en évidence 1,2 % de réactions de grade 3 ou 4 [21]
- aux Etats-Unis (états du Nord-Est et de la côte Ouest), une étude de phase II dans le traitement du cancer colorectal menée sur 80 patients n'a mis en évidence aucune réaction de grades 3 ou 4 [50]
- une étude menée en Europe, en Australie et en Asie sur 800 patients suivis pour cancer colorectal, dont 400 traités par cetuximab, n'a mis en évidence que 0,5 % de réactions de grade 3 ou 4 dans le groupe cetuximab [51].

Certaines études estiment cependant que les hypersensibilités sévères au cetuximab sont sous-estimées. Dans l'étude de Foley *et al.* [52], les auteurs estimaient que le taux de réaction à la perfusion de cetuximab nécessitant une intervention médicale serait deux à trois fois plus élevé que celui indiqué par le fabricant. Malgré ces discordances sur l'incidence globale, plusieurs études s'accordent sur le fait que l'incidence des réactions au cetuximab aux Etats-Unis est très hétérogène en fonction des zones géographiques. Dans la plus grande partie du pays, l'incidence est comprise entre 1 % et 3 %, notamment, en Californie et à Boston. Dans les Etats du sud-est comme l'Arkansas, le Tennessee ou la Caroline du Nord l'incidence est, en revanche, beaucoup plus élevée (entre 10 et 27 %, Figure 12) [53]. En 2006, O'Neil *et al.* [45] ont étudié 88 patients traités par cetuximab, 35 demeuraient en Caroline du Nord et 53 dans le

Tennessee. Sur ces 88 patients, 19 (22 %) ont présenté une réaction sévère (grade 3 à 4) à la première perfusion.

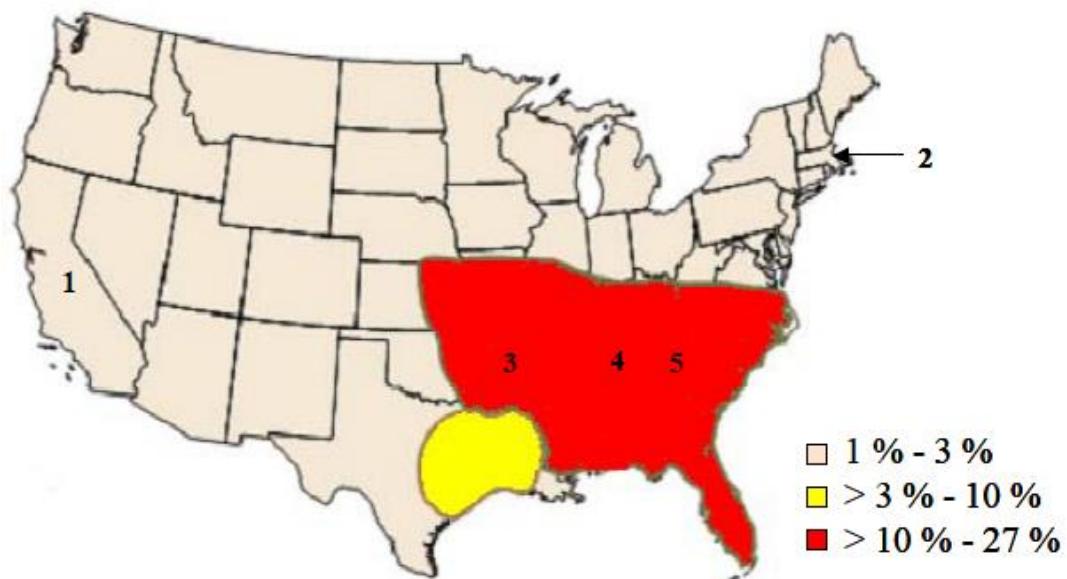


Figure 12. Incidence des réactions à la perfusion de cetuximab en fonction des zones géographiques aux Etats-Unis [53].

Quelques données d'incidence française sont disponibles et notamment par l'observatoire dédié au cancer Bretagne – Pays de la Loire qui a analysé les causes d'arrêt du cetuximab dans deux cohortes de patients, hors essais thérapeutiques. Dans la première cohorte de 670 patients traités par cetuximab en 2005 et 2006, 422 patients (63 %) ont dû arrêter le traitement dont 36 pour une toxicité, parmi lesquels 16 pour un choc / hypersensibilité / allergie, soit 2,4% des patients traités. Une deuxième cohorte a inclus 1700 patients traités par cetuximab en 2009 et 2010 ; sur les 630 (37 %) causes d'arrêt connues, 74 l'ont été pour toxicités dont 24 chocs / hypersensibilité / allergie, soit 1,4% des patients traités.

En France, une étude rétrospective sur les réactions à la perfusion de cetuximab a été menée à l'aide de la base de données de pharmacovigilance, fondées sur les déclarations spontanées [54]. Parmi les 602 cas sélectionnés, 374 réactions à la perfusion ont été retenues. Les facteurs de risques associés à l'anaphylaxie étaient l'indication (cancer des VADS versus colorectal : OR=2,70 (1,62-4,49)), la période où s'est produite la réaction avec une tendance à

l'augmentation depuis 2006, ce qui correspond sans doute à l'arrivée de l'AMM dans les cancers des VADS, et le cycle en cours (premier versus les suivants : OR=13,05 (8,05-21,15)).

1.3.2.3. IgE et anti- α 3GAL

1.3.2.3.1. Généralités et mécanismes

Les oligosaccharides sont capables de déclencher des réactions immunitaires ; les agglutinines dirigées contre les antigènes A et B des groupes sanguins en sont un bon exemple. La plupart des allergènes que nous inhalons ou ingérons sont des protéines glycosylées et leurs oligosaccharides peuvent être la cible d'une réponse IgE anti-glycannes. Les épitopes oligosaccharidiques étant présents sur un grand nombre de protéines provenant d'organismes différents et parfois phylogénétiquement très éloignés sont à l'origine d'une réactivité croisée très large. Ils sont fréquemment dénommés CCDs pour Cross-reactive Carbohydrate Determinant.

L'épitope α 3Gal est le premier épitope IgE de nature glycannique décrit dans des protéines de mammifères et qui présente un réel intérêt clinique. Depuis, ces IgE ont également été identifiées comme étant à l'origine de réactions anaphylactiques survenant après l'ingestion de viande (exemple : bœuf) [55]. Ces réactions allergiques à la viande sont dites retardées car les symptômes se manifestent 3 à 6 heures après l'ingestion, le temps nécessaire à l'antigène pour pénétrer les muqueuses. Elles n'en sont pas moins médiées par les IgE. Les réactions au cetuximab, au contraire, sont rapides car celui-ci est administré par voie intraveineuse et présente deux épitopes α 3Gal par molécule (une sur chaque domaine VH) permettant le pontage des IgE fixées sur les mastocytes. Les allergies à la viande, comme les allergies au cetuximab, sont observées plus fréquemment dans le sud-est des Etats-Unis que dans le reste du pays.

L'épitope α 3Gal n'a été que récemment reconnu comme cible d'IgE, mais il est connu depuis longtemps notamment comme facteur important dans les transplantations xénogéniques. Dès les années 1930, Karl Landsteiner reconnaît l'existence d'une molécule présente à la surface des cellules de mammifères qui mime les sucres du groupe sanguin B, et qui serait la cible d'anticorps agglutinants dans le sérum humain. Cette substance était probablement l'épitope α 3Gal, car celui-ci ne diffère de l'antigène du groupe sanguin B que par la présence d'un fucose en α 1,2 sur l'avant-dernier galactose (Figure 13) [55].

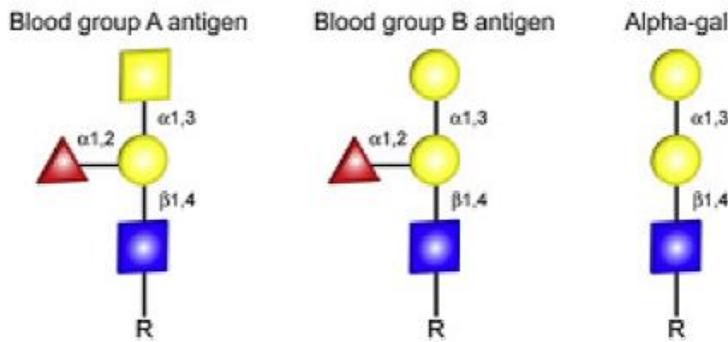


Figure 13. Comparaison des structures des antigènes de groupe sanguin A et B et de l'épitope α 3Gal - d'après une figure de Commins et al. [55]. L'antigène de groupe sanguin A et l'antigène de groupe sanguin B diffèrent au niveau du résidu terminal (GalNAc ou Gal). L'antigène de groupe sanguin B et l'épitope α 3 ne diffèrent que par la présence ou l'absence d'un fucose.▲

Parmi les mammifères, l'épitope α 3Gal est seulement absent chez l'Homme, les grands singes et les singes de l'Ancien Monde (Asie et Afrique). Il est exprimé chez tous les autres mammifères, y compris les prosimiens et singes du Nouveau Monde (Amérique Centrale et Amérique de Sud) [56,57] (Tableau 10).

Tableau 10. Expression de l'épitope α 3Gal, de l' α 1,3galactosyltransférase (α 3GT) et des anti- α 3Gal chez les mammifères.

Mammifères	Expression de l'épitope α 3Gal	Activité de l' α 3GT	Production d' anti- α 3Gal
Marsupiaux	+	+	-
Mammifères non-primates	+	+	-
Prosimiens	+	+	-
Singes du Nouveau Monde	+	+	-
Singes de l'Ancien Monde	-	-	+
Grands singes	-	-	+
Hommes	-	-	+

Cette distribution s'explique par l'inactivation, il y a environ 20 millions d'années, chez un ancêtre de tous les primates de l'Ancien Monde, du gène codant pour l'alpha1,3galactosyltransférase, l'enzyme qui synthétise l'épitope α 3Gal dans l'appareil de Golgi [58]. En accord avec le principe de Landsteiner "le système immunitaire produit des

anticorps contre les antigènes qui ne nous appartiennent pas" et du fait d'un contact précoce avec cet antigène ubiquitaire, tous les êtres humains produisent donc des anticorps contre l'épitope α 3Gal. Ces anticorps appelés anti- α 3Gal sont les anticorps naturels les plus abondants chez l'Homme, représentant environ 1 % des immunoglobulines du sérum humain [59-61].

Le disaccharide Gal α 3Gal est présent sur le lipopolysaccharide et la capsule polysaccharidique de nombreuses bactéries à gram négatif qui colonisent de façon physiologique l'intestin de l'Homme [62]. Selon toute vraisemblance, les bactéries intestinales sont responsables d'une stimulation antigénique continue pour la production des anti- α 3Gal [63], comme pour la production des agglutinines anti-A et anti-B des groupes sanguins [64]. Cependant, alors que les lymphocytes B avec une spécificité anti-A ou B ne synthétisent que des IgM, les lymphocytes B possédant une spécificité anti- α 3Gal peuvent produire des IgM [65] mais aussi des IgG [59], des IgA [66] et des IgE [67]. Il n'existe à l'heure actuelle dans la littérature aucune explication sur cette commutation de classe absente dans un cas (anti-A et anti-B) et présente dans l'autre (anti- α 3Gal). Si les IgE anti- α 3Gal n'ont été découvertes que récemment, les autres classes (IgG, IgM et IgA) ont été très étudiées dans le cadre de la xénotransplantation porc-homme. En effet, l'interaction entre les anti- α 3Gal humains et l'épitope α 3Gal exprimé par les cellules porcines constitue la principale barrière immunologique dans ce type de greffe. L'interaction entre les anti- α 3Gal et l'épitope α 3Gal active le complément, conduisant à un rejet suraigu du greffon porcin. Même si l'activation du complément est inhibée, les IgG anti- α 3Gal vont tout de même se lier à l'épitope α 3Gal des cellules greffées et induire leur destruction via le mécanisme d'ADCC conduisant au rejet du greffon après quelques semaines ou quelques mois [68]. La littérature relative à la xénotransplantation comporte donc de nombreuses publications relatives aux techniques de dosage des IgM, IgG et IgA anti- α 3Gal et aux techniques permettant d'épurer les sérum par adsorption ces immunoglobulines.

1.3.2.3.2. Facteurs influençant la production d'IgE anti- α 3GAL

O'Neil *et al.* [45] n'ont pas mis en évidence de relation entre la survenue d'une réaction sévère à la perfusion et l'âge, le sexe, l'ethnie ou le type de cancer. En revanche, ils ont mis en évidence une relation entre les réactions graves d'hypersensibilité au cetuximab et l'antécédent d'atopie : 29 % des patients avec un antécédent d'atopie ont présenté une réaction à la perfusion de grades 3 ou 4 contre 8 % de ceux sans antécédent d'atopie. Par ailleurs, toutes ces réactions sont survenues malgré une prémédication par antihistaminique H1 et corticoïdes.

Des facteurs environnementaux comme les morsures de tiques pourraient expliquer les disparités de fréquence des réactions d'HSI au cetuximab selon les zones géographiques [45,67,69]. En questionnant les patients, une forte relation avec les morsures de tiques est apparue, plus de 90 % des patients de Virginie ayant des IgE anti- α 3Gal rapportaient des piqûres de tiques ou d'aoûtats. De plus, dans une étude australienne [70], une relation entre des réactions aux morsures de tiques et l'allergie à la viande rouge a été mise en évidence ; parmi les 25 patients étudiés qui présentaient des réactions allergiques à la viande, autre tableau clinique s'expliquant par la présence d'IgE anti- α 3Gal, presque tous décrivaient des réactions locales importantes après morsure par des tiques. C'est donc la première hypothèse envisagée pour expliquer les cas aux Etats-Unis, même si les espèces de tiques ne sont pas les mêmes en Amérique et en Europe.

A l'heure actuelle, le mécanisme par lequel les morsures de tiques pourraient stimuler la synthèse d'IgE anti- α 3Gal n'est pas élucidé. L'une des hypothèses pourrait être que la tique, lors de la morsure, inocule des bactéries porteuses de la séquence Gal α 3Gal dans un contexte de morsure « allergisante », provoquant chez les atopiques la commutation des lymphocytes B producteurs d'IgM ou d'IgG anti- α 3Gal en lymphocytes B producteurs d'IgE anti- α 3Gal.

Chung *et al.* ont proposé des facteurs comme l'âge, le sexe, l'origine ethnique, des antécédents d'atopie, un cancer ORL ou des traitements concomitants (chimiothérapie ou radiothérapie) comme étant potentiellement favorisants de ce type de réactions, mais ils restent controversés [53,67,71].

Les cas d'anaphylaxie au cetuximab sortent du schéma classique de l'allergie puisqu'ils apparaissent lors de la première perfusion, en dehors de tout contact préalable avec l'allergène (ici, le cetuximab proprement dit).

1.3.2.3.3. Relation avec le cetuximab

Qu'est-ce que le cetuximab a de si particulier pour déclencher un tel phénomène, jusqu'ici inédit parmi les anticorps thérapeutiques?

Puisque les réactions sévères surviennent dans les premières minutes de la première perfusion, l'hypothèse est que les IgE anti-cetuximab préexisteraient avant tout contact avec le cetuximab.

Le cetuximab est produit dans la lignée cellulaire Sp2/0, une lignée de plasmocytes issue d'un myélome de souris. Les glycoprotéines IgG possèdent un site conservé de N-glycosylation au niveau de l'asparagine (Asn) 297 dans le domaine CH2 de la portion Fc [72,73]. Ce site est présent sur la molécule de cetuximab. Quinze à 20 % des IgG plasmatiques humaines normales possèdent en plus un ou plusieurs sites de N-glycosylation dans les domaines variables [74]. C'est aussi le cas du cetuximab qui possède un site sur le domaine variable de la chaîne lourde au niveau de la troisième région charpente, sur l'Asn 97, et un autre site sur le domaine variable de la chaîne légère, sur l'Asn 47 [75]. Ces deux sites de glycosylation sont caractéristiques du cetuximab car ils ne sont pas retrouvés dans les domaines variables des autres anticorps monoclonaux. Le site situé sur le domaine $V\kappa$ (Asn 47) du cetuximab n'est pas glycosylé. En revanche, les sites présents sur le domaine VH (Asn 97) et sur le fragment Fc (Asn 297) le sont. Tous les N-glycannes partagent le même noyau de base trimannosyle (Figure 14) [76]. La N-glycosylation est la liaison covalente d'un oligosaccharide sur le groupement NH₂ d'un résidu asparagine d'une protéine. C'est une modification post-traductionnelle, dépendante de l'équipement enzymatique de la cellule, variable d'une espèce à l'autre et au sein d'une espèce d'un tissu à l'autre. Les dernières étapes se déroulent dans l'appareil de Golgi.



Figure 14. Noyau de base trimannosyle des N-Glycannes.

En fonction notamment des contraintes structurales tridimensionnelles, d'autres sucres vont être ou non ajoutés sur le noyau. Des chaînes osidiques très diverses peuvent être attachées sur ce noyau. En fonction de leur nature, trois types de N-glycannes sont définis (Figure 15): le type oligomannosidique, le type hybride et le type complexe. Le type oligomannosidique et le type hybride résultent d'une démannosylation incomplète du noyau lors de la biosynthèse. Ils conservent des mannoses résiduels à leurs extrémités. Le type oligomannosidique n'est pas du tout démannosylé, alors que le type hybride, résultat d'une biosynthèse plus avancée, est partiellement démannosylé. Le troisième type de glycanne est dit "complexe", il est le résultat d'une biosynthèse aboutie : après démannosylation, des résidus N-acétyllactosaminyles ($\text{Gal}\beta4\text{GlcNAc}$) ont été fixés sur les mannoses du noyau. Les glycannes complexes possèdent ainsi de 2 à 5 antennes attachées au noyau. Chez l'Homme, la cinquième antenne, fixée sur le mannose en $\beta4$ est réduite au seul résidu GlcNAc, alors dit bissecteur.

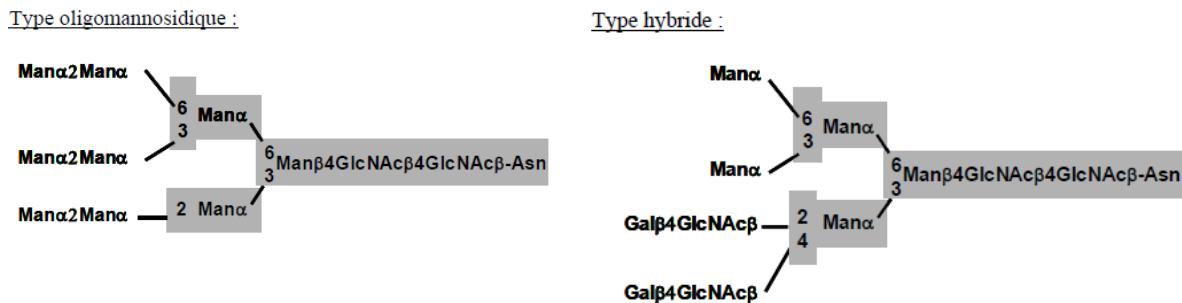
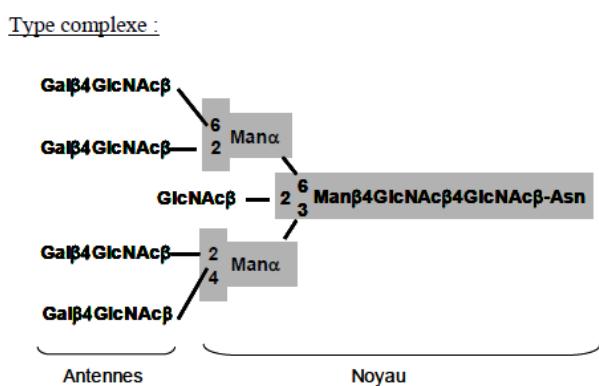


Figure 15. Définition des trois types de N-Glycannes.



Les antennes des glycannes complexes (et hybrides) sont toujours initiées par les disaccharides N-acétyllactosaminyles ($\text{Gal}\beta4\text{GlcNAc}$), sur lesquels peuvent ensuite être ajoutés d'autres sucres tels que des résidus Gal, GalNAc ou Fuc formant ainsi différentes épitopes (Figure 16). Peuvent aussi être ajoutés des acides sialiques (Neu5Ac chez l'Homme, Neu5Gc chez certains mammifères).

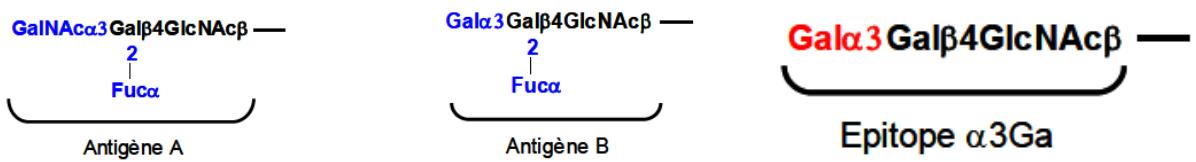


Figure 16. Exemples d'antennes de glycanne (Antigènes A et B, épitope α 3Gal).

Le site de N-glycosylation sur le fragment Fc du cetuximab est peu accessible aux enzymes de la glycosylation, limitant les possibilités d'elongation [72]. Ce glycanne va donc conserver une structure à peu près identique, que l'anticorps soit synthétisé dans des cellules murines ou dans des cellules humaines.

Au niveau du site de glycosylation sur l'Asn 97 du domaine VH du cetuximab, il n'y a en revanche pas de contraintes stériques. Les glycosyltransférases vont avoir accès au site pour poursuivre l'elongation du glycanne [77]. L'éloignement phylogénétique des espèces a entraîné des différences dans leurs équipements enzymatiques respectifs. Ainsi, les cellules Sp2/0 produisant le cetuximab vont exprimer des enzymes différentes de celles retrouvées dans les cellules humaines, contribuant à l'élaboration de chaînes osidiques différentes. Les cellules Sp2/0 expriment l' α 3GT, une enzyme absente chez l'Homme, qui permet l'ajout au niveau terminal d'un résidu galactose selon une liaison α 1→3. Environ 30 % des glycannes présents sur le site Asn 97 du cetuximab portent ainsi au niveau terminal la séquence oligosidique $\text{Gal}\alpha\text{3Gal}\beta\text{4GlcNAc}$, appelée épitope α 3Gal, absente chez l'Homme (Figure 17) [78]. Les autres anticorps monoclonaux, produits dans des systèmes murins exprimant l' α GT (NS0, Sp2/0) possèdent également des glycoformes "murines" mais seulement à l'état de traces [79]. Les cellules CHO dans lesquelles sont exprimés de nombreux anticorps monoclonaux thérapeutiques (exemple : rituximab, trastuzumab) n'expriment pas le gène codant pour l' α 3GT [80,81]. Les anticorps produits par ces cellules ne portent donc pas l'épitope α 3Gal. Parmi les anticorps monoclonaux thérapeutiques, seul le cetuximab porte l'épitope α 3Gal en forte quantité.

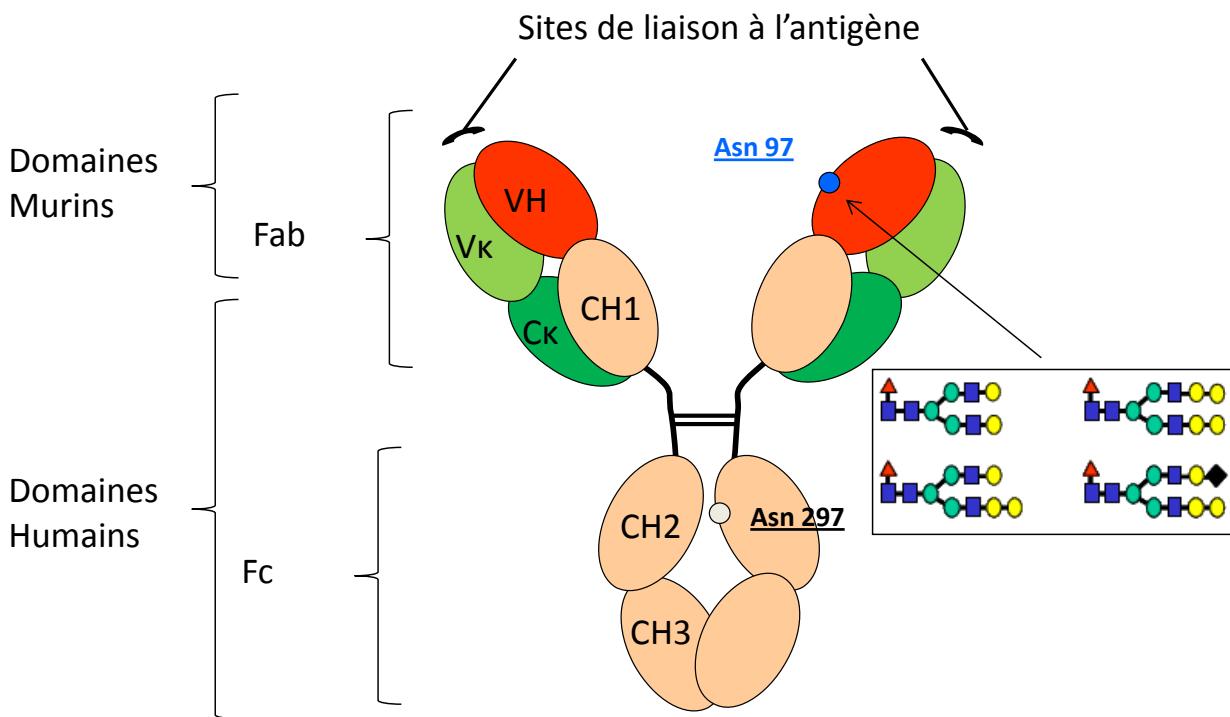


Figure 17. Structure et glycosylation du cetuximab. Les chaînes lourdes (H) sont représentées en rose-rouge, les chaînes légères (κ) en vert avec V : domaine variable et C : domaine constant. Les sites de N-glycosylation sont représentés en bleu et blanc. Le site de N-glycosylation situé sur le fragment Fc, sur l'Asn 297, porte des glycoformes habituelles chez l'homme, donc n'étant pas des cibles d'anticorps naturels. Le site de N-glycosylation situé sur le domaine VH, sur l'Asn 97, porte des glycoformes dont une grande proportion possède la séquence terminale $\text{Gala}_3\text{Gal}\beta_4\text{GlcNAc}$ (●—■—○—□), qui est une cible d'anticorps naturel chez l'homme. ● Gal ; ■ GalNac ; ○ Glc ; □ GlcNAc ; ● Man ; ▲ Fuc ; ♦ NGNA : symboles suggérés par le « Consortium of Functional Glycomics ».

Chung *et al.* [67] ont mis en évidence la présence d'IgE anti-cetuximab dans le sérum de patients ayant présenté une réaction sévère à la perfusion de cet anticorps et donc confirmé que ces réactions sévères pouvaient être médiées par un mécanisme dépendant des IgE. Ils ont ensuite recherché ces IgE dans le sérum pré-cetuximab de patients du Tennessee, de Caroline du Nord et de l'Arkansas et dans le sérum de témoins non traités par cetuximab venant du Tennessee, de Californie et de Boston (Figure 18).

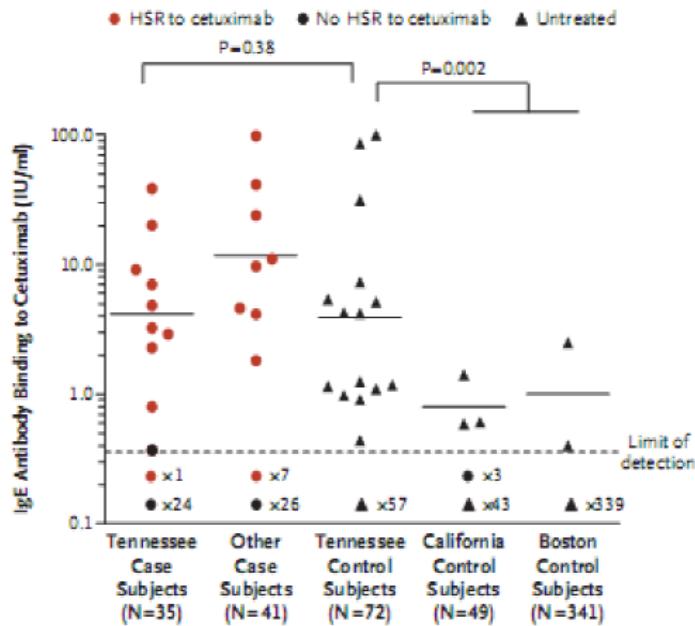


Figure 18. Résultats du dosage des IgE anti-cetuximab dans le sérum de 76 patients et de 462 témoins - Reproduction de la figure 1 de l'article de Chung et al. [67]. Les données rapportées par les cliniciens permettent de classer les cas en fonction de la présence ou de l'absence d'une réaction d'hypersensibilité (HSR) au cetuximab. La ligne horizontale indique la moyenne des résultats positifs. Les valeurs avec un signe de multiplication indiquent le nombre de valeurs négatives.

Les auteurs ont utilisé pour effectuer leurs dosages une technique automatisée basée sur le principe de l'ELISA. Les dosages ont été réalisés par un automate commercialisé par Phadia®, l'Immunocap™ 250. La phase solide était constituée par des ImmunoCaps™ streptavidine, sur lesquels peuvent se fixer divers antigènes biotinylés.

Ils ont cherché à déterminer si les IgE anti-cetuximab étaient dirigées contre la portion Fc ou contre la portion Fab du cetuximab. Douze sérums positifs en IgE anti-cetuximab ont été testés en parallèle sur des ImmunoCaps™ sensibilisés par des fragments Fc de cetuximab et sur des ImmunoCaps™ sensibilisés par des fragments F(ab')₂ de cetuximab. Des IgE dirigées contre les F(ab')₂ du cetuximab ont été détectées dans tous les sérums alors qu'aucune IgE anti-Fc n'a été détectée (Figure 19).

L'épitope semblait donc présent sur le segment Fab. Il pouvait donc s'agir soit d'une séquence peptidique murine (les domaines variables du cetuximab étant d'origine murine), soit d'un oligosaccharide. L'absence ou le faible taux, dans les douze sérums, d'IgE dirigées contre un

autre anticorps chimérique (rituximab) et contre les IgG murines n'était pas en faveur d'un épitope protéique murin (Figure 19).

Cetuximab	Fragment of Cetuximab Molecule		Rituximab	Mouse IgG
	F(ab')2	Fc		
	<i>international units per milliliter</i>			
1	41.6	40.9	0.35	0.35
2	38.8	52.3	ND	0.35
3	20.2	26.0	0.35	0.35
4	11.1	13.2	0.35	0.35
5	4.9	5.7	0.35	0.35
6	4.2	6.6	0.35	0.35
7	131.0	158.0	2.90	1.75
8	69.2	86.8	1.20	0.35
9	55.1	99.6	0.35	0.35
10	43.5	45.8	0.35	0.35
11	81.1	100.0	0.35	0.35
12	13.0	17.9	0.57	0.78

Figure 19. Concentrations d'IgE dirigées contre la molécule de cetuximab et ses différents fragments, contre le rituximab et contre les IgG de souris - d'après l'article de Chung et al. [67]. Les IgE anti-cetuximab reconnaissent les fragments $F(ab')_2$ et non Fc du cetuximab. Les sérum positifs en IgE anti-cetuximab ne possèdent pas ou peu d'IgE anti-rituximab et d'IgE anti-IgG de souris, les IgE anti-cetuximab ne semblent donc pas dirigées contre un épitope protéique d'origine murine. Le seuil de positivité de la technique a été fixé à 0,35 UI/mL.

Les douze sérum ont ensuite été testés sur des ImmunoCapsTM sensibilisés avec des molécules de cetuximab produites dans des cellules CHO, cellules ne produisant pas l' α 1,3GT, et sur des ImmunoCapsTM sensibilisés par l'oligoside Gal α 3Gal β 4GlcNAc, c'est à dire l'épitope α 3Gal. Parmi les douze sérum positifs en IgE anti-"*cetuximab* produit en Sp2/0" (*cetuximab classique*), aucun ne contenait d'IgE anti-"*cetuximab* produit dans les cellules CHO", c'est-à-dire le *cetuximab* dépourvu d'épitope α 3Gal. En revanche tous ces sérum présentait des IgE reconnaissant l'épitope α 3Gal. L'épitope reconnu par les IgE anti-*cetuximab* semblait donc être l'épitope α 3Gal présent sur le domaine variable de la chaîne lourde du *cetuximab*. Chung et al. ont ensuite dosé les IgE anti-*cetuximab* et les IgE anti-

α 3Gal dans 150 sérums. Les concentrations des deux types d'IgE sont apparues fortement corrélées entre elles ($r = 0.92$, $p < 0.001$) confirmant ainsi les résultats précédents.

Par cette démonstration élégante, Chung *et al.* ont déterminé que les IgE anti-cetuximab étaient dirigées contre l'épitope α 3Gal et ont ainsi, dans le même temps, découvert l'existence, jusqu'alors ignorée, de ces IgE anti- α 3Gal.

Des IgE anti-cetuximab ont été trouvées chez 24 % (18/76) des patients du Tennessee, de Caroline du Nord et de l'Arkansas, chez 21 % (15/72) des témoins du Tennessee, chez 6 % (3/49) des témoins de Californie et chez 0,6 % (2/341) des témoins de Boston. Parmi les 76 patients traités par cetuximab, 25 ont présenté une réaction d'hypersensibilité au cetuximab, et parmi eux, 17 avaient des anticorps anti-cetuximab dans leur sérum de prétraitement. Seul un patient ayant des IgE anti-cetuximab n'a pas fait de réaction d'hypersensibilité au cetuximab. Cette étude prouve d'une part la préexistence d'IgE anti-cetuximab avant tout contact avec cet anticorps et d'autre part que les patients présentant ces IgE dans leur sérum avant traitement sont fortement plus à risque que les autres de faire des réactions d'hypersensibilité ($p = 0,03$ par le test de Fisher). De plus, la prévalence des IgE anti-cetuximab dans les différents groupes concorde avec l'incidence des réactions graves au cetuximab observée dans les différentes régions géographiques : élevée dans les groupes originaires du sud-est et faible à Boston et en Californie.

La découverte des IgE anti- α 3Gal fait donc suite aux travaux de Chung *et al.* [67] qui ont mis en évidence que les réactions allergiques sévères au cetuximab étaient dues à des IgE anti-cetuximab sériques préexistantes, dirigées contre le fragment Fab du cetuximab, et plus précisément contre l'épitope α 3Gal terminant la chaîne oligosaccharidique du domaine VH. Malheureusement, ces travaux restent méconnus de la part de nombreux cliniciens et le risque de choc peut en être sous-évalué ou redécouvert [82,83].

1.3.3. Prise en charge du choc et mesures de précautions

Le choc anaphylactique au cetuximab peut être responsable de symptômes tels que bronchospasme, urticaire, élévation ou diminution de la pression artérielle, perte de conscience ou état de choc. Dans de rares cas, un angor, un infarctus du myocarde ou un arrêt cardiaque ont été observés.

Le traitement est celui du choc, à savoir l'arrêt de la perfusion (geste fondamental), la libération des voies aériennes (intubation, ventilation), l'oxygénothérapie et la mise en

position de Trendelenbourg. Du point de vue des thérapeutiques, le recours à l'adrénaline injectable est indispensable combiné à un remplissage vasculaire (sérum physiologique) et éventuellement à l'utilisation de corticoïdes et d'antihistaminiques (bien que d'un intérêt non démontré). Enfin, une surveillance est nécessaire pendant 12 à 24 heures en unité intensive compte tenu du risque de récidive.

La gravité potentielle de ces réactions d'HSI a induit un renforcement des règles de surveillance pendant les premières injections de cetuximab, sans que celles-ci ne soient à ce jour formalisées sous formes de recommandations. Ainsi, dans certains établissements, les patients sont hospitalisés pendant la nuit qui suit la perfusion. Il semble au minimum nécessaire de réaliser l'administration du cetuximab au cours d'une hospitalisation complète, avec présence médicale, protocole infirmier précis et chariot de réanimation. La récidive de choc anaphylactique est classique et un patient qui a présenté un choc doit être maintenu en service de réanimation ou de surveillance continue pendant 24 à 48h. De plus, la survenue d'une réaction anaphylactique contre-indique de façon absolue la réintroduction.

Une prémédication par corticoïdes et/ou antihistaminiques peut permettre de prévenir une réaction anaphylactoïde mais sera insuffisante dans le cas d'un mécanisme dépendant des IgE [84].

1.4. PHARMACOCINETIQUE DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES

1.4.1. GENERALITES

L'effet d'un médicament dépend de la dose administrée et plus généralement de sa posologie. La posologie englobe la quantité de médicament administrée, la fréquence d'administration et la voie d'administration. Si la dose est trop faible, aucun effet ne sera observé. Si la dose est trop élevée, le patient présentera des effets indésirables dose-dépendants. Entre les deux se situe un intervalle de doses permettant d'obtenir l'effet thérapeutique souhaité tout en minimisant le risque de survenue d'effets indésirables.

Les différents mécanismes intervenant *in vivo* entre l'administration d'un médicament et son effet sur l'organisme peuvent être décrits de façon quantitative. Pour cela, la relation entre la dose et l'effet est généralement décrite en deux étapes, qui sont respectivement (Figure 20) :

- La relation entre la dose et la concentration, ou pharmacocinétique (PK)
- La relation entre la concentration et l'effet du médicament *in vivo*, ou relation pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD)

Chacune de ces deux étapes a des sources spécifiques de variabilité, inter- et intra-individuelles. La connaissance et la description de ces facteurs de variabilité permet de comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet des médicaments et d'envisager une adaptation individuelle de la posologie afin d'optimiser la réponse thérapeutique.

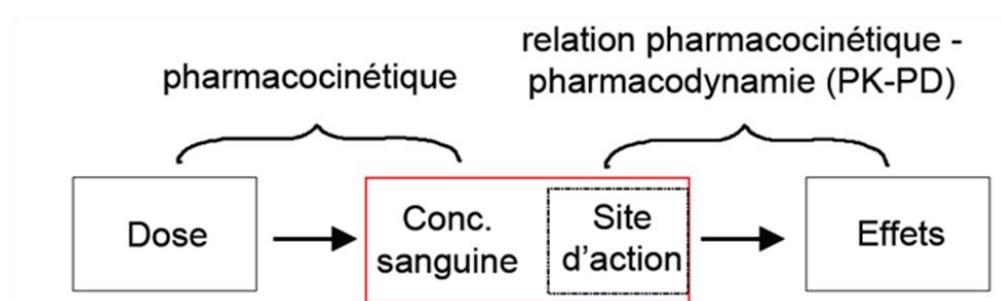


Figure 20. Relation dose-concentration-effet d'un médicament.

L'évolution des concentrations d'un médicament dans l'organisme au cours du temps dépend des modalités d'administration (forme galénique, posologie,...) et du devenir du médicament dans l'organisme, qui peut être décrit schématiquement par les étapes suivantes :

Absorption - Une phase d'absorption existe lorsqu'un médicament est administré par voie extravasculaire. Seule une fraction de la dose (D) de médicament atteint alors la circulation générale. La biodisponibilité est définie à la fois par cette fraction de la dose de médicament et par la vitesse d'absorption. La fraction biodisponible est calculée par rapport à celle de la voie intraveineuse (IV), qui est par définition de 1.

Distribution - La distribution correspond au passage du médicament dans les différents tissus et liquides biologiques de l'organisme.

Élimination - Les mécanismes d'élimination du médicament dépendent de sa nature. Dans le cas des médicaments « classiques » (petites molécules, souvent obtenues par synthèse chimique), l'élimination est due à leur métabolisme (biotransformation) ou à leur excréition, c'est-à-dire leur élimination sous forme inchangée, par voie rénale ou biliaire notamment. Les mécanismes d'élimination des biomédicaments sont ceux des molécules endogènes dont ils sont proches. Le cas des anticorps thérapeutiques sera décrit plus loin.

Les études pharmacocinétiques nécessitent à la fois la mesure des concentrations de médicaments dans les milieux biologiques, notamment le sang, par une technique analytique validée, et la quantification du devenir des médicaments dans l'organisme par des méthodes mathématiques (modélisation pharmacocinétique). Doivent donc être définis les différentes approches de modélisation pharmacocinétique et notamment les mécanismes impliqués dans la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux et les principes d'estimation des paramètres d'un modèle pharmacocinétique.

1.4.2. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA PHARMACOCINETIQUE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Ne serait-ce que parce que ce sont des protéines de haute masse moléculaire (environ 150 kDa), les anticorps monoclonaux ont des sources de variabilité pharmacocinétique différentes de celles des médicaments « classiques », molécules généralement issues d'une synthèse chimique et d'une masse moléculaire faible.

Cependant, on peut décrire des phases d'absorption (pour les administrations par voie extravasculaire), de distribution et d'élimination.

1.4.2.1. Absorption des anticorps monoclonaux

La majorité des anticorps monoclonaux est administrée par voie IV, ce qui permet une exposition rapide et complète. Cependant, certains d'entre eux, comme l'adalimumab, un anti-TNF α , sont administrés par voie sous cutanée. Plus récemment, le trastuzumab a eu une autorisation pour son utilisation en sous cutanée avec un dosage unique de 600 mg par injection sans adaptation posologique au patient. L'administration extravasculaire représente un confort pour le patient puisque qu'elle est moins invasive et peut se faire, pour certains à domicile. Cependant, l'absorption des anticorps monoclonaux est lente et donc difficile à quantifier précisément. Elle est par ailleurs incomplète. Ces voies d'administration sont donc une source de variabilité pharmacocinétique supplémentaire qu'il faut théoriquement prendre en compte. Les mécanismes d'absorption des IgG après administration sous cutanée et extravasculaire n'ont été que très peu directement étudiés [85].

1.4.2.2. Elimination des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont principalement éliminés par deux mécanismes associés : un catabolisme non spécifique suivant leur endocytose passive et une élimination faisant suite à leur fixation sur l'antigène cible. Lorsqu'une immunisation survient les anticorps peuvent également être éliminés par la formation de complexes immuns.

1.4.2.2.1. Captation par endocytose

Comme l'ensemble des protéines circulantes, les anticorps pénètrent dans les cellules endothéliales vasculaires par endocytose passive [85,86]. Ce phénomène pourrait également se produire dans certains tissus (peau, muscles, foie et intestin) [87]. Mais un phénomène de protection contre la dégradation des IgG existe, dans lequel le FcRn joue un rôle clé.

1.4.2.2.2. Rôle du FcRn dans l'élimination et la distribution

La demi-vie ($t_{1/2}$) d'élimination de l'albumine et des IgG endogènes (à l'exception de celle des IgG3) est d'environ 21 jours chez l'homme, ce qui est plus long que celle des autres protéines et notamment des autres immunoglobulines (entre 2,5 et 6 jours) [88,89]. Par ailleurs, la demi-vie d'élimination du fragment Fc est du même ordre de grandeur que celle de l'IgG totale, alors que celle des fragments Fab est plus courte [90]. La portion Fc joue donc un rôle majeur dans la vitesse d'élimination des IgG.

Brambell, dans les années 1960, a émis l'hypothèse d'un récepteur spécifique et saturable protégeant les IgG du catabolisme endogène [91]. Ce récepteur est maintenant appelé FcRn (pour *neonatal Fc receptor*) car il a été identifié pour la première fois dans l'épithélium intestinal de rat nouveau-né [92]. Depuis, du FcRn a été trouvé chez d'autres rongeurs, chez le singe, chez l'Homme [93] et il est maintenant admis qu'il est présent chez tous les mammifères. Chez l'Homme, le FcRn a été identifié dans le poumon [94], la barrière hémato-encéphalique, le foie [95], les reins et d'autres organes [96].

L'interaction FcRn – IgG est pH dépendante : après leur endocytose passive (pinocytose) par les cellules endothéliales, les IgG se fixent à pH acide (6,0) au FcRn, à l'intérieur des vésicules d'endocytose. Cette dépendance au pH est en partie expliquée par la présence d'histidines dans les domaines CH₂ et CH₃ de la portion Fc [97,98]. Les protéines endocytées mais non fixées au FcRn sont dégradées dans les lysosomes [99,100]. La fixation au FcRn permet de détourner les IgG de la dégradation et se conclut par leur exocytose à pH neutre. On parle de recyclage ou de transcytose suivant si la vésicule est exocytée vers le pôle apical ou le pôle baso-latéral. (Figure 21). Plusieurs études ont confirmé le rôle décisif du FcRn dans l'homéostasie des IgG [100,101].

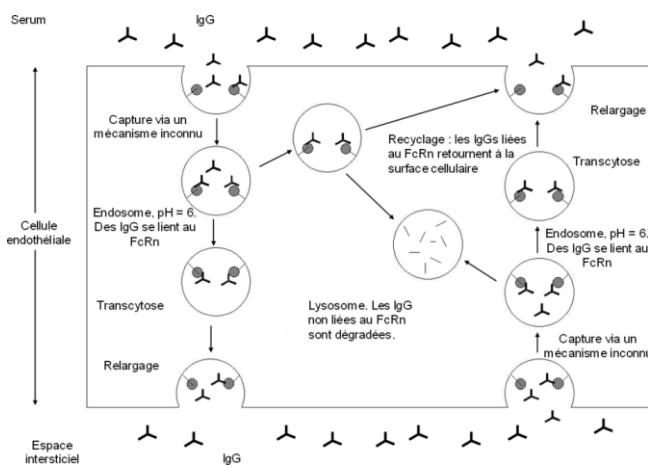


Figure 21. Rôle du FcRn dans la protection des IgG de la dégradation et dans leur transport bidirectionnel à travers la cellule endothéliale. D'après Ghetie & Ward, 1997 [86 d'après 101].

Le FcRn d'une espèce animale donnée peut avoir une affinité pour les IgG d'une autre espèce. Ainsi, le FcRn de souris est peu spécifique et fixe les IgG de plusieurs espèces (Lapin, Rat, Cochon d'Inde, Bœuf, Mouton et Homme), alors que le FcRn humain est plus sélectif et ne fixe que les IgG de Lapin et de Cochon d'Inde [99].

Les IgG devraient théoriquement avoir une faible pénétration tissulaire en raison de leur masse moléculaire élevée et donc être confinés dans la circulation sanguine et les liquides extracellulaires. Cependant, une phase de distribution est clairement identifiable sur la courbe des concentrations en fonction du temps, pour toutes les IgG1. Le FcRn, en permettant la transcytose des IgG, joue vraisemblablement un rôle majeur dans leur distribution dans l'organisme [102,103].

1.4.2.2.3. Elimination après fixation sur la cible

Le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques repose sur leur fixation sur un antigène cible (circulant ou membranaire). Dans le cas d'un antigène circulant, la formation puis l'élimination par le système immunitaire du complexe antigène-anticorps entraîne l'élimination de la cible et de l'anticorps. Dans le cas d'un antigène membranaire, la fixation de l'anticorps peut provoquer l'endocytose du complexe antigène-anticorps formé. Cette internalisation a par exemple été décrite après la fixation de l'efalizumab sur le CD11a (la sous-unité α du récepteur LFA-1). Après son internalisation, le complexe immun est retrouvé dans les lysosomes, puis est dégradé [104]. Une internalisation a également été décrite pour le complexe formé par le cetuximab et sa cible, l'EGFR [105]. La vitesse d'élimination par cette voie est le plus souvent limitée par la quantité de cible.

1.4.3. MODELISATION PHARMACOCINETIQUE PAR APPROCHE NON-COMPARTIMENTALE

L'objectif de l'analyse pharmacocinétique non-compartmentale est de décrire et de quantifier le devenir du médicament dans l'organisme en faisant le moins d'hypothèses possibles. C'est l'approche pharmacocinétique qui est privilégiée par les agences du médicament car elle est robuste, elle peut être facilement vérifiée et est la plus objective. De plus, les paramètres décrits ci-après sont mesurables quel que soit l'allure des concentrations au cours du temps, pourvu qu'un nombre suffisant de prises de sang ait été réalisé.

1.4.3.1. Aire sous la courbe

L'aire sous la courbe ou *AUC* (pour « *Area under the concentration time versus curve* ») reflète l'exposition du sujet au médicament administré. Sa dimension est la suivante :

$$\text{Unité de concentration} \times \text{Unité de temps}$$

L'*AUC* est l'intégration des concentrations en fonction du temps :

$$AUC(t_{\infty}) = \int_0^{t_{\infty}} C(t) \cdot dt \quad (1)$$

où C est la concentration et t le temps. Dans un premier temps, l'*AUC* entre les temps t_0 et t_n est estimée par la méthode des trapèzes :

$$AUC_{0 \rightarrow t_n} = \sum_{i=0}^{n-1} \left(\frac{C_i + C_{i+1}}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i) \right) \quad (2)$$

où C_i est la concentration mesurée au temps t_i et t_n est le temps correspondant à la dernière concentration mesurée.

Lors d'administrations répétées, la mesure de l'exposition repose sur le calcul de l'*AUC* à l'état d'équilibre, entre deux administrations (séparées par l'intervalle de temps τ), par la méthode des trapèzes.

L'*AUC* est souvent le meilleur critère pour l'étude des relations entre l'exposition et l'effet du médicament mais elle ne permet généralement pas d'étudier la relation concentration-effet individuelle et ses sources de variabilité. L'*AUC* est un indice pharmacocinétique dose-

dépendant et la cinétique est dite linéaire lorsque l'*AUC* augmente proportionnellement à la dose.

1.4.3.2. Demi-vie

La demi-vie $t_{1/2}$ est le paramètre le plus souvent utilisé pour quantifier l'élimination des médicaments. C'est le temps nécessaire pour que la concentration du médicament diminue de moitié. Lors de l'administration répétée d'un médicament, la $t_{1/2}$ permet de déterminer le temps nécessaire à l'obtention de l'état d'équilibre.

1.4.3.3. Clairance

La clairance (CL) quantifie la capacité d'élimination du médicament par l'organisme. Elle correspond au volume de liquide biologique épuré par unité de temps. Elle a donc la dimension d'un débit volume $[L]^3.[T]^{-1}$. La clairance permet de relier à chaque instant la vitesse d'élimination à la concentration :

$$\text{Vitesse d'élimination} = CL \times \text{concentration}$$

La CL peut être calculée, après administration IV, par :

$$CL = \frac{D}{AUC} \quad (3)$$

La capacité d'élimination du médicament par le patient peut donc être quantifiée quelle que soit l'allure de la courbe des concentrations en fonction du temps. S'il n'y a pas de phénomènes saturables intervenant dans l'élimination, la clairance CL ne change pas avec la dose D .

1.4.4. MODELISATION PHARMACOCINETIQUE PAR APPROCHE COMPARTIMENTALE

Contrairement à l'approche non-compartmentale, l'approche compartimentale impose des hypothèses fortes. L'organisme est assimilé à un réseau de compartiments. Ce sont des volumes fictifs, sans réalité physiologique, dans lesquels la concentration de médicament est instantanément homogène. L'entrée et la sortie de ces compartiments étant le plus souvent liées à des phénomènes passifs, leurs vitesses peuvent être décrites par des constantes d'ordre 1, c'est-à-dire que ces vitesses sont, à chaque instant, proportionnelles à la

concentration. Bien que l'approche compartimentale ne soit pas toujours applicable, elle présente les avantages suivants :

- elle vise une description plus mécanistique de la pharmacocinétique que l'analyse non-compartimentale,
- elle permet, grâce à l'approche de population, d'estimer des paramètres individuels en utilisant des données « pauvres » (faible nombre de prises de sang par sujet) si le nombre de sujet est suffisamment grand,
- Le modèle paramétrique qui en découle peut être utilisé pour prédire par simulation les concentrations attendues au cours du temps avec d'autres posologies.

1.4.4.1. Modèle monocompartimental avec élimination d'ordre 1

Ce type de modèle pharmacocinétique est paramétré par un volume de distribution unique et par une constante d'élimination d'ordre 1 (Figure 22).

Après administration en bolus IV, la variation des concentrations du médicament au cours du temps est décrite par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dC}{dt} = -k_{10} \cdot C(t) \quad (4)$$

où dC/dt est la variation instantanée de la concentration en fonction du temps, k_{10} la constante d'élimination d'ordre 1 de dimension $[T]^{-1}$ et $C(t)$ la concentration au temps t . La condition initiale de l'équation 4 étant $C(0) = C_0$, c'est-à-dire la concentration sanguine extrapolée à $t = 0$, son intégration conduit à la relation :

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-k_{10}t} \quad (5)$$

Dans le cas d'un modèle monocompartimental, la demi-vie d'élimination ($t_{1/2}$) peut être estimée grâce à k_{10} :

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{10}} \quad (6)$$

Le modèle monocompartimental peut également être exprimé en termes de « paramètres physiologiques » (Figure 22), c'est-à-dire du volume de distribution (V) et de la clairance systémique (CL). Le volume de distribution est estimé par la relation suivante :

$$V = \frac{D}{C(0)} \quad (7)$$

CL est relié à k_{10} et à V par l'équation suivante :

$$CL = k_{10} \cdot V \quad (8)$$

L'équation 5 s'écrit alors :

$$C(t) = \frac{D}{V} \cdot e^{-\frac{CL}{V}t} \quad (9)$$



Figure 22. Modèle à un compartiment où D est la dose de médicament administrée, V le volume de distribution. L'élimination peut être codée par k_{10} , une constante d'élimination d'ordre 1 ou par CL , la clairance d'élimination.

1.4.4.2. Modèle bicompartimental avec constantes de transfert d'ordre 1

Dans la plupart des cas, les médicaments ne sont pas instantanément distribués de façon homogène dans tout l'organisme. Le modèle bicompartimental permet de décrire le fait que les concentrations dans deux groupes de tissus ou de fluides biologiques ne s'équilibrent pas immédiatement. Les échanges entre ces compartiments sont le plus souvent décrits par des constantes de transfert d'ordre 1. Le compartiment « central » correspond au sang et aux tissus dans lesquels les concentrations s'équilibrent rapidement avec celles du sang. Le compartiment périphérique correspond aux tissus et organes dans lesquels la concentration du médicament s'équilibre plus lentement avec celle du compartiment central. Pour des raisons d'identifiabilité, l'élimination du médicament de l'organisme est le plus souvent décrite comme se faisant à partir du compartiment central.

Comme le modèle monocompartimental, le modèle bicompartimental peut être paramétré de plusieurs façons :

- Paramétrisation à l'aide de « micro-constantes » : après administration par voie IV bolus, le modèle est décrit à l'aide du volume du compartiment central (V_1), des constantes de distribution k_{12} et k_{21} (d'ordre 1) et de la constante d'élimination k_{10} (Figure 23) :

$$\begin{cases} \frac{dC_1}{dt} = k_{10} \cdot C_1 - k_{12} \cdot C_1 + k_{21} \cdot C_2 & \text{avec } C_1(0) = \frac{D}{V_1} \\ \frac{dC_2}{dt} = k_{12} \cdot C_1 - k_{21} \cdot C_2 & \text{avec } C_2(0) = 0 \end{cases} \quad (10)$$

où C_1 et C_2 sont les concentrations du médicament, respectivement dans le compartiment central et le compartiment périphérique.

- Paramétrisation « physiologique » : le modèle est décrit à l'aide des volumes de distribution du compartiment central et périphérique, respectivement V_1 et V_2 , et des clairances systémique CL et de distribution Q (Figure 24).

Les relations entre les micro-constantes et les constantes physiologiques sont les suivantes :

$$k_{10} = \frac{CL}{V_1} \quad (11)$$

$$k_{21} = \frac{Q}{V_2} \quad (12)$$

$$k_{12} = \frac{Q}{V_1} \quad (13)$$

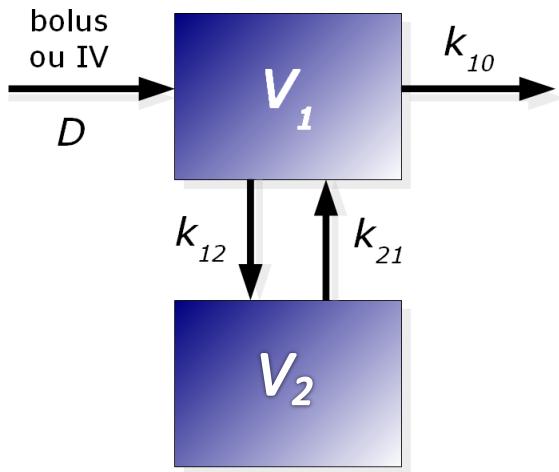


Figure 23. Modèle à deux compartiments où D est la dose de médicament administrée, V_1 et V_2 les volumes de distribution, k_{10} la constante d'élimination d'ordre 1, k_{12} et k_{21} les constantes de distribution.

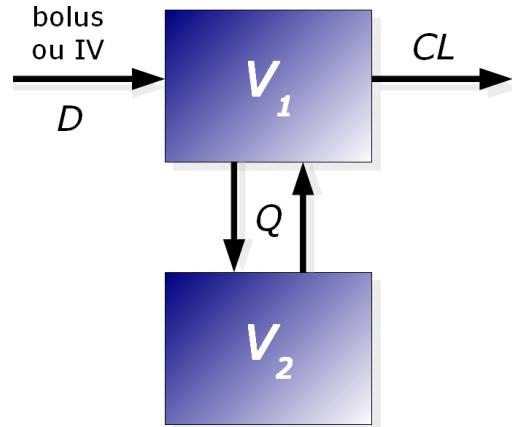


Figure 24. Modèle à deux compartiments où D est la dose de médicament administrée, V_1 et V_2 les volumes de distribution, CL et Q les clairances d'élimination et de distribution.

- Paramétrisation à l'aide de « macro-constantes » : celle-ci permet de faire une description graphique de l'évolution des concentrations et d'estimer les demi-vies de distribution et d'élimination. Ainsi la cinétique de décroissance des concentrations de médicament s'écrit :

$$C(t) = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} \quad (14)$$

où A et B sont respectivement les concentrations de distribution et d'élimination, extrapolées au temps 0 (« à l'origine »), analogues au C_0 du modèle monocompartimental, et α et β sont les macro-constantes de distribution et d'élimination définies par :

$$\alpha = \frac{1}{2} \left(k_{12} + k_{21} + k_{10} + \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - 4 \cdot k_{21} \cdot k_{10}} \right) \quad (15)$$

$$\beta = \frac{1}{2} \left(k_{12} + k_{21} + k_{10} - \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - 4 \cdot k_{21} \cdot k_{10}} \right) \quad (16)$$

On note que l'équation 6 de calcul de la demi-vie pour le modèle monocompartimental ne s'applique pas au modèle bicompartmental. En revanche à l'aide des paramètres α et β , il est possible de calculer :

$$t_{1/2^\alpha} = \frac{\ln(2)}{\alpha} \quad (17)$$

et

$$t_{1/2^\beta} = \frac{\ln(2)}{\beta} \quad (18)$$

qui sont respectivement les demi-vies de distribution et d'élimination [106].

1.4.4.3. Modèles avec élimination saturable

Lorsque l'élimination du médicament est liée à des phénomènes actifs et que la capacité d'élimination est limitée, on parle d'élimination saturable. Les vitesses de transfert du médicament ne sont alors plus proportionnelles à la concentration si bien qu'à forte concentration, la vitesse d'élimination est à sa valeur maximale. Ce phénomène peut être décrit par différents modèles mécanistiques : modèle d'élimination liée à la cible (*TMDD* pour *Target Mediated Drug Disposition*), modèle avec élimination de type Michaelis-Menten (MM) ou encore modèle avec constante d'élimination d'ordre 0.

L'élimination saturable des médicaments « classiques », généralement liée à une saturation du métabolisme hépatique, peut être décrite par une équation de type Michaelis-Menten, le métabolisme étant limité par la quantité d'enzyme présente dans l'organisme. Si la vitesse d'élimination est la plupart du temps à sa valeur maximale, la description mathématique de celle-ci peut être simplifiée en utilisant une constante d'élimination d'ordre 0.

1.4.4.3.1. Modèle mécanistique TMDD

Le modèle mécanistique *TMDD* a été développé pour décrire la pharmacocinétique de médicaments dont la distribution et/ou l'élimination sont influencées par la fixation sur leur cible [107]. Ce modèle est fréquemment utilisé pour les anticorps monoclonaux [108]. La fixation peu réversible des anticorps sur leurs cibles est en effet souvent suivie de leur élimination. S'il s'agit d'un antigène membranaire, une internalisation du complexe antigène-anticorps ou une cytolysé peuvent être observées. S'il s'agit d'un antigène circulant, un complexe immun est formé puis dégradé par les macrophages. Lorsque la cible est en quantité limitée par rapport à la concentration d'anticorps, la fraction de l'élimination de l'anticorps due à l'interaction avec la cible est saturable.

Un modèle pharmacocinétique de type *TMDD* est une interprétation mécanistique précise de l’interaction entre le médicament et sa cible au cours du temps (Figure 25). Les variations de concentration de médicament, de quantité de cible et de complexe médicament-cible sont décrites par le système d’équations différentielles suivant :

$$\begin{cases} \frac{dC}{dt} = -k_{on} \cdot C \cdot R + k_{off} \cdot RC \\ \frac{dR}{dt} = k_{syn} - k_{deg} \cdot R - k_{on} \cdot C \cdot R + k_{off} \cdot RC \\ \frac{dRC}{dt} = k_{on} \cdot C \cdot R - k_{off} \cdot RC - k_{int} \cdot RC \end{cases} \quad (19)$$

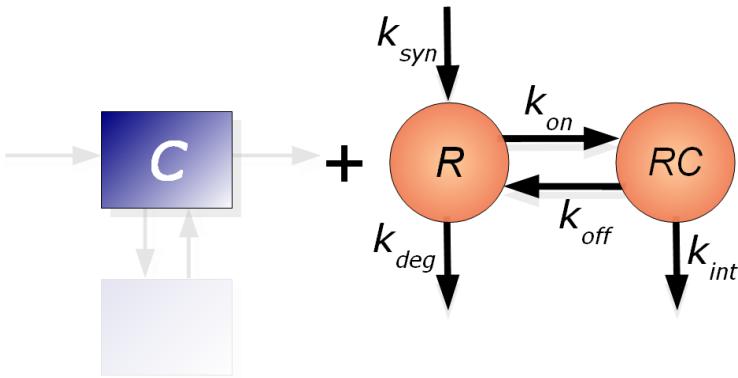


Figure 25. Représentation d’un modèle TMDD où C est la concentration du médicament libre, R est la cible libre et RC est le complexe cible-médicament.

Le médicament sous forme libre, de concentration C , se lie à une quantité de cible libre R avec une constante d’association k_{on} . Cette constante est d’ordre 2 car l’association dépend à la fois de la concentration C et de la quantité de récepteur R . Cette association forme un complexe médicament-cible RC . Le complexe RC peut soit se dissocier avec une constante de dissociation d’ordre 1 k_{off} (qui est très faible pour les anticorps) soit être internalisé ou dégradé avec une constante d’ordre 1 k_{int} . Comme indiqué dans le système d’équations 19, le modèle peut également prendre en compte le fait que les cibles libres sont synthétisées avec une constante d’ordre 0 k_{syn} et dégradées indépendamment de l’effet du médicament, avec une constante de dégradation d’ordre 1 k_{deg} [107].

Un tel modèle doit être couplé à un modèle compartimental classique qui décrit les phénomènes d’absorption, de distribution et d’élimination du médicament qui ne sont pas liés à la cible. Dans ce cas, C représente la concentration dans le compartiment central.

1.4.4.3.2. Elimination de type Michaelis-Menten

L'équation de Michaelis-Menten a été initialement proposée pour décrire la saturation de la cinétique enzymatique [109]. Elle est maintenant couramment utilisée pour décrire, entre autres, la cinétique d'élimination saturable de certains médicaments. D'après le modèle de Michaelis-Menten, ce type d'élimination est décrit par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{V_{\max} \cdot C}{k_M + C} \quad (20)$$

où V_{\max} est la vitesse maximale d'élimination du médicament et k_M est la constante dite de Michaelis, qui correspond à la concentration de médicament pour laquelle la vitesse d'élimination est égale à la moitié de V_{\max} (Figure 26).



Figure 26. Modèle à un compartiment avec élimination de type Michaelis-Menten.

Un tel type d'élimination peut être considéré comme une simplification d'un modèle TMDD sous deux conditions :

- L'affinité du médicament pour sa cible est très forte (c'est à dire : $k_{on} \gg k_{off}$).
- La quantité totale de cible R_{tot} ($R + RC$) reste constante au cours du temps.

Dans ces conditions, les paramètres de Michaelis-Menten sont définis par : $V_{\max} = k_{int} \cdot R_{tot} \cdot V$ où V est le volume de distribution du médicament et par $k_M = k_{off}/k_{on}$ [108,110].

1.4.4.3.3. Elimination d'ordre 0

Ce modèle est le plus simple pour décrire une élimination saturable. L'élimination n'est pas dépendante de la concentration et la vitesse d'élimination (quantité de médicament éliminée par unité de temps) est constante (Figure 27). Ce type d'élimination est décrit par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dC}{dt} = -k_0 \quad (21)$$

où k_0 est une constante d'ordre 0, la vitesse d'élimination étant indépendante de la concentration.

L'élimination d'ordre 0 est un cas particulier de l'élimination de type Michaelis-Menten, correspondant à des concentrations de médicaments $\gg k_M$. Dans ce cas, k_M n'est pas identifiable et $k_0 \approx V_{max}$.

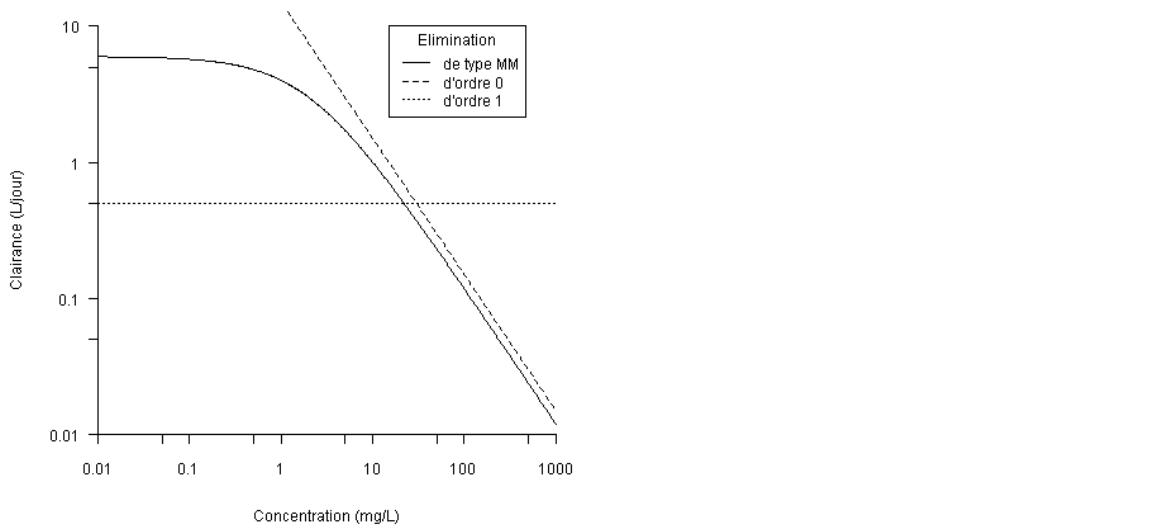


Figure 27. Clairance du médicament en fonction de sa concentration. En trait plein, élimination de type Michaelis-Menten ; en traits discontinus, élimination d'ordre 0 (indépendante de la concentration) ; en pointillés, élimination d'ordre 1 (proportionnelle à la concentration).

1.4.4.4. Principe de l'estimation des paramètres d'un modèle pharmacocinétique

Avant d'estimer les paramètres d'un système d'équations différentielles, il est important de s'assurer de leur identifiabilité ; c'est-à-dire qu'à partir des données expérimentales, le système d'équations admet une solution unique pour chaque paramètre. Par exemple, la pharmacocinétique d'un médicament administré de façon régulière en bolus IV avec un intervalle de temps τ ne peut être décrite par un modèle à deux compartiments (équation 10) si les concentrations disponibles ne sont que des concentrations résiduelles (avant réinjection). En effet, dans ce cas, les paramètres correspondant au compartiment périphérique Q et V_2 ne sont généralement pas identifiables.

La modélisation pharmacocinétique s'inscrit dans le cadre de la régression non-linéaire sur mesures répétées. Comme pour de nombreux types de modélisation, la qualité d'un modèle pharmacocinétique est quantifiée par la « -2 ln-vraisemblance » (-2LL). La -2LL est couramment appelée fonction objective (FO). Les paramètres sont estimés en minimisant la FO.

L'équilibre entre complexité du modèle et ajustement des données prédites et observées doit être recherché. Un modèle complexe peut fournir un ajustement très précis entre les données, mais ses paramètres risquent de ne pas être identifiables. Ainsi, pour des valeurs de fonction objective non significativement différentes, le modèle le plus simple doit être privilégié. Par exemple, un modèle à deux compartiments n'est justifié que s'il permet d'obtenir une valeur de fonction objective significativement inférieure à celle d'un modèle à un compartiment. Ceci est évalué par le critère d'information d'Akaïke (AIC).

La modélisation pharmacocinétique peut être réalisée par approche individuelle ou par approche de population.

1.4.4.4.1. Approche individuelle

L'approche individuelle consiste à étudier le profil des concentrations sanguines du médicament chez chaque sujet, indépendamment des autres sujets. Elle permet une description précise pour chaque sujet, même si la variabilité interindividuelle des paramètres estimés est grande. Cette approche nécessite cependant un grand nombre de données pour chaque sujet.

1.4.4.4.2. Approche de population

A l'origine, l'approche de population a été proposée pour analyser des données « pauvres » (faible nombre de données par patient) et « hétérogènes » (posologies et temps d'observation différents d'un patient à l'autre) car provenant de larges cohortes de patients [111]. Elle est maintenant de plus en plus utilisée pour l'analyse de données « riches » recueillies dans le cadre d'études pharmacocinétiques cliniques. Cette approche est recommandée par la *Food and Drug Administration (FDA)* pour l'obtention de l'AMM.

L'analyse pharmacocinétique de population prend en compte l'ensemble des individus inclus dans l'étude et permet donc d'utiliser l'information de chaque sujet pour estimer des paramètres moyens dans la population considérée.

La modélisation de population s'inscrit dans le cadre des modèles non-linéaires à effets mixtes sur mesures répétées [112]. Les modèles de population sont également appelés « hiérarchiques » car ils incluent plusieurs niveaux de variabilité. A chacun de ces niveaux correspond un modèle descriptif, comme décrit ci-après :

Modèle structural : Pour la pharmacocinétique, il s'agit du modèle qui relie la concentration au temps. La fonction qui relie les deux variables comporte les paramètres pharmacocinétiques : volume de distribution, clairance, constantes de transfert, etc. Le modèle structural s'écrit :

$$Y_{ij,pred} = f(\varphi_i, t_{ij}) \quad (22)$$

où Y est la variable étudiée, $Y_{ij,pred}$ est la valeur prédictée par le modèle pour le sujet i et la répétition j et φ_i sont les paramètres du sujet i .

Exemple : Après une dose unique et d'après (9), pour un modèle pharmacocinétique monocompartimental avec élimination d'ordre 1, l'équation 22 peut s'écrire :

$$C_{ij,pred} = \frac{D_i}{V_i} \cdot e^{-\frac{CL_i}{V_i} \cdot t_{ij}} \quad (23)$$

où $C_{ij,pred}$ est la concentration prédictée par le modèle pour le sujet i au temps de prélèvement j , D_i , V_i et CL_i sont respectivement la dose administrée au sujet i , le volume de distribution et la clairance du sujet i .

Modèle d'erreur interindividuelle : Il décrit la variabilité interindividuelle des sujets, c'est-à-dire l'écart entre les paramètres de population et les paramètres individuels estimés. Ce modèle s'écrit :

$$\theta_{ki} = \varphi_k(\theta_k, \eta_{ki}) \quad (24)$$

où φ_k est le modèle d'erreur interindividuelle utilisé pour décrire la variabilité des valeurs individuelles θ_{ki} du paramètre de population θ_k et η_{ki} quantifie la différence individuelle du sujet i par rapport à θ_k . On suppose la distribution des η_{ki} normale et centrée, telle que :

$$\eta_{ki} = N(0, \omega_k^2) \quad (25)$$

où ω_k^2 est la variance interindividuelle du paramètre.

Pour décrire la variabilité interindividuelle des paramètres, plusieurs modèles peuvent être utilisés ou combinés :

$$\text{Modèle additif :} \quad \theta_{ki} = \theta_k + \eta_{ki} \quad (26)$$

$$\text{Modèle proportionnel :} \quad \theta_{ki} = \theta_k \cdot (1 + \eta_{ki}) \quad (27)$$

$$\text{Modèle exponentiel :} \quad \theta_{ki} = \theta_k \cdot e^{\eta_{ki}} \quad (28)$$

En pratique, le modèle exponentiel est le plus utilisé car c'est le seul qui ne peut pas donner de valeurs d' θ_{ki} nulles ou négatives. Surtout, le rapport de deux lois log-normales (issue d'un modèle exponentiel) suit également une loi log-normale tandis que le rapport de deux lois normales suit une loi de Cauchy (aussi appelée loi de Lorentz) qui n'admet ni espérance, ni écart-type. Ceci serait par exemple problématique pour établir des relations entre micro constantes et constantes physiologiques (équations 11-13).

Si aucune variabilité interindividuelle n'est estimée,

$$\theta_{ki} = \theta_k \quad (29)$$

Pour chaque individu i , la valeur θ_{ki} du $k^{\text{ème}}$ paramètre est donc égale à θ_k .

Modèle de covariables : une covariable est une caractéristique individuelle qualitative ou quantitative avec laquelle la valeur d'un paramètre est significativement reliée. Les covariables sont souvent des facteurs démographiques (âge, taille, poids, sexe, surface corporelle, etc.) ou biologiques (clairance de la créatinine, numération sanguine, etc.). L'intérêt d'inclure une covariable dans l'analyse pharmacocinétique est d'expliquer une partie de la variabilité interindividuelle d'un paramètre. Si cette inclusion a une influence significative sur la fonction objective, elle peut réduire la variabilité interindividuelle d'un paramètre et, dans une moindre mesure, l'erreur résiduelle du modèle (*cf. infra*). Dans le modèle final, la covariable devient ainsi un facteur explicatif et prédictif de la variabilité de la pharmacocinétique du médicament. Par exemple, si le volume de distribution d'un médicament augmente avec le poids, le poids est un facteur prédictif d'exposition à ce médicament, car on peut s'attendre à trouver, pour une même dose injectée, des concentrations de médicament d'autant plus faibles que le poids des patients augmente.

Si aucune covariable n'est ajoutée au modèle interindividuel, θ_k s'écrit :

$$\theta_{k,TV} = \theta_k \quad (30)$$

où $\theta_{k,TV}$ est la valeur « typique » (*typical value*) du paramètre k , dans la population. Si une covariable m est ajoutée au modèle interindividuel, $\theta_{k,TV}$ s'écrit :

$$\theta_{k,TV} = g(\theta_k, z_{kmi}) \quad (31)$$

où g est le modèle de covariables et z_{kmi} est la valeur de la covariable m propre au sujet i et au paramètre k .

Exemple : Pour un modèle interindividuel exponentiel, la clairance du sujet i s'écrit :

$$CL_i = CL_{TV} \cdot e^{\eta_{CL,i}} \quad (32)$$

Si CL_{TV} est influencée par la surface corporelle (*BSA* pour *body surface area*) du patient (Figure 28), la valeur typique de CL peut s'écrire :

$$CL_{TV} = CL \cdot \beta_{BSA,CL} \cdot \frac{BSA_i}{BSA_{med}} \quad (33)$$

où CL est la valeur de population de la clairance, $\beta_{BSA,CL}$ est une constante, BSA_i la surface corporelle du patient i et BSA_{med} la surface corporelle médiane de la population. Pour un modèle interindividuel exponentiel, la clairance CL_i du sujet i s'écrit donc :

$$CL_i = CL \cdot \beta_{BSA,CL} \cdot \frac{BSA_i}{BSA_{med}} \cdot e^{\eta_{CL,i}} \quad (34)$$

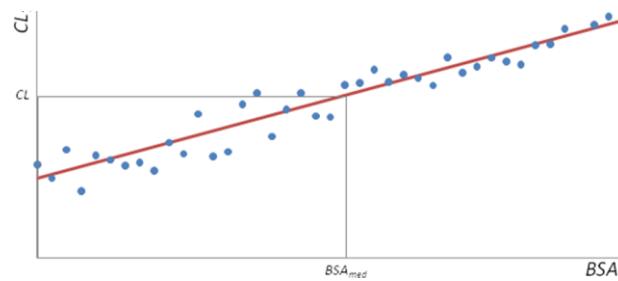


Figure 28. Modèle de covariable. Exemple d'une relation linéaire entre la clairance systémique d'un médicament et la surface corporelle (BSA). Les points bleus représentent les valeurs individuelles. TV : "Typical Value" ; med : Valeur médiane.

Une covariable est retenue pour être testée sur un paramètre du modèle structural si des arguments biologiques ou bibliographiques le justifient (ex. : influence du poids sur le volume de distribution V_I) et si elle n'est pas trop fortement corrélée ($|\text{coefficient de corrélation}| > 0,3$) avec une autre covariable d'intérêt (ex. : la surface corporelle avec le poids) [113]. Si ces conditions sont respectées, la covariable est appelée covariable d'intérêt. La significativité de l'influence des covariables d'intérêt sur les paramètres est classiquement testée par une procédure pas à pas ascendante puis pas à pas descendante (cf. méthode infra). Une autre procédure de test de la significativité des covariables d'intérêt consiste à tester toutes les covariables d'intérêt en même temps (*Full covariate model*). La significativité est contrôlée par un test de Wald [114]. Cette procédure, qui nécessite cependant une plus grande puissance de calcul, est encore peu utilisée.

A la fin de ces procédures, le modèle obtenu comporte uniquement les covariables qui influencent significativement les paramètres.

Modèle d'erreur résiduelle : Malgré l'utilisation d'un modèle de variabilité interindividuel et d'un modèle de covariables, il reste toujours un écart « résiduel », appelé résidu, entre la valeur d'une concentration observée et celle de la concentration prédictive. Le modèle d'erreur résiduelle permet de décrire la distribution des résidus. L'équation générale du modèle d'erreur résiduelle s'écrit :

$$Y_{ij,obs} = \zeta(Y_{ij,pred}, \varepsilon_{ij}) \quad (35)$$

où $Y_{ij,obs}$ est la $j^{\text{ème}}$ valeur observée (ici, une concentration) pour le sujet i , ζ est le modèle d'erreur résiduelle et ε_{ij} est une variable aléatoire. On suppose que $\varepsilon_{ij} \sim N(0 ; \sigma^2)$ où σ^2 est la variance résiduelle. Comme pour la variabilité interindividuelle, plusieurs modèles d'erreur résiduelle peuvent être utilisés (Figure 29) :

Modèle additif :

$$Y_{ij,obs} = Y_{ij,pred} + \varepsilon_{ij} \quad (36)$$

Modèle proportionnel :

$$Y_{ij,obs} = Y_{ij,pred} \cdot (1 + \varepsilon_{ij}) \quad (37)$$

Modèle mixte :

$$Y_{ij,obs} = Y_{ij,pred} \cdot (1 + \varepsilon_{ij_1}) + \varepsilon_{ij_2} \quad (38)$$

Modèle exponentiel :

$$Y_{ij,obs} = Y_{ij,pred} \cdot e^{\varepsilon_{ij}} \quad (39)$$

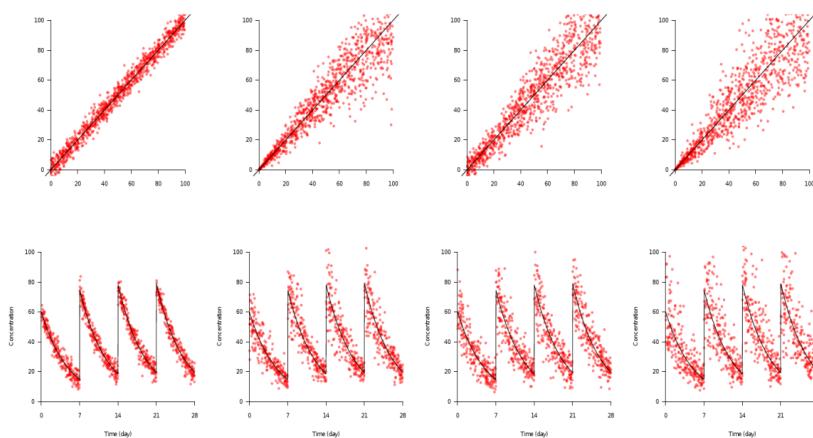


Figure 29. Visualisation de l'erreur résiduelle. En haut, concentrations prédictives versus observées. En bas, concentrations observées au cours du temps avec la concentration prédictive par les paramètres de population (ligne). De gauche à droite, modèle d'erreur additif, proportionnel, mixte, exponentiel.

1.4.5. MODELISATION PHARMACOCINETIQUE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Comme pour les médicaments « classiques », la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux est principalement étudiée lors des phases initiales de leur développement clinique (phases I et II) pour déterminer les doses qui seront testées en phase III. Cependant, pour de nombreux anticorps monoclonaux actuellement sur le marché, la relation entre la concentration et l'effet *in vivo* est mal connue et/ou peu décrite dans la littérature et les données pharmacocinétiques sont insuffisamment utilisées lors du choix des doses à administrer. Une meilleure connaissance de la pharmacocinétique est donc une étape indispensable pour l'optimisation de l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux. Ce besoin d'amélioration du schéma posologique est particulièrement net en cancérologie. Il y a au moins deux raisons à cela : d'une part, au moment de la mise sur le marché, la connaissance de l'anticorps monoclonal est souvent incomplète car son développement clinique a été accéléré compte tenu de la gravité de la pathologie. D'autre part, une influence de la masse antigénique sur la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux est suspectée [115-117]. Si cette influence est confirmée pour un anticorps donné, ce facteur devrait être pris en compte pour améliorer l'adaptation posologique individuelle. De plus, l'analyse de la pharmacocinétique clinique des anticorps thérapeutiques est une étape nécessaire à l'étude de leur relation concentration-effet, outil indispensable à la fois pour un choix raisonné de la posologie et pour la compréhension de leur mécanisme d'action chez l'Homme.

La pharmacocinétique n'a pas été étudiée avec le même niveau de détail pour tous les anticorps thérapeutiques. La pharmacocinétique de l'efalizumab (anti-CD11a) a été bien décrite [118-120]. La pharmacocinétique du rituximab a été assez bien étudiée [121,122], mais la connaissance de la pharmacocinétique d'anticorps comme l'adalimumab et le bevacizumab, reste insuffisante. Les études de la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux chez l'Homme ont utilisé l'approche non-compartimentale [123-129] et l'approche compartimentale. Dans ce cas, les modèles étaient parfois monocompartimentaux [130] mais le plus souvent, bicompartmentaux. Après administration IV, les concentrations d'anticorps monoclonaux décroissent en effet généralement de façon bi-exponentielle. Les anticorps se distribuent donc dans deux types de tissus, respectivement modélisés par un volume central de distribution V_1 et un volume périphérique V_2 avec une clairance de distribution Q et une clairance d'élimination CL .

1.4.5.1. Dose – dépendance et élimination non-linéaire

Des phénomènes d'éliminations saturables ont été décrits pour près de la moitié des anticorps monoclonaux commercialisés [131]. Leur clairance étant en partie due à leur fixation sur l'antigène cible, un modèle mécanistique de type TMDD peut être utilisé si les données sont suffisamment riches. Les données disponibles étant rarement très riches, la description de ces phénomènes d'élimination saturable est souvent réalisée par une équation de type Michaelis-Menten [132]. Mould *et al.* [131] ont par exemple décrit l'élimination de l'alemtuzumab par une équation de type Michaelis-Menten reliée au compartiment central. Kloft *et al.* ont décrit l'élimination du sibrotuzumab par une équation combinant clairance (élimination non saturable) et élimination de type Michaelis-Menten à partir du compartiment central [133]. Sharma *et al.* ont quant à eux décrit la pharmacocinétique du keliximab et du clenoliximab (deux anticorps anti CD4) par un modèle à deux compartiments avec élimination de type Michaelis-Menten à partir des deux compartiments [134].

Lorsque l'élimination n'est pas saturée, l'AUC - qui est le reflet de l'exposition - est proportionnelle à la dose (équation 1). Dans ce cas, si l'intervalle d'injection τ est doublé, la même AUC peut être obtenue en doublant la dose. Lorsque l'élimination fait intervenir des phénomènes saturables, cette relation n'est plus vraie et il est nécessaire de disposer d'un modèle compartimental intégrant ces phénomènes pour adapter la posologie selon l'objectif d'exposition.

Bien que les modèles de type TMDD soient théoriquement les mieux adaptés à la description mécanistique de l'élimination des anticorps monoclonaux, aucune publication n'a encore rapporté leur utilisation pour le cetuximab. Les caractéristiques non-linéaires de l'élimination sont généralement décrites par une équation de Michaelis-Menten.

1.4.5.2. Facteurs de variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la plupart des études initiales [123,124,128,130], ont rapporté une grande variabilité interindividuelle des concentrations résiduelles (avant l'injection suivante) pour une même dose d'anticorps monoclonal. Cette grande variabilité a été confirmée par toutes les études pharmacocinétiques, celles-ci ayant rapporté des coefficients de variabilité (CV) interindividuels des paramètres compris entre 20% et 50%. Avec la généralisation de l'analyse pharmacocinétique de population, quelques facteurs de variabilité ont pu être identifiés, mais la majeure partie de cette variabilité demeure inexpliquée.

1.4.5.2.1. Facteurs démographiques et biologiques

Les facteurs démographiques (âge, poids, sexe, surface corporelle, etc...) ainsi que certaines mesures biologiques (albuminémie, numération des cellules sanguines, marqueurs de l'inflammation, etc...) ont été reliés avec les paramètres pharmacocinétiques d'un anticorps thérapeutique. Le poids ou la surface corporelle sont souvent les principales covariables explicatives de la variabilité interindividuelle des volumes de distribution, ceux-ci augmentant avec la valeur de ces covariables [122,133-139]. Le sexe peut également influencer la pharmacocinétique des anticorps. Ternant *et al.* ont montré une influence du sexe sur le volume de distribution de l'infliximab [140].

Comme décrit plus haut, la distribution et l'élimination de l'albumine et des IgG sont liées. Fasanmade *et al.* ont observé une relation entre la concentration sérique d'albumine et la pharmacocinétique de l'infliximab chez les patients traités pour rectocolite hémorragique [141]. La clairance de l'infliximab était d'autant plus faible que les patients avaient une concentration d'albumine élevée. Pour expliquer ces résultats, les auteurs ont fait l'hypothèse que des concentrations faibles d'albumine sont le reflet d'une expression plus faible de FcRn, responsable d'un recyclage plus faible et donc d'une élimination plus importante de l'infliximab et de l'albumine. Ils ont proposé d'utiliser la concentration sérique d'albumine comme indicateur prédictif de l'exposition des patients à l'infliximab.

1.4.5.2.2. Immunisation

L'immunisation contre les anticorps thérapeutiques augmente leur clairance. Ternant *et al.* ont montré que la clairance de l'infliximab était 2,7 fois plus élevée chez les patients ayant des anticorps anti-infliximab [140] que chez les patients non immunisés.

1.4.5.3. Pharmacocinétique des anticorps anti-EGFR

La pharmacocinétique du cetuximab est relativement peu décrite. Les analyses qui ont été réalisées sont principalement non-compartimentales [142-144]. Cependant, comme pour la plupart des anticorps thérapeutiques, l'élimination du cetuximab est en partie concentration-dépendante en raison de la quantité limitée de cibles (EGFR) [129,145,146]. La vitesse d'élimination varie donc avec la concentration et donc en fonction du temps. Une approche compartimentale peut permettre de quantifier de manière plus précise des phénomènes d'élimination saturables.

Dirks *et al.* ont décrit la pharmacocinétique du cetuximab chez des patients traités pour carcinome épidermoïde de la tête et du cou par approche compartimentale de population. L'élimination y était quantifiée grâce à une équation de type Michaelis-Menten (équation 34) [147]. Dans cette étude, le poids idéal et la numération leucocytaire étaient des covariables influençant significativement la V_{max} , tandis que le poids influençait significativement V_1 .

Dans le cancer colorectal métastatique, une étude ancillaire d'un essai de phase II multicentrique (FOLFIRICETUX) qui évaluait la tolérance d'un schéma FOLFIRI optimisé (acide folinique, 5-Fluorouracile (5-FU) et irinotécan), une analyse de la pharmacocinétique du cetuximab retrouvait une description de cette dernière au moyen d'un modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0 [148]. Le modèle d'erreur était proportionnel. Le remplacement de l'élimination d'ordre 0 par une élimination de type Michaelis-Menten ne diminuait pas significativement la valeur de la fonction objective. La surface corporelle était retrouvée comme étant une covariable significative de V_1 , V_2 et k_0 , ces paramètres augmentant avec sa valeur. L'albuminémie initiale était une covariable significative de CL : la clairance était d'autant plus importante que l'albuminémie était faible.

Le matuzumab est une autre IgG anti-EGFR dont le développement a été arrêté en 2008 par manque d'efficacité. Sa pharmacocinétique a cependant été décrite par approche compartimentale, à l'aide d'un modèle à deux compartiments avec élimination linéaire (CL) couplée à une élimination saturable de type Michaelis-Menten [149,150]. La masse maigre était une covariable influençant significativement CL .

La pharmacocinétique du panitumumab (IgG2 anti-EGFR) a également été décrite par un modèle à deux compartiments avec élimination linéaire couplée à une élimination saturable de type Michaelis-Menten [151]. Le poids était la covariable la plus influente, reliée à CL , V_{max} , et V_1 .

1.4.6. RELATIONS DOSE-REONSE ET CONCENTRATION-REONSE DU CETUXIMAB

Peu d'études de la variabilité de la relation dose-réponse ou concentration-réponse du cetuximab ont été publiées.

Des études ont décrit une relation entre la toxicité cutanée du cetuximab et son efficacité [21] et entre la dose de cetuximab et la toxicité cutanée [143]. Dans cette dernière étude, qui est la seule publiée décrivant la relation concentration-effet du cetuximab *in vivo*, Fracasso *et al.* ont monté dans une cohorte de 39 patients traités par cetuximab pour différents types de carcinomes, que les patients répondeurs avaient un grade de première toxicité cutanée plus important que les autres patients. Fracasso *et al.* ont également observé que les patients stables et les patients répondeurs avaient une concentration résiduelle moyenne plus élevée que les patients en progression : 60 mg/L vs 30 mg/L [143].

1.5. PRINCIPE DE LA SIMULATION

Le principe de la simulation repose sur la création d'une population virtuelle, créée *in silico*, à partir d'une population réelle.

Les paramètres pharmacocinétiques individuels de cette population virtuelle sont échantillonnés à partir des paramètres de population issus du modèle compartimental de la cohorte de patients réels. Ces paramètres individuels sont utilisés pour prédire les concentrations qui seront obtenues après administration de différentes doses et différents intervalles d'injection.

A partir de ces simulations, les schémas d'injection seront comparés entre eux à l'aide des concentrations à un temps donné ou encore à l'aide de paramètres secondaires telles que l'AUC cumulée ou la clairance globale.

2. MATERIELS-METHODES ET RESULTATS

2.1. OBJECTIFS

Comme exposé dans le paragraphe initial de la thèse (*Cheminement de la thèse : de la clinique à la biologie et l'espoir d'un retour à la clinique*), mes travaux de recherche ont pris source dans les constatations de la pratique clinique : pourquoi certains patients font-ils des réactions sévères lors de la première injection du cetuximab ? Pourquoi pour certains d'entre eux le traitement a-t-il une efficacité alors que d'autres sont en échec ? Est-il légitime de faire venir les patients métastatiques toutes les semaines pour l'injection de cetuximab alors que la chimiothérapie est quant à elle administrée toutes les 3 semaines ?

Les données actuelles de la littérature sont en faveur de l'adjonction de cetuximab dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures notamment en première ligne métastatique avec un bénéfice en survie globale de 3 mois, ce qui reste la seule avancée significative de ses 30 dernières années dans ce domaine. En cas de tumeurs localement avancées, le cetuximab améliore le devenir des patients comparé à une irradiation seule. Cependant, à l'heure actuelle, le choix d'ajouter le cetuximab dans les tumeurs des VADS repose sur une décision médicale sans autres options thérapeutiques ciblées et surtout, sans facteur prédictif validé du risque de choc anaphylactique. Une fois le traitement initié, les toxicités notamment cutanées vont apparaître avec une gestion médecin-dépendante. Actuellement, cette gestion repose sur l'utilisation d'une antibiothérapie à base de cyclines et de soins locaux. Aucun élément ne justifie actuellement une augmentation de la dose de cetuximab afin d'en majorer l'efficacité. La dose est par contre volontiers revue à la baisse en cas de toxicité, en prenant le risque d'une potentielle moins grande efficacité. Des progrès sont donc à envisager dans ces domaines entraînant les réflexions menées au cours de ce travail de thèse.

Parallèlement à la prise en charge de patients dans l'essai TREMLIN et à leur analyse conduisant à sa publication en 2013, l'objectif des travaux menés était de développer un test prédictif des réactions anaphylactiques au cetuximab dans une cohorte de patients pris en charge pour un cancer ORL et de le comparer à un test commercial, d'étudier la pharmacocinétique du cetuximab dans une population de patients traités par cetuximab pour un cancer ORL localement avancé ou métastatique et d'étudier les sources de variabilité interindividuelles, son influence sur la réponse clinique et les conséquences potentielles en termes de modes d'administration :

- Essai randomisé de phase II TREMLIN proposant une chimiothérapie d'induction par docetaxel, cisplatine et 5-Fluorouracile (5-FU) suivie d'une radiothérapie

concomitante au cisplatine ou au cetuximab dans le but de préserver le larynx (Publication I).

- Analyse bibliographique des réactions à la perfusion aux anticorps thérapeutiques centrées sur celles au cetuximab (Publications II et III) et développement d'un test de détection des IgE anti- α 3Gal afin de prédire le risque de réactions anaphylactiques après l'avoir comparé à un test commercial (Manuscrit V).
- Etude des relations entre deux facteurs individuels, la pharmacocinétique du cetuximab et la toxicité cutanéomuqueuse, et la survie de patients traités pour un cancer de VADS (Publication IV).
- Etude par simulation de la faisabilité d'espacer les perfusions du cetuximab chez les patients traités par chimiothérapie pour un cancer des VADS (Manuscrit VI).

2.2. PHASE II RANDOMISEE TREMLIN

2.2.1. CHIMIOTHERAPIE D'INDUCTION ET PRESERVATION LARYNGEE

Dans le début des années 1990, le standard de prise en charge des patients porteurs de tumeurs classées T3 ou T4 du larynx ou de l'hypopharynx était la (pharyngo)laryngectomie totale avec curage ganglionnaire suivie d'une radiothérapie postopératoire. Cette intervention chirurgicale permettait d'obtenir un bon contrôle local de la maladie. Ce contrôle tumoral se faisait au prix d'une mutilation importante avec perte de la phonation et réalisation d'une trachéotomie définitive. Cette chirurgie retentissait négativement sur la vie des patients avec un risque d'isolement social, de perte d'emploi et de dépression. Cette chirurgie était également contrebalancée par un risque de récidive locorégionale et métastatique (40-60% des cas) de la pathologie tumorale [152,153].

Des stratégies alternatives se sont alors développées telles que la laryngectomie partielle, l'adjonction de chimiothérapie, des modifications dans la délivrance de la radiothérapie (modification du fractionnement et de l'étalement) sans qu'aucun schéma optimal ne soit retenu. Ces travaux de recherche pour un traitement conservateur ont été menés pour essayer d'obtenir une efficacité thérapeutique identique à la chirurgie tout en évitant la laryngectomie totale.

Les premiers essais dits de préservation laryngée ont été faits en utilisant la chimiothérapie d'induction, c'est-à-dire une chimiothérapie réalisée en première ligne de l'arsenal thérapeutique (encore appelée chimiothérapie néoadjuvante). Elle permettait de sélectionner les patients chez lesquels un traitement conservateur pouvait être proposé. Les patients bons répondeurs à la chimiothérapie recevaient une irradiation et les patients non répondeurs étaient traités par la (pharyngo)laryngectomie totale initialement prévue.

Cette première génération d'essais de préservation a été marquée par trois essais randomisés majeurs [153-155]. Les essais des Vétérans [154] et du GETTEC [155] concernaient des patients porteurs d'un cancer du larynx et l'essai de l'EORTC [153] ceux porteurs d'un cancer de l'hypopharynx. Les trois études ont utilisé une chimiothérapie (PF) associant le cisplatine (P à 100 mg/m² à J1) et le 5-FU (ou F en perfusion continue à 1000 mg/m²/j de J1 à J5) à raison d'un cycle toutes les 3 semaines pour un maximum de 3 cycles.

Dans l'essai des Vétérans [154], les patients en réponse partielle après 2 cycles de PF recevaient un troisième cycle de chimiothérapie puis étaient irradiés ; les autres patients étaient opérés. Dans l'essai EORTC [153], seuls les patients en réponse complète après le deuxième ou le troisième cycle de PF étaient irradiés et les autres opérés.

Dans ces deux études les taux de survie des deux bras (chirurgie et chimiothérapie d'induction) n'étaient pas différents et les auteurs ont conclu qu'un traitement conservateur par radiothérapie chez les patients répondeurs à la chimiothérapie d'induction était un traitement efficace, ne compromettant pas la survie et que 40 à 64% des patients pouvaient ainsi conserver leurs larynx.

L'étude du GETTEC [155] a retrouvé des résultats défavorables chez les patients ayant reçu la chimiothérapie d'induction, mais elle n'a porté que sur 68 patients. Dans cette étude française les deux tiers des patients étaient porteurs d'une tumeur (T3 uniquement) glottique ou trans-glottique et un tiers une tumeur sus glottique (margelle laryngée exclue) et il faut noter que tous avaient une fixité laryngée initiale, donc une population de moins bon pronostic.

Une méta-analyse (MACH-NC) a été effectuée sur ces 3 études et a rassemblé 602 patients [156]. Les taux de survie à 5 ans étaient de 45 % (bras chirurgical) versus 39 % (bras chimiothérapie d'induction). La différence n'était pas statistiquement significative mais 58 % des patients en vie avaient un larynx fonctionnel en place.

La chimiothérapie d'induction avec le schéma PF (3 cycles) a donc été retenue comme un traitement standard chez les bons répondeurs en alternative thérapeutique à la chirurgie radicale. Les travaux de recherche suivants dans ce domaine ont eu pour objectif d'obtenir un taux de réponse le plus élevé possible en utilisant des protocoles intensifiés : soit en combinant des thérapeutiques, soit par l'adjonction de taxanes.

Une deuxième génération d'essais de préservation a été mise en place avec une autre voie d'optimisation des résultats de la radiothérapie. Il s'agissait de l'association de la chimiothérapie non plus de façon séquentielle mais de façon simultanée à la radiothérapie.

Cette stratégie a été testée aux Etats Unis dans l'essai du Radiation Therapy Oncology Group (RTOG 91-11). Il s'agissait d'une étude à trois bras [157] comparant la chimiothérapie d'induction par PF (bras expérimental des précédents essais d'induction) suivie d'une irradiation, la radiochimiothérapie concomitante (RCC) avec du cisplatine à 100 mg/m² (J1, J22 et J43) et enfin la radiothérapie exclusive. Cinq cent quarante-sept patients ont été inclus

dans cette étude et 518 furent analysés pour la publication. La survie n'était pas significativement différente entre les trois bras mais le taux de préservation laryngée était significativement supérieur dans le bras concomitant : 88 % (IC 95 % : 83 – 93), contre 75 % (IC 95 % : 68 – 81) pour le bras induction et 70 % (IC 95 % : 63 – 76) pour le bras radiothérapie exclusive. Une actualisation à 10 ans a eu lieu en 2012 [158]. Un total de 520 patients a été analysé. Le suivi médian des patients vivants était de 10,8 ans. Seuls 11,7% des patients étaient vivants avec un recul d'au moins 10 ans. Les deux bras comportant de la chimiothérapie augmentaient significativement la survie sans laryngectomie par rapport à la radiothérapie seule avec respectivement pour l'induction et pour la RCC des hazard ratio à 0,75 (IC95% 0,59 – 0,95) et 0,78 (IC95% 0,61 – 0,98). La survie globale ne différait pas de manière significative, même s'il existait une tendance délétère dans le bras RCC comparé à l'induction (27,5% versus 38,8% ; HR = 1,25; IC95% 0,98 – 1,61) alors que le chiffre était de 31,8% pour l'irradiation seule. Le bras RCC augmentait significativement le taux de préservation du larynx par rapport à l'induction (HR = 0,58; IC95% 0,37 – 0,89) ou à l'irradiation seule ($p < 0,001$) ; alors qu'induction et irradiation seule ne différaient pas (HR = 1,26; IC95% 0,88 – 1,82). Aucune différence en termes de toxicité tardive n'était rapportée (avec respectivement 30,6, 33,3 et 38,0% de grade 3 à 5 dans les bras induction, RCC et radiothérapie) mais le nombre de décès non attribuable aux traitements ou aux cancers du larynx était nettement plus important dans le bras RCC avec 30,8% versus 20,8% pour l'induction et seulement 16,9% pour l'irradiation seule. Cette actualisation à 10 ans [158] montre l'absence de différence entre chimiothérapie d'induction (sans docetaxel) suivie de radiothérapie versus RCC en termes de survie sans laryngectomie. Le taux de contrôle locorégional et de préservation du larynx semble meilleur dans le bras RCC mais le nombre de décès dans ce bras est conséquent et interroge.

La publication de la méta-analyse MACH-NC regroupait plus de 10 000 dossiers de patients enrôlés dans des études randomisées comparant un traitement conventionnel à ce même traitement associé à une chimiothérapie soit d'induction, soit concomitante, soit adjuvante [156]. Globalement la chimiothérapie apportait à 5 ans un bénéfice significatif de survie de 4 %. En fait, il n'y avait aucun bénéfice significatif pour la chimiothérapie d'induction ou adjuvante et seuls les essais de RCC faisaient apparaître un bénéfice significatif de 8 %.

Les mises à jour [159,160] de la méta-analyse MACH-NC incluant plus de 16 000 patients (dont ceux inclus dans des essais plus récents de RCC chez des patients non prétraités) confirmait la supériorité de ce type de traitements combinés quand on les comparaient à la

radiothérapie exclusive (+8 %, et même +11 % pour l'association du cisplatine seul à la radiothérapie). Parmi les 4307 patients inclus dans des essais de radiothérapie et de chimiothérapie concomitante, 1565 patients étaient porteurs d'une tumeur laryngée ou hypopharyngée. Ces patients inclus dans le bras concomitant avaient, en comparaison avec ceux inclus dans le bras de radiothérapie exclusive, une réduction relative du risque à 5 ans de 16 à 22 % ce qui correspondait à un bénéfice absolu de survie à 5 ans de 8 à 10 %.

Ces différents essais et les méta-analyses ont permis de retenir la RCC comme étant le meilleur schéma pour la préservation laryngée et le contrôle locorégional.

Une troisième génération d'essais de préservation laryngée a ensuite vue le jour et a relancé le principe de l'induction avec l'avènement des taxanes et notamment du docétaxel.

En effet, l'induction est revenue sur le devant de la scène car, d'un point de vue chirurgical, elle présentait l'avantage de changer rapidement de stratégie pour opérer les patients mauvais répondeurs puis de délivrer une radiothérapie postopératoire adaptée. Deux essais randomisés de phase III utilisant le TPF en induction suivi de radiothérapie seule (TAX 323) ou en association au carboplatine (TAX 324) ont confirmé, chez les patients non opérables, la supériorité du TPF [161,162] comparé au schéma PF en termes de réponse, de survie globale et d'intervalle sans progression. Dans l'essai TAX 323 [161], les patients étaient randomisés dans les bras TPF ou PF. La médiane de survie globale était de 18,8 mois pour le TPF et de 14,5 mois pour le groupe PF. Dans l'essai TAX 324 [162], la survie globale médiane était de 71 mois pour le TPF et de 30 mois pour le PF, avec une différence significative en faveur du bras TPF ($p = 0,006$). Le taux de contrôle locorégional était plus élevé dans le bras TPF que dans le bras PF. Ces essais rapportaient également une meilleure compliance et une meilleure qualité de vie chez les patients du groupe TPF. Ces deux derniers essais n'étaient pas conçus pour évaluer spécifiquement les taux de préservation laryngée.

Le seul essai randomisé de phase III spécifiquement conçu pour évaluer la préservation laryngée était l'essai GORTEC 2000-01 [163]. Il incluait des patients porteurs de cancers ORL relevant d'une laryngectomie totale qui ont été randomisés pour recevoir trois cycles de chimiothérapie d'induction par TPF ou PF. Les patients bons répondeurs à la chimiothérapie recevaient une radiothérapie parfois associée à de la chimiothérapie. Les autres étaient traités par laryngectomie totale suivie de radiothérapie. Les caractéristiques des patients et de leurs tumeurs étaient comparables dans les deux bras de traitement se répartissant en 110 malades dans le bras TPF et 103 dans le bras PF. Avec un suivi médian de 36 mois, les taux de préservation laryngée étaient de 70,3% dans le bras TPF et de 57,5% dans le bras PF, avec

une différence significative de 12,8% ($p = 0,03$). Les patients du groupe TPF ont présenté davantage d’alopécie grade 2, de neutropénie grade 4 et de neutropénie fébrile, alors que les patients du groupe PF ont présenté plus de mucite grades 3 à 4, de thrombopénie grade 4 et d’insuffisance rénale. Le taux de réponse globale était de 80,0% dans le bras TPF versus 59,2% dans le bras PF ($p = 0,002$). Le schéma d’induction par TPF était supérieur au bras de référence PF en terme de réponse globale et de préservation laryngée validant définitivement ce schéma d’induction dans le cadre d’une préservation laryngée. Aucun impact n’était retrouvé sur la survie globale.

2.2.2. RATIONNEL DE L’ESSAI TREMPLIN ET OBJECTIFS

La question suivante était de savoir quel était le traitement optimal réalisable au décours de cette chimiothérapie d’induction par TPF et ce nouvel essai avait pour but de répondre à cette interrogation.

Dans les cancers des VADS, le cetuximab a été évalué dans de nombreuses études cliniques, soit en association avec la radiothérapie dans les cancers localement avancés, soit chez des patients non prétraités ou réfractaires aux sels de platines dans les cancers récurrents et/ou métastatiques.

Dans une étude randomisée de phase III réalisée chez des patients présentant des carcinomes localement avancés de pronostic intermédiaire, Bonner *et al.* ont comparé une radiothérapie exclusive à 70 Gy ($n = 213$) à l’association radiothérapie plus cetuximab ($n = 211$) administré à raison de 7 injections hebdomadaires aux doses recommandées pendant la durée de la radiothérapie [18,19]. La combinaison a démontré un impact positif sur le contrôle locorégional et la survie globale sans majorer les toxicités aiguës à type de mucite. La médiane du contrôle locorégional était de 24,4 mois dans le bras d’association et de 14,9 mois dans celui de radiothérapie seule ($p = 0,005$). L’association permettait également de prolonger l’intervalle sans progression de la maladie. Les événements indésirables les plus fréquemment reliés au cetuximab étaient les éruptions acnéiformes et/ou moins fréquemment sous forme d’anomalies unguérales (paronychies). L’éruption acnéiforme survenait habituellement dans les trois premières semaines de traitement au niveau du visage, du thorax et du dos et pouvait s’étendre parfois aux extrémités. En général, cette éruption était réversible spontanément à l’arrêt du traitement. Des réactions d’hypersensibilité de grade 3 ou 4 (incluant réactions allergiques et anaphylactiques) ont été observées chez des patients traités par cetuximab.

Ces résultats ont motivé la comparaison du cetuximab et du cisplatine associé à la radiothérapie externe au décours de la chimiothérapie par TPF chez les patients bons répondeurs dans un essai de phase II randomisé. En 2005, le GORTEC et le GETTEC ont initié cet essai multicentrique prospectif pour tester ces deux associations dans le but d'augmenter le taux de préservation laryngée par rapport au schéma TPF suivi d'une irradiation seule. Cet essai a été spécialement conçu pour évaluer la préservation d'organe.

L'objectif principal était d'évaluer le taux de préservation laryngée immédiat à 3 mois, obtenu par la séquence d'une chimiothérapie d'induction puis d'une association de la radiothérapie avec soit du cisplatine soit du cetuximab. La préservation laryngée était définie 3 mois après la fin de la radiothérapie comme l'absence de résidu tumoral évaluée par endoscopie et scanner justifiant la réalisation d'une laryngectomie totale de rattrapage immédiate. Une trachéotomie et/ou ou la mise en place d'une sonde nasogastrique (ou de gastrostomie) provisoires de principe ou de nécessité, pour la durée du traitement et les suites immédiates n'étaient pas considérées comme des échecs à la condition qu'elles aient été retirées à la date d'évaluation.

Les objectifs secondaires étaient l'évaluation de la durée de la réponse, le taux de préservation laryngée à 18 mois (c'est-à-dire l'absence de toute évolution locale et l'absence de trachéotomie ou de sonde d'alimentation et avec une voix socialement acceptable), la qualité de vie (essentiellement qualité de la fonction pharyngolaryngée : phonation, déglutition et respiration) pendant et après le traitement, la toxicité des traitements et les interruptions de traitement, la faisabilité et la morbidité de la chirurgie de rattrapage si celle-ci était nécessaire.

2.2.3. PATIENTS, TRAITEMENTS ET METHODES

Les patients étaient randomisés pour recevoir :

- trois cycles de chimiothérapie d'induction par TPF puis en cas de réponse majeure :
 - ✓ soit une radiothérapie conventionnelle associée au cisplatine (bras A)
 - ✓ soit une radiothérapie conventionnelle associée au cetuximab (bras B)
- les patients sans réponse majeure étant traités par chirurgie et irradiation postopératoire après cette chimiothérapie d'induction.

La réponse majeure était définie 3 semaines après la chimiothérapie d'induction comme la régression de plus de 50 % du volume tumoral évaluée endoscopiquement et scanographiquement (par comparaison avec la description endoscopique et scanographique initiale) associée à une remobilisation laryngée évaluée en fibroscopie.

Les critères d'inclusion des patients étaient les suivants :

- Carcinome épidermoïde du larynx ou de l'hypopharynx, histologiquement prouvé, localement avancé, relevant d'une (pharyngo)laryngectomie totale ou subtotale
- Volume tumoral évaluable selon les critères RECIST
- Absence de métastase à distance, confirmée par TDM thoracique, échographie abdominale (ou TDM) en cas d'anomalie de la fonction hépatique, et scintigraphie osseuse en cas de symptômes locaux
- Absence de toute chimiothérapie ou radiothérapie antérieure, quelle qu'en soit la raison
- Absence de toute intervention chirurgicale pour carcinome épidermoïde des VADS
- Absence de toute participation à un essai thérapeutique dans les 30 jours précédent l'inclusion
- Absence de tout traitement anticancéreux concomitant
- Absence de tout traitement chronique (≥ 3 mois) par corticoïde dont la posologie journalière était ≥ 20 mg/jour de méthylprednisolone ou équivalent
- Age compris entre 18 et 75 ans
- Indice de performance (« Performance Status » ou OMS) de 0 ou 1 selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)
- Bonnes fonctions biologiques
- Espérance de vie supérieure ou égale à 3 mois
- Perte de poids inférieure à 10 % au cours des 3 derniers mois
- Patient ayant donné son consentement écrit avant toute procédure spécifique du protocole.

Il s'agissait d'un essai de phase II randomisé, multicentrique, en ouvert. Tous les patients éligibles devaient être enregistrés pour être ensuite randomisés. La randomisation se faisait 3 semaines après la fin de la chimiothérapie d'induction uniquement pour les patients présentant une réponse majeure, les autres étant opérés.

Le diagramme CONSORT rapporte le schéma de l'essai (Figure 30). La réponse tumorale à la chimiothérapie d'induction était évaluée 3 à 5 semaines après le dernier cycle de

chimiothérapie par laryngoscopie directe et scanner cervical. La mobilité laryngée, définie par une mobilité normale des cordes vocales, était évaluée pendant l'endoscopie sous anesthésie générale.

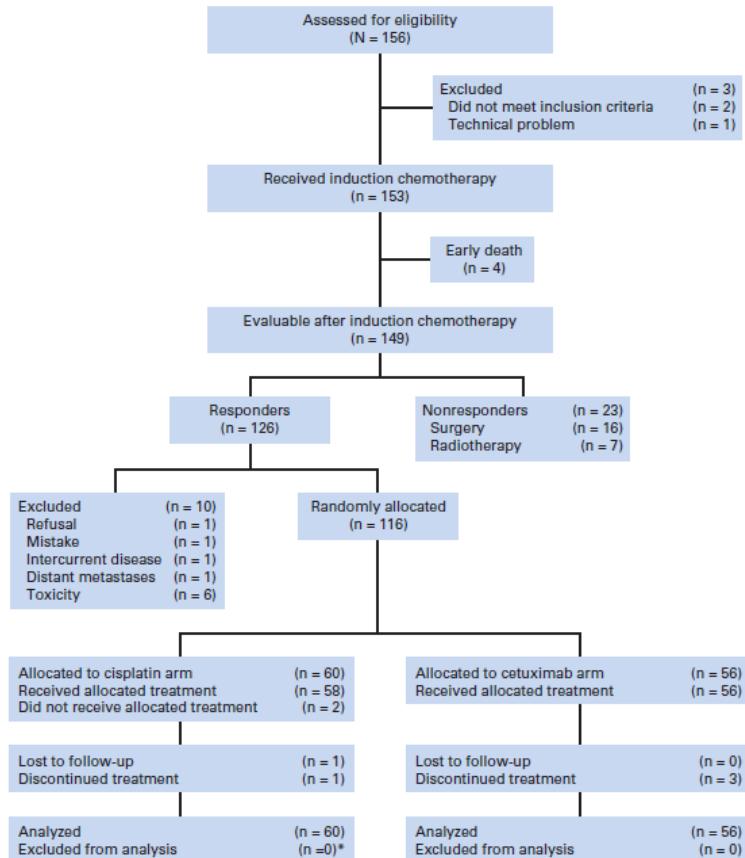


Figure 30. Diagramme CONSORT de l'essai TREMPLIN.

Les patients en réponse complète sur le site tumoral primitif ou en réponse partielle avec une remobilisation laryngée normale ont été traités par radiothérapie externe associée à un des 2 médicaments. Un curage ganglionnaire était réalisé en cas d'adénomégalies persistantes. Les patients non répondeurs étaient pris en charge par laryngectomie totale et curage ganglionnaire suivis d'une radiothérapie externe.

L'essai thérapeutique TREMPLIN a été enregistré au ClinicalTrials.gov sous le numéro NCT00169247.

La chimiothérapie d'induction était la même pour l'ensemble des patients. Le docétaxel à 75 mg/m² était administré à J1 de chaque cure par perfusion IV d'une heure suivi du cisplatine 75

mg/m² administré à J1 par perfusion d'une heure suivi du 5-FU à 750 mg/m²/jour administré en perfusion continue de J1 à J5.

Les cycles étaient répétés toutes les 3 semaines jusqu'à un total de 3 cycles. Le traitement était interrompu en cas de progression, de toxicité inacceptable, ou en cas de refus du patient. Pour les patients en progression, la chirurgie était proposée.

Tous les patients en réponse majeure devaient recevoir une irradiation externe après la chimiothérapie d'induction. En cas de dissociation entre la réponse ganglionnaire et la réponse tumorale locale (réponse tumorale complète ou majeure mais réponse ganglionnaire insuffisante) et en l'absence de continuité initiale entre la tumeur et les ganglions, il était possible de proposer une préservation laryngée par radiothérapie. Il était laissé à l'appréciation de chaque institution de réaliser un curage ganglionnaire avant cette radiothérapie si la réalisation de celui-ci ne compromettait pas la mise en route de la radiothérapie dans les délais impartis.

La radiothérapie était débutée après un intervalle libre minimum de 3 semaines et au maximum de 6 semaines après le début de la dernière cure de chimiothérapie et était pratiquée en mode fractionné conventionnel. La toxicité aiguë était évaluée au cours de la consultation hebdomadaire pendant les 7 semaines de la radiothérapie et pendant les 5 semaines consécutives.

Le cisplatine était administré en perfusion IV d'une heure à la dose de 100 mg/m² aux jours 1, 22 et 43 de la radiothérapie.

La première perfusion intraveineuse de cetuximab était réalisée à la dose de 400 mg/m². Avant la première perfusion, les patients devaient recevoir une prémédication par un antihistaminique afin de réduire les risques de réaction à la perfusion. La perfusion de cetuximab était réalisée sur une durée de 120 minutes. Les administrations ultérieures étaient réalisées à la dose de 250 mg/m² aux jours 8, 15, 22, 29, 36 et 43 de la radiothérapie. Une prémédication par un antihistaminique était recommandée. La perfusion de cetuximab était réalisée sur une durée de 60 minutes.

Les caractéristiques des patients étaient comparées par un test t de Student ou un test de Mann-Whitney pour les variables continues et par un test du Chi2 ou un test exact de Fischer pour les variables discrètes. Tous les calculs des valeurs du « p » étaient faits de manière bilatérale et considérés comme significatifs pour une valeur inférieure à 0,05.

2.2.4. RESULTATS

Un total de 156 patients a été inclus. Deux patients ont été considérés comme inéligibles (un pour laryngectomie partielle réalisable d'emblée et un pour carcinome invasif non prouvé) et un patient n'a reçu aucune chimiothérapie pour des problèmes de complications de la voie d'abord centrale (cathéter posé dans le système artériel) ayant entraînait le dépassement du délai pour l'inclusion. Ces trois patients ont été exclus de l'analyse.

Un total de 153 patients a débuté le traitement par chimiothérapie d'induction. Un total de 443 cycles de chimiothérapie d'induction a été administré et 113 patients ont reçu les 3 cycles à doses complètes.

Au total, 126 patients étaient répondeurs mais seulement 116 ont été randomisés. Parmi ces 116 malades, 60 ont été randomisés dans le bras cisplatine et 56 dans le bras cetuximab. Les deux bras de traitement étaient bien équilibrés en termes de sexe, âge, stade tumoral, score OMS, taux d'hémoglobine et type histologique (Tableau 11).

Tableau 11. Caractéristiques des patients randomisés dans l'essai TREMLIN après chimiothérapie d'induction.

Characteristic	Cisplatin		Cetuximab	
	No.	95% CI	No.	95% CI
No. of patients	60		56	
Sex				
Male	52		55	
Female	8		1	
Mean age, years	57.5	56 to 59	57.8	56 to 59.5
WHO performance status				
0	46		39	
1	13		17	
Missing data	1		—	
Primary tumor site				
Larynx	27		20	
Hypopharynx	33		36	
Disease stage at enrollment				
II	9		4	
III	35		30	
IVa	16		22	

Parmi les 58 patients ayant débuté la radiochimiothérapie concomitante avec du cisplatine, seuls 25 patients (43%) ont reçu le traitement complet. En effet, 8 patients n'ont reçu qu'un seul cycle de chimiothérapie et 25 ont reçu 2 cycles. Les causes étaient des insuffisances rénales (n = 9), des toxicités sévères (10 toxicités hématologiques, 7 mucites et 2 autres), une progression tumorale sous traitement (n = 1), un refus de poursuite du traitement (n = 2) et 2 erreurs d'administration.

Parmi les 56 patients ayant débuté la radiothérapie concomitante au cetuximab, 40 ont pu recevoir le traitement complet (71%). Les 16 autres patients ont reçus moins de cycles pour causes de réaction allergique à la première injection ($n = 2$), de malaise cardiaque à la première injection ($n = 1$), de toxicité cutanée ($n = 9$ dont 3 liées au cetuximab et 6 à la radiothérapie), de mucite ($n = 2$) ou de pathologie intercurrente ($n = 2$).

Avec un recul médian de 3 mois, le taux de préservation laryngée chez les patients était de 95% dans le bras cisplatine et de 93% dans le bras cetuximab (non significatif).

Il n'y avait pas non plus de différence en survie globale (Figure 31).

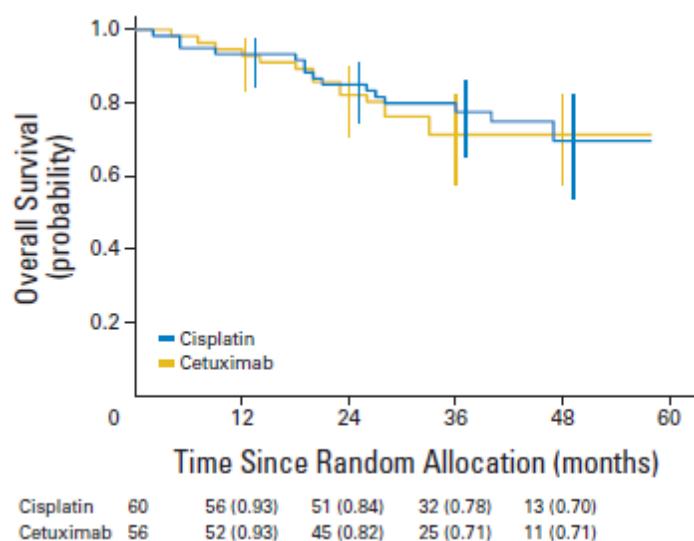


Figure 31. Survie globale des patients répondeurs à la chimiothérapie d'induction dans l'essai TREMLIN.

2.2.5. CONCLUSION

La population des patients porteurs d'une tumeur localement avancée de l'hypopharynx ou du larynx recevant une chimiothérapie d'induction par TPF, ont un taux de préservation laryngée excellent avec une efficacité à 3 mois identique quand la radiothérapie, réalisée chez les patients bons répondeurs, est associée soit au cisplatine soit au cetuximab.

Le recul n'est cependant pas suffisant pour qu'une différence en terme de contrôle locorégional ou de toxicité tardive soit mise en évidence entre ces deux protocoles ou encore en comparaison à la radiothérapie seule.

Les stratégies de préservation sont toujours d'actualité et la comparaison des standards vient de débuter dans l'essai SALTORL qui compare le bras standard selon le RTOG 91-11 (radiothérapie plus cisplatine 100 mg/m² J1, J22 et J43), au bras standard de la chimiothérapie d'induction selon le GORTEC 2000-01 (3 cycles de TPF suivis, chez les bons répondeurs, d'une irradiation seule).

2.3. DEPISTAGE PRE-TRAITEMENT : RECHERCHE DES IGE ANTI- α 3GAL

2.3.1. TECHNIQUES DE DOSAGE DES IGE ANTI- α 3GAL

A l'heure actuelle, la présence des IgE anti- α 3Gal reste le seul marqueur prédictif du risque de réaction d'hypersensibilité sévère au cetuximab. Dans ce contexte, une technique de dosage des IgE anti- α 3Gal utilisable en routine serait un outil intéressant pour les cliniciens et surtout pour les patients.

Depuis les travaux de Chung *et al.* publiés en 2008 [67], il est maintenant communément admis que les réactions sévères à la perfusion de cetuximab sont en majorité dues à des IgE anti- α 3Gal préexistantes dans le sérum. Une technique de dosage des IgE anti- α 3Gal, applicable en routine, permettrait une utilisation plus sûre du cetuximab. En effet, le dosage systématique de ces IgE dans le sérum des patients en prétraitement permettrait de dépister les patients les plus à risque de présenter une réaction allergique sévère. Une alternative thérapeutique, lorsqu'elle existe, pourrait alors leur être proposée ou bien, leur première perfusion de cetuximab pourrait être réalisée dans un environnement très encadré, par exemple en service de réanimation.

La mise en place de ce dosage en routine devient donc une nécessité. Les réactions allergiques sévères au cetuximab semblent plus fréquentes que ne le laissent supposer les chiffres mentionnés par le fabricant. Ces réactions peuvent être fatales pour les patients et d'un point de vue médico-légal il devient "condamnable" de ne pas mettre en œuvre leur dépistage. Le dépistage systématique des IgE anti- α 3Gal permettrait de pouvoir continuer à utiliser cet anticorps thérapeutique, à moindre risque.

A l'heure actuelle, en l'absence de tests de routine permettant de caractériser leur mécanisme (dépendant ou non d'IgE), toute réaction sévère à la perfusion impose l'arrêt définitif du traitement par cetuximab, réduisant encore les possibilités thérapeutiques. Le dosage des IgE anti- α 3Gal chez les patients ayant déjà subi une réaction sévère au cetuximab, permettrait d'orienter vers le mécanisme sous-jacent : anaphylactique ou anaphylactoïde. En cas de mécanisme non dépendant des IgE, une réintroduction du cetuximab pourrait être concevable.

La diminution de l'incidence des réactions graves au cetuximab par dépistage des patients à risques, en plus d'un impact médical important, aurait également un impact économique. En effet, les patients manifestant des réactions à la perfusion nécessitent entre 31 et 80 % de

temps supplémentaire par rapport à un patient tolérant la perfusion [164]. Une perfusion de cetuximab déclenchant une réaction chez le patient et nécessitant une hospitalisation et/ou une intervention médicale revient trois fois plus chère qu'une perfusion bien tolérée (13.863 \$ vs 4.555\$) [52].

Pour toutes ces raisons, plusieurs équipes basées dans différents pays travaillent actuellement sur la mise au point et la validation d'un test de routine pour le dosage des IgE anti- α 3Gal ou des IgE anti-cetuximab. Nous pouvons citer par exemple les travaux menés par une équipe du CHU de Nancy, qui ont développé une technique de détection de ces IgE anti- α 3Gal. Celle-ci est basée sur celle de Chung *et al.*, la détection étant réalisé de façon automatisée dans des ImmunoCapsTM streptavidine sensibilisés par l'épitope α 3Gal (Gal α 3Gal β 4GlcNAc) biotinylé [165].

A Caen, une technique de dosage par ELISA classique, a été développée. Elle permet de doser les IgE anti-cetuximab [166]. Cette technique utilise l'anticorps entier qui sert alors d'antigène. Ce test a été réalisé chez 92 patients avant l'injection de cetuximab. Un échantillon de 117 donneurs de sang a été également testé. Les IgE ainsi mesurées étaient présentes à un pourcentage identique dans le sérum des donneurs de sang (population générale) que dans celui des patients (26 % vs 28 %). Les réactions d'hypersensibilité étaient observées chez 15 % des patients mais la moitié seulement était de grade III ou IV (8,7%). Ce test semble donc assez peu spécifique.

La multiplication des essais pour la mise au point d'un dosage des IgE anti- α 3Gal met bien en évidence l'universalité du problème des allergies au cetuximab.

Plus récemment, un test automatisé (ImmunoCAP250TM) a été commercialisé pour doser les IgE anti- α 3Gal dans le cadre du dépistage des allergies à la viande. Il s'agit d'un test utilisant de la thyroglobuline bovine (test bTG), naturellement riche en sucres α -galactosylés. Ce test sera également appliqué aux cohortes étudiées compte tenu de sa simplicité d'utilisation.

2.3.2. MISE AU POINT DE L'ANALYSE

L'objectif de cette partie a été de mettre au point une méthode ELISA pour détecter en routine la présence d'IgE anti- α 3Gal dans le sérum avec l'évaluation de divers antigènes à différentes concentrations afin de déterminer les paramètres permettant une détection optimale des IgE anti- α 3Gal.

2.3.2.1. Sélection de serum tests

Trois sérums prélevés à distance de chocs anaphylactiques à la première injection de cetuximab, collectés après recueil du consentement du patient, ont été utilisés pour mettre au point le dosage (Tableau 12).

Tableau 12. Caractéristiques des patients ayant présenté une réaction d'hypersensibilité grave au cetuximab et analysés en rétrospectif.

	Caractéristiques du patient				Caractéristiques de la réaction			Date du prélevement
	Sexe	Date de naissance	Pathologie	Ville	Date	Description*	Classification **	
Patient 1	M	27/11/1949	Adénocarcinome rectal + métastases pulmonaires	Tours (CHRU)	15/12/2005	30 min après le début de la première perfusion : <ul style="list-style-type: none"> malaise au lever prurit éruption cutanée érythème généralisé suces chute tension artérielle (9/5 cm Hg) 	Grade III	16/09/2008
Patient 2	M	07/03/1966	Adénocarcinome colique + 11 ganglions métastasiques	Chartres (CH)	19/03/2008	10 min après le début de la première perfusion : <ul style="list-style-type: none"> prurit généralisé œdème du visage tachycardie chute de la tension artérielle (imprenable) 	Grade IV	21/10/2008
Patient 3	F	06/11/1954	Adénocarcinome colique + métastases hépatiques	Tours (CHRU)	10/12/2008	10 min après le début de la première perfusion : <ul style="list-style-type: none"> urticaire généralisée tachycardie (110 battements/min) désaturation en oxygène (94%) brûlures respiratoires 	Grade IV	22/03/2009

Remarques : tous les patients avaient reçu une prémedication par Solumédrol® et Polaramine® ; aucun ré-introduction du cetuximab n'a été testée

* données collectées à posteriori dans le dossier médical du patient

** la sévérité de la réaction a été évaluée à posteriori sur la base des données présentes dans le dossier médical et à l'aide de la classification du NCI-CTC v3.0 section "réactions allergiques/hypersensibilité" (Tableau II)

2.3.2.2. Mise au point du dosage (Thèse de C. Fréneaux)

Comparées aux autres classes d'immunoglobulines, les IgE sont présentes en très faible quantité dans le sérum. En effet, dans le sérum humain, les IgG sont présentes à des concentrations de plusieurs grammes par litres, les IgM et IgA à des concentrations variant de plusieurs centaines de milligrammes à quelques grammes par litres alors que les concentrations d'IgE sont de l'ordre de nanogrammes par litre. Pour s'affranchir des difficultés de dosage possiblement rencontrées dans un ELISA manuel classique, a été préféré un système dédié aux dosages des IgE spécifiques en routine : le système ImmunoCap™ commercialisé par Phadia®. La caractéristique du système ImmunoCap™ réside dans la nature de sa phase solide. Il s'agit d'un dérivé de cellulose enfermé dans une capsule. Ce

polymère hydrophile, très ramifié, offre une grande surface de fixation des allergènes conférant à cette technologie une grande sensibilité.

Pour les dosages, des ImmunoCapsTM streptavidine ont été utilisés. Ces caps, commercialisés depuis 2005, permettent de fixer sur la phase solide n'importe quel antigène dès lors qu'il a été préalablement biotinylé [167,168]. Les dosages ont été réalisés par un automate ImmunoCap 100TM.

Dans un premier temps, les ImmunoCapsTM streptavidine sont prélavés automatiquement avec la solution de lavage (à base de 5-chloro-2-méthyl-4 isothiazoline-3-un et de 2-méthyl-2*H*isothiazol-3-un en tampon phosphate) fournie par Phadia[®]. Cette solution sera utilisée pour la réalisation de toutes les étapes de lavage qui vont suivre. Les allergènes biotinylés sont ensuite déposés sous un volume de 50 µL sur la phase solide portant la streptavidine. Cette étape de dépôt peut être automatisée si le même allergène est déposé dans tous les ImmunoCapsTM de la série. Les dépôts d'antigènes sont effectués manuellement mais les étapes ultérieures sont réalisées par l'automate après programmation. Une incubation de 30 min à 37°C permet la fixation des antigènes sur la phase solide, un lavage par la même solution que celle précédemment utilisée permet ensuite l'élimination des allergènes biotinylés en excès non fixés. L'automate ajoute ensuite 50 µL de sérum puis réalise une étape d'incubation de 30 min à 37°C suivie d'un lavage avec la solution de lavage PhadiaTM. Le conjugué, un anticorps monoclonal murin anti-IgE couplé à une enzyme (β -galactosidase), est ensuite déposé dans l'ImmunoCapTM (50 µL). Pendant l'étape d'incubation de 24 minutes à 37°C, les anticorps anti-IgE vont se fixer sur les éventuelles IgE du sérum fixées sur l'antigène. Un lavage est ensuite réalisé pour éliminer les anti-IgE non fixées, puis 50 µL de la solution de substrat de l'enzyme (4-Méthylombelliféryl- β -D-galactoside) sont ajoutés. En présence de l'enzyme, le substrat se transforme en un produit fluorescent. Le signal de fluorescence développé est proportionnel à la quantité d'enzyme présente, donc à la quantité d'IgE fixées sur l'antigène. Après 9 minutes à 37°C, la réaction est stoppée par ajout d'une solution modifiant le pH (solution stop à base de carbonate de sodium). La fluorescence est ensuite mesurée par lecture à travers un capillaire en verre (Figure 32).

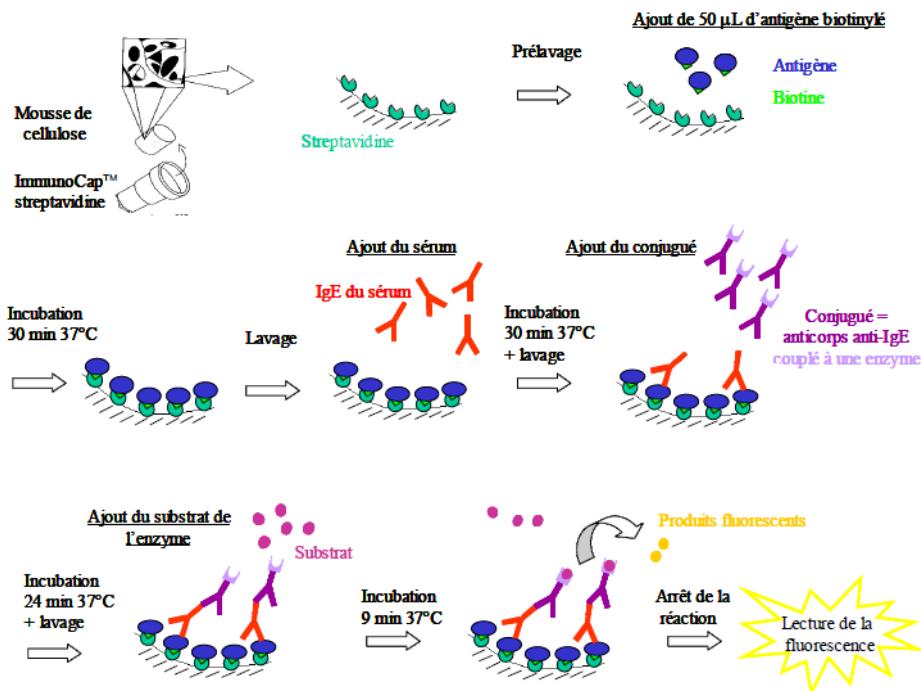


Figure 32. Principe du dosage des IgE spécifiques par la technique ImmunoCap™.

Pour évaluer les résultats du test, les signaux de fluorescence obtenus pour les échantillons sont convertis en concentration par l'intermédiaire d'une courbe de calibration. Celle-ci est réalisée à partir de mesures d'IgE totales, car il n'existe pas d'échalon international pour la mesure des IgE spécifiques (trop grande diversité d'allergènes). Les concentrations d'IgE totales sont exprimées en unités internationales (kU/L), 1 unité (U) de protéine IgE étant définie par le standard international WHO75/502 comme correspondant à 2,42 ng d'IgE. Les concentrations d'IgE spécifiques sont extrapolées à partir de la gamme d'échalonnage des IgE totales et exprimées en unités arbitraires (kUA/L), ce qui est habituel pour les IgE spécifiques. Il s'agit d'une extrapolation car dans le cas du dosage des IgE totales, il s'agit d'un dosage d'antigène : les IgE détectées sont des antigènes reconnus par un anticorps monoclonal anti-IgE fixé sur la phase solide (puis par un anticorps monoclonal anti-IgE couplé à l'enzyme). Dans le cas du dosage des IgE spécifiques, il s'agit en revanche d'un dosage d'anticorps : les IgE détectées sont celles qui ont reconnu l'antigène fixé sur la phase solide (puis qui ont été reconnues par l'anticorps monoclonal anti-IgE couplé à l'enzyme). Dans le cas du dosage des IgE spécifiques, la quantité d'IgE fixées sur l'antigène est non seulement fonction de la concentration de ces IgE dans le sérum, mais également de leur affinité, qui peut varier d'un patient à l'autre, pour l'antigène utilisé pour le dosage.

Plusieurs types d'antigènes ont été utilisés pour mettre au point la technique : des oligosides α 3-galactosylés, des oligosides α 4-galactosylés et des fragments Fab de cetuximab. Les oligosides α 3 et α 4-galactosylés ont été préparés et biotinylés par la société Lectinity® (Moscou, Russie) et les fragments Fab biotinylés ont été préparés par la société P.A.R.I.S® (Paris) à partir des anticorps entiers. Différents antigènes (Tableau 13) ont été testés à des concentrations variables (entre 0,33 et 10 μ g).

Tableau 13. Récapitulatif des antigènes oligosaccharidiques utilisés pour la mise au point de la technique.

Nom abrégé	Formule	Forme	Nom commercial	Représentation schématique
Oligosaccharide en α1,3				
TRI 2	$\text{Gal}\alpha\text{3Gal}\beta\text{4GlcNAc}$	Monomérique	70BM	
		Polymérique	70BP	
TRI 6	$\text{Gal}\alpha\text{3Gal}\beta\text{4Glc}$	Polymérique	10BP	
Oligosaccharide en α1,4				
-	$\text{Gal}\alpha\text{4Gal}\beta\text{4GlcNAc}$	Monomérique	8BM	
		Polymérique	8BP	
-	$\text{Gal}\alpha\text{4Gal}\beta\text{4Glc}$	Polymérique	37BP	

Finalement, c'est l'oligoside α 3-galactosylé 70BP (test 70BP) polymérique à la concentration de 3,33 μ g par ImmunoCap™ qui donnait les meilleurs résultats (Tableau 14).

Tableau 14. Concentrations d'IgE spécifiques (en kUA/L) détectées dans les sérums après réaction d'hypersensibilité au cetuximab en fonction de l'antigène utilisé.

	70BP (1 µg) / 8BP (1 µg) 	70BM (1 µg) / 8BM (1 µg) 	10BP (1 µg) / 37BP (1 µg) 	PBS (50 µL)
Patient 1	3,17 / <0,10	1,26 / <0,10	1,42 / <0,10	<0,10
Patient 2	0,76 / <0,10	0,27 / <0,10	0,39 / <0,10	<0,10
Patient 3	0,37 / <0,10	0,37 / <0,10	0,35 / <0,10	<0,10

2.3.3. RESULTATS ET COMPARAISON DU TEST DEVELOPPE AU TEST COMMERCIAL

Pour évaluer les tests (tests 70BP et bTG), plusieurs variables ont été comparées : la positivité ou non du test développé (70BP) et du test commercial (bTG), leurs sensibilités, spécificités, valeurs prédictives positives et négatives. Les variables continues (âge, IgE totale) ont été comparées par un test de Mann-Whitney. Les variables discrètes (groupes sanguins, IgE totale >150 ou <150, résultats du Phadiatop®) ont été comparées par un test exact de Fisher. Pour la corrélation des deux tests, un calcul du coefficient de corrélation de Pearson (r^2) a été réalisé. Tous les tests étaient bilatéraux avec un risque alpha de 5%.

2.3.3.1. Dans une cohorte de donneurs de sang

Deux cent quatre-vingt-dix-neuf sérums de témoins sains (donneurs de sang) ont été dosés en IgE anti- α 3Gal par les tests 70BP et bTG pour évaluer la prévalence des IgE anti- α 3Gal dans cette population. Seules les données sur l'âge, le sexe, la détermination du groupe sanguin et la supposition de terrain atopique (mesure des IgE totales, test Phadiatop®) étaient connues.

Parmi les 299 donneurs de sang, 18 étaient positifs avec le test 70BP (prévalence de 6%) et 15 avec le test 70BP (prévalence de 5%). Dix donneurs étaient positifs pour les deux tests. La positivité étant définie par un signal > 0,1 kUA/L. Différents paramètres de la population ont été regardés en fonction des deux tests (Tableau 15).

Tableau 15. Détection des IgE anti- α 3Gal dans la cohorte des donneurs de sang avec le test développé (70BP) et le test commercial (bTG): Prévalence des IgE anti- α 3Gal en fonction de l'âge, du sexe, des groupes sanguins et de marqueurs d'atopie (IgE totale et Phadiatop[®]).

	Test 70 BP			p	Test bTG			P
	Total	Positif	Négatif		Positif	Négatif		
Nombre	299	18	281	-	15	284	-	
Age médian	38,4	42,1	38,1	0,33	39,5	38,3	0,84	
Groupes B/AB	39	1	38	0,49	0	39		0,23
Groupes O/A	260	17	243		15	245		
Sexe M/F	164/135	15/3	149/132	0,014	12/3	152/132	0,06	
Moyenne IgE totale	114,2	135,7	112,8	0,11	198,0	109,7	0,03	
IgE Totale >150/<150	61/238	4/14	57/224	0,77	6/9	55/229	0,09	
Phadiatop [®] +/-	96/203	7/11	89/192	0,60	3/12	93/191	0,4	

Avec le test 70BP, les valeurs médianes du signal étaient respectivement de 0,049 (0 à 4,81) et 0,81 kUA/L (0,11 à 4,81) parmi les 299 donneurs de sang et parmi ceux ayant un signal positif. Avec le test bTG, les valeurs médianes du signal étaient respectivement de 0,026 (0 à 2,71) et 0,55 kUA/L (0,10 à 2,71) parmi les 299 donneurs de sang et parmi ceux ayant un signal positif.

Les trois sérums ayant des valeurs les plus élevées avec le test bTG avaient aussi les valeurs les plus élevées avec le test 70BP. La corrélation entre les deux tests était excellente, $r^2 = 0,91$ (Figure 33).

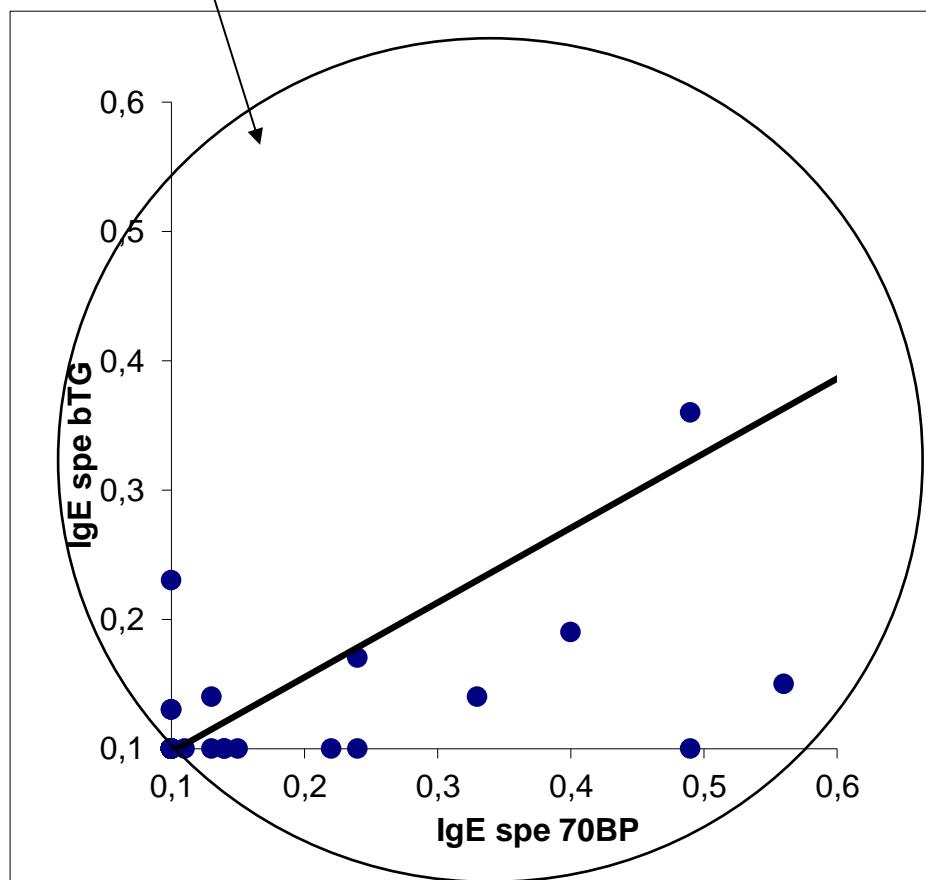
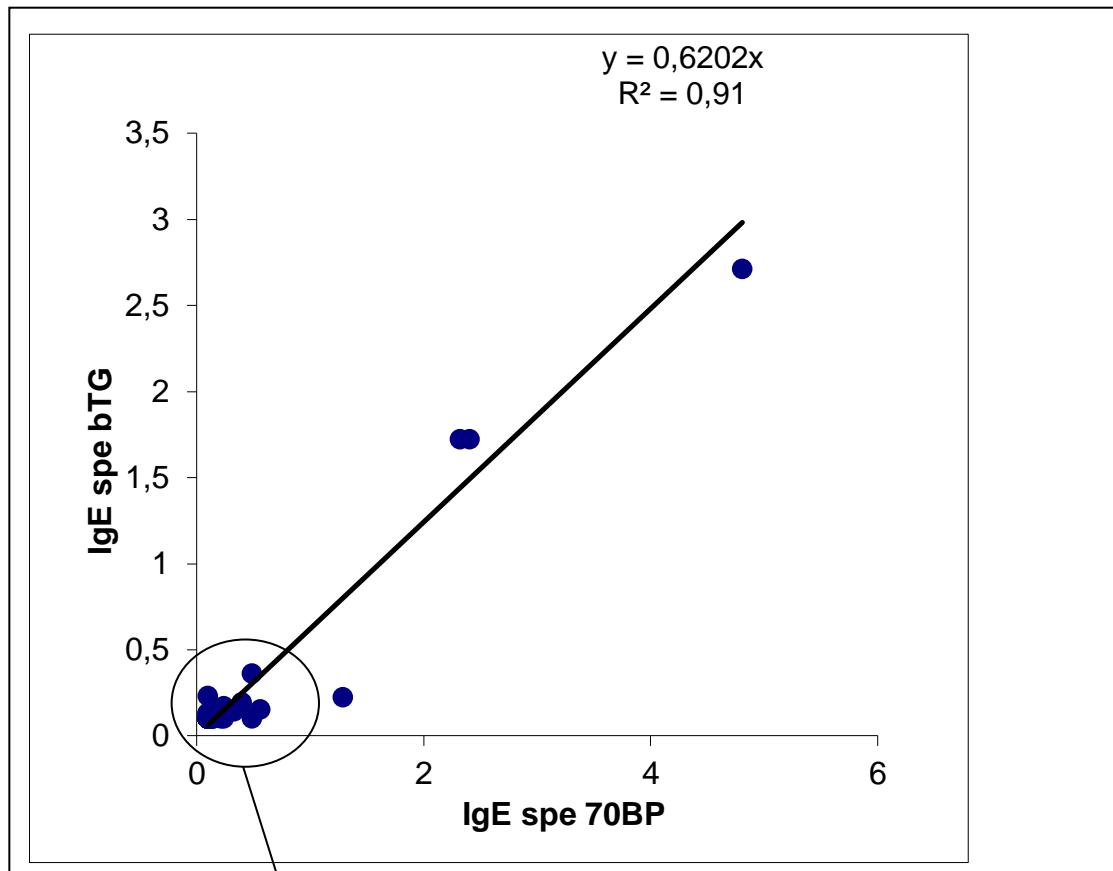


Figure 33. Corrélation entre les deux tests (bTG et 70BP) chez les donneurs de sang.

Afin de détecter d'éventuels facteurs individuels prédisposants au développement d'IgE anti- α 3Gal, a été analysé la prévalence de sérum positifs en fonction de l'âge, du groupe sanguin, du sexe et des marqueurs biologiques d'atopie (IgE totale en variable continue, concentration d'IgE totale supérieure ou inférieure à 150kU/L et test Phadiatop[®]).

Le sexe masculin était associé à la détection d'IgE anti- α 3Gal avec le test 70BP avec un sex ration de 5/1 en faveur du sexe masculin ($p < 0,05$) et avait une tendance avec le test bTG ($p = 0,05$ avec un sex ratio à 4/1).

Uniquement avec le test bTG, la concentration médiane en IgE totale ($p = 0,03$) et son chiffre supérieur à 150kU/L ($p = 0,09$) semblaient reliés à la détection d'IgE anti- α 3Gal. Cela n'était pas retrouvé pour le test 70BP.

L'âge et les groupes sanguins n'avaient pas d'influence.

2.3.3.2. Dans la cohorte de patients ORL

Cette cohorte a été constituée suite aux prélèvements de routine de sérum prétraitements de 41 patients consécutifs porteurs d'un cancer des VADS allant recevoir du cetuximab. Les concentrations d'IgE anti- α 3Gal mesurées ont été confrontées aux données disponibles sur les patients : âge, sexe, antécédents d'allergie (alimentaires, animaux...), supposition de terrain atopique (mesure des IgE totales, test Phadiatop[®]), consommation de tabac et d'alcool, et réactions à la perfusion. Les objectifs étaient d'évaluer la pertinence clinique du test développé et du test commercial et de rechercher des facteurs prédictifs.

Tous les patients avaient reçu une prémédication à base de corticoïdes et d'antihistaminiques H1 comme recommandé et en cas de réaction, un dosage de la tryptase était effectué.

Parmi les 41 patients, quatre ont présenté des réactions anaphylactiques en cours de première perfusion (incidence de 9,76%). Les réactions étaient de grade 5 (un patient décédé cinq jours après la perfusion de cetuximab malgré une ventilation invasive avec oxygénothérapie), un grade 4 (décédé de sa maladie plus tard) et deux grades 3. Tous les patients ont de nouveau reçu des corticoïdes et des antihistaminiques H1 et deux ont reçu de l'adrénaline. Deux patients parmi les quatre étaient métastatiques dont le patient décédé. Ce dernier avait un terrain alcoolotabagique et avait une allergie connue aux abâts.

Les dosages de tryptases ont été recueillis pour trois patients parmi les quatre avec des niveaux très élevés (90, 125 et 198 pour une norme < 11,4 µg/l) traduisant une dégranulation mastocytaire.

Aucun patient n'a eu de réintroduction de cetuximab en raison du risque de récidive de la réaction anaphylactique.

Les autres patients n'ont pas fait de réaction sauf un avec un rash cutané de grade 2 résolutif après injection de corticoïdes et d'antihistaminiques H1. Il a d'ailleurs poursuivit le cetuximab sans récidive des symptômes.

Les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 16.

Tableau 16. Caractéristiques de la cohorte ORL testée pour l'anaphylaxie.

Réactions Anaphylactiques				
	Total	Grade 3-5	Non	p
Nombre	41	4	37	-
Age médian	63,6	56,4	63,8	0,11
Sexe M/F	36/5	4/0	32/5	1
Métastases: Oui/Non	18/23	2/2	16/21	1
Alcool: Oui/Non	29/12	4/0	25/12	0,30
Tabac: Oui/Non	31/10	4/0	27/10	0,56
Allergie: Oui/Non	11/30	1/3	10/27	1
IgE totale (médiane)	353,9	1042,5	279,4	0,05
IgE Totale >150/<150	17/24	3/1	14/23	0,29
Phadiatop® +/-	12/29	3/1	9/28	0,07

Parmi les 41 patients, sept étaient positifs pour le test 70BP (17,1%) et six pour le test bTG (16,6%). Le seul patient discordant n'a pas eu de réaction à la perfusion du cetuximab. Le patient ayant fait un rash de grade 2 était positif pour les deux tests et correspond à un faux positif.

Avec le test 70BP, les valeurs médianes du signal étaient respectivement de 2,89kUA/L (0 à 77,1), 16,78kUA/L (0,22 à 77,1) et 28,94kUA/L (7,55 à 77,1) chez les 41 patients, chez ceux avec un signal positif et chez ceux ayant fait une réaction anaphylactique.

Avec le test bTG, les valeurs médianes du signal étaient respectivement de 1,66kUA/L (0 à 44,1), 11,32kUA/L (0,14 à 44,1) et 16,88kUA/L (5,35 à 44,1) chez les 41 patients, chez ceux avec un signal positif et chez ceux ayant fait une réaction anaphylactique.

Aucun patient faux négatif n'a été retrouvé dans cette cohorte, en effet aucun patient n'a fait de réaction anaphylactique en ayant un test négatif.

Le test bTG était significativement plus fréquemment positif chez les patients ayant des concentrations d'IgE totale élevée ($p = 0,02$) et de la même manière, une tendance était retrouvée pour le test 70 BP ($p = 0,09$).

Les caractéristiques des résultats des deux tests dans la cohorte ORL sont résumées dans le tableau 17.

Tableau 17. Caractéristiques des deux tests dans la cohorte ORL testée pour l'anaphylaxie.

	Test 70BP			Test bTG			p
	Total	Positif	Négatif	p	Positif	Négatif	
Nombre	41	7	34	-	6	35	-
Age médian	63,0	57,4	64,2	0,05	59,3	63,7	0,18
Sexe M/F	36/5	7/0	29/5	0,57	6/0	30/5	1
IgE totale (moy)	353,9	725,3	277,4	0,09	844,2	269,8	0,02
IgE Totale >150/<150	17/24	5/2	12/22	0,11	5/1	12/23	0,066
Phadiatop® +/-	12/29	4/3	8/26	0,17	4/2	8/27	0,05

Dans cette cohorte ORL, les deux tests étaient bien corrélés, $r^2 = 0,99$ (Figure 34).

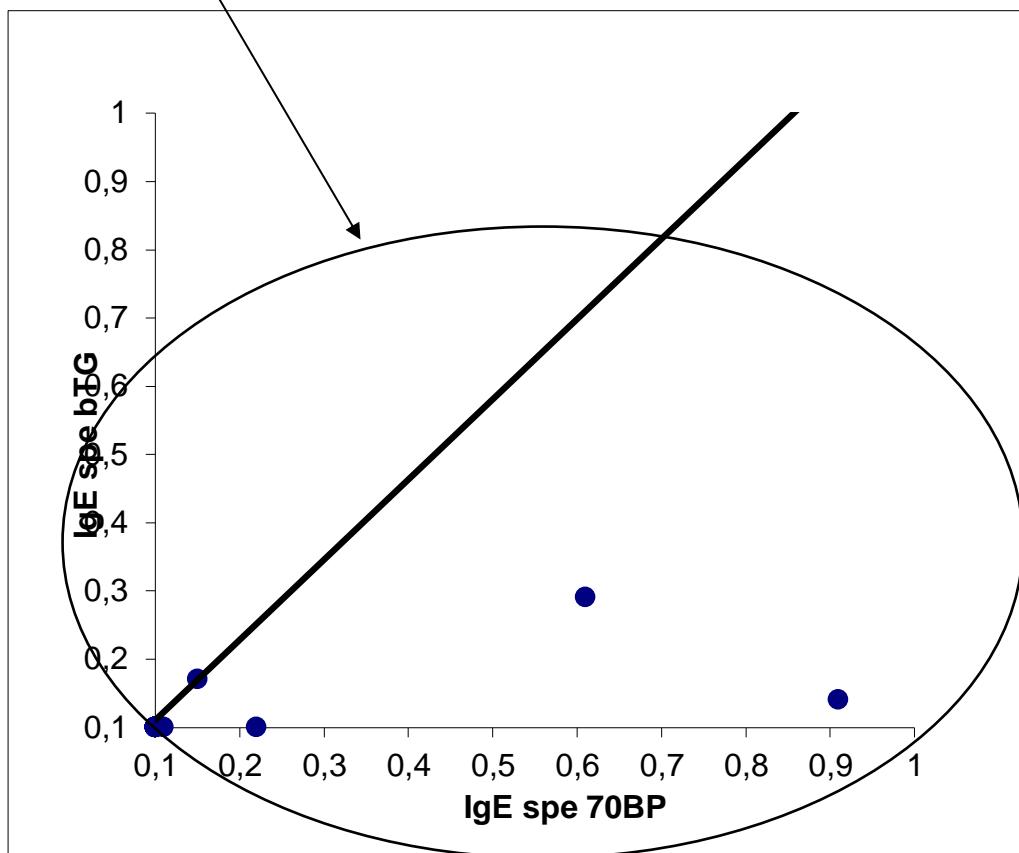
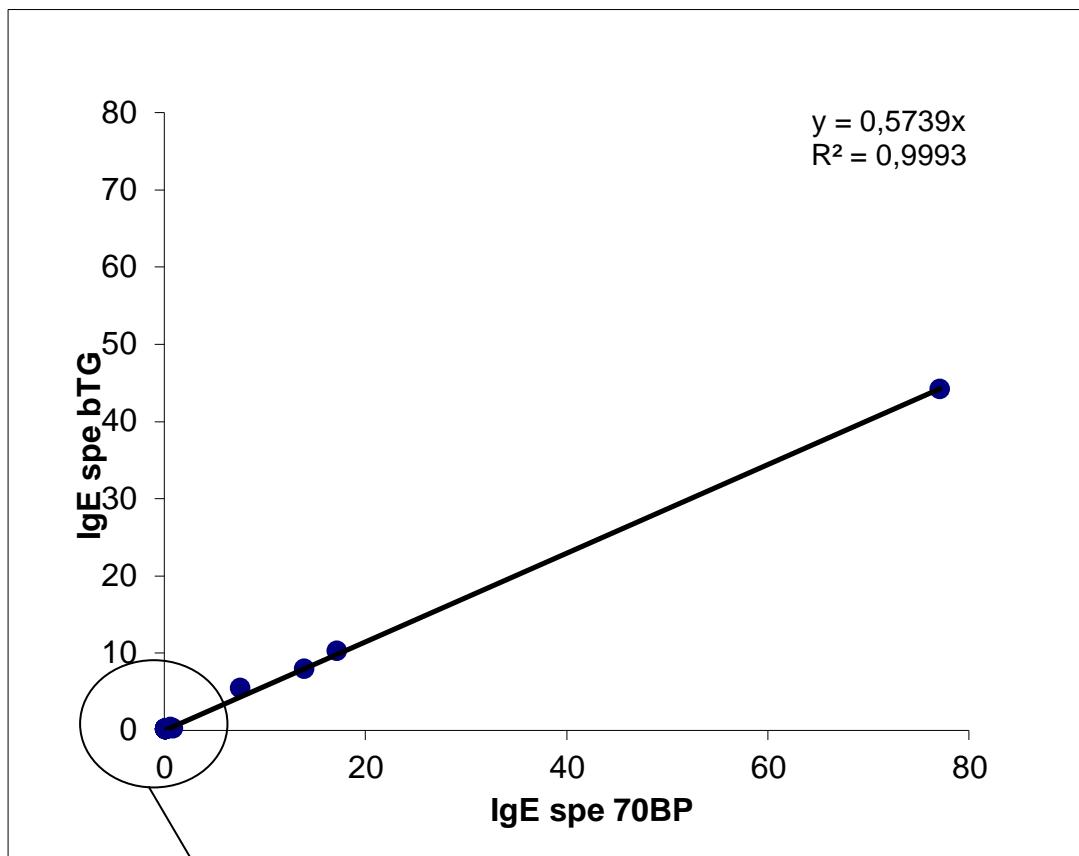


Figure 34. Corrélation entre les deux tests (bTG et 70BP) chez les patients ORL.

Les valeurs prédictives des deux tests pour la prédition de l'anaphylaxie ont été calculées avec un seuil de positivité de 0,1kUA/L en fonction de la positivité ou de la négativité des 2 tests et en fonction d'une réaction anaphylactique ou non (Tableau 18).

Tableau 18. Répartition de la positivité ou de la négativité des 2 tests en fonction de la survenue ou non d'une réaction anaphylactique.

Réactions anaphylactiques			Pas de réaction	Total	Réactions anaphylactiques			Pas de réaction	Total
Grade 3-5		anaphylactique			Grade 3-5		anaphylactique		
70BP	4		3	7	bTG +		4	2	6
+					bTG -		0	35	35
70BP	0		34	34					
-					Total		4	37	41
Total	4		37	41					

Ainsi, les deux tests ont une sensibilité et une valeur prédictive négative de 100%. Les sensibilités et les valeurs prédictives positives sont respectivement de 91,9% et 57,1% pour le test 70BP ; et sont de 94,6% et 66,6% pour le test bTG.

2.3.4. CONCLUSION

Les cliniciens doivent être sensibilisés au risque d'anaphylaxie lors de la perfusion de cetuximab et les mesures nécessaires de réanimation doivent être à disposition. Il est maintenant établi que les réactions anaphylactiques sont dues à la présence d'IgE préexistantes dans le sérum des malades et qu'elles sont dirigées vers un motif sucré, le résidu α 3Gal.

Les perspectives de développement de tests biologiques prédictifs doivent être au cœur de nos préoccupations en terme de recherche translationnelle et devront faire l'objet d'une validation scientifique afin d'utiliser en toute sécurité cet anticorps et en le contre-indiquer si nécessaire. L'avenir verra peut-être l'arrivée d'autres anticorps de même spécificité et efficacité que le cetuximab, mais sans ses inconvénients, ce que certains appellent déjà des « biobetters », car il ne pourra s'agir d'authentiques biosimilaires.

2.4. MONITORING PER-TRAITEMENT : PHARMACOCINETIQUE

2.4.1. DEFINITION DE LA POPULATION ET DES TRAITEMENS

Les patients pris en charge dans le centre de cancérologie du CHRU de Tours pour un carcinome épidermoïde des VADS (CEVADS) ont participé à la constitution d'une cohorte rétrospective. Les prélèvements sanguins se faisaient dans le cadre du monitoring de routine des anticorps thérapeutiques et les résultats étaient envoyés au praticien et discutés si besoin au cas par cas. Les résultats ont été analysés rétrospectivement pour la constitution de cette cohorte. Un total de 34 patients consécutifs a été inclus pour les analyses pharmacocinétiques et de survies. Les patients pouvaient avoir une maladie localement avancée (LA) pour 21 d'entre eux ou être à la phase métastatique/récidive (M) pour les 13 autres constituant ainsi deux populations. Ils pouvaient recevoir le cetuximab combiné à de la radiothérapie ($n = 21$) ou combiné à une chimiothérapie ($n = 10$) ou encore seul en monothérapie ($n = 3$). Tous les patients avaient un carcinome histologiquement confirmé de stades II à IV.

Plusieurs données étaient recueillies telles que l'âge, le sexe, le poids et la taille avec calcul de l'index de masse corporelle (IMC), l'index de Karnofsky, la classification TNM, la localisation du primitif, les tailles lésionnelles (tumeur primitive, adénomégalies et métastases mesurées dans les 3 dimensions), la date de première injection, le nombre de cycles de cetuximab et les doses administrées, les effets indésirables cutanéomuqueux (radiodermite, mucite, folliculite), la date de progression/récidive.

Les principales caractéristiques des patients sont listées dans le tableau 19.

Le cetuximab était administré de façon conventionnelle avec une dose de charge de 400 mg/m^2 suivie d'injections hebdomadaires de 250 mg/m^2 . Le nombre d'injections hebdomadaires était au maximum de sept en cas d'association à la radiothérapie et sans limitation en association à la chimiothérapie (l'arrêt se faisant en cas de progression de la maladie, de toxicité inacceptable ou du décès).

La radiothérapie était délivrée par un accélérateur linéaire délivrant des photons de 4 à 6 MV avec une dose thérapeutique de 70 Gy dans les lésions macroscopiques et de 50 Gy dans les régions prophylactique ; irradiation réalisée à raison de 2 Gy par jour et 5 séances par semaine.

La chimiothérapie pouvait être à base de sels de platine avec le plus souvent du 5-FU et pour un patient du docétaxel dans le cadre d'un essai clinique.

Parmi les 24 patients ne recevant pas de chimiothérapie, 21 recevaient le cetuximab pour une maladie localement évoluée en association à la radiothérapie et trois recevaient le cetuximab seul (un patient pour récidive après échec de la chimiothérapie, un patient pour poursuite évolutive d'un cancer de l'oropharynx traité par chimiothérapie d'induction, chimioradiothérapie sans efficacité puis chimiothérapie mal tolérée, un patient pour récidive d'un cancer cutané). Il s'agissait de stades II pour deux patients, les autres étant stades III ou IV. Les 21 patients irradiés avaient un index de Karnofsky moyen de 94 (70 à 100) et ont reçu en moyenne sept injections de cetuximab durant l'irradiation.

Parmi les dix patients recevant de la chimiothérapie, sept l'avaient dans le cadre du schéma EXTREME (ou équivalent – Essai ADVANTAGE) en association avec du cisplatine et du 5-FU, un avec du carboplatine et du 5-FU dans le cadre d'un essai clinique (avec de la radiothérapie également – Essai GORTEC 2007-01, seul patient n'étant pas métastatique mais recevant une chimiothérapie), un avec du docetaxel et du cisplatine dans le cadre d'un essai de phase II (Essai TPEx) et un avec du carboplatine seul (patient fragile). L'index de Karnofsky moyen était de 91 (70 à 100).

Il s'agissait d'une majorité d'homme (n = 31) avec seulement trois femmes (toutes recevaient la radiothérapie en association pour une maladie localement avancée). Leur âge moyen était de 61 ans (40-84). L'index de Karnofsky médian dans l'ensemble de la cohorte était de 92.6 (70 à 100).

Pour l'analyse des survies, la population globale a été séparée en deux avec d'une part les patients avec des carcinomes épidermoïdes récidivants/métastatiques (CEM ; n = 13) et d'autre part les patients avec un carcinome épidermoïde localement avancé (CELA ; n = 21). Les paramètres pharmacocinétiques ont été étudiés et notamment la clairance globale du cetuximab en variable continue et en valeur dichotomisée par rapport à la médiane dans l'ensemble de la population. L'intensité des effets indésirables cutanéomuqueux (radiodermite, mucite, folliculite) a été étudiée uniquement chez les patients avec un CELA pour qui ces données étaient disponibles et recueillies de manière hebdomadaire.

Tableau 19. Caractéristiques de la cohorte de patients ORL inclus dans l'analyse pharmacocinétique du cetuximab.

	Cohorte Totale N=34	Patients avec un CELA N=21	Patients avec un CEM N=13
Age – année			
Médiane	61	61	61
Rang	40 – 84	40 - 84	49 - 74
Sexe – no. (%)			
Homme	31 (91,2%)	18 (85,7%)	13 (100%)
Femme	3 (8,8%)	3 (14,3%)	0 (0%)
Karnofsky – no. (%)			
100	18 (53,0%)	12 (57,1%)	6 (46,1%)
90	10 (29,4%)	7 (33,3%)	3 (23,1%)
80	3 (8,8%)	1 (4,8%)	2 (15,4%)
70	3 (8,8%)	1 (4,8%)	2 (15,4%)
Médiane	92,6	94,3	90
Site du primitif –no. (%)			
Cavité buccale	3 (8,8%)	1 (4,8%)	2 (15,4%)
Oropharynx	18 (53,0%)	12 (57,1%)	6 (46,1%)
Hypopharynx	7 (20,6%)	5 (23,8%)	2 (15,4%)
Larynx	3 (8,8%)	2 (9,5%)	1 (7,7%)
Primitif inconnu	1 (2,9%)	1 (4,8%)	0
Primitif cutané	2 (5,9%)	0	2 (15,4%)
Stade T – no. (%)			
Tx	1 (2,9%)	1 (4,8%)	0
T1	5 (14,7%)	1 (4,8%)	4 (30,75%)
T2	12 (35,3%)	8 (38,1%)	4 (30,75%)
T3	10 (29,4%)	8 (38,1%)	2 (15,4%)
T4	6 (17,7%)	3 (14,2%)	3 (23,1%)
Stade N – no. (%)			
N0	9 (26,45%)	5 (23,8%)	4 (30,75%)
N1	7 (20,6%)	5 (23,8%)	2 (15,4%)
N2a	2 (5,9%)	2 (9,5%)	0
N2b	9 (26,45%)	5 (23,8%)	4 (30,75%)
N2c	5 (14,7%)	3 (14,2%)	2 (15,4%)
N3	2 (5,9%)	1 (4,9%)	1 (7,7%)
Traitements			
Radiothérapie	21	21	0
Cetuximab seul	3	0	3
Chimiothérapie	11	1	10

2.4.2. MESURE DES CONCENTRATIONS SÉRIQUES DU CETUXIMAB

Les patients avaient un prélèvement de 5 mL sur tube sec avant chaque injection de cetuximab et deux heures après la fin de l'injection.

La mesure des concentrations sériques du cetuximab a été réalisée par une méthode ELISA développée par l'équipe de Tours [36], à l'aide d'un EGFR recombinant produit dans le cadre d'une collaboration puis par l'équipe elle-même. La méthode ELISA a été développée et validée conformément aux recommandations publiées sur le développement de méthodes d'analyse des biomolécules par fixation à un ligand [169].

Les différentes étapes de cette méthode schématisées sur la Figure 35 sont les suivantes :

- la sensibilisation des puits de la plaque (une ligne sur deux) avec de l'EGFR recombinant.
- la saturation de tous les puits avec de l'albumine pour limiter les fixations non spécifiques.
- le dépôt des échantillons éventuellement dilués avec du sérum.
- le dépôt du conjugué qui est une portion F(ab)² d'anticorps de Chèvre couplée à une peroxydase et qui reconnaît spécifiquement la chaîne γ des IgG humaines.
- le dépôt du substrat, un mélange de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'ortho-phénylène diamine (OPD).
- La réaction chimique catalysée par la peroxydase qui donne de l'eau (H_2O) et du 2-3 diaminophénazine (coloration jaune).
- Arrêt de la réaction par de l'acide sulfurique (H_2SO_4) qui dénature les protéines.
- Lecture de l'absorbance à 492 et 620 nm puis interprétation.

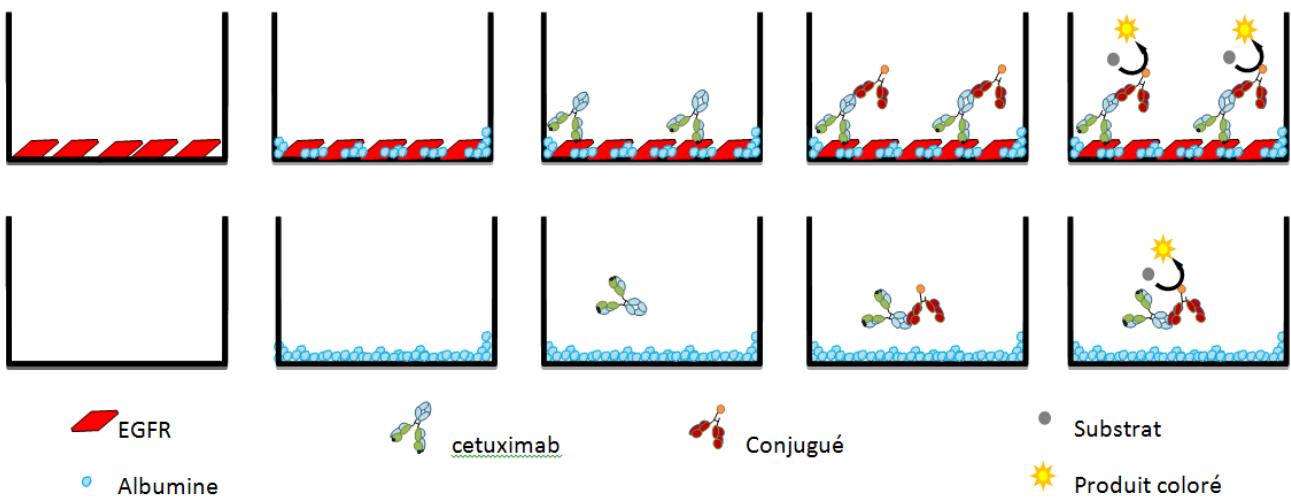


Figure 35. Étapes de la technique ELISA de dosage du cetuximab. Chaque échantillon était déposé en double, dans un puits contenant de l'EGFR et dans un puits témoin sans EGFR. Pour chaque plaque, la mesure de 9 points de calibration et de 3 points de contrôle était réalisée. Avec une plaque de 96 puits, il était ainsi possible d'estimer la concentration de cetuximab de 12 échantillons de sérum.

La limite de détection était de 0,012 mg/L et la limite inférieure de quantification de 0,75 mg/L.

2.4.3. ANALYSE DE LA PHARMACOCINETIQUE DU CETUXIMAB

2.4.3.1. Outils informatiques

La pharmacocinétique du cetuximab ont été analysées par une approche de population en utilisant le logiciel MONOLIX 4.3.2 [170,171].

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R version 3.1 [172].

2.4.3.2. Choix de l'approche de modélisation

L'approche compartimentale individuelle peut être utilisée lorsque les données sont « riches » et qu'elles permettent une description satisfaisante des concentrations. Les données de notre étude pharmacocinétique étaient trop « pauvres » pour permettre une approche non-compartimentale seule ou compartimentale individuelle. En revanche, le nombre de patients était suffisamment important pour permettre une analyse compartimentale de population et ainsi rechercher les covariables influençant la pharmacocinétique du cetuximab.

2.4.3.3. Choix du modèle structural et du modèle de variabilité interindividuelle

Des modèles à un et deux compartiments, avec constantes de transfert d'ordre 1 et constante(s) d'élimination d'ordre 0 et/ou d'ordre 1 ont été testés. Les données de la littérature [148,151] ayant montré une non linéarité de la PK du cetuximab, des modèles avec élimination mixte d'ordre 1 et de type Michaelis-Menten ou de type k_0 ont été testés. Le modèle structural retenu a été celui qui présentait les meilleures performances descriptives et permettait une diminution significative de la fonction objective (FO ; meilleur ajustement des concentrations prédictes aux concentrations observées). Le critère d'Akaikie a également été utilisé pour sélectionner un modèle parcimonieux, c'est-à-dire permettant de décrire les données de façon satisfaisante avec un faible nombre de paramètres. La variabilité interindividuelle des paramètres structuraux a été décrite grâce à un modèle exponentiel.

L'évaluation du modèle final était basée sur l'inspection graphique (*goodness of fit plot*) et sur l'analyse des erreurs standards relatives des paramètres obtenus (r.s.e.%).

2.4.3.4. Choix du modèle d'erreur résiduelle

Le choix du modèle d'erreur résiduelle était déterminé par la diminution significative de la $-2LL$ et par l'ajustement des concentrations prédictes avec les concentrations observées. Des modèles additif, proportionnel, mixte et exponentiel ont été testés.

2.4.3.5. Sélection des covariables significatives

Les covariables d'intérêt ont été analysées par une procédure pas à pas ascendante puis pas à pas descendante :

- Pas à pas ascendante (ou *Forward stepwise*) : En partant du modèle structural sans covariable, les covariables d'intérêt étaient incluses l'une après l'autre. Si la diminution de la FO était significative ($p < 0,1$), la covariable était retenue dans le modèle. La covariable d'intérêt suivante était testée sur le modèle retenu.
- Pas à pas descendante (ou *Backward stepwise*) : A la fin de l'étape *Forward*, après inclusion de toutes les covariables d'intérêt significatives, ces covariables étaient retirées une à une. Si le retrait d'une covariable ne faisait pas augmenter significativement la FO ($p < 0,05$), la covariable n'était pas retenue.

Les covariables continues testées étaient l'âge (AGE), le poids (WT pour Weight) et la surface corporelle (BSA). Les covariables continues étaient centrées sur leurs valeurs médianes (COVmed) comme suit :

$$\theta_{TV} = \theta_0 \times \left(\frac{COV}{COV_{med}} \right)^{\beta_{COV}}$$

où θ_0 correspond à la valeur de θ pour un patient « médian » et β_{COV} quantifie l'influence de la covariable sur θ .

Les variables discrètes testées étaient : le sexe, le traitement par chimiothérapie ou non (la radiothérapie n'ayant pas été testée car, sauf pour un patient, tous les patients recevant la radiothérapie n'avaient pas de chimiothérapie), le volume tumoral estimé en approximant les lésions à des sphères et en utilisant les dimensions tumorale dans les 3 axes ($4/3\pi \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot r_3$) et la surface tumorale estimée ($(3 \cdot \text{volume}/4\pi)^{1/3}$). L'influence de ces variables discrètes sur θ_{TV} était décrite comme suit :

$$\ln(\theta_{TV}) = \ln(\theta_{CAT=ref}) + \sum_{i=1}^n \beta_{CAT=i}$$

où $\theta_{\text{CAT}=\text{ref}}$ correspond à la valeur de θ_{TV} pour une catégorie arbitraire de référence et $\beta_{\text{CAT}=i}$ quantifie la valeur de θ_{TV} pour la catégorie.

2.4.3.6. Résultats obtenus

Comme nous l'avons vu, peu d'études ont analysé la pharmacocinétique du cetuximab chez l'Homme même si davantage de données sont publiées ces dernières années.

L'utilisation du cetuximab en association à la radiothérapie est approuvée pour le traitement du cancer de la tête et du cou [18,19]. La variabilité interindividuelle de la relation dose-concentration a été décrite par Dirks *et al.* dans cette pathologie [147]. Cependant, la pertinence des covariables identifiées dans cette étude devait être confirmée dans notre population de patients.

L'objectif de cette partie est de décrire la pharmacocinétique du cetuximab chez des patients atteints de cancer des VADS localement évolué ou métastatique et d'en identifier les sources de variabilité.

Un total de 544 concentrations sériques de cetuximab a été mesuré avec un nombre moyen de 10 concentrations par patient (de 2 à 76). En dehors de la première injection et de 3 concentrations (qui ont été censurées à gauche), les concentrations sériques résiduelles de cetuximab étaient supérieures à la limite de quantification (0,75 mg/L). La pharmacocinétique du cetuximab a été décrite au moyen d'un modèle à 2 compartiments car il permettait la meilleure description des données.

Dans un premier temps, les modèles structuraux ont été comparés entre eux notamment un modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0 et un modèle dans lequel l'élimination d'ordre 0 est remplacée par une élimination de type Michaelis-Menten. Ce dernier majorait les valeurs de -2LL (4515 versus 4445) et d'AIC (4539 versus 4469). Le modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0 (modèle CLk_0) a donc été retenu.

Dans un second temps, les modèles de variabilité et d'erreurs ont été testés. Les modèles donnant les meilleurs résultats étaient une variabilité interindividuelle log-normale et un modèle d'erreur résiduelle de type proportionnel.

Lors de l'approche ascendante, des covariables ont été ajoutées au modèle :

1. Comme habituellement, la BSA a été testée en premier sur les paramètres VI , $V2$ et k_0 . Les résultats étaient significatifs sur VI ($p = 1,2 \times 10^{-5}$) et sur $V2$ ($p = 0,0061$) mais pas pour k_0 ($p = 0,12$). Les valeurs alors obtenues étaient pour la -2LL de 4418 et pour l'AIC de 4446.

2. Ont ensuite étaient testées deux variables catégorielles : le sexe et le traitement (chimiothérapie ou non). La catégorie sexe n'avait aucune influence mais il n'y avait que 3 femmes et aucune n'avaient reçu de chimiothérapie (uniquement du cetuximab et de la radiothérapie). L'influence de la catégorie traitement était significative sur les paramètres CL ($p = 0,014$), $V2$ ($p = 0,01$) et k_0 ($p = 0,0021$) mais pas pour VI ($p = 0,2$) ni Q ($p = 0,18$). Les valeurs alors obtenues étaient pour la -2LL de 4395 et pour l'AIC de 4429.

Le meilleur modèle étant alors celui incluant les covariables BSA (sur VI et $V2$) et traitement (sur CL , $V2$ et k_0).

3. Ont ensuite étaient testées d'autres variables notamment le volume tumoral et la surface tumorale estimés à partir de la mesure de l'ensemble des masses tumorales (tumeur primitive, ganglions, métastases) dans leur trois axes selon les formules précédentes et sous l'hypothèse que toutes les lésions étaient des sphères (Cf. supra).

Le calcul de la surface tumorale n'avait aucune influence avec des valeurs obtenues pour la -2LL de 4393 et pour l'AIC de 4437.

Par contre, le calcul du volume tumoral avait une influence significative sur les paramètres CL ($p = 0,0013$) et k_0 ($p = 1,8 \times 10^{-5}$) mais pas pour VI ($p = 0,95$), $V2$ ($p = 0,81$) ni Q ($p = 0,7$). Les valeurs alors obtenues étaient pour la -2LL de 4384 et pour l'AIC de 4422.

Le meilleur modèle étant alors celui avec les covariables BSA (sur VI et $V2$), traitement (sur CL , $V2$ et k_0) et volume tumoral (sur CL et k_0).

L'ensemble des paramètres disponibles ayant par ailleurs été analysés et le modèle ascendant étant finalisé, une tentative de simplification a ensuite été faite selon un modèle descendant en retirant les covariables une à une et pour chaque paramètre tout en vérifiant la valeur de la -2LL (et d'AIC) : analyse en fonction d'un écart supérieur ou non à 10,83, les variations de la -2LL inférieures à 10,83 par rapport au meilleur chiffre de -2LL (soit 4384) permettant de simplifier le modèle.

Les résultats suivants ont été obtenus :

1. Le retrait de la BSA sur VI changeait suffisamment la -2LL : 4397
2. Le retrait de la BSA sur $V2$ changeait suffisamment la -2LL : 4407
3. Le retrait du TTT sur CL changeait suffisamment la -2LL : 4405
4. Le retrait du TTT sur k_0 changeait suffisamment la -2LL : 4404
5. Le retrait du TTT sur $V2$ ne changeait pas suffisamment la -2LL : 4393
6. Le retrait du Volume tumoral sur k_0 ne changeait pas suffisamment la -2LL : 4394
7. Le retrait du Volume tumoral sur CL ne changeait pas suffisamment la -2LL : 4395

Après cette dernière étape, le modèle le plus simple retenu est celui intégrant les covariables BSA (sur VI et $V2$) et traitement (sur CL et k_0) avec des valeurs respectives pour la -2LL et pour l'AIC de 4400 et 4434. Ces deux dernières valeurs étant moins bonnes que celles obtenues à la fin du modèle ascendant mais le modèle final est plus simple avec 3 covariables de moins (pas d'influence du TTT sur $V2$ et pas d'influence retenue du volume tumoral sur CL et k_0).

Ce modèle a permis une description satisfaisante des concentrations visualisable sur les graphiques diagnostiques (Figure 36) et sur le graphique comparant les concentrations observées aux concentrations prédictes (Figure 37).

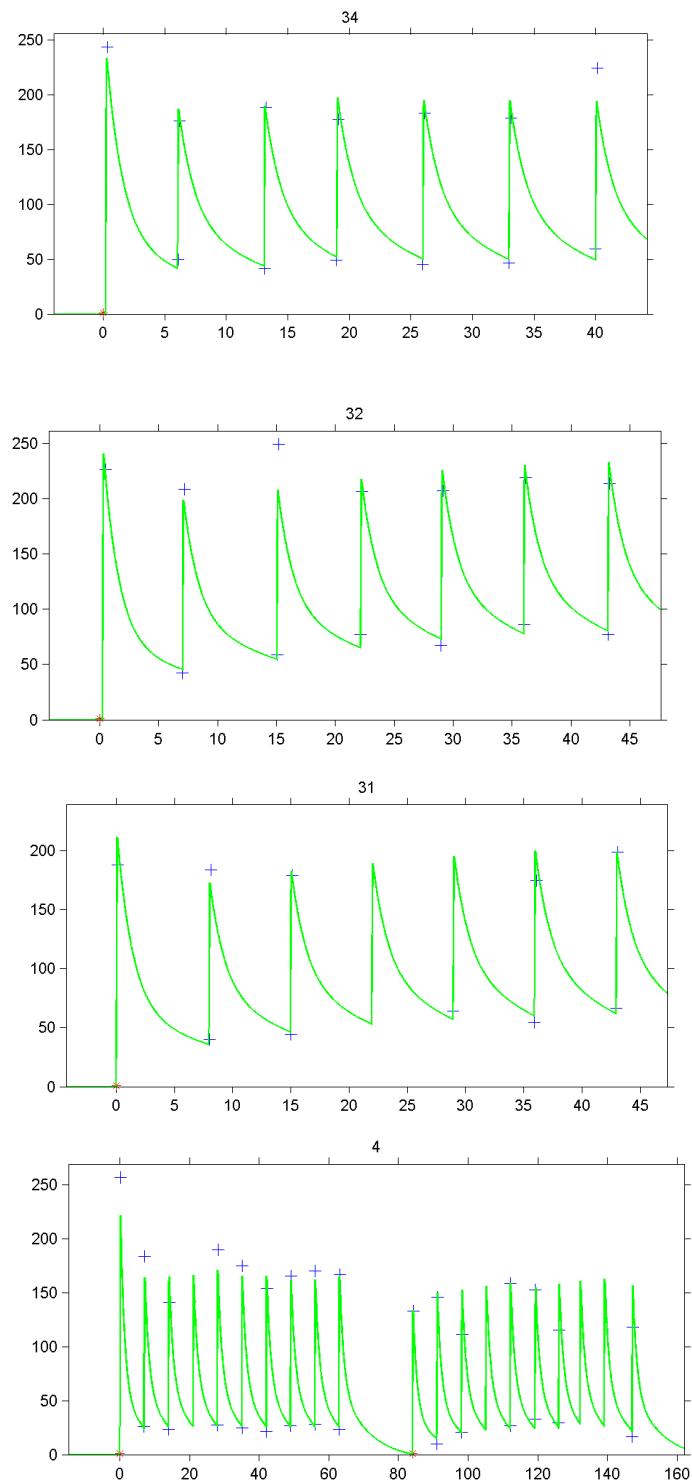


Figure 36. Concentrations de cetuximab observées vs. concentrations prédictes chez quatre patients au moyen d'un modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0.

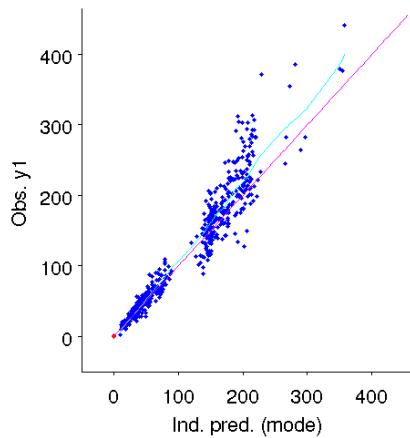


Figure 37. Concentrations de cetuximab observées chez des patients traités pour cancer ORL vs. concentrations prédites au moyen d'un modèle à 2 compartiments combinant une élimination d'ordre 1 et une élimination d'ordre 0.

Les valeurs de population des cinq paramètres du modèle final étaient correctement estimées avec (% Coefficient de Variabilité) : volume central de distribution $V1 = 3,18$ L (6%), volume périphérique de distribution $V2 = 5,4$ L (42%), clairance d'élimination $CL = 0,57$ L/jour (31%), clairance de distribution $Q = 0,64$ L/jour et élimination d'ordre zéro $k_0 = 6,72$ mg/jour (29%). Elles sont présentées dans le tableau 19. La surface corporelle est apparue comme étant une covariable significative de $V1$ et $V2$, ces paramètres augmentant avec sa valeur, ce qui est habituellement retrouvé avec les anticorps monoclonaux. La chimiothérapie avait une influence significative sur CL et k_0 : la clairance étant d'autant moins importante (de 1,6 fois) quand la chimiothérapie était administrée et l'inverse étant observé pour k_0 (de 3,3 fois).

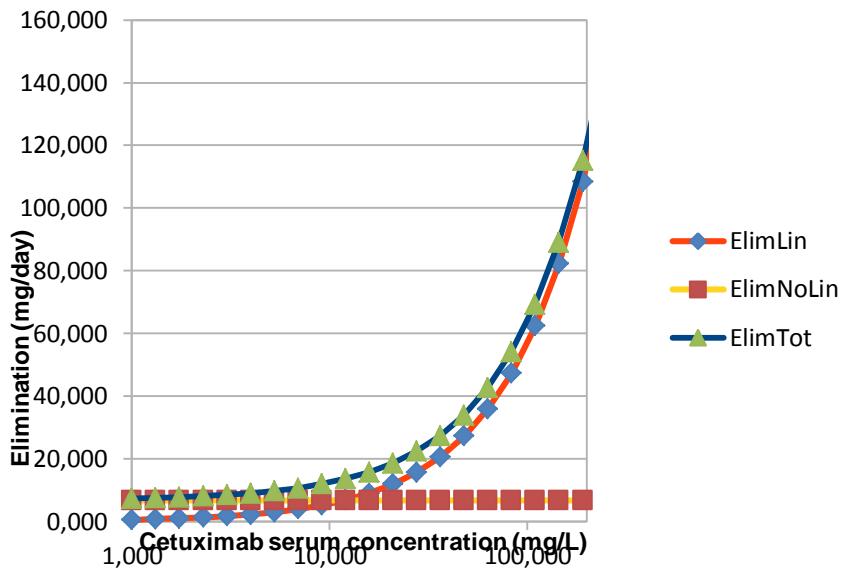
La clairance d'élimination est donc influencée par la concentration du cetuximab et elle différente selon l'adjonction ou non d'une chimiothérapie (Figure 38).

Tableau 20. Valeurs estimées des paramètres pharmacocinétique du cetuximab dans la cohorte des patients avec cancers des VADS.

	paramètres	s.e.	r.s.e. (%)	p
V_1 (L)	3,18	0,09	3	
CL (L/jour)	0,57	0,07	12	
V_2 (L)	5,40	0,82	15	
Q (L/jour)	0,64	0,09	15	
k_0 (mg/jour)	6,72	3,7	56	
$\beta_{V1}(\text{BSA})$	1,28	0,26	21	0,000012
$\beta_{V2}(\text{BSA})$	5,54	1,4	25	0,00063
$\beta_{k0}(\text{TTT})$	1,2	0,59	49	0,04
$\beta_{CL}(\text{TTT})$	-0,45	0,25	55	0,037
ω^2_{V1}	0,06	0,05	78	
ω^2_{CL}	0,30	0,05	17	
ω^2_{V2}	0,41	0,15	38	
ω^2_Q	-	-	-	
ω^2_{k0}	0,28	0,13	45	
σ^2_{prop}	0,32	0,01	3	

Abréviations : V_1 et V_2 , Volumes de distribution central et périphérique ; CL et Q , Clairances d'élimination et de distribution ; k_0 Constante d'élimination d'ordre 0. (s.e.) Erreur standard des valeur des paramètres estimés ; r.s.e. (%) Erreur standard relative (s.e./valeur du paramètre) $\times 100$; BSA: Surface corporelle (m^2); TTT: Traitement chimiothérapie associé.

A. Clairance d'élimination en fonction de la concentration de cetuximab dans la population sans chimiothérapie.



B. Clairance d'élimination en fonction de la concentration de cetuximab dans la population recevant la chimiothérapie.

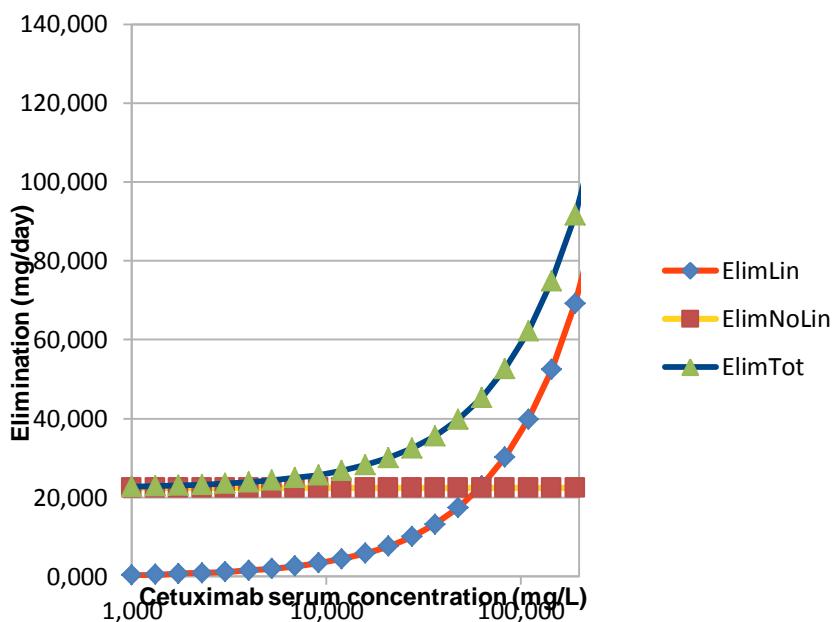


Figure 38. Clairance d'élimination en fonction de la concentration de cetuximab. A. dans la population sans chimiothérapie. B. Dans la population recevant la chimiothérapie. L'élimination globale du cetuximab (en vert) a été décrite comme la combinaison d'une élimination linéaire (en rouge) et d'une élimination non linéaire (en jaune).

2.4.4. ANALYSE DES EFFETS INDESIRABLES CUTANEOMUQUEUX ET DE LA SURVIE

2.4.4.1. Paramètres étudiés

Les deux paramètres de survie étudiés sont la survie sans progression et la survie globale.

Le temps de survie sans progression (PFS pour *progression-free survival*) est le temps de traitement pendant lequel le patient n'a pas progressé ou n'est pas décédé en prenant comme date initiale la date de première injection de cetuximab. Ce temps peut éventuellement être censuré, si le patient n'a pas encore progressé au moment de l'arrêt du suivi ou de l'analyse.

La survie globale est le délai écoulé entre la première injection de cetuximab et la date de décès, quel qu'en soit la cause.

Dans cette analyse, les données médiane de survie sans progression et globale (et leurs intervalle de confiance à 95%) ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier. Les *hazard ratios* ont été estimés par un modèle de Cox en univarié et en multivarié. Les survies ont aussi été comparées par un test de Log-rank. L'influence de potentiels facteurs pronostiques sur les hazard ratios ont été testés, dont des facteurs continus (âge, clairance globale du cetuximab) et des facteurs catégoriels (clairance globale du cetuximab dichotomisée par rapport à sa médiane, la présence de chimiothérapie ou non, et les effets indésirables cutanéomuqueux liés à l'association radiothérapie-cetuximab).

L'AUC est le meilleur reflet de l'exposition. Cependant, c'est une valeur qui varie au cours du temps : un patient qui a progressé au bout de 6 mois a, à ce moment-là, une AUC approximativement deux fois supérieure à celle d'un patient qui a progressé (et donc arrêté son traitement) trois mois plus tôt. Un tel paramètre dit « temps-dépendant » peut être intégré dans un modèle de Cox mais son interprétation est difficile. Afin d'obtenir un facteur indépendant du temps, nous avons normalisé l'AUC par la dose cumulée. Cette AUC normalisée (AUC_n) a la dimension d'un temps par unité de volume ($[T] \cdot [L]^{-1}$). Pour faciliter l'interprétation, la « clairance globale » qui correspond à l'inverse de l' AUC_n a été préférée (Volume par unité de temps). La clairance globale a été calculée par l'équation 11, l'AUC étant estimée par approche compartimentale.

Les toxicités cutanéomuqueuses de l'association radiothérapie-cetuximab (radiodermite, mucite et folliculite) ont été étudiées chez les 21 patients recevant de la radiothérapie car elles étaient rapportées toutes les semaines. Les toxicités étaient gradées de 0 à 5 selon leur intensité en se basant sur la classification internationale CTCAE v4.02 scale [38] et pour les

patients traités par radiothérapie, avec l'aide supplémentaire de la classification de Bernier [173,174] faisant mieux la distinction entre les toxicités liées au cetuximab ou à la radiothérapie. Afin d'éviter trop de catégories de toxicités, ces dernières ont été regroupée en toxicités faibles et sévères. Pour les radiodermites, l'effectif a été séparé en faible toxicité pour les grades 0 à 2 (n = 8) et en toxicités sévères pour les grades 3 et 4 (n = 13). Pour les toxicités muqueuses (mucite), l'effectif a été séparé en faible toxicité pour les grades 0 à 2 (n = 9) et en toxicités sévères pour les grades 3 et 4 (n = 12). Pour les toxicités à type de folliculite, l'effectif a été séparé en faible toxicité pour les grades 0 à 1 (n = 9) et en toxicités sévères pour les grades 2 et 3 (n = 12). Pour les 13 patients métastatiques, les données étaient trop pauvres pour être interprétées.

2.4.4.2. Résultats obtenus

Pour l'analyse des survies, plusieurs paramètres ont été étudiés :

- la présence de métastases dans la population globale en séparant la population en 2 avec les patients métastatiques (CEM, n = 13) et les patients non métastatiques avec une maladie uniquement locorégionale (CELA)
- la clairance globale du cetuximab en variable continue et en valeur dichotomisée sur la médiane dans l'ensemble de la population
- l'intensité des toxicités (radiodermites, mucites et folliculite) uniquement chez les 21 patients traités en intention curatrice (non métastatiques) par radiothérapie dans le cadre d'une maladie locorégionale (Tableau 21).

Les radiodermites maximales étaient respectivement de grades 0, 1, 2, 3 et 4 pour 2, 3, 3, 11 et 2 patients.

Les toxicités muqueuses maximales étaient respectivement de grades 0, 1, 2, 3 et 4 pour 2, 1, 6, 11 et 1 patients.

Les toxicités maximales à type de folliculite étaient respectivement de grades 0, 1, 2 et 3 pour 5, 4, 10 et 2 patients (absence de grade 4).

Tableau 21. Grades des toxicités chez les patients traités par radiothérapie pour un cancer localement avancé des VADS ($N = 21$).

	Radiodermite	Mucites	Folliculite
Grades			
0	2	2	5
1	3	1	4
2	3	6	10
3	11	11	2
4	2	1	0
	Faible = 8	Faible = 9	Faible = 9
	Sévère = 13	Sévère = 12	Sévère = 12

2.4.4.2.1. Survie sans progression

Dans l'ensemble de la population ($N = 34$), la médiane de survie sans progression (PFS) était de 11,56 mois (IC95%: 6,18 mois à NA) (Figure 39).

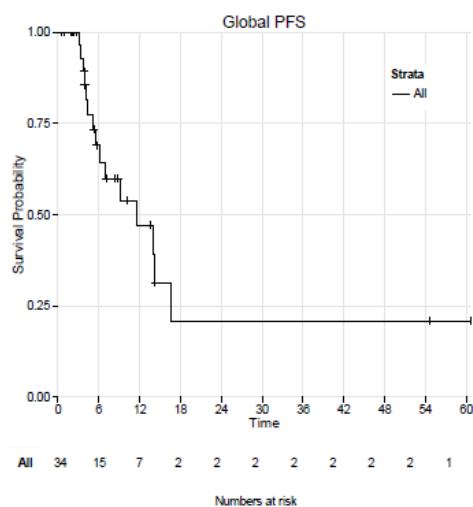


Figure 39. Survie sans progression (PFS) des 34 patients traités par cetuximab pour leurs cancers des VADS.

Des facteurs influençant la PFS ont été recherchés chez les 34 patients:

- La présence ou non de métastases,
- la clairance globale du cetuximab en variable continue,
- la clairance du cetuximab dichotomisée sur la médiane.

Paradoxalement, la PFS n'était pas significativement différentes (test du Log-rank) selon le statut métastatique ou non des patients ; $p = 0,09$ (Figure 40).

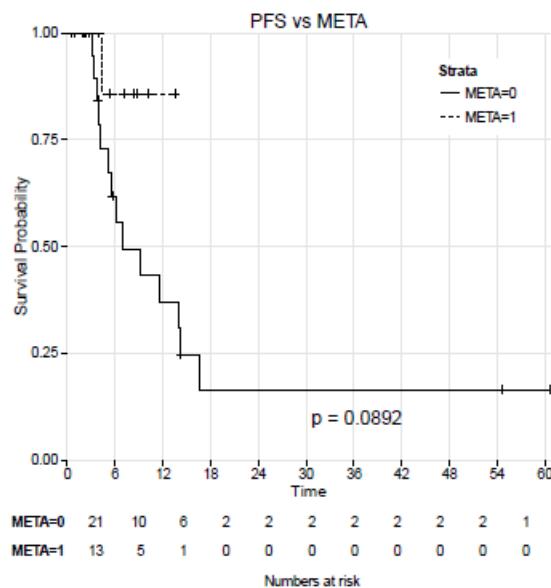


Figure 40. Survie sans progression (PFS) des 34 patients selon le statut métastatique ou non des patients.

La clairance globale du cetuximab étudiée en variable continue (modèle de Cox) n'avait pas d'impact significatif ($p = 0,104$) (Figure 41). En revanche, les patients ayant une clairance globale du cetuximab inférieure à la valeur médiane de la population (0,747 L/jour) avaient une PFS significativement plus longue : 14,1 mois (IC95%: 7 mois à NA) versus 11,6 mois (IC95%: 3,9 mois à NA) pour les autres patients ($p = 0,037$) (Figure 42).

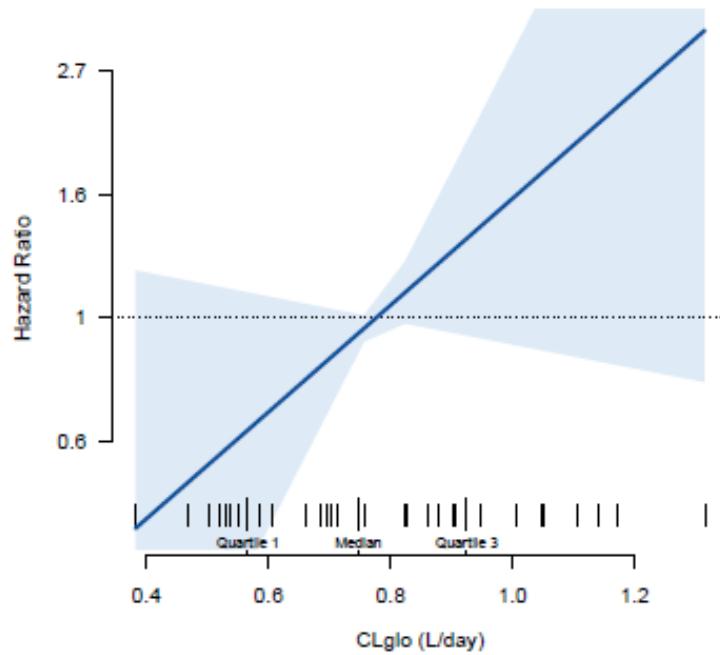


Figure 41. Hazard ratio de la clairance globale du cetuximab sur la PFS des 34 patients.

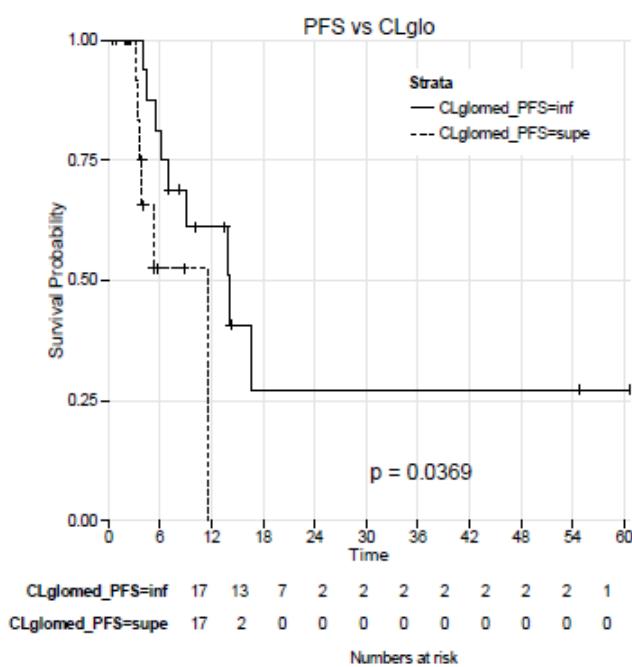


Figure 42. Survie sans progression (PFS) des 34 patients selon la clairance globale du cetuximab dichotomisée sur la médiane (0,747 L/jour).

Des facteurs influençant la PFS ont été recherchés chez les 21 patients non métastatiques (les données n'étant pas suffisantes pour les patients métastatiques) :

- L'intensité de la radiodermite,
- l'intensité de la mucite,
- l'intensité de la folliculite.

Ni la radiodermite (Figure 43; $p = 0,251$), ni la mucite (Figure 44; $p = 0,857$) ni la folliculite (Figure 45; $p = 0,242$) étaient reliées à la PFS chez ces 21 patients.

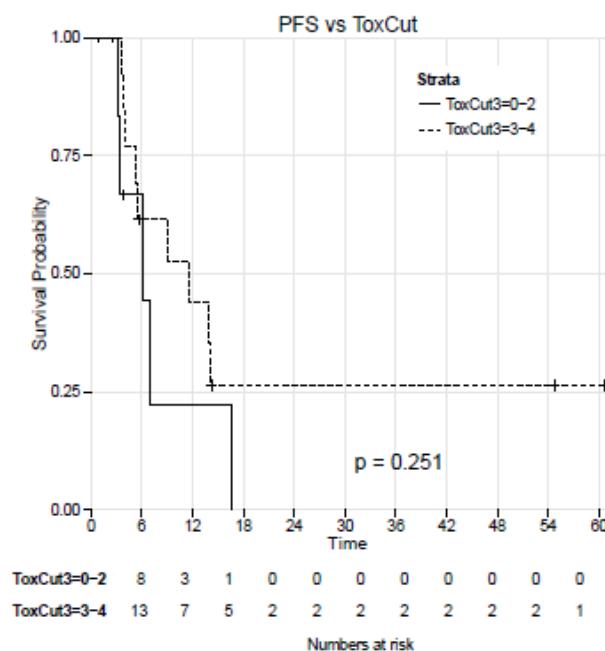


Figure 43. Survie sans progression (PFS) selon la radiodermite.

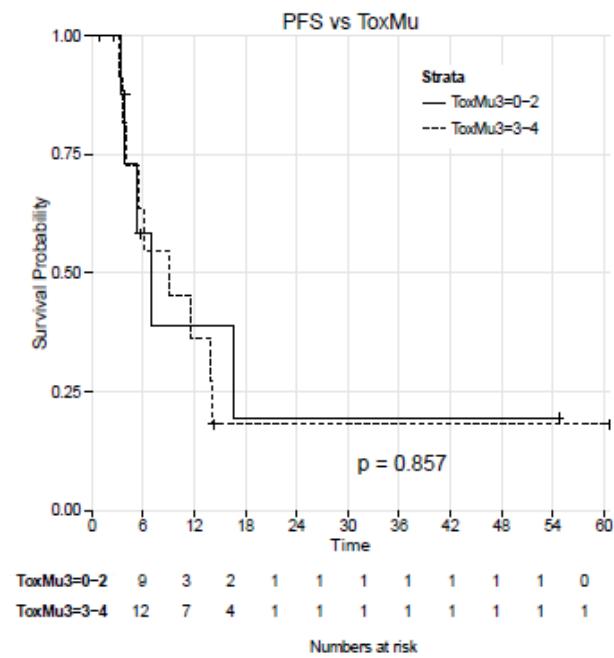


Figure 44. Survie sans progression (PFS) selon la mucite.

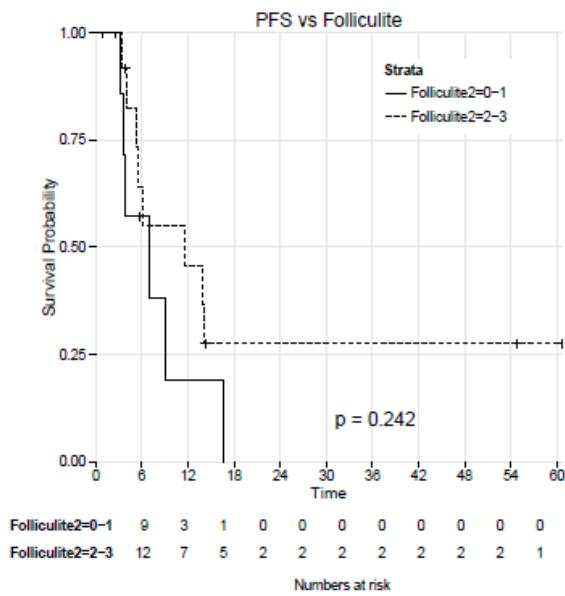


Figure 45. Survie sans progression (PFS) selon l'intensité de la folliculite.

2.4.4.2.2. Survie globale

Dans l'ensemble de la population (N = 34), la survie globale (OS) était de 12,4 mois (IC95%: 9,3 à 22,1 mois) (Figure 46).

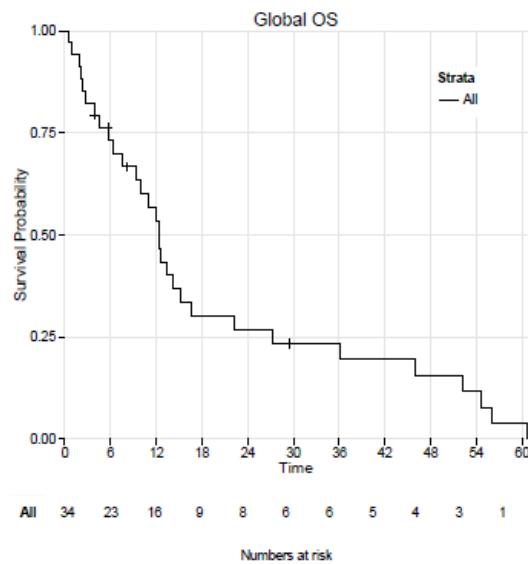


Figure 46. Survie globale (OS) des 34 patients traités par cetuximab pour leurs cancers des VADS.

Des facteurs influençant l'OS ont été recherchés chez les 34 patients:

- La présence ou non de métastases,
- la clairance globale du cetuximab en variable continue,
- la clairance du cetuximab dichotomisée sur la médiane.

Paradoxalement, l'OS n'était pas significativement différentes (test du Log-rank) selon le statut métastatique ou non des patients ; p = 0,125 (Figure 47).

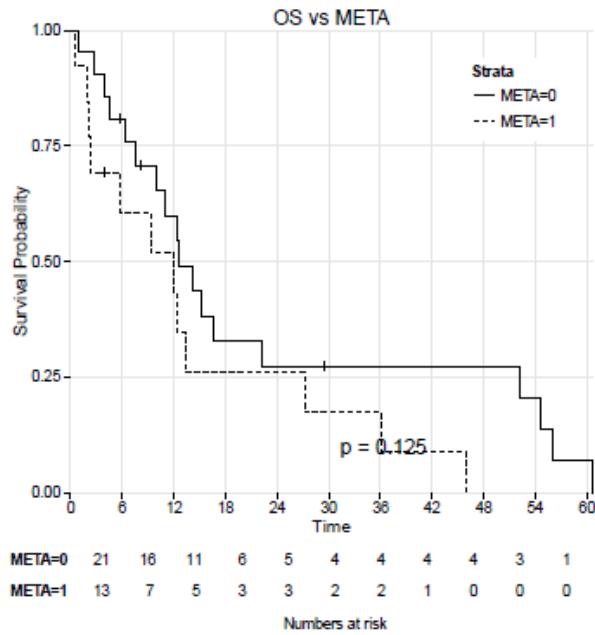


Figure 47. Survie globale (OS) des 34 patients selon le statut métastatique ou non des patients.

La clairance globale du cetuximab étudiée en variable continue ou dichotomisée par rapport à la valeur médiane de la population (0,744 L/jour) avaient un impact significatif sur l'OS avec respectivement $p = 0,007$ (Figure 48) et $p = 0,007$ (Figure 49).

Les patients dont la clairance globale était inférieure à la valeur médiane (0,744 L/jour) avaient une survie globale plus longue : 16,56 mois (IC95% : 12,35 à 55,7 mois) contre 6,43 mois (IC95% : 3,88 mois à NA) pour les autres patients, $p = 0,007$.

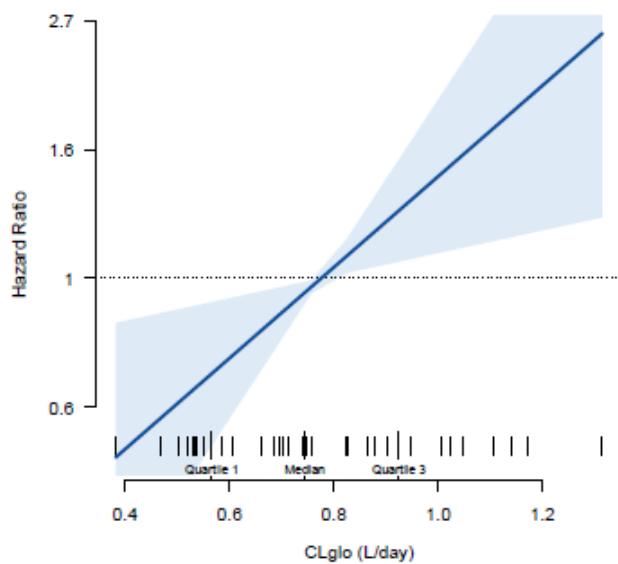


Figure 48. Hazard ratio de la clairance globale du cetuximab sur la survie globale des 34 patients.

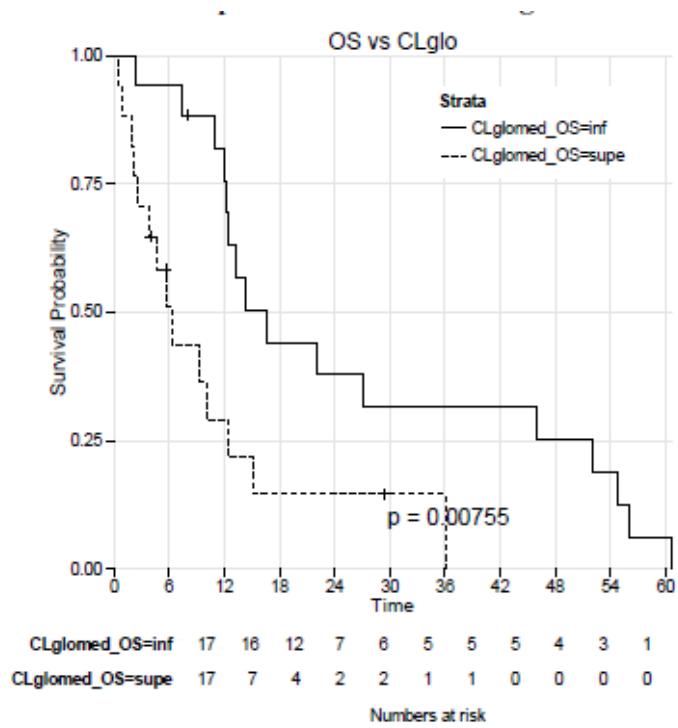


Figure 49. Survie globale (OS) des 34 patients selon la clairance globale du cetuximab dichotomisée sur la médiane (0,744 L/jour).

Des facteurs influençant l'OS ont été recherchés chez les 21 patients non métastatiques (les données n'étant pas suffisantes pour les patients métastatiques) :

- L'intensité de la toxicité cutanée = radiodermite,
- l'intensité de la toxicité muqueuse = mucite,
- l'intensité de la folliculite.

L'étude de l'intensité des différentes toxicités cutanéomuqueuses au cours des traitements par radiothérapie et cetuximab a permis de mettre en évidence une relation significative entre la survie globale et la survenue de radiodermite (Figure 50 ; $p = 0,005$). Les patients avec des grades de toxicité 3 et 4 ayant une meilleure survie globale.

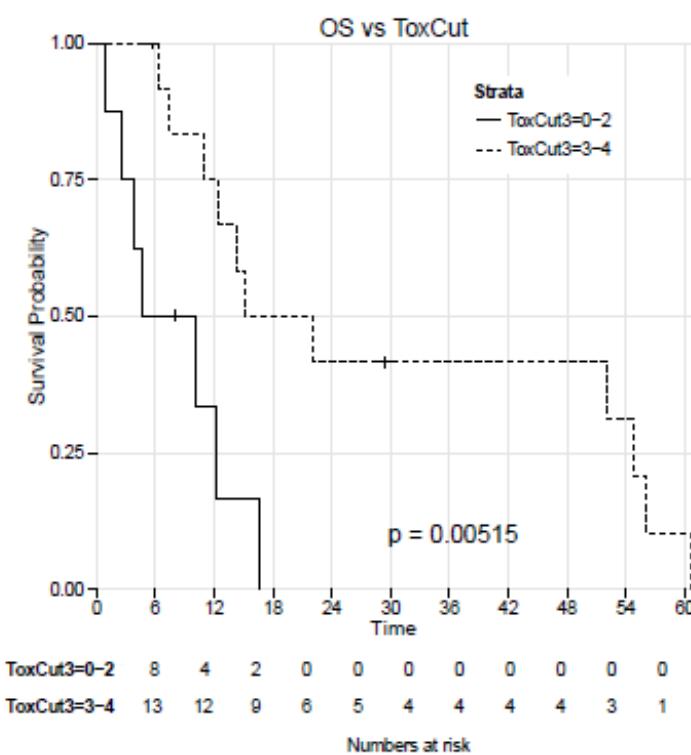


Figure 50. Survie globale (OS) selon la radiodermite.

Par contre, aucun impact n'a été retrouvé pour les mucites (Figure 51 ; $p = 0,221$) ou avec la folliculite (Figure 52 ; $p = 0,227$).

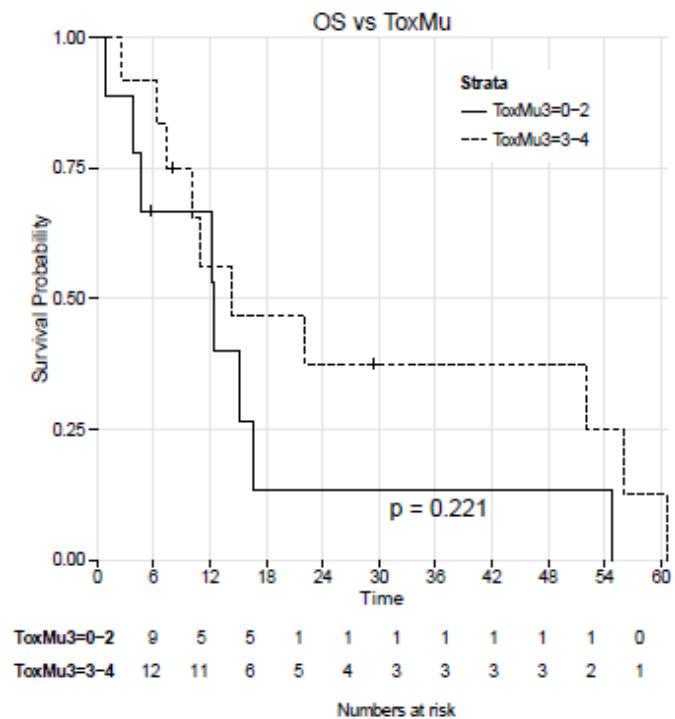


Figure 51. Survie globale (OS) selon la mucite.

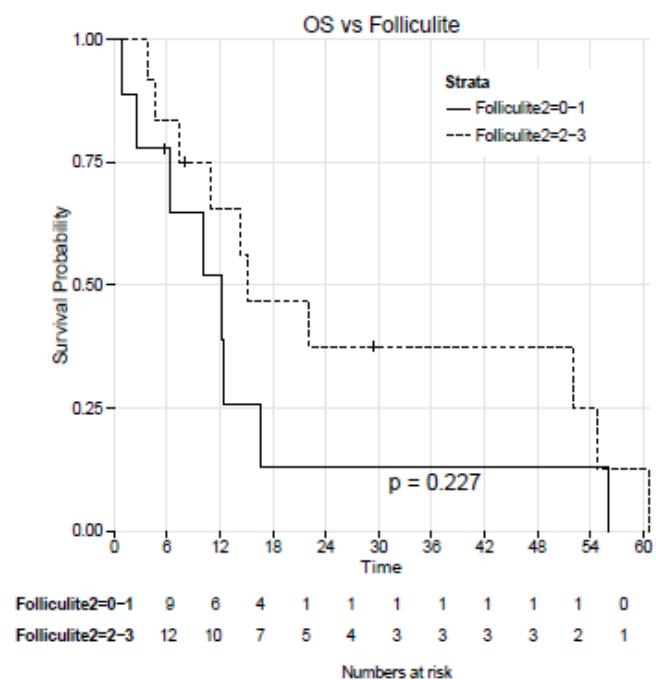


Figure 52. Survie globale (OS) selon l'intensité de la folliculite.

2.4.5. CONCLUSION

L'exposition individuelle au cetuximab a été ici estimée par une approche pharmacocinétique de population selon un modèle à deux compartiments avec à la fois une élimination d'ordre 1 et une élimination saturable. Dans cette analyse pharmacocinétique portant sur une cohorte de patients traités pour un cancer des VADS, est rapportée pour la première fois une influence des paramètres pharmacocinétiques sur la survie globale des malades. En effet, la clairance globale du cetuximab est significativement reliée aux paramètres de survie.

La discussion générale sera l'occasion de comparer notre modèle à ceux déjà publiés et de revenir sur les sources de variabilité pharmacocinétique identifiées et les paramètres reliés aux données de survie.

2.5. SIMULATION D'UNE ADMINISTRATION DE CETUXIMAB TOUTES LES 2 OU 3 SEMAINES

2.5.1. RAPPEL

Dans le cadre du traitement du cancer, le cetuximab est approuvé pour être administré avec une dose de charge de 400 mg/m^2 suivi de perfusions de 250 mg/m^2 toutes les semaines. Cette posologie a montré son efficacité notamment dans les cancers des VADS, mais l'intervalle d'injection (τ) n'est pas adapté à celui d'une chimiothérapie dans cette pathologie. En effet, dans le cadre de l'AMM délivrée pour le traitement du cancer des VADS, la chimiothérapie est administrée toutes les trois semaines [20]. Il est donc possible d'envisager un ajustement de l'intervalle d'injection du cetuximab à celui de la chimiothérapie dans cette pathologie.

Dans le cancer colorectal, la chimiothérapie est administrée toutes les 2 semaines et il est devenu courant dans la pratique d'y adjoindre le cetuximab au même rythme mais avec une dose doublée de 500 mg/m^2 . Peu de données fiables confortent cette pratique. Cependant, les études visant à justifier l'équivalence de cette posologie avec celle recommandée se basent sur des comparaisons de toxicités cutanées ou de réponses cliniques qui ont été réalisées dans des petites cohortes [142,175-179]. En raison de ce rythme d'administration toutes les 2 semaines, des essais de phase II en ORL proposent, lors de la phase de maintenance post-chimiothérapie, d'administrer le cetuximab tous les 15 jours à la posologie de 500 mg/m^2 au lieu du rythme hebdomadaire validé, sans supports clinique ou biologique validés dans cette localisation tumorale. Un espacement des injections a été proposé en première ligne métastatique dans le cadre d'un essai de phase II [180]. Les patients recevaient 4 cycles de chimiothérapie par docetaxel, cisplatine toutes les trois semaines associés à une injection hebdomadaire de cetuximab. A l'issue de cette phase, le cetuximab était administré toutes les deux semaines en maintenance à la dose de 500 mg/m^2 . Cependant, comme évoqué, durant la phase de chimiothérapie, l'injection de cetuximab se faisait toutes les semaines, ce qui peut être vécu comme contraignant par les patients.

La variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique du cetuximab a été rapportée dans différentes études [143,147]. Une relation entre les concentrations résiduelles de cetuximab et la réponse objective a été décrite précédemment [143]. Cette étude montre que les patients en progression ont des concentrations résiduelles moyennes autour de 30 mg/L alors que les patients stables ou répondeurs ont des concentrations résiduelles moyennes autour de 60

mg/L. La publication d’Azzopardi *et al.* [148], a montré que la clairance globale du cetuximab ainsi que la concentration résiduelle à 14 jours, qui en est le reflet, étaient des facteurs reliés significativement avec la survie sans progression (PFS). Il est également reconnu que la pharmacocinétique du cetuximab est dose-dépendante, car elle fait intervenir une élimination saturable [129,142,145-147]. Cette dose-dépendance rend le choix de posologies équivalentes complexe et peut entraîner une sous-exposition des patients recevant du cetuximab toutes les deux ou trois semaines si la posologie est fondée sur une pharmacocinétique considérée comme linéaire.

Une simulation des résultats obtenus avec des injections toutes les deux ou trois semaines est donc pertinente.

L’étude de l’équivalence entre différentes posologies de cetuximab doit comparer l’efficacité des traitements, mais doit tout d’abord être fondée sur une bonne description de l’exposition des patients. Nous avons utilisé les paramètres de population obtenus lors de l’analyse de la pharmacocinétique du cetuximab chez des patients traités dans le cadre de notre cohorte de cancers des VADS métastatiques pour simuler l’exposition de patients virtuels traités par cetuximab avec différentes posologies, faisant intervenir différentes doses injectées toutes les une, deux ou trois semaines.

2.5.2. METHODE

Pour étudier l’impact de l’espacement des injections de cetuximab sur les concentrations obtenues, trois profils obtenus avec différentes posologies ont été simulés. La surface corporelle de 5 000 patients a été générée à l’aide d’une loi normale de moyenne égale à la surface corporelle médiane des patients métastatiques de la cohorte ORL utilisée pour l’analyse pharmacocinétique (1,72 m²). Ces surfaces corporelles étaient censurées à gauche et à droite en fonction des valeurs extrêmes. A partir du modèle compartimental de population retrouvé dans l’analyse pharmacocinétique des patients, les paramètres pharmacocinétiques de ces patients virtuels ont été générés. Pour être comparables, les simulations d’injection de 250 (après dose de charge de 400), 500 et 750 mg/m² respectivement, toutes les une, deux ou trois semaines devaient se faire sur 84 jours (2 fois 6 semaines). Pour chaque heure, les concentrations étaient estimées dans les deux compartiments et l’AUC dans le compartiment central.

A l'aide de cette cohorte virtuelle de 5 000 patients, nous avons simulé *in silico*, trois propositions cliniques, avec les posologies de cetuximab suivantes :

- Posologie 1 : Dose de charge de 400 mg/m² suivie de 250 mg/m² toutes les semaines (posologie approuvée lors de l'AMM).
- Posologie 2 : Dose de 500 mg/m² de cetuximab toutes les deux semaines (posologie déjà utilisée en clinique dans les cancers colorectaux et dans certaines études de phase II en ORL).
- Posologie 3 : Dose de 750 mg/m² de cetuximab toutes les trois semaines (correspondant à 3 x 250 mg/m² toute les semaines)

2.5.3. RESULTATS OBTENUS

Les trois profils de concentration obtenus avec les différentes posologies (simple multiplication de la dose hebdomadaire par le nombre de semaines d'espacement) ont été analysés.

En termes d'AUC, il n'y avait pas de différence significative du point de vue graphique (Figure 53) et en termes d'AUC cumulée lors de l'analyse des quartiles (Tableau 22).

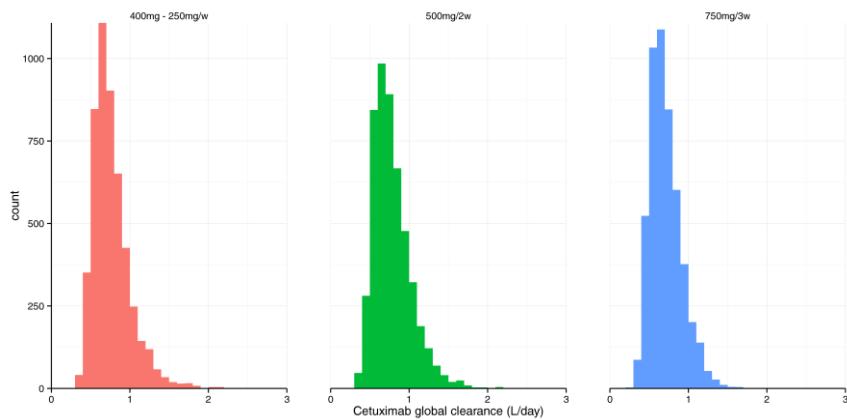


Figure 53. AUC du cetuximab simulées avec trois posologies différentes ayant la même dose cumulée sur trois semaines. – En rouge, 400 mg/m² suivie de 250 mg/m² toutes les semaines – En vert, 500 mg/m² toutes les deux semaines – En bleu, 750 mg/m² toutes les trois semaines.

En termes de clairance globale, il n'y a pas de différence significative du point de vue graphique (Figure 54) et lors de l'analyse des quartiles (Tableau 22).

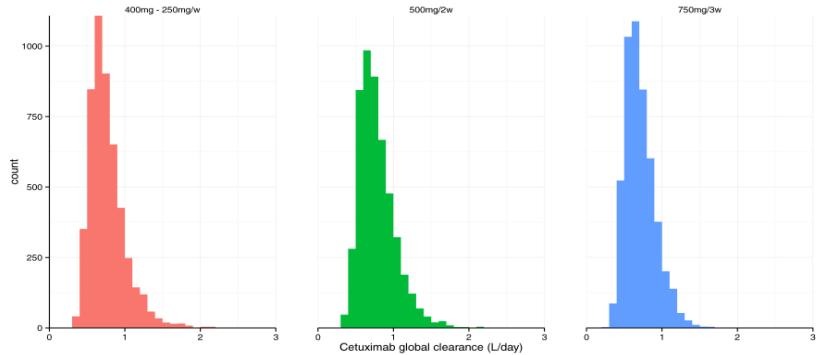


Figure 54. Clairance globale du cetuximab simulées avec trois posologies différentes. – En rouge, 400 mg/m² suivie de 250 mg/m² toutes les semaines – En vert, 500 mg/m² toutes les deux semaines – En bleu, 750 mg/m² toutes les trois semaines.

Par contre, en termes de concentrations résiduelles, la posologie à 750 mg/m² toutes les 3 semaines entraîne des concentrations résiduelles de cetuximab les plus faibles (Figure 55) avec plus de 5% des patients n'ayant plus de cetuximab sérique à 84 jours (Tableau 22).

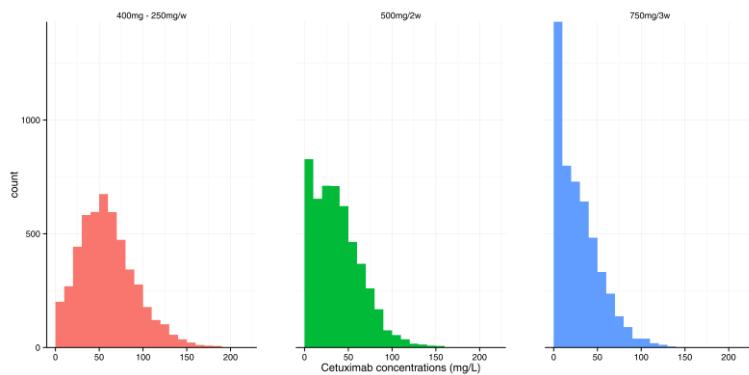


Figure 55. Concentrations résiduelles à 84 jours du cetuximab simulées avec trois posologies différentes. – En rouge, 400 mg/m² suivie de 250 mg/m² toutes les semaines – En vert, 500 mg/m² toutes les deux semaines – En bleu, 750 mg/m² toutes les trois semaines.

Ces résultats objectivent les conséquences potentielles de la non-linéarité de la pharmacocinétique du cetuximab sur ses concentrations sériques lors de l'espacement des injections. Bien que les différences observées en termes d'AUC cumulées et de clairance globale ne soient pas cliniquement pertinentes, les différences en termes de concentrations résiduelles à l'équilibre sont importantes et leurs pertinences devraient être étudiées.

Tableau 22. Quantiles des distributions des AUC cumulées, de la clairance globale et des concentrations résiduelles à 84 jours en fonction de la posologie, pour 5000 patients virtuels.

		Quantiles des concentrations résiduelles de cetuximab à 84 jours (mg/L)					Quantiles des AUC cumulées de cetuximab à 84 jours (g/L/jour)				
Doses (mg/m ²)	τ en semaine	5%	25%	50%	75%	95%	5%	25%	50%	75%	95%
400 - 250	1	12,7	36,1	56,4	78,0	119,4	4,5	6,2	7,6	9,0	11,5
500	2	0,0	16,5	34,0	54,1	87,3	4,0	5,5	6,8	8,2	10,3
750	3	0,0	7,6	23,8	42,6	76,3	4,7	6,3	7,6	9,2	11,8

Quantiles de la clairance globale du cetuximab à 84 jours (L/j)

		Quantiles de la clairance globale du cetuximab à 84 jours (L/j)				
Doses (mg/m ²)	τ en semaine	5%	25%	50%	75%	95%
400 - 250	1	0,47	0,60	0,72	0,87	1,22
500	2	0,48	0,60	0,73	0,91	1,23
750	3	0,44	0,57	0,68	0,82	1,09

2.5.4. CONCLUSION

Ces données suggèrent, en cas d'espacement des injections, une possibilité d'augmenter les posologies et pourrait faire l'objet d'explorations complémentaires.

L'espacement des injections associé à une augmentation proportionnelle de la dose des perfusions entraîne de grands écarts entre les concentrations avant et après injection (pic). Ces résultats donnent des outils pour une adaptation posologique raisonnée lors de l'augmentation des intervalles de perfusion. Nos résultats doivent bien entendu être confirmés par des études prospectives analysant à la fois les concentrations de cetuximab et la réponse clinique.

3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux de cette thèse portent sur le cetuximab dans le cadre des cancers des VADS avec différentes approches passant par la recherche clinique, la proposition de sécurisation de son administration avant la première injection, la recherche de relations entre la survie des patients et des facteurs individuels clinico-biologiques et enfin sur la faisabilité théorique de l'espacement des dates d'injections. La discussion reprendra ces différentes approches.

Dans l'essai de phase II TREMLIN, spécifiquement conçu pour évaluer la capacité à préserver le larynx, les patients porteurs d'une tumeur localement avancée de l'hypopharynx ou du larynx recevant une chimiothérapie d'induction par TPF, avaient un taux de préservation laryngée excellent avec une efficacité à 3 mois identique quand la radiothérapie, réalisée chez les patients bons répondeurs, était associée soit au cisplatine soit au cetuximab. De nombreux protocoles de préservation laryngée ont été testés depuis plus de 30 ans avec soit des schémas de radiochimiothérapie soit de la chimiothérapie d'induction suivie d'une radiothérapie locorégionale. Avec les protocoles d'induction à base de taxanes, cette prise en charge est devenue une véritable alternative thérapeutique à la chirurgie ou à la radiochimiothérapie. Dans l'étude du GORTEC 2000-01 [163], le schéma par TPF a été comparé au schéma de référence PF en situation d'induction pour des patients porteurs de cancers du larynx ou de l'hypopharynx localement avancés. La chimiothérapie était suivie d'une radiothérapie ou d'une radiochimiothérapie en cas de bonne réponse tumorale. Le traitement par TPF permettait d'augmenter le taux de préservation laryngé (70,3 versus 57,5 % ; $p = 0,03$) avec une meilleure tolérance et une meilleure compliance mais aucun bénéfice n'a été retrouvé sur la survie globale. Comparativement à la RCC, les schémas de chimiothérapie d'induction étaient moins toxiques pour les patients porteurs d'une tumeur de la sphère cervico-faciale, et en particulier pour les localisations laryngées où se développent plus fréquemment des toxicités tardives sévères. Le cetuximab a été testé avec succès en combinaison avec la radiothérapie [18,19] et a démontré un impact positif sur le contrôle locorégional et la survie globale sans majorer les toxicités aiguës à type de mucite.

Dans l'essai TREMLIN, les résultats obtenus ont été excellents mais restent ouverts à la discussion car le recul est faible pour détecter une différence significative entre les 2 bras et pour les comparer, de manière indirecte, aux résultats obtenus dans les autres essais de préservation laryngée. De plus, les thérapeutiques sont appliquées à une population bien sélectionnée avec uniquement des cancers du larynx et de l'hypopharynx dans un but unique de préservation d'organe.

Le cetuximab fait donc désormais partie de l'arsenal thérapeutique des cancers des VADS. Bien que testé dans la phase II de l'essai TREMLIN dans le cadre de la préservation laryngée, il n'est actuellement pas à l'étude dans cette indication car n'a pas démontré de bénéfice lorsqu'il était ajouté. En effet, la phase III actuellement en cours (essai SALTORL) compare un bras de chimioradiothérapie à un bras de chimiothérapie d'induction par TPF suivie d'une irradiation seule.

La recherche des IgE anti- α 3Gal, seul marqueur prédictif du risque de réaction d'hypersensibilité sévère au cetuximab, a été réalisée à l'aide d'un test que nous avons développé à partir du système ImmunoCapTM (Phadia[®]), en utilisant comme antigène le 70BP (oligoside Gal α 3Gal β 4GlcNAc biotinylé sous forme polymérique) à la concentration de 3,33 μ g par cap et à l'aide d'un test commercial automatisé (ImmunoCAP250TM) validé pour le dépistage des allergies à la viande rouge, test utilisant de la thyroglobuline bovine (test bTG), naturellement riche en sucres α -galactosylés. Plusieurs variables ont été comparées pour évaluer ces deux tests (70BP et bTG) dans une cohorte de 299 donneurs de sang et dans une cohorte de 41 patients traités par cetuximab pour un cancer des VADS (avec 9,76% de réactions anaphylactiques) et une très bonne corrélation entre les deux tests a été observée. De plus, les deux tests ont une sensibilité et une valeur prédictive négative de 100%. Les sensibilités et les valeurs prédictives positives étaient respectivement de 91,9% et 57,1% pour le test 70BP et de 94,6% et 66,6% pour le test bTG. Il n'y avait donc aucun faux négatifs. Dans la cohorte des patients, le seul facteur individuel associé à la détection des IgE anti- α 3Gal était la valeur des IgE totale.

Les raisons pour lesquelles certains patients ont des IgE anti- α 3Gal préexistantes sont encore mal connues. Cependant, leur détection en préthérapeutique est majeure pour sécuriser l'utilisation du cetuximab, en particulier dans les cancers des VADS localement avancés et métastatiques car il n'y a actuellement pas d'alternative en terme d'utilisation d'anticorps monoclonaux. Le passage en routine du test bTG semble donc une perspective d'avenir proche. En attendant, une surveillance rapprochée des patients lors de la première injection est indispensable et la communauté des oncologues doit y être sensibilisée.

Un suivi thérapeutique reposant sur la mesure des concentrations sériques de cetuximab chez les patients traités pour cancer des VADS pourrait être utile afin d'adapter les posologies de façon individuelle. Dans la cohorte des 34 patients (544 concentrations), et grâce aux mesures fiables des concentrations sériques de cetuximab, une approche de population utilisant le logiciel MONOLIX 4.3.2 a permis de développer un modèle à deux compartiments avec à la

fois une élimination d'ordre 1 et une élimination saturable, dans lequel les covariables étaient la BSA (sur V_1 et V_2) et le traitement par chimiothérapie ou non (sur CL et k_0). Dans l'étude pharmacocinétique du cetuximab chez les patients porteurs d'un cancer des VADS rapportée par Dirks *et al.* [147], l'élimination était décrite comme exclusivement non linéaire en utilisant une équation de Michaelis-Menten. Plus récemment, dans une population traitée pour un cancer colorectal métastatique, Azzopardi *et al.* [148] ont rapporté un modèle similaire avec une combinaison d'élimination linéaire et non linéaire, l'élimination saturable étant décrite par une constante d'ordre 0, k_0 . Dans notre population de patients traités pour un cancer des VADS, nous avons mis en évidence qu'un modèle du même type était le plus approprié. L'élimination des protéines plasmatiques, incluant les IgG et l'albumine, est liée au catabolisme intracellulaire au décours d'une phase d'endocytose, celle-ci étant un mécanisme non saturable aux concentrations physiologiques [181]. Les anticorps ont également une élimination liée à leur liaison sur leur cible antigénique. Ce dernier mode d'élimination étant par définition limité et donc saturable eu égard au nombre limité de cibles antigéniques. Le modèle structurel que nous avons développé dans cette cohorte paraît donc adapté puisqu'il tient compte des deux modalités d'éliminations : non saturable (de premier ordre) et saturable (d'ordre 0).

Des facteurs individuels ont déjà été rapportés comme pouvant influencer la pharmacocinétique du cetuximab. Tan *et al.* ont rapporté une association significative entre la clairance du cetuximab et à la fois la surface corporelle (BSA) et le poids des patients [129]. Azzopardi *et al.* [148] ont observé une augmentation de V_1 , V_2 et k_0 avec la BSA et une relation inverse entre la concentration sérique initiale d'albumine et la composante non saturable de l'élimination. Dans notre cohorte, nous avons retrouvée l'influence attendue de la BSA sur V_1 et V_2 , ce qui justifie l'adaptation des doses du cetuximab à la surface corporelle. Malheureusement, faute d'avoir à notre disposition les concentrations sériques initiales d'albumine, nous n'avons pas pu tester son association éventuelle avec les paramètres pharmacocinétiques du cetuximab. Par contre, nous rapportons pour la première fois une influence de la chimiothérapie à la fois sur l'élimination d'ordre 1 (CL) et sur l'élimination saturable (k_0) du cetuximab. En comparaison aux patients ne recevant que le cetuximab (donc sans chimiothérapie associée), CL était plus faible et k_0 était plus élevé lorsque la chimiothérapie était associée. Le paramètre k_0 pourrait refléter la partie saturable (spécifique) de l'élimination en rapport avec la fixation du cetuximab sur l'EGFR. Une hypothèse pouvant expliquer ce facteur de variabilité de k_0 serait que les patients recevant une chimiothérapie dans notre cohorte auraient des maladies plus avancées (métastatiques) et donc davantage de

cibles antigéniques (EGFR) pour la fixation du cetuximab. De plus, la destruction des cellules cancéreuses par la chimiothérapie pourrait libérer davantage d'EGFR. A l'inverse, CL qui reflète l'élimination non spécifique (d'ordre 1) du cetuximab est plus faible chez les patients recevant la chimiothérapie, sans que nous ayons pu en identifier la cause. Le modèle proposé semble donc cohérent avec les résultats obtenus. Cependant, les résultats révèlent un $r.s.e$ du k_0 élevé ce qui pourrait traduire la limite du modèle utilisé et encourage à tenter d'utiliser des modèles plus mécanistiques de type TMDD.

Deux précédentes études ont analysé la relation entre les paramètres pharmacocinétiques du cetuximab et son efficacité. Fracasso *et al.* [143] ont observé des concentrations sériques plus élevées chez les répondeurs que chez les non répondeurs dans une cohorte de patients traités pour différents types de cancers. La concentration résiduelle moyenne des patients stables ou répondeurs était de 60,7 mg/L alors que celle des non répondeurs était de 33,2 mg/L. Azzopardi *et al.* [148] ont rapporté une relation entre la clairance globale du cetuximab (définie par la dose cumulée de cetuximab divisée par l'AUC cumulée) et la survie sans progression des patients traités pour un cancer colorectal métastatique, le risque de progression augmentant significativement avec la clairance globale.

Dans notre cohorte de patients avec un cancer des VADS, les données de survies n'étaient pas différentes selon le statut métastatique ou non. En effet, paradoxalement, la PFS n'était pas significativement différente (test du Log-rank) selon ce statut ; $p = 0,09$. Cela peut s'expliquer par le fait que de nombreuses données sont en fait censurées par la date de décès des patients. Là encore, l'OS n'était pas significativement différente selon le statut métastatique ou non des patients bien qu'un peu meilleure en l'absence de métastases ; $p = 0,125$. Cela peut s'expliquer par de nombreux événements parmi les patients traités par cetuximab et radiothérapie avec un décès en cours de traitement, un grand nombre de poursuites évolutives dans les 4 mois après le début du traitement ($n = 8$), des rechutes précoces entre 4 et 12 après le début du traitement ($n = 3$), des rechutes plus d'un an après le début du traitement ($n = 4$), trois décès inexplicables (un à 3 mois et un à 6 mois du début du traitement plus un à 2 ans) et finalement seulement 2 patients vivants sans rechutes au moment de l'analyse. A l'inverse, certains patients métastatiques ont eu de longues survies, 5 sur 13 ayant des survies supérieures à la médiane attendue de 10,1 mois rapportée dans l'essai EXTREME ayant permis l'obtention de l'AMM dans cette population [20]. Le faible effectif peut également expliquer que les données de survies ne sont pas différentes entre les deux populations.

Pour la première fois, dans la population du cancer des VADS, une influence des paramètres pharmacocinétiques sur les survies sans progression et globale est rapportée. La survie sans progression est significativement associée avec la clairance globale du cetuximab, avec une PFS plus longue chez les patients ayant une valeur de clairance globale inférieure à la médiane de cette dernière ($p = 0,037$). La survie globale était également significativement associée à la clairance globale du cetuximab avec une meilleure survie des patients en cas de clairance globale basse ($p = 0,007$). Ces résultats sont majeurs et pourraient expliquer le fait que les patients ayant une plus forte exposition au cetuximab auraient de meilleures survies sans progression et globale.

Chez les patients traités (pour un cancer des VADS ou colorectal) par les anticorps monoclonaux anti-EGFR, l'intensité de la toxicité cutanée à type de rash/folliculite a été décrite comme reliée à l'efficacité ; les patients avec des toxicités de grades élevés ayant de meilleurs taux de réponse et même de meilleures survies, aussi bien avec la panitumumab [182,183] qu'avec le cetuximab [19,21,46]. Cependant, dans le cadre des cancers des VADS métastatiques, Vermorken *et al.* [20] n'ont pas retrouvé d'association entre la sévérité de la toxicité cutanée et la survie ($p = 0,14$). Enfin, aucune étude n'a rapporté d'association entre la radiodermite et les données de survie.

Parmi nos 21 patients porteurs d'une tumeur des VADS localement évoluée traités par une radiothérapie associée au cetuximab, la mucite ou la folliculite (ou rash) n'étaient pas significativement reliées à la survie globale. Par contre, une radiodermite sévère (au moins grade 3) était significativement reliée à une meilleure survie globale ($p = 0,005$). La différence entre la toxicité cutanée liée à la radiothérapie (radiodermite) ou au cetuximab (folliculite) dans les champs d'irradiation n'est pas simple ; les classifications utilisées dans les précédentes publications ne faisaient pas clairement la distinction, ce qui a pu induire un biais de confusion. Dans notre cohorte, la distinction était plus aisée compte tenu de l'utilisation d'une classification adaptée spécifiquement et conçue pour les patients traités par l'association radiothérapie et cetuximab [173,174].

Finalement, dans notre cohorte, le modèle combinant des mécanismes d'éliminations linéaire et non linéaire a donné les meilleurs résultats en termes de description de la pharmacocinétique du cetuximab, avec une influence de l'exposition au cetuximab (à travers sa clairance globale) sur les survies.

Compte tenu de cette non linéarité, une modification de la posologie telle qu'une augmentation de l'intervalle de temps entre les injections doit reposer sur des bases pharmacocinétiques. Nous avons utilisé le modèle pharmacocinétique décrit dans la publication IV (avec les paramètres des patients métastatiques) pour simuler les concentrations attendues avec différentes doses de perfusion pour des intervalles d'une, deux et trois semaines (manuscrit VI) dans une population virtuelle de 5 000 patients. Les résultats montrent, qu'en termes d'AUC et de clairance globale, il n'y avait pas de différence significative entre la posologie hebdomadaire de l'AMM, celle d'une injection de 500 mg/m² toutes les deux semaines et celle d'une injection des 750 mg/m² toutes les trois semaines. Par contre, le doublement ou le triplement de la dose sont probablement insuffisants pour maintenir des concentrations résiduelles comparables lorsque l'intervalle entre deux perfusions est doublé ou surtout triplé, certains patients n'ayant plus de cetuximab circulant au moment de la réinjection. Ces résultats préliminaires justifient un suivi minutieux des concentrations de cetuximab dans les études testant un espacement des perfusions et la recherche d'une concentration sérique minimale en dessous de laquelle il ne faudrait pas descendre semble une perspective intéressante.

4. CONCLUSION

Les travaux menés pour ce travail de thèse se sont centrés sur le cetuximab mais avec une vision relativement globale. L'enjeu de la question du cheminement global semble atteint puisque les constatations cliniques initiales ont permis une plongée dans des données biologiques et théoriques pour finalement tendre vers une transposition dans la pratique.

A la question « pourquoi certains patients font-ils des chocs à la première injection ? », la revue de la littérature aura trouvé la réponse avec la découverte de la présence de l'épitope α 3Gal sur le cetuximab qui est reconnu comme cible d'IgE anti- α 3Gal préexistantes chez certains patients. Le développement du test 70BP et sa comparaison à un test commercial (bTG), à la fois dans une cohorte de donneurs de sang et dans une cohorte de patients traités pour un cancer des VADS auront permis d'ouvrir des perspectives pratiques de sécurisation de l'emploi du cetuximab avant la première injection. Le projet de retour à la pratique quotidienne semble donc tout à fait possible mais reste à valider à plus grande échelle. Et ce d'autant que la dernière mise à jour d'août 2014 du résumé des caractéristiques du produit (cetuximab) informe « qu'une réaction anaphylactique peut survenir dès les premières minutes de la première perfusion en raison, par exemple, d'une réaction croisée entre les anticorps IgE préformés et le cetuximab et qu'elle peut apparaître en dépit de l'utilisation d'une prémédication. Ce risque de réactions anaphylactiques est fortement majoré chez les patients présentant des antécédents d'allergie à la viande rouge ou aux morsures de tiques, ou présentant des résultats positifs aux tests de détection des anticorps IgE anti-cetuximab (α -1-3-galactose). Chez ces patients, le cetuximab ne devra être administré qu'après évaluation soigneuse des bénéfices/risques, y compris des alternatives thérapeutiques, et sous la surveillance étroite d'un personnel bien formé ayant un équipement de réanimation à disposition ».

A la question « pourquoi y a-t-il une différence d'efficacité/toxicité entre les patients ? », la modélisation pharmacocinétique aura apporté une partie des réponses. Dans une cohorte de patients traités pour un cancer des VADS, un modèle combinant des mécanismes d'élimination linéaire et non linéaire aura permis de décrire correctement la pharmacocinétique du cetuximab. L'exposition au cetuximab, à travers le calcul de sa clairance globale, influençait significativement la survie sans progression et la survie globale des patients traités par radiothérapie ou chimiothérapie. Un grade élevé de radiodermite était également relié significativement à la survie globale des patients. Le projet d'une transposition à la clinique semble donc envisageable avec d'une part une prédiction d'efficacité chez les patients ayant une radiodermite plus intense et d'autre part, par le calcul

de la clairance globale du cetuximab chez les patients à titre individuel, une possibilité d'adaptation future des doses injectées pour optimiser l'exposition au médicament. Bien sûr, une application par la mesure des concentrations sériques au quotidien semble à envisager et à valider à plus grande échelle dans cette population au pronostic globalement mauvais.

A la question « pourquoi ne pas envisager des injections de cetuximab toutes les trois semaines plutôt que toutes les semaines chez les patients métastatiques recevant par ailleurs leurs chimiothérapies toutes les trois semaines ? », les simulations pharmacocinétiques permettaient, par multiplication des doses injectées par l'espacement des injections, de retrouver des AUC et des clairances globales relativement proches. Cependant les concentrations résiduelles restaient assez différentes avec des valeurs de moins en moins élevées avec la majoration des délais d'injection. Or, le maintien d'une exposition au produit au-dessus d'une certaine concentration seuil pourrait être un facteur important d'efficacité. Ces constatations encouragent à revenir à la clinique au travers d'essais cliniques où le cetuximab serait injecté à la posologie de 750 mg/m² toutes les 3 semaines avec mesure au cours du temps des concentrations sériques du cetuximab (notamment aux pics et aux vallées). Il faudrait ensuite modéliser les résultats et les relier aux données cliniques et biologiques comme dans notre publication numéro IV. Pourraient même être envisagé des schémas d'escalade de dose lors de l'espacement des injections.

Finalement, des réponses auront été trouvées avec un transfert possible dans la pratique quotidienne mais des perspectives de recherche restent à envisager et cela encourage à poursuivre encore plus loin les travaux engagés.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. Kohler G and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *J Immunol* 1975; 174: 2453-5.
2. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1393-8.
3. Andersen DC and Reilly DE. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 456-62.
4. Congy-Jolivet N, Probst A, Watier H and Thibault G. Recombinant therapeutic monoclonal antibodies: mechanisms of action in relation to structural and functional duality. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64: 226-33.
5. Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 2000; 355: 735-40.
6. Gschwind A, Fischer OM and Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 361-70.
7. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183-232.
8. Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1S-13S.
9. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 637-43.
10. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY and Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6 : 876-85.
11. Nishinaka T and Yabe-Nishimura C. EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 205-16.
12. Vivanco I and Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501.
13. Bowman T, Garcia R, Turkson J and Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 2474-88.
14. Harding J and Burtress B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)* 2005; 41: 107-27.
15. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK and Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 331S-6S.
16. Bibeau F, Lopez-Capez E, Di Fiore F, et al. Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1122-29.

17. Geva R, Vecchione L, Kalogeras KT, et al. FGFR polymorphisms and cetuximab efficacy in chemorefractory metastatic colorectal cancer: an international consortium study. *Gut* 2015; 64: 921-8.
18. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354: 567-78.
19. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 2010; 11: 21-8.
20. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1116-27.
21. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-45.
22. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 663-71.
23. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011; 22: 1535-46.
24. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 1408-17.
25. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2011-9.
26. Perkins G, Lievre A, Ramacci C, Meatchi T, et al. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 1321-31.
27. Weber A, Langhanki L, Sommerer F et al. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene* 2003; 30: 4757-9.
28. Bissada E, Abboud O, Abou Chakra Z et al. Prevalence of K-RAS codons 12 and 13 mutations in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma and impact on clinical outcomes. *Int J Otolaryngol* 2013; 2013: 1-6.
29. Maubec E, Petrow P, Scheer-Senyarich I, et al. Phase II Study of Cetuximab As First-Line Single-Drug Therapy in Patients With Unresectable Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3419-26.

30. Palmer JD, Strasser J, Hanlon A, et al. Bioradiotherapy for head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: abstr 6038.
31. Male D, Brostoff J, Roth DB and Roitt I. Immunology. 7th Edition, ed.^eds. by Editor 2006.
32. Kelley M and DeSilva B. Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. *Aaps J* 2007; 9: E156-63.
33. Stubenrauch K, Wessels U, Vogel R and Schleyen J. Evaluation of a biosensor immunoassay for simultaneous characterization of isotype and binding region of human anti-tocilizumab antibodies with control by surrogate standards. *Anal Biochem* 2009; 390: 189-96.
34. Engvall E and Perlmann P. 'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871-4.
35. Damen CW, Schellens JH and Beijnen JH. Bioanalytical methods for the quantification of therapeutic monoclonal antibodies and their application in clinical pharmacokinetic studies. *Hum Antibodies* 2009; 18: 47-73.
36. Ceze N, Ternant D, Piller F, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of cetuximab. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 597-601.
37. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, et al. The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 579-628.
38. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) and Common Toxicity Criteria (CTC) du NCI version 4 (2010) disponible à partir de URL : http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm].
39. Hwang WY, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 2005; 36: 3-10.
40. Jakobovits A, Amado RG, Yang X, Roskos L and Schwab G. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1134-43.
41. Chung CH. Managing premedications and the risk for reactions to infusional monoclonal antibody therapy. *Oncologist* 2008; 13: 725-32.
42. Cmelak AJ, Lordick F, Borner M, Goldberg RM and Saif MW. Management of infusion reactions in clinical trials and beyond: the US and EU perspectives. *Oncology* 2009; 23: 18-25.
43. Cook-Bruns N. Retrospective analysis of the safety of Herceptin immunotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* 2001; 61: 58-66.
44. Daguet A, Watier H. 2nd Charles Richet et Jules Hericourt Workshop: Therapeutic antibodies and anaphylaxis. *MAbs* 2011; 3: 417-21.

45. O'Neil BH, Allen R, Spigel DR et al. High incidence of cetuximab-related infusion reactions in Tennessee and North Carolina and the association with atopic history. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3644-8.
46. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-8.
47. Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S et al. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4914-21.
48. Burtness B, Goldwasser MA, Flood W et al. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8646-54.
49. Rosell R, Robinet G, Szczesna A et al. Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2008; 19: 362-9.
50. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL et al. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4557-61.
51. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2311-9.
52. Foley KA, Wang PF, Barber BL et al. Clinical and economic impact of infusion reactions in patients with colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2010; 21: 1455-61.
53. George TJ, Jr., Laplant KD, Walden EO et al. Managing cetuximab hypersensitivity-infusion reactions: incidence, risk factors, prevention, and retreatment. *J Support Oncol* 2010; 8: 72-7.
54. Grandvillemin A, Disson-Dautriche A, Miremont-Salamé G, et al. Cetuximab infusion reactions: French pharmacovigilance database analysis. *J Oncol Pharm Pract* 2012; 19:130-7.
55. Commins SP, Satinover SM, Hosen J, et al. Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 426-33.
56. Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1369-73.

57. Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 17755-62.
58. Galili U, Swanson K. Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7401-4.
59. Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti-alphagalactosyl specificity. *J Exp Med* 1984; 160: 1519-31.
60. Galili U, Macher BA, Buehler J, Shohet SB. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1----3)-linked galactose residues. *J Exp Med* 1985; 162: 573-82.
61. Galili U, Buehler J, Shohet SB, Macher BA. The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J Exp Med* 1987; 165: 693-704.
62. Jansson PE, Lindberg B, Widmalm G, Leontine K. Structural studies of the *Escherichia coli* O78 O-antigen polysaccharide. *Carbohydr Res* 1987; 165: 87-92.
63. Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffiss JM. Interaction between human natural antialpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 1988; 56: 1730-7.
64. Springer GF, Horton RE. Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria. *J Clin Invest* 1969; 48: 1280-91.
65. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IF. Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 11391-5.
66. Hamadeh RM, Galili U, Zhou P, Griffiss JM. Anti-alpha-galactosyl immunoglobulin A (IgA), IgG, and IgM in human secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 125-31.
67. Chung CH, Mirakhur B, Chan E et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 2008; 358: 1109-17.
68. Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 1993; 14: 480-2.
69. Commins SP, James HR, Kelly LA et al. The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1286-93.
70. Van Nunen SA, O'Connor KS, Clarke LR et al. An association between tick bite reactions and red meat allergy in humans. *Med J Aust* 2009; 190: 510-1.

71. Hansen NL, Chandiramani DV, Morse MA et al. Incidence and predictors of cetuximab hypersensitivity reactions in a North Carolina academic medical center. *J Oncol Pharm Pract* 2011; 17: 125-30.
72. Sutton BJ and Phillips DC. The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G. *Biochem Soc Trans* 1983; 11: 130-2.
73. Deisenhofer J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-A resolution. *Biochemistry* 1981; 20: 2361-70.
74. Youings A, Chang SC, Dwek RA and Scragg IG. Site-specific glycosylation of human immunoglobulin G is altered in four rheumatoid arthritis patients. *Biochem J* 1996; 314: 621-30.
75. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog* 2005; 21: 11-6.
76. Kornfeld R and Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 631-64.
77. Endo T, Wright A, Morrison SL, Kobata A. Glycosylation of the variable region of immunoglobulin G—site specific maturation of the sugar chains. *Mol Immunol* 1995; 32: 931-40.
78. Qian J, Liu T, Yang L, Daus A, Crowley R and Zhou Q. Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Anal Biochem* 2007; 364: 8-18.
79. Satoh M, Iida S and Shitara K. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 1161-73.
80. Smith DF, Larsen RD, Mattox S, Lowe JB and Cummings RD. Transfer and expression of a murine UDPGal: beta-D-Gal-alpha 1,3-galactosyltransferase gene in transfected Chinese hamster ovary cells. Competition reactions between the alpha 1,3-galactosyltransferase and the endogenous alpha 2,3-sialyltransferase. *J Biol Chem* 1990; 265: 6225-34.
81. Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, et al. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 7819-22.
82. Tronconi MC, Sclafani F, Rimassa L et al. Fatal infusion reaction to cetuximab: the need for predictive risk factors and safer patient selection. *J Clin Oncol* 2011; 29: e680-1.
83. Pointreau Y, Commins SP, Calais G et al. Fatal infusion reactions to cetuximab: role of immunoglobulin e-mediated anaphylaxis. *J Clin Oncol* 2012; 30: 334.

84. Waqar SN TB, Zubal B, et al. Race and albuterol premedication are risk factors for hypersensitivity reactions to cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: abstract 20503.
85. Paintaud G. Pharmacokinetics (PK) of mAbs. *Med Sci (Paris)* 2009; 25: 1057-62.
86. Ternant D and Paintaud G. Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: S37-47.
87. Garg A and Balthasar JP. Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model to predict IgG tissue kinetics in wild-type and FcRn-knockout mice. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2007; 18: 18.
88. Morell A, Terry WD and Waldmann TA. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J Clin Invest* 1970; 49: 673-80.
89. Anderson CL, Chaudhury C, Kim J, Bronson CL, Wani MA and Mohanty S. Perspective--FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol* 2006; 27: 343-8.
90. Spiegelberg HL and Weigle WO. The Catabolism of Homologous and Heterologous 7s Gamma Globulin Fragments. *J Exp Med* 1965; 121: 323-38.
91. Brambell FW, Hemmings WA and Morris IG. A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature* 1964; 203: 1352-4.
92. Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 1989; 337: 184-7.
93. Israel EJ, Taylor S, Wu Z, et al. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology* 1997; 92: 69-74.
94. Kim KJ and Malik AB. Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: 247-59.
95. Telleman P and Junghans RP. The role of the Brambell receptor (FcRB) in liver: protection of endocytosed immunoglobulin G (IgG) from catabolism in hepatocytes rather than transport of IgG to bile. *Immunology* 2000; 100: 245-51.
96. Spiekermann GM, Finn PW, Ward ES, et al. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J Exp Med* 2002; 196: 303-10.
97. Popov S, Hubbard JG, Kim J, Ober B, Ghetie V and Ward ES. The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. *Mol Immunol* 1996; 33: 521-30.
98. Reff ME and Heard C. A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficacy in oncology applications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 40: 25-35.

99. Ober RJ, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J and Ward ES. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J Immunol* 2004; 172: 2021-9.
100. Ward ES, Zhou J, Ghetie V and Ober RJ. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int Immunol* 2003; 15: 187-95.
101. Ghetie V and Ward ES. FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. *Immunol Today* 1997; 18: 592-8.
102. Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, et al. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J Immunol* 2003; 170: 3528-33.
103. Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, Schoenfeld D and Simister NE. Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology* 1996; 89: 573-8.
104. Coffey GP, Stefanich E, Palmieri S, et al. In vitro internalization, intracellular transport, and clearance of an anti-CD11a antibody (Raptiva) by human T-cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 896-904.
105. Harding J and Burtness B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today* 2005; 41: 107-27.
106. Bonate PL. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation. ed. Springer 2006; pp. 387.
107. Yan X, Mager DE and Krzyzanski W. Selection between Michaelis-Menten and target-mediated drug disposition pharmacokinetic models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2009; 37: 25-47.
108. Grimm HP. Gaining insights into the consequences of target-mediated drug disposition of monoclonal antibodies using quasi-steady-state approximations. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2009; 36: 407-20.
109. Michaelis L and Menten ML. Kinetics on Invertase Action. *Biochem Z* 1913; 49: 333-69.
110. Mager DE and Jusko WJ. General pharmacokinetic model for drugs exhibiting target-mediated drug disposition. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001; 28: 507-32.
111. Sheiner LB, Rosenberg B and Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1977; 5: 445-79.
112. Davidian M and Giltinan D. Nonlinear models for repeated measurement data, ed.^eds. by Editor, Chapman & Hall/CRC, 1995.
113. Bonate PL. The effect of collinearity on parameter estimates in nonlinear mixed effect models. *Pharm Res* 1999; 16: 709-17.

114. Kowalski KG and Hutmacher MM. Efficient screening of covariates in population models using Wald's approximation to the likelihood ratio test. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001; 28: 253-75.
115. Cartron G and Rossi JF. Therapeutic monoclonal antibodies in onco-hematology. *Med Sci (Paris)* 2009; 25: 1085-9.
116. Dayde D, Ternant D, Ohresser M, et al. Tumor burden influences exposure and response to rituximab: pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling using a syngeneic bioluminescent murine model expressing human CD20. *Blood* 2009; 113: 3765-72.
117. Cartron G. Immunologic effects of anti-B-lymphocyte antibodies. *Rev Med Interne* 2005; 26: 42-6.
118. Bauer RJ, Dedrick RL, White ML, Murray MJ and Garovoy MR. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-CD11a antibody hu1124 in human subjects with psoriasis. *J Pharmacokinet Biopharm* 1999; 27: 397-420.
119. Mortensen DL, Walicke PA, Wang X, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple weekly subcutaneous efalizumab doses in patients with plaque psoriasis. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 286-98.
120. Ng CM, Joshi A, Dedrick RL, Garovoy MR and Bauer RJ. Pharmacokinetic-pharmacodynamic-efficacy analysis of efalizumab in patients with moderate to severe psoriasis. *Pharm Res* 2005; 22: 1088-100.
121. Iacona I, Lazzarino M, Avanzini MA, et al. Rituximab (IDE-C2B8): validation of a sensitive enzyme-linked immunoassay applied to a clinical pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 295-301.
122. Ng CM, Bruno R, Combs D and Davies B. Population pharmacokinetics of rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) in rheumatoid arthritis patients during a phase II clinical trial. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 792-801.
123. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 2188-95.
124. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, et al. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDE-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 1994; 84: 2457-66.
125. Miescher S, Spycher MO, Amstutz H, et al. A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the FcgammaRIIA and FcgammaIIIA genes. *Blood* 2004; 103: 4028-35.
126. Morris EC, Rebello P, Thomson KJ, et al. Pharmacokinetics of alemtuzumab used for in

- vivo and in vitro T-cell depletion in allogeneic transplantations: relevance for early adoptive immunotherapy and infectious complications. *Blood* 2003; 102: 404-6.
127. Oberneder R, Weckermann D, Ebner B, et al. A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2530-8.
128. Stephens S, Emtage S, Vetterlein O, et al. Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses. *Immunology* 1995; 85: 668-74.
129. Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, et al. Pharmacokinetics of cetuximab after administration of escalating single dosing and weekly fixed dosing in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6517-22.
130. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1451-9.
131. Mould DR and Sweeney KR. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies--mechanistic modeling applied to drug development. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2007; 10: 84-96.
132. Yan X, Mager DE and Krzyzanski W. Selection between Michaelis-Menten and target-mediated drug disposition pharmacokinetic models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2009; 37: 25-47.
133. Kloft C, Graefe EU, Tanswell P, et al. Population pharmacokinetics of sibrotuzumab, a novel therapeutic monoclonal antibody, in cancer patients. *Invest New Drugs* 2004; 22: 39-52.
134. Sharma A, Davis CB, Tobia LA, et al. Comparative pharmacodynamics of keliximab and clenoliximab in transgenic mice bearing human CD4. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 33-41.
135. Hayashi N, Tsukamoto Y, Sallas WM and Lowe PJ. A mechanism-based binding model for the population pharmacokinetics and pharmacodynamics of omalizumab. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 63: 548-61.
136. Bruno R, Washington CB, Lu JF, Lieberman G, Banken L and Klein P. Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2+ metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 361-9.
137. Dirks NL and Meibohm B. Population pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49: 633-59.

138. Wiseman GA, Kornmehl E, Leigh B, et al. Radiation dosimetry results and safety correlations from 90Y-ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: combined data from 4 clinical trials. *J Nucl Med* 2003; 44: 465-74.
139. Zhou H, Jang H, Fleischmann RM, et al. Pharmacokinetics and safety of golimumab, a fully human anti-TNF-alpha monoclonal antibody, in subjects with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 383-96.
140. Ternant D, Aubourg A, Magdelaine-Beuzelin C, et al. Infliximab pharmacokinetics in inflammatory bowel disease patients. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 523-9.
141. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Ford J, et al. Population pharmacokinetic analysis of infliximab in patients with ulcerative colitis. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65: 1211-28.
142. Tabernero J, Ciardiello F, Rivera F, et al. Cetuximab administered once every second week to patients with metastatic colorectal cancer: a two-part pharmacokinetic/pharmacodynamic phase I dose-escalation study. *Ann Oncol* 2010; 21: 1537-45.
143. Fracasso M, Burris H, Arquette MA, et al. A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 986-93.
144. Delbaldo C, Pierga JY, Dieras V, et al. Pharmacokinetic profile of cetuximab (Erbitux) alone and in combination with irinotecan in patients with advanced EGFR-positive adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1739-45.
145. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000; 18: 904-14.
146. Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, et al. Phase I study of anti--epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3234-43.
147. Dirks NL, Nolting A, Kovar A and Meibohm B. Population pharmacokinetics of cetuximab in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pharmacol* 2008; 48: 267-78.
148. Azzopardi N, Lecomte T, Ternant D, et al. Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6329-37.
149. Kuester K, Kovar A, Lupfert C, Brockhaus B and Kloft C. Refinement of the population pharmacokinetic model for the monoclonal antibody matuzumab: external model evaluation and simulations. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48: 477-87.

150. Kuester K, Kovar A, Lupfert C, Brockhaus B and Kloft C. Population pharmacokinetic data analysis of three phase I studies of matuzumab, a humanised anti-EGFR monoclonal antibody in clinical cancer development. *Br J Cancer* 2008; 98: 900-6.
151. Ma P, Yang BB, Wang YM, et al. Population pharmacokinetic analysis of panitumumab in patients with advanced solid tumors. *J Clin Pharmacol* 2009; 49: 1142-56.
152. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, et al. An Intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 92-8.
153. Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B, et al. Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 890-9.
154. Wolf G on behalf on The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group, Induction chemotherapy plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1685-90.
155. Richard JM, Sancho-Garnier H, Pessy JJ, et al. Randomized trial of induction chemotherapy in larynx carcinoma. *Oral Oncology* 1998; 34: 224-8.
156. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, et al. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000; 355: 949-55.
157. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 2091-8.
158. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *J Clin Oncol* 2012; 31: 845-52.
159. Pignon JP, le Maître A and Bourhis J. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analyses of Chemotherapy in Head and Neck Cancer (MACH-NC): an update. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69: S112-4.
160. Pignon JP, le Maître A, Maillard E, et al.; MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009; 92: 4-14.
161. Vermorken JB, Remenar E, Van Herpen C, et al. Cisplatin, Fluorouracil and Docetaxel in Unresectable Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 1695-704.

162. Posner MR, Hershock D, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 1705-15.
163. Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, et al. Randomized trial of induction chemotherapy with Cisplatin and 5-Fluorouracil with or without Docetaxel for larynx preservation. *J Nat Cancer Inst* 2009; 101: 498-506.
164. Schwartzberg LS, Stepanski EJ, Walker MS, Mathias S, Houts AC and Fortner BV. Implications of IV monoclonal antibody infusion reaction for the patient, caregiver, and practice: results of a multicenter study. *Support Care Cancer* 2009; 17: 91-8.
165. Jacquet S, Moneret-Vautrin DA and Bihain BE. Mammalian meat-induced anaphylaxis: clinical relevance of anti-galactose-alpha-1,3-galactose IgE confirmed by means of skin tests to cetuximab. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 603-5.
166. Mariotte D, Dupont B, Gervais R, et al. Anti-cetuximab IgE ELISA for identification of patients at a high risk of cetuximab-induced anaphylaxis. *MAbs* 2011; 3: 396-401.
167. Erwin EA, Custis NJ, Satinover SM, et al. Quantitative measurement of IgE antibodies to purified allergens using streptavidin linked to a high-capacity solid phase. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1029-35.
168. Sander I, Kesphol S, Merget R, et al. A new method to bind allergens for the measurement of specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136: 39-44.
169. DeSilva B, Smith W, Weiner R, et al. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm Res* 2003; 20: 1885-900.
170. Lavielle M and Mentre F. Estimation of population pharmacokinetic parameters of saquinavir in HIV patients with the MONOLIX software. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2007; 34: 229-49.
171. Panhard X and Samson A. Extension of the SAEM algorithm for nonlinear mixed models with 2 levels of random effects. *Biostatistics* 2009; 10: 121-35.
172. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. ed. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing 2011.
173. Bernier J, Bonner J, Vermorken JB, et al. Consensus guidelines for the management of radiation dermatitis and coexisting acne-like rash in patients receiving radiotherapy plus EGFR inhibitors for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* 2008; 19: 142-9.
174. Bernier J, Russi EG, Homey B, et al. Management of radiation dermatitis in patients receiving cetuximab and radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: proposals for a revised grading system and consensus management guidelines. *Ann Oncol* 2011; 22: 2191-200.

175. Shitara K, Yuki S, Yoshida M, et al. Phase II study of combination chemotherapy with biweekly cetuximab and irinotecan for wild-type KRAS metastatic colorectal cancer refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *Invest New Drugs* 2012; 30: 787-93.
176. Schoennemann KR, Bjerregaard JK, Hansen TP, et al. Biweekly cetuximab and irinotecan as second-line therapy in patients with gastro-esophageal cancer previously treated with platinum. *Gastric Cancer* 2011; 14: 219-25.
177. Kang MJ, Hong YS, Kim KP, et al. Biweekly cetuximab plus irinotecan as second-line chemotherapy for patients with irinotecan-refractory and KRAS wild-type metastatic colorectal cancer according to epidermal growth factor receptor expression status. *Invest New Drugs* 2012; 30: 1607-13.
178. Fernandez-Plana J, Pericay C, Quintero G, et al. Biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 in the first-line treatment of wild-type KRAS metastatic colorectal cancer: final results of a phase II, open-label, clinical trial (OPTIMIX-ACROSS Study). *BMC Cancer* 2014; 14: 865.
179. Pfeiffer P, Sorbye H, Qvortrup C, et al. Maintenance Therapy With Cetuximab Every Second Week in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: The NORDIC-7.5 Study by the Nordic Colorectal Cancer Biomodulation Group. *Clin Colorectal Cancer* 2015; 14: 170-6.
180. Guigay J, Fayette J, Dillies AF, et al. Cetuximab, docetaxel, and cisplatin as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a multicenter, phase II GORTEC study. *Ann Oncol* 2015; 26: 1941-7.
181. Wang W, Wang EQ and Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84: 548-58.
182. Peeters M, Siena S, Van Cutsem E, et al. Association of progression-free survival, overall survival, and patient-reported outcomes by skin toxicity and KRAS status in patients receiving panitumumab monotherapy. *Cancer* 2009; 115: 1544-54.
183. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label, phase 3 clinical trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1658-64.

6. PUBLICATIONS

Publications et manuscrits de la thèse

- I. Lefebvre JL, **Pointreau Y**, Rolland F, Alfonsi M, Baudoux A, Sire C, de Raucourt D, Malard O, Degardin M, Tuchais C, Blot E, Rives M, Reyt E, Tourani JM, Geoffrois L, Peyrade F, Guichard F, Chevalier D, Babin E, Lang P, Janot F, Calais G, Garaud P, Bardet E.

Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMLIN randomized phase II study.

J Clin Oncol 2013; 31: 853-9.

Induction Chemotherapy Followed by Either Chemoradiotherapy or Bioradiotherapy for Larynx Preservation: The TREMLIN Randomized Phase II Study

Jean Louis Lefebvre, Yoann Pointreau, Frederic Rolland, Marc Alfonsi, Alain Baudoux, Christian Sire, Dominique de Raucourt, Olivier Malard, Marian Degardin, Claude Tuchais, Emmanuel Blot, Michel Rives, Emile Reyt, Jean Marc Tourani, Lionel Geoffrois, Frederic Peyrade, Francois Guichard, Dominique Chevalier, Emmanuel Babin, Philippe Lang, Francois Janot, Gilles Calais, Pascal Garaud, and Etienne Bardet

See accompanying editorial doi: 10.1200/JCO.2012.45.8976

ABSTRACT

Purpose

To compare the efficacy and safety of induction chemotherapy (ICT) followed by chemoradiotherapy (CRT) or bioradiotherapy (BRT) for larynx preservation (LP).

Patients and Methods

Previously untreated patients with stage III to IV larynx/hypopharynx squamous cell carcinoma received three cycles of ICT—docetaxel and cisplatin 75 mg/m² each on day 1 and fluorouracil 750 mg/m² per day on days 1 through 5. Poor responders (< 50% response) underwent salvage surgery. Responders (≥ 50% response) were randomly assigned to conventional radiotherapy (RT; 70 Gy) with concurrent cisplatin 100 mg/m² per day on days 1, 22, and 43 of RT (arm A) or concurrent cetuximab 400 mg/m² loading dose and 250 mg/m² per week during RT (arm B). Primary end point was LP at 3 months. Secondary end points were larynx function preservation (LFP) and overall survival (OS) at 18 months.

Results

Of the 153 enrolled patients, 116 were randomly assigned after ICT (60, arm A; 56, arm B). Overall toxicity of both CRT and BRT was substantial following ICT. However, treatment compliance was higher in the BRT arm. In an intent-to-treat analysis, there was no significant difference in LP at 3 months between arms A and B (95% and 93%, respectively), LFP (87% and 82%, respectively), and OS at 18 months (92% and 89%, respectively). There were fewer local treatment failures in arm A than in arm B; salvage surgery was feasible in arm B only.

Conclusion

There is no evidence that one treatment was superior to the other or could improve the outcome reported with ICT followed by RT alone (French Groupe Oncologie Radiothérapie Tête et Cou [GORTEC] 2000-01 trial [Induction CT by Cisplatin, 5FU With or Without Docetaxel in Patients With T3 and T4 Larynx and Hypopharynx Carcinoma]). The protocol that can best compare with RT alone after ICT is still to be determined.

J Clin Oncol 31. © 2013 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Two main approaches to larynx preservation (LP) have been evaluated: induction chemotherapy (ICT) followed by radiotherapy (RT) in good responders to ICT and concurrent chemotherapy and RT (CRT). In Europe, and particularly in France, ICT-based protocols tend to be preferred to CRT unlike in the United States where CRT remains the standard for avoiding total laryngectomy (TL).¹ In

the ICT approach, only good responders have a chance of avoiding surgery, whereas in the CRT approach all patients do, but CRT is associated with substantial acute and late toxicities.

According to a meta-analysis of three randomized trials²⁻⁵ in patients with larynx or hypopharynx squamous cell carcinoma comparing TL with ICT followed by RT in good responders or TL alone in poor responders, ICT with cisplatin-fluorouracil (PF) did not jeopardize overall survival (OS); 56% of

the larynx was preserved. In a more recent study,⁶ a docetaxel-PF (TPF) regimen provided a significantly higher LP rate with no difference in OS compared with PF alone.

Two trials have assessed CRT for LP: A three-arm trial comparing CRT with PF-based ICT and with RT alone concluded that the LP rate was significantly higher in the CRT arm but that acute toxicity was also much higher.⁷ An update on this study⁸ concluded that laryngectomy-free survival was significantly better with either ICT or CRT compared with RT, with no difference between arms, but it found the rate of non-cancer-related deaths double in the CRT arm. The second trial⁹ compared PF-based ICT with alternating PF and RT and found no difference in LP, OS, or late toxicity between the two arms.

Finally, a randomized trial^{10,11} compared bioradiotherapy (BRT) using cetuximab with RT alone. Locoregional failure-free survival and OS were significantly higher in the BRT arm. Grade 3 to 4 mucositis/stomatitis or dysphagia were not increased but transient all-grade acne-like rash and infusion-related reactions were observed. These favorable results suggested that BRT might be an alternative to CRT.

In the view of a phase III trial challenging TPF-ICT followed by RT for LP, the randomized phase II TREMLIN trial (Radiotherapy With Cisplatin Versus Radiotherapy With Cetuximab After Induction Chemotherapy for Larynx Preservation) aimed to evaluate the tolerability of and compliance to a sequential approach (ICT followed by RT and systemic therapy) for LP and to assess whether the therapeutic index could vary between BRT and CRT after ICT in terms of LP and OS. GORTEC (Groupe Oncologie Radiotherapie de la Tête et du Cou) and GETTEC (Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou) had joint responsibility for this trial.

PATIENTS AND METHODS

Patient Eligibility and Ineligibility Criteria

Patients from 20 centers were enrolled onto the study. They had to have a previously untreated, measurable, and histologically proven squamous cell carcinoma of the larynx or hypopharynx (T2-T3, N0-resectable N3) suitable for TL. Eligibility criteria were age between 18 and 75 years, a good performance status (WHO 0 to 1), and no previous malignancy. The initial workup included a neck and chest computed tomography (CT) scan, endoscopy under general anesthesia (GA), and a full clinical and biologic evaluation documenting the absence of distant metastases, of a synchronous cancer, and of a contraindication to GA or cytotoxic medication (Fig 1).

Ineligibility criteria included highly infiltrative transglottic tumors, tumors extending through the cartilage, tumors resectable by partial laryngectomy or, on the contrary, requiring a circumferential total pharyngolaryngectomy, pretreatment tracheotomy, prior or present history of malignancy, a comorbidity or biologic disorder contraindicating GA, administration of docetaxel, cisplatin, or fluorouracil, or expected poor compliance with treatment. Eligible patients signed an informed consent form before being included in the trial.

Treatment and Follow-Up

Eligible patients received three cycles of TPF (docetaxel 75 mg/m² on day 1, cisplatin 75 mg/m² on day 1, and fluorouracil 750 mg/m² per day on days 1 through 5) at 3-week intervals. Premedication consisted of oral dexamethasone (8 mg twice a day from day -1 to day 2) and ciprofloxacin (500 mg twice a day from day 5 to day 15). Granulocyte colony-stimulating factor was not administered prophylactically and was given only in case of febrile neutropenia (150 µg/m² per day). Setrons were given before and after cisplatin, and hydration was delivered according to institutional protocols.

Two weeks after the third treatment cycle, the patients underwent an endoscopy under GA and a CT scan of the neck and chest. The study protocol

stipulated that only those patients who experienced at least 50% regression of their primary tumor volume and who recovered larynx mobility were eligible for random assignment. All randomly assigned patients received conventional external beam RT (one 2-Gy fraction per day 5 days per week for a total of 70 Gy). Those randomly assigned to arm A received three cycles of 100 mg/m² cisplatin per day on days 1, 22, and 43 of RT, and those randomly assigned to arm B received a loading dose of cetuximab 400 mg/m² on day 1 of the week preceding RT and thereafter a weekly dose of 250 mg/m² during RT. Patients who were not eligible for random assignment underwent immediate salvage TL.

In randomly assigned patients, an endoscopic evaluation was scheduled per protocol at post-treatment months 3 and 18 and in cases of suspected recurrence. A CT scan of the neck and chest was scheduled at 3 and 6 months post-treatment and thereafter every 6 months.

End Points

The primary end point was LP rate 3 months post-treatment (defined as the absence of any residual disease that would justify salvage TL). Secondary end points were larynx function preservation (LFP) at 18 months post-treatment (defined as a disease-free larynx in place, without tracheotomy or feeding tube), OS, tolerance to and compliance with treatment, and feasibility of salvage surgery, if indicated, and its efficacy at the last evaluation.

Statistics

The sample size rationale came from the GORTEC 2000-01 [Induction CT by Cisplatin, 5FU With or Without Docetaxel in Patients With T3 and T4 Larynx and Hypopharynx Carcinoma] trial database.⁶ Of the 110 patients randomly assigned in the TPF arm, four died during ICT. After TPF, 85 patients were responders and one died before RT for a total of 84 patients (76%) starting RT. After RT, six patients had residual/persistent disease, which corresponded to an immediate LP rate (larynx in place, free of disease) of 70%. Sample size and decision rules were based on a one-stage Fleming design with a 5% type I error and 90% power. For an expected 80% LP rate at 3 months post-treatment and a null hypothesis of 60%, 43 eligible patients were needed in each arm. If a 55% response rate in patients amenable to further chemotherapy could be expected after TPF, 156 patients had to be included to obtain these 86 eligible patients. Patients were randomly assigned to a treatment arm by a central office after post-ICT eligibility was established. No stratification was used. Survivals were calculated from randomization, and 95% CIs have been calculated for means and percentages. We used StatView 3.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA) and R v.2.10.1 software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.r-project.org/>) for our analyses.

RESULTS

Patient Characteristics and Treatment Received

From March 2006 to April 2008, 156 consecutive patients were screened for the study and 153 were enrolled. Two patients were excluded because of ineligibility and one was excluded because of a technical problem. All 153 included patients started ICT with TPF. Of these 153 patients, 113 (74%) underwent three cycles of treatment at the planned doses. The remaining 40 patients (26%) received fewer cycles and/or reduced doses because of toxicity. Four patients died during ICT (two from toxicity, one from intercurrent disease, and one from rapid disease progression). Apart from the two patients (1.6%) who died as a result of toxicity during ICT, 36 patients (23.5%) experienced some grade 3 to 4 toxicity, in particular, febrile neutropenia (n = 16) and renal toxicity (n = 4).

The dropout rate after ICT and before random assignment was substantial (24%; n = 37): four toxic deaths, 23 insufficient responses to ICT, and 10 exclusions. This was in line with the GORTEC 2000-01 trial. Of the 149 evaluable patients after ICT, 23 (15%) were poor responders and were offered immediate salvage surgery (seven refused

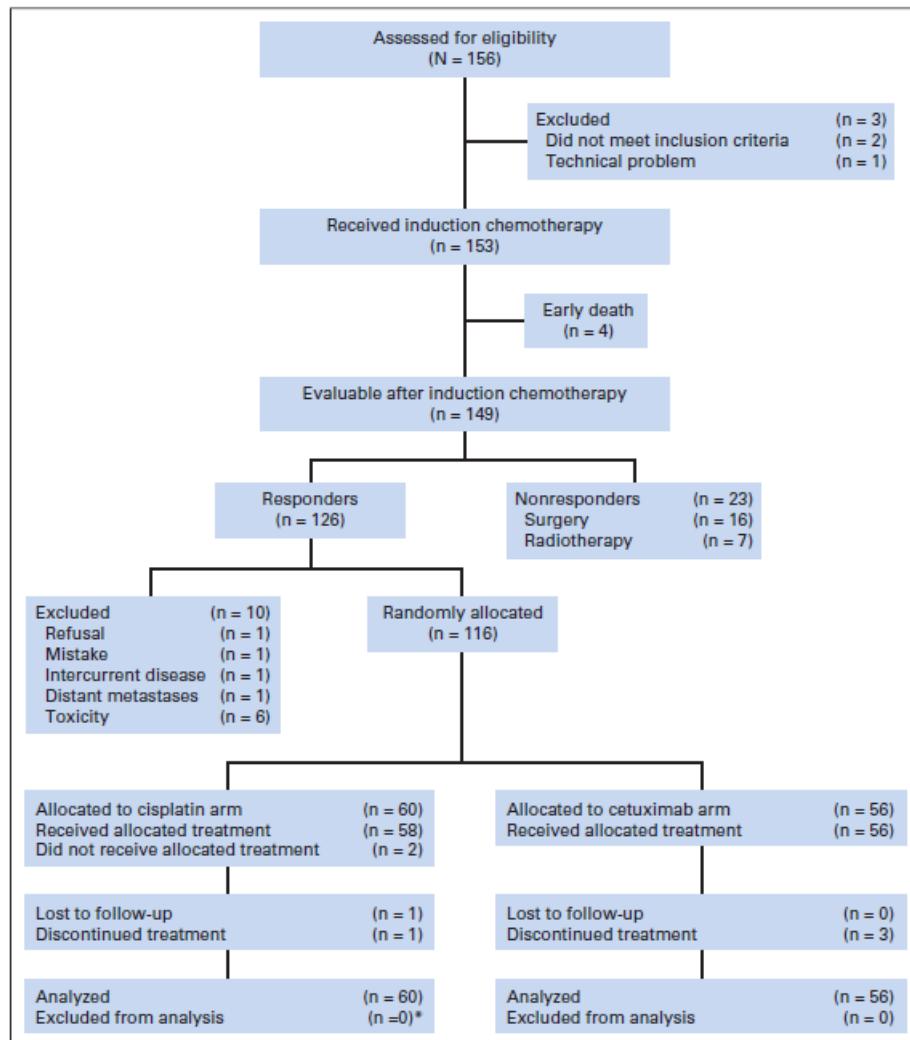


Fig 1. CONSORT diagram. (*) In the cisplatin arm, no patients were excluded from analysis for the end points, but two patients were excluded from the analysis for toxicity, given that they did not receive the treatment.

and underwent RT). Among the 126 responders, 10 (6%) were excluded, and 116 were randomly assigned to either cisplatin (n = 60) or cetuximab (n = 56). The two arms were well balanced except for sex (Table 1). The 10 exclusions were one patient refusal, one protocol violation (wrong regimen), one intercurrent disease, one metastatic progression, and six cases of toxicity precluding further cisplatin (ie, one colonic perforation, one severe sepsis, and four renal dysfunction). Of the four patients with renal dysfunction, two recovered near-normal function, one died rapidly of a second primary cancer without recovering normal function, and one with late-diagnosed pre-existing renal artery atrophy is currently being treated for tubular necrosis.

The toxicity prompted modification of the ICT protocol in 40 patients (26%), but the modification did not generate any imbalance in terms of ICT actually received. In the cisplatin arm, 59 patients received three cycles of TPF (49 at planned doses), and one patient received one TPF cycle at a reduced dose. In the cetuximab arm, all patients received three treatment cycles (49 at planned

doses). At randomization, clinical characteristics were similar in both arms (Table 2).

Toxicity and Treatment Compliance in Treated Patients

In the cisplatin arm, two patients did not start treatment (one refused treatment and one had rapid disease progression). The mean RT dose in the 58 treated patients was 69 Gy (range, 24 to 74 Gy); one patient developed rapid disease progression at 24 Gy and was withdrawn from the study. Twenty-five patients (42%) received three cycles of cisplatin, 25 received two cycles, and eight received one cycle only. In the cetuximab arm, all 56 patients started treatment at a mean RT dose of 69.5 Gy (range, 56 to 76 Gy) but received varying numbers of cetuximab cycles: seven cycles (n = 40; 71%), six cycles (n = 3), five cycles (n = 4), four cycles (n = 1), three cycles (n = 1), two cycles (n = 2), and one cycle (n = 2). Three patients experienced an infusion-related reaction at the beginning of the first infusion and did not complete a treatment cycle.

Table 1. Patient Characteristics at Random Assignment

Characteristic	Cisplatin		Cetuximab	
	No.	95% CI	No.	95% CI
No. of patients	60		56	
Sex				
Male	52		55	
Female	8		1	
Mean age, years	57.5	56 to 59	57.8	56 to 59.5
WHO performance status				
0	46		39	
1	13		17	
Missing data	1	—	—	
Primary tumor site				
Larynx	27		20	
Hypopharynx	33		36	
Disease stage at enrollment				
II	9		4	
III	35		30	
IVa	16		22	

Table 3. Acute Toxicity

Variable	Cisplatin		Cetuximab	
	No.	%	No.	%
No. of patients	58*		56	
Mucositis grade				
3	25	43	24	43
4	2	3	1	2
In-field skin toxicity grade				
3	14	24	29	52
4	1	2	3	5
Other toxicity, any grade, justifying protocol modification				
Renal	9	15.5	0	
Hematologic	8	14	0	
Poor performance	7	12	1	1.7
Infusion-related reaction	0	—	3	5
Protocol modification due to acute toxicity	33	57	19	34

*Two patients did not start treatment.

Substantial acute toxicity was observed during CRT and BRT (Table 3). There was no difference between arms in grade 3 to 4 mucositis, but more grade 3 to 4 in-field skin toxicity was observed in the BRT arm. Limiting acute toxicity warranted protocol modification in significantly more patients in the CRT arm than in the BRT arm (43% v 71% of patients received the full protocol, respectively). Except for renal toxicity (grade 1) in patients receiving cisplatin, late toxicity (occurring 6 months or later after end of treatment) did not differ significantly between the two arms (Table 4).

Disease Progression in the Intent-to-Treat Population

Treatment failures in the intent-to-treat population of 116 patients are given in Table 5. At 18 months, fewer local (with or without regional) failures were recorded in the cisplatin arm than in the cetuximab arm (five [8.3%] v eight [14.3%, respectively]. Seven patients underwent salvage surgery in the cetuximab arm and none in the cisplatin arm. The number of regional failures was the same ($n = 5$) in each arm.

At the last evaluation as of July 2011, after a median follow-up of 36 months (range, 0 to 58 months), fewer local failures (with or without regional failure) still persisted in the CRT arm. Regional failures or distant metastases were similar in the two arms (Table 5). One of the five patients with regional failure alone in the cisplatin arm at 18 months developed a local failure thereafter. A second primary tumor occurred in seven patients receiving cisplatin and in eight patients receiving cetuximab.

Salvage Surgery in Patients With Local and/or Regional Failure

Salvage TL is detailed in Table 5. At last evaluation, eight patients receiving cisplatin demonstrated local failure. One patient left the study and was lost to follow-up, one was suitable for salvage TL but disease control was not achieved, and six were considered unsuitable because of local extension ($n = 1$), local extension and radiation sequelae on tissue ($n = 1$), nodal extension ($n = 1$), concomitant bone metastases and poor performance status ($n = 1$), concomitant

Table 2. Clinical/Radiologic Findings at Random Assignment

Variable	Cisplatin	Cetuximab
No. of patients	60	56
Larynx mobility		
Normal	54	51
Impaired	5	5
Missing data	1	—
Response at primary tumor site		
Complete	41	36
Partial	19	20
Nodal status		
No palpable lymph node	49	42
Partial response	9	12
Stable disease	1	1
Progressive disease	1	—
Missing data	—	1

Table 4. Late Toxicity

Variable	Cisplatin		Cetuximab	
	No.	%	No.	%
No. of patients	58*		56	
Residual renal dysfunction at last examination (all grade 1)	13	22.4	0	
4 cycles	3			
5 cycles	5			
6 cycles	14			
Grade 3 to 4 toxicity				
Mucosal	2	3.5	1	1.8
Xerostomia	6	10.3	5	8.9
Subcutaneous fibrosis	4	7.0	1	2.0
Neuropathy	2	3.4	0	
Laryngoesophageal	5	8.6	5	9.0

*Two patients did not start treatment.

Table 5. Treatment Failures and Salvage Surgery

Variable	Patients 18 Months Post-Treatment				Patients at Last Evaluation*			
	Cisplatin		Cetuximab		Cisplatin		Cetuximab	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Local (with or without regional) failure	5†	8.3	8	14.3	8	13.3	12	21.4
Surgery feasible	0	5	7	8	1	8	9‡	12
Surgery successful					0	1	6	8
Ultimate local failure					8	13.3	6	10.7
Regional failure only	5	8.3	5	8.9	4	6.7	5	8.9
Surgery feasible					1	4	4	5
Surgery successful					0	1	1	4
Ultimate regional failure					4		4	
Distant metastases					5	8.3	3	5.4
Second primary cancer					7	11.7	8	14.3

*Median follow-up, 36 months; maximum follow-up, 58 months in each arm.

†One patient with uncontrolled disease lost to follow-up.

‡One patient refused all further treatment, including salvage surgery.

primary lung cancer and radiation sequelae on tissue ($n = 1$), and unspecified ($n = 1$). Twelve patients in the cetuximab arm demonstrated local failure. Ten patients were suitable for salvage TL, eight accepted (six were treated successfully with salvage TL), one refused, and one died of abdominal complications after a gastrostomy. Unsuitability was due to local extension in one patient and to an unspecified reason in another.

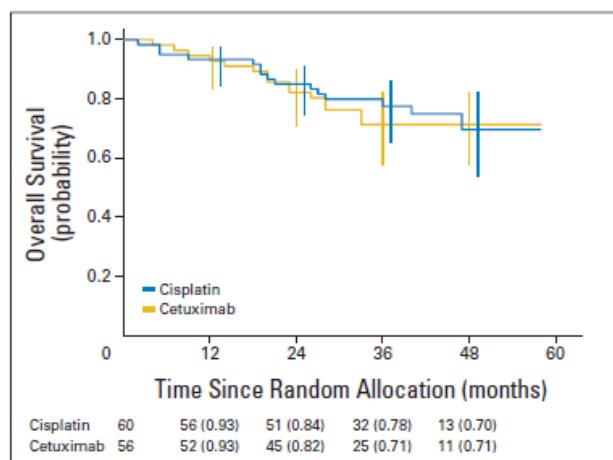
Four patients who received cisplatin and five patients who received cetuximab experienced failure of therapy to the neck. One patient who was given cisplatin and four patients given cetuximab underwent salvage neck dissection but control was achieved in only one patient given cetuximab. The contraindications to salvage surgery were nodal extension (two patients receiving cisplatin, one receiving cetuximab) and severe deterioration of performance status (one patient receiving cisplatin).

Despite a higher number of local failures in the cetuximab arm, after salvage surgery, the ultimate local failure rate (eight for cisplatin v six for cetuximab) seemed quite comparable in both arms at the last data assessment.

Organ Preservation, Function Preservation, and Survival in the Intent-to-Treat Population

End points were evaluated on the randomly assigned population only, which represented 76% of the patients included in the trial; thus, they are inflated. They were considered in an exploratory attempt to possibly selecting one arm for a phase III trial. Of course, no formal test can be made from these data. In addition, comparison to any published data from LP trials (LP rates or survival) is inappropriate because of selection bias.

There was no significant difference between the two arms for the primary end point (ie, LP rate at 3 months): 57 (95%) of 60 patients (95% CI, 86 to 98) for cisplatin versus 52 (93%) of 56 patients (95% CI, 83 to 97) for cetuximab. Taking into account the 24% dropout, the trial did not reach the expected 80%, and the immediate LP did not differ from the data from the previous GORTEC study if either CRT or BRT were considered.

**Fig 2.** Overall survival (intent to treat) for the subgroup of patients who were responding to induction chemotherapy.

There was no obvious difference in secondary end points at 18 months: LFP, 52 (87%; 95% CI, 76% to 93%) of 60 patients for cisplatin versus 46 (82%; 95% CI, 70% to 90%) of 56 patients for cetuximab and OS of 92% (95% CI, 82% to 96%) for cisplatin and 89% (95% CI, 79% to 95%) for cetuximab.

By July 2011, 30 of the 116 randomly assigned patients had died. Fifteen in each arm died with 10 of 15 dying as a result of disease progression. The remaining five patients given cisplatin died of a second primary tumor ($n = 2$), late toxicity ($n = 1$), intercurrent disease ($n = 1$), or an unknown cause ($n = 1$). The remaining five patients on cetuximab died of a second primary tumor ($n = 2$) or an unknown cause ($n = 3$).

OS did not differ between the two arms (Fig 2). It was 75% (95% CI, 62% to 85%) for cisplatin and 73% (95% CI, 60% to 84%) for cetuximab after a median follow-up of 36 months (maximum, 58 months) from the time of random assignment. A composite end point—laryngoesophageal dysfunction-free survival, which included death, local relapse, laryngectomy, tracheotomy, and/or feeding tube at 2 years or later—was introduced after the study was designed.^{12,13} No difference was detected in this end point between the two arms 2 years after random assignment: 79% (95% CI, 67% to 89%) for cisplatin versus 72% (95% CI, 65% to 88%) for cetuximab.

DISCUSSION

LP trials are conducted on the specific disease setting of patients with locally advanced larynx/hypopharynx cancer suitable for a TL but for whom an alternative to TL could reasonably be attempted. The larynx/hypopharynx organ is a complex anatomic entity. In particular, the sophisticated functions of the cricoarytenoid joints and pharyngeal muscles are necessary for good larynx function. Thus, acute and late toxicity may compromise the function of a preserved larynx. This explains why results from other clinical situations cannot be extrapolated to LP and the converse.

Although TPF-based ICT and CRT have been found to provide high LP rates, no study has been conducted so far in the LP

setting with ICT followed by CRT.^{6,14-16} The randomized phase II TREMLIN trial was designed to fill this gap. A key observation of our trial was that CRT or BRT was difficult to deliver after TPF-based ICT because of limiting acute toxicity, but compliance was higher with BRT. There were fewer local failures in the CRT arm, but successful salvage surgery was achieved in the BRT arm only. The ultimate disease control did not differ between arms, and there was no difference in OS.

Because the definition of LP in published trials varies from simply "larynx in place" to "larynx in place without tumor, without tracheotomy, and without feeding tube" at the time of evaluation, comparison with published results may be misleading. The highest LP rate has been reported for the CRT arm of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 91-11 trial.^{7,8} However, the accompanying toxicity was substantial as is also reported in another RTOG analysis^{7,8,17} that found a high rate of late toxicity, particularly with regard to laryngoesophageal function. Because of the lack of a standard definition for LP, we recently introduced a new composite end point—laryngoesophageal dysfunction-free survival—that reflects true patient benefit by taking organ preservation, function preservation, and survival into account.^{12,13} We found no difference between the two arms for this end point either.

The limitations of our study are that the randomized phase II design and the quite small number of patients in each arm that does not allow any solid comparison between arms. In addition, the unbalanced sex ratio (eight females in the CRT arm, one in the BRT arm) may have introduced a positive bias in favor of the CRT arm, because all randomly assigned female patients are alive with a long follow-up (≥ 29 months) and with a functional larynx; none have relapsed.

So far, both ICT and CRT have been validated for LP. In the TREMLIN trial, we found that TPF-based ICT followed by CRT or BRT was feasible but had substantial overall toxicity. In comparison with the trial comparing BRT to RT,¹⁰ a similar grade 3 to 4 mucositis rate and a higher grade 3 to 4 skin toxicity were observed. Residual effects of ICT cytotoxic agents on tissues might have affected tolerance to BRT. There was no obvious difference in any efficacy end point (LP, LFP, or OS) or a composite end point that included organ preservation, function, and survival.

When compared with the GORTEC 2000-01 trial, none of the arms provided better results. The TPF regimen followed by RT alone remains the reference arm, and its competitor is still to be determined. Further clinical research is therefore needed to assess the value of ICT, new ICT regimens, new RT techniques, and the place of biotherapies in these combined approaches for patients suitable for TL and for whom LP is attempted.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Although all authors completed the disclosure declaration, the following author(s) and/or an author's immediate family member(s) indicated a financial or other interest that is relevant to the subject matter under consideration in this article. Certain relationships marked with a "U" are those for which no compensation was received; those relationships marked with a "C" were compensated. For a detailed description of the disclosure categories, or for more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to the Author Disclosure Declaration and the Disclosures of Potential Conflicts of Interest section in Information for Contributors.

Employment or Leadership Position: Frederic Peyrade, Merck (C)

Consultant or Advisory Role: Jean Louis Lefebvre, Boehringer Ingelheim (C), Merck Serono (C), sanofi-aventis (C); Frederic Rolland, Bristol-Myers Squibb (C)

Stock Ownership: None

Honoraria: Jean Louis Lefebvre, Boehringer Ingelheim, Merck Serono, sanofi-aventis; Frederic Rolland, Merck Serono; Frederic Peyrade, Merck Serono

Research Funding: None

Expert Testimony: None

Remuneration: None

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: All authors

Provision of study materials or patients: Jean Louis Lefebvre, Yoann Pointreau, Frederic Rolland, Marc Alfonsi, Alain Baudoux, Christian Sire, Dominique de Raucourt, Olivier Malard, Marian Degardin, Claude Tuchais, Emmanuel Blot, Michel Rives, Emile Rey, Jean Marc Tourani, Lionel Geoffrois, Francois Guichard, Dominique Chevalier, Emmanuel Babin, Philippe Lang, Francois Janot, Gilles Calais, Etienne Bardet

Collection and assembly of data: Jean Louis Lefebvre, Yoann Pointreau, Michel Rives, Frederic Peyrade, Pascal Garaud, Etienne Bardet

Data analysis and interpretation: Jean Louis Lefebvre, Yoann Pointreau, Frederic Rolland, Pascal Garaud, Etienne Bardet

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

REFERENCES

1. American Society of Clinical Oncology, Pfister DG, Laurie SA, et al: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 24:3693-3704, 2006
2. [No authors listed]: Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer: The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *N Engl J Med* 324:1685-1690, 1991
3. Richard JM, Sancho-Garnier H, Pessey JJ, et al: Randomized trial of induction chemotherapy in larynx carcinoma. *Oral Oncol* 34:224-228, 1998
4. Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B, et al: Larynx preservation in pyriform sinus cancer: Preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial—EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst* 88:890-899, 1996
5. Pignon JP, Bourhis J, Domènec C, et al: Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: Three meta-analyses of updated individual data—MACHNC Collaborative Group, Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 355:949-955, 2000
6. Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, et al: Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. *J Natl Cancer Inst* 101:498-506, 2009
7. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, et al: Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 349:2091-2098, 2003
8. Forastiere AA, Maor M, Weber RS, et al: Long-term results of Intergroup RTOG 91-11: A phase III trial to preserve the larynx—Induction cisplatin/5-FU and radiation therapy versus concurrent cisplatin and radiation therapy versus radiation therapy. *J Clin Oncol* 24:284s, 2006 (suppl; abstr 5517)
9. Lefebvre JL, Rolland F, Tesselaar M, et al: Phase 3 randomized trial on larynx preservation comparing sequential vs alternating chemotherapy and radiotherapy. *J Natl Cancer Inst* 101:142-152, 2009
10. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-578, 2006
11. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomized trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11:21-28, 2010

- 12.** Lefebvre JL, Ang KK, Larynx Preservation Consensus Panel: Larynx preservation clinical trial design: Key issues and recommendations—A consensus panel summary. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 73:1293-1303, 2009
- 13.** Lefebvre JL, Ang KK, Larynx Preservation Consensus Panel: Larynx preservation clinical trial design: Key issues and recommendations—A consensus panel summary. *Head Neck* 31:429-441, 2009
- 14.** Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, et al: Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 357:1695-1704, 2007
- 15.** Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al: Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* 357:1705-1715, 2007
- 16.** Posner MR, Norris CM, Wirth LJ, et al: Sequential therapy for locally advanced larynx and hypopharynx cancer subgroup in TAX324: Survival, surgery, and organ preservation. *Ann Oncol* 20:921-927, 2009
- 17.** Machtay M, Moughan J, Trotti A, et al: Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: An RTOG analysis. *J Clin Oncol* 26:3582-3589, 2008

Affiliations

Jean Louis Lefebvre and Marian Degardin, Centre Oscar Lambret; Dominique Chevalier, Centre Hospitalier Universitaire Claude Huriez, Lille; Yoann Pointreau, Gilles Calais, and Pascal Garraud, Centre Hospitalier Universitaire Pierre Bretonneau, Tours; Frederic Rolland and Etienne Bardet, Institut de Cancerologie de l'Ouest Rene Gauducheau; Olivier Malard, Centre Hospitalier Universitaire Hotel Dieu, Nantes; Marc Alfonsi, Institut Sainte Catherine, Avignon; Christian Sire, Centre Hospitalier Bretagne Sud, Lorient; Dominique de Raucourt, Centre Francois Baclesse; Emmanuel Babin, Centre Hospitalier Universitaire Cote de Nacre, Caen; Claude Tuchais, Centre de Cancerologie de l'Ouest, Paul Papin, Angers; Emmanuel Blot, Centre Henri Becquerel, Rouen; Michel Rives, Centre Claudius Regaud, Toulouse; Emile Reyt, Centre Hospitalier Albert Michallon, Grenoble; Jean Marc Tourani, Centre Hospitalier Universitaire Jean Bernard, Poitiers; Lionel Geoffrois, Centre Alexis Vautrin, Nancy; Frederic Peyrade, Institut Universitaire de la Face et du Cou, Nice; Francois Guichard, Polyclinique de Bordeaux Nord, Bordeaux; Philippe Lang, Centre Hospitalier Universitaire Pitie Salpetriere, Paris; Francois Janot, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; and Alain Baudoux, Centre Medical Sainte Elisabeth, Namur, Belgium.

II. **Pointreau Y**, Commins SP, Calais G, Watier H, Platts-Mills TA.

Fatal infusion reactions to cetuximab: role of immunoglobulin e-mediated anaphylaxis.

Comment on “Fatal infusion reaction to cetuximab: the need for predictive risk factors and safer patient selection”.

J Clin Oncol 2012; 30: 334.

Fatal Infusion Reactions to Cetuximab: Role of Immunoglobulin E–Mediated Anaphylaxis

TO THE EDITOR: In *Journal of Clinical Oncology*, Tronconi et al¹ report a fatal hypersensitivity reaction to cetuximab in a 63-year-old patient with metastatic colon cancer and outlined a 0.1% incidence of death in the literature. We greatly acknowledge the authors' desire to communicate the risk of fatal anaphylactic reaction with cetuximab. Over the past 2 years in our center in Tours, France, four instances of grade 4 anaphylactic reactions occurred in patients treated for head and neck cancer (locally advanced or metastatic), with one immediately fatal; another patient died within 5 days (unpublished data). Seven lethal anaphylactic reactions were registered in a pharmacovigilance survey in France, based on spontaneous declarations (Grandvullemain et al, manuscript in preparation). Anaphylaxis to cetuximab is a problem that merits serious clinical attention.

In the authors' words, "the pathogenic mechanisms underlying the development of this phenomenon remain to be elucidated."¹ They raise the hypothesis of immunoglobulin E (IgE)–independent mechanisms, even in the context of a paradoxical atopic history. Moreover, Tronconi et al suggest that the field "search for reliable risk factors that can facilitate the safe selection of patients as candidates for cetuximab-based treatment."¹

These comments are quite surprising, because they do not integrate major contributions that have been previously published. Indeed, it has been known for 3 years that anaphylaxis to cetuximab is the result of antidirug IgE antibodies present in patient serum before therapy.² These IgE antibodies are directed against galactose- α -1,3-galactose (α 3Gal) residues, present in the Fab portion of this monoclonal antibody.³ Because humans do not express this glycan, anti- α 3Gal IgM and IgG antibodies spontaneously develop, whereas the appearance of IgE is only occasional. The observation that most of the patients developed reactions to cetuximab during their first infusion supports this hypothesis and is consistent with an IgE-mediated event. Environmental factors, such as bites by ectoparasitic ticks, probably explain the heterogeneous proportion of individuals displaying anti- α 3Gal IgE and the heterogeneous incidence of anaphylactic reactions to cetuximab among studies and geographic areas.^{2,4–6} History of atopy, age, race, additional therapy (ie, chemotherapy or radiotherapy), sex, and head and neck cancer (rather than colorectal cancer) have also been proposed as factors favoring anaphylaxis to cetuximab, but they remain controversial.^{2,4,5}

Therefore, instead of searching for reliable risk factors, it seems more straightforward to detect the presence of anti- α 3Gal IgE before treatment. Since the first studies, several academic groups and com-

panies around the world have developed such assays (Pointreau et al, manuscript in preparation),^{2,7} and the recent international congress held in Tours dedicated to anaphylaxis to cetuximab provided us with the opportunity to discuss this relevant strategy.⁸

Yoann Pointreau

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours; Université François-Rabelais de Tours; Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer, Tours, France

Scott P. Commins

Asthma and Allergic Diseases Center, University of Virginia, Charlottesville, VA

Gilles Calais

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours; Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

Hervé Watier

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours; Université François-Rabelais de Tours; Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer, Tours, France

Thomas A.E. Platts-Mills

Asthma and Allergic Diseases Center, University of Virginia, Charlottesville, VA

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. Tronconi MC, Sclafani F, Rimassa L, et al: Fatal infusion reaction to cetuximab: The need for predictive risk factors and safer patient selection. *J Clin Oncol* 29:e680–e681, 2011
2. Chung CH, Mirakhor B, Chan E, et al: Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 358:1109–1117, 2008
3. Magdelaine-Beuzelin C, Kaas Q, Wehbi V, et al: Structure-function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 64:210–225, 2007
4. O'Neil BH, Allen R, Spigel DR, et al: High incidence of cetuximab-related infusion reactions in Tennessee and North Carolina: Association with atopic history. *J Clin Oncol* 25:3644–3648, 2007
5. George TJ Jr, Laplant KD, Walden EO, et al: Managing cetuximab hypersensitivity-infusion reactions: Incidence, risk factors, prevention, and treatment. *J Support Oncol* 8:72–77, 2010
6. Commins SP, James HR, Kelly LA, et al: The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose- α -1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol* 127:1286–1293, 2011
7. Mariotte D, Dupont B, Gervais R, et al: Anti-cetuximab IgE ELISA for identification of patients at a high risk of cetuximab-induced anaphylaxis. *MAbs* 3:396–401, 2011
8. Daguet A, Watier H: 2nd Charles Richet et Jules Héricourt Workshop: Therapeutic antibodies and anaphylaxis; May 31–June 1, 2011, Tours, France. *MAbs* 3:417–421, 2011

DOI: 10.1200/JCO.2011.38.4701; published online ahead of print at www.jco.org on December 12, 2011

III. **Pointreau Y**, Fréneaux C, Bejan-Angoulvant T, Watier H.

Anticorps thérapeutiques et réactions à la perfusion : cas de l'anaphylaxie au cetuximab et facteurs prédictifs.

In: Médecine personnalisé en cancérologie digestive – Vers un traitement à la carte.

2013; 193-206. Springer-Verlag editors, Paris, France.

Anticorps thérapeutiques et réactions à la perfusion : cas de l'anaphylaxie au cétuximab et facteurs prédictifs

14

Y. Pointreau, C. Fréneaux, T. Bejan-Angoulvant et H. Watier

Introduction

La cancérologie digestive est une spécialité médicale où l'utilisation des anticorps monoclonaux à titre thérapeutique est désormais un standard. En utilisation clinique, le cétuximab, le bevacizumab, le trastuzumab et le panitumumab sont administrés soit en association à la chimiothérapie, soit en monothérapie selon les données des autorisations de mise sur le marché (AMM).

D'une manière générale, les anticorps monoclonaux peuvent être responsables de réactions à la perfusion ou d'hypersensibilité, définies par l'apparition d'une réaction clinique pendant ou dans l'heure suivant la fin de la perfusion. Ce terme est bien souvent imprécis et se résume souvent au terme de « choc ». Il regroupe la véritable réaction d'hypersensibilité de type I médiée par les IgE (anaphylaxie) mais également les réactions immunitaires de mécanisme moins précis encore appelées syndrome de libération de cytokines. L'anaphylaxie fait suite à l'introduction préalable dans l'organisme d'une substance étrangère provoquant la synthèse d'IgE puis, à l'occasion de la réintroduction de cette substance ou d'une subs-

Y. Pointreau* , C. Fréneaux, T. Bejan-Angoulvant*** et H. Watier******

*Centre Jean Bernard-Clinique Victor Hugo, 72000 Le Mans ; Service oncologie-radiothérapie, CHRU Bretonneau, Tours ; UMR 7292-CNRS Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer de l'Université François-Rabelais de Tours, 37020 Tours Cedex 1

E-mail : pointr_y@yahoo.fr

**Pharmacien biologiste, Centre Hospitalier, 78201 Mantes-la-Jolie ; ancienne interne en biologie, CHRU de Tours

***Service de pharmacologie clinique, CHRU de Tours, boulevard Tonnellé, 37000 Tours ; Université François Rabelais (UMR CNRS 7292)

****Service du laboratoire d'immunologie, CHRU, boulevard Tonnellé, 37000 Tours ; Professeur d'immunologie, Faculté de Médecine de Tours ; UMR CNRS 7292 ; coordinateur du Laboratoire d'excellence MAbImprove

Sous la direction de Olivier Bouché et Pierre Laurent-Puig, *Traitements personnalisés des cancers digestifs – Vers un traitement à la carte*.

ISBN : 978-2-8178-0426-2, © Springer-Verlag Paris 2013

193

tance proche, la libération de médiateurs vasoactifs puissants. Les réactions anaphylactoïdes ressemblent par définition aux réactions anaphylactiques sans que ne soit mis en évidence des IgE ; elles font probablement intervenir des médiateurs capables de faire dégranuler des mastocytes, comme les anaphylatoxines libérées secondairement par l'action du complément. Toutes ces réactions peuvent conduire au choc, c'est-à-dire à une insuffisance circulatoire aiguë qui retentit gravement sur la perfusion tissulaire en compromettant les échanges gazeux et énergétiques cellulaires, et qui nécessite une prise en charge en urgence. La gradation du choc se fait actuellement selon la classification internationale du National Cancer Institute (NCI), Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) and Common Toxicity Criteria (CTC) version 4.

Ce chapitre se centre sur le cétximab car c'est pour cet anticorps que les données sont les plus riches et la physiopathologie la mieux comprise ; il ne sera pas question du panitumumab ni du bevacizumab ou du trastuzumab.

Clinique et classifications internationales des réactions à la perfusion

Les manifestations cliniques entre un syndrome de libération de cytokines et un choc anaphylactique véritable se confondent parfois, rendant difficile l'interprétation ; les principales manifestations cliniques de ces deux entités sont résumées dans le tableau I.

Tableau I – Principales manifestations cliniques des réactions à la perfusion.

	Principales manifestations cliniques de réaction à la perfusion
Cardio-vasculaires	Douleur thoracique, palpitations, hypotension, tachycardie ou bradycardie, arythmie, œdème, ischémie, infarctus, arrêt cardiaque
Neurologiques	Céphalées, confusion, trouble de la conscience
Cutanéo-muqueuses	Rash, prurit, urticaire, flush, angioœdème, œdème conjonctival
Digestives	Nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales, ballonnements
Pulmonaires	Toux, dyspnée, congestion nasale, tachypnée, bronchospasme, sibilants, œdème laryngé, stridor, cyanose, syndrome de détresse respiratoire
Endocrinologiques	Sueurs, fièvre, impression de chaleur
Autres	Perte d'urine, fatigue, arthralgies, myalgies, anxiété, sensation de mort imminente

La gradation de la sévérité de ces symptômes se fait à l'aide de différentes classifications dont la plus utilisée est résumée dans le tableau II. La classification internationale de référence est celle du NCI (CTCAE-CTC) version 4 qui se résume à trois grades pour l'anaphylaxie et qui doit être employée, bien que très peu différente (tableau III) [1]. Cette même classification contient cinq grades pour le syndrome de libération de cytokines (tableau III).

Tableau II – Classification des réactions à la perfusion.

Grade I (légère)	Rougeur ou rash transitoires Fièvre induite < 38°C
Grade II (modérée)	Rougeur ou rash Urticaire Dyspnée Fièvre induite ≥ 38°C
Grade III (sévère)	Bronchospasme symptomatique avec ou sans urticaire Nécessité de médicaments par voie parentérale Œdème ou angioœdème allergique Hypotension
Grade IV (mettant en jeu le pronostic vital ou séquelles)	Anaphylaxie (choc)
Grade V (décès)	Décès

Tableau III – Classification de l'anaphylaxie et du syndrome de libération cytokinique selon le NCI-CTCAE version 4 [1].

	Syndrome de libération de cytokines	Anaphylaxie
Grade I	Réaction légère Ne nécessitant pas l'arrêt de la perfusion Ne nécessitant aucun traitement	Non classé
Grade II	Nécessitant un traitement ou une interruption de la perfusion mais avec une réponse rapide à un traitement symptomatique (ex. : antihistaminiques, AINS, morphiniques, remplissage intraveineux) Traitement prophylactique pendant moins de 24 heures	Non classé
Grade III	Prolongée (ex. : absence de réponse rapide au traitement symptomatique et/ou à une brève interruption de la perfusion) Réapparition des symptômes après amélioration initiale Nécessitant une hospitalisation en raison de conséquences cliniques (ex. : insuffisance rénale, infiltrats pulmonaires)	Bronchospasme symptomatique ; avec ou sans urticaire Nécessité d'un traitement parentéral Œdème ou angioœdème lié à l'allergie Hypotension
Grade IV	Mise en jeu du pronostic vital Nécessité d'une prise en charge en urgence	Mise en jeu du pronostic vital Nécessité d'une prise en charge en urgence
Grade V	Décès	Décès

Les caractéristiques de ces deux manifestations sont résumées dans le tableau IV.

Tableau IV – Caractéristiques des réactions à la perfusion.

	Syndrome de libération de cytokines	Anaphylaxie
Contact antérieur	Non	Oui ou inconnu
Incidence	Haute	Faible
Atopic	Non	Oui ou non
Facteurs de risque	Taille tumorale (en particulier cellules cibles circulantes)	Inconnue
Survenue	Première perfusion	Première perfusion ou suivantes
Délai	Plusieurs minutes	Immédiat
Pré-tests biologiques	Non	Parfois
Retraitements	Possible	Non

Physiopathologie

Les réactions anaphylactiques nécessitent conceptuellement un contact préalable avec un antigène, suivi d'une réponse immunitaire et de la production d'immunoglobuline E (IgE) dirigées contre cet antigène, et allant se fixer par leur portion Fc sur les polynucléaires basophiles circulants et les mastocytes dans les tissus. Lors d'un nouveau contact avec l'antigène, le pontage des IgE déjà présentes sur les basophiles et les mastocytes déclenche une dégranulation de ces dernières, libérant des médiateurs dont l'histamine et des enzymes (tryptase, hyaluronidase, chymase...) et activant la production de médiateurs néoformés, tels que des leucotriènes.

L'histamine est la principale responsable de la réaction anaphylactique, par stimulation de récepteurs H1 (bronchoconstriction, vasodilatation (libération des NO), perméabilité capillaire) et H2 (sécrétion gastrique et de mucus bronchique, péristaltisme intestinal, vasodilatation artérielle pulmonaire et coronaire, effets chronotropes et inotropes positifs).

Le cétximab est un anticorps monoclonal chimérique IgG1kappa, dirigé contre le récepteur du facteur épidermique de croissance ou EGF (*Epidermal Growth Factor*). Il est indiqué en cancérologie en France dans deux indications :

- traitement des patients ayant un cancer colo-rectal métastatique (gène KRAS de type sauvage), soit en association avec une chimiothérapie, soit en monothérapie après échec d'un traitement à base d'oxaliplatin et d'irinotécan ;
- traitement des patients ayant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou, en association soit avec la radiothérapie en cas de maladie localement avancée, soit avec la chimiothérapie à base de sels de platine en cas de maladie récidivante et/ou métastatique.

Des réactions allergiques de type hypersensibilité immédiate (HSI) ont été décrites avec des fréquences de 1 à 10 % chez les patients traités avec le cétuximab, dès la première injection [2], avec des fréquences encore plus élevées dans certaines zones géographiques aux États-Unis [3]. On sait depuis 2008 que ces réactions sont dues à la présence d'IgE chez les patients, préalablement à tout traitement [4]. Il ne peut donc pas s'agir d'une immunisation au cétuximab ; il s'agit d'une immunisation préexistante à divers allergènes, qui se retrouvent avoir des parentés antigéniques avec le cétuximab.

Qu'est-ce que le cétuximab a-t-il de si particulier pour déclencher un tel phénomène, jusqu'ici inédit parmi les anticorps thérapeutiques ? Les IgG (telles que le cétuximab) sont toujours des glycoprotéines ; elles possèdent en effet un site conservé de *N*-glycosylation au niveau de l'asparagine (Asn) 297 du domaine CH2 (portion Fc) [5, 6]. En outre, 15 à 20 % des IgG plasmatiques humaines normales possèdent en plus un ou plusieurs sites de *N*-glycosylation dans les domaines variables [7]. C'est aussi le cas du cétuximab qui, fait unique parmi les anticorps monoclonaux thérapeutiques, possède un site sur le domaine variable de la chaîne lourde (fig. 1), sur l'asparagine 97 [8-10].

Ce motif sucré est élaboré au cours de la biosynthèse du cétuximab, dans la lignée cellulaire qui le produit. Il s'agit de cellules Sp2/0, déri-

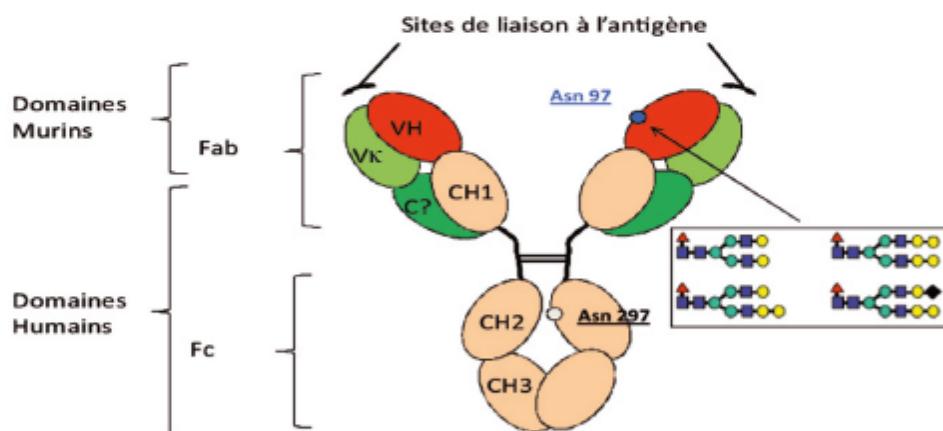


Fig. 1 – Structure et glycosylation du cétuximab. Les chaînes lourdes (H) sont représentées en rose-rouge, les chaînes légères (κ) en vert avec V : domaine variable et C : domaine constant. Les sites de *N*-glycosylation sont représentés en bleu et blanc. Le site de *N*-glycosylation situé sur le fragment Fc, sur l'Asn 297, porte des glycoformes habituelles chez l'homme, donc n'étant pas des cibles d'anticorps naturels. Le site de *N*-glycosylation situé sur le domaine VH, sur l'Asn 97, porte des glycoformes dont une grande proportion possède la séquence terminale Gal:3Gal- β 4GlcNAc (Gal:3Gal- β 4GlcNAc), qui est une cible d'anticorps naturel chez l'homme.

- Gal
- GalNAc
- Glc
- GlcNAc
- Man
- ▲ Fuc
- ◆ NGNA : symboles suggérés par le « Consortium of Functional Glycomics »

vant d'un myélome de souris. L'éloignement phylogénétique des espèces a entraîné des différences dans leurs équipements enzymatiques. Ainsi, les cellules murines, telles que les cellules Sp2/0 produisant le cétximab, vont exprimer des enzymes de la glycosylation différentes de celles des cellules humaines, contribuant à l'élaboration de chaînes osidiques différentes. Les cellules Sp2/0 expriment ainsi l'alpha1,3 galactosyltransférase (α 3GT), une enzyme absente chez l'homme et qui permet l'ajout au niveau terminal d'un résidu galactose selon une liaison α 1→3. Environ 30 % des glycannes présents sur le site Asn 97 du cétximab portent ainsi au niveau terminal la séquence oligosidique Gal α 3Gal β 4GlcNAc, appelée épitope α 3Gal, absente chez l'homme.

En accord avec le principe de Landsteiner « le système immunitaire produit des anticorps contre les antigènes qui ne nous appartiennent pas » et du fait d'un contact précoce avec cet antigène ubiquitaire, tous les êtres humains produisent des anticorps contre l'épitope α 3Gal. Ces anticorps appelés anti- α 3Gal sont les anticorps naturels les plus abondants chez l'homme, représentant environ 1 % des immunoglobulines du sérum humain [11-13].

Si l'existence d'IgE anti- α 3Gal n'a été révélée que récemment, « grâce » au cétximab d'ailleurs, les autres classes (IgG, IgM et IgA) d'anticorps anti- α 3Gal ont été très étudiées dans le cadre de la xénotransplantation porc-homme. En effet, l'interaction entre les anti- α 3Gal humains et l'épitope α 3Gal exprimé par les cellules porcines constitue la principale barrière immunologique dans ce type de greffe. Les IgM anti- α 3Gal activent le complément, conduisant à un rejet suraigu du greffon porcin. Même si l'activation du complément est inhibée, les IgG anti- α 3Gal vont tout de même se lier à l'épitope α 3Gal des cellules greffées et induire leur destruction via le mécanisme d'ADCC conduisant au rejet du greffon après quelques semaines ou quelques mois [14, 15]. La littérature relative à la xénotransplantation comporte donc de nombreuses publications relatives aux techniques de dosage des IgM, IgG et IgA anti- α 3Gal et aux techniques permettant d'épurer les sérums par adsorption des immunoglobulines.

La découverte des IgE anti- α 3Gal fait donc suite aux travaux publiés en 2008 par Chung *et al.* [4] qui ont mis en évidence que les réactions allergiques sévères au cétximab étaient dues à des IgE anti-cétximab séries préexistantes. Malheureusement, ces travaux restent méconnus de la part de nombreux cliniciens et le risque de choc peut en être sous-évalué ou redécouvert [16, 17]. En cherchant à déterminer contre quel épitope étaient dirigées ces IgE, Chung *et al.* ont découvert qu'il s'agissait d'IgE anti- α 3Gal présentes, comme les IgA anti- α 3Gal [18] seulement chez un nombre restreint de patients, à la différence des IgM et IgG anti- α 3Gal qu'on trouve chez tous les individus. Pour rechercher ces IgE dans le sérum, Chung *et al.* [4] ont utilisé une technique automatisée fondée sur le principe de l'ELISA. Ils ont pu montrer que les IgE anti-cétximab étaient dirigées contre la portion Fab du cétximab et, grâce à du cétximab produit dans des cellules CHO (cellules n'exprimant pas

α 1,3GT), qu'elles ne reconnaissaient pas les portions peptidiques du Fab, en particulier qu'il ne s'agissait pas d'IgE dirigées contre les portions murines (VH et VL) de cet anticorps chimérique. L'utilisation d'un oligoside Gal α 3Gal β 4GlcNAc, c'est-à-dire l'épitope α 3Gal leur a ensuite permis de doser directement les IgE anti- α 3Gal et de montrer que leur présence corrélait fortement ($r = 0,92$, $p < 0,001$) avec la présence d'IgE anti-cétuximab.

Les IgE spécifiques impliquées dans les réactions anaphylactiques au cétuximab sont donc dirigées contre un déterminant oligosidique, le galactose- α -1,3-galactose (alpha-Gal), présent sur la portion variable de la chaîne lourde du cétuximab. Ces réactions ont comme particularité de survenir lors de la première perfusion, habituellement pendant ou dans l'heure qui la suit du fait d'une pré-sensibilisation à l'épitope α 3Gal.

Épidémiologie et facteurs prédictifs

Des réactions sévères à la perfusion ont été retrouvées chez environ 3 % des patients traités par cétuximab pour un cancer colo-rectal [19, 20] et chez 2 à 7 % des patients traités pour un cancer ORL [21-23]. Le fabricant du cétuximab indique une incidence globale de 3 % pour les réactions sévères à la perfusion, avec moins de 0,1 % de réactions fatales. Diverses études mettent en évidence des incidences du même ordre ou inférieures :

- en Europe, une étude de phase II pour le traitement des cancers colo-rectaux menée sur 329 patients a mis en évidence 1,2 % de réactions de grade 3 ou 4 [24] ;
- aux États-Unis (États du Nord-Est et de la côte Ouest), une étude de phase II dans le traitement des cancers colo-rectaux menée sur 80 patients n'a mis en évidence aucune réaction de grade 3 ou 4 [25] ;
- une étude menée en Europe, en Australie et en Asie sur 800 patients suivis pour des cancers colo-rectaux, dont 400 traités par cétuximab, n'a mis en évidence que 0,5 % de réactions de grade 3 ou 4 dans le groupe cétuximab [26].

Certaines études estiment cependant que les hypersensibilités sévères au cétuximab sont sous-estimées. Dans une étude récente, Foley *et al.* [27] estimaient que le taux de réaction à la perfusion de cétuximab nécessitant une intervention médicale serait deux à trois fois plus élevé que celui indiqué par le fabricant. Malgré ces discordances sur l'incidence globale, plusieurs études s'accordent sur le fait que l'incidence des réactions au cétuximab aux États-Unis est très hétérogène en fonction des zones géographiques. Dans la plus grande partie du pays, l'incidence est comprise entre 1 % et 3 %, notamment, en Californie et à Boston. Dans les États du Sud-Est des États-Unis comme l'Arkansas, le Tennessee ou la Caroline du Nord l'incidence est, en revanche, beaucoup plus élevée

(entre 10 et 27 %) [28]. En 2006, O'Neil *et al.* ont étudié 88 patients traités par cétximab, 35 demeuraient en Caroline du Nord et 53 dans le Tennessee [3]. Sur ces 88 patients, 19 (22 %) ont présenté une réaction sévère (grade 3 à 4) à la première perfusion [3].

Quelques données d'incidence française sont disponibles et notamment par l'observatoire dédié au cancer Bretagne-Pays de la Loire qui a analysé les causes d'arrêt du cétximab dans deux cohortes de patients, hors essais thérapeutiques. Dans la première cohorte de 670 patients traités par cétximab en 2005 et 2006, 422 patients (63 %) ont dû arrêter le traitement dont 36 pour une toxicité, parmi lesquels 16 pour un choc/hypersensibilité/allergie, soit 2,4 % des patients traités. Une deuxième cohorte a inclus 1 700 patients traités par cétximab en 2009 et 2010 ; sur les 630 (37 %) causes d'arrêt connues, 74 l'ont été pour toxicités dont 24 chocs/hypersensibilité/allergie, soit 1,4 % des patients traités. Des incidences similaires de chocs ont été observées dans la région Centre.

En France, une étude rétrospective sur les réactions à la perfusion de cétximab a été menée à l'aide de la base de données de pharmacovigilance, fondées sur les déclarations spontanées [2]. Parmi les 602 cas sélectionnés, 374 réactions à la perfusion ont été retenus. Les facteurs de risques associés à l'anaphylaxie étaient l'indication (cancers ORL *versus* colo-rectaux : OR = 2,70 [1,62-4,49]), la période où s'est produite la réaction avec une tendance à l'augmentation depuis 2006, ce qui correspond sans doute à l'arrivée de l'AMM dans les cancers ORL, et le cycle en cours (premier *versus* les suivants : OR = 13,05 [8,05-21,15]).

O'Neil *et al.* [3] n'ont pas mis en évidence de corrélation entre réaction sévère à la perfusion et âge, sexe, race ou type de cancer. En revanche, ils ont mis en évidence une relation entre réactions graves d'hypersensibilité au cétximab et antécédents d'atopie : 29 % des patients avec des antécédents d'atopie ont présenté une réaction à la perfusion de grade 3 ou 4 contre 8 % de ceux sans antécédent d'atopie. Par ailleurs, toutes ces réactions sont survenues malgré une prémédication par antihistaminique H1 et corticoïdes.

Des facteurs environnementaux comme les morsures de tiques pourraient expliquer les disparités de fréquence des réactions d'HSI au cétximab selon certaines zones géographiques [3, 4, 29]. En questionnant les patients, une forte relation avec les morsures de tiques est apparue, plus de 90 % des patients de Virginie ayant des IgE anti- α 3Gal rapportant des piqûres de tiques ou d'aoutats. De plus, dans une étude australienne récente [31], une corrélation entre des réactions aux morsures de tiques et l'allergie à la viande rouge a été mise en évidence ; parmi les 25 patients étudiés qui présentaient des réactions allergiques à la viande, autre tableau clinique s'expliquant par la présence d'IgE anti- α 3Gal [30], presque tous décrivent des réactions locales importantes après morsure par des tiques. C'est donc la première hypothèse envisagée pour expliquer les cas aux États-Unis, même si les espèces de tiques ne sont pas les mêmes en Amérique et en Europe.

À l'heure actuelle, le mécanisme par lequel les morsures de tiques pourraient stimuler la synthèse des IgE anti- α 3Gal n'est pas élucidé. L'une des hypothèses pourrait être que la tique, lors de la morsure, inocule des

bactéries porteuses de la séquence Gal α 3Gal dans un contexte de morsure « allergisante », provoquant chez des atopiques la commutation des lymphocytes B producteurs d'IgM ou d'IgG anti- α 3Gal en lymphocytes B producteurs d'IgE anti- α 3Gal.

D'autres facteurs comme l'âge, le sexe, l'origine ethnique, des antécédents d'atopie, un cancer ORL ou des traitements concomitants (chimiothérapie ou radiothérapie) ont été proposés comme étant potentiellement favorisants de ce type de réactions, mais ils restent controversés [4, 28, 32].

Les cas d'anaphylaxie au cétuximab sortent donc du schéma classique de l'allergie puisqu'ils apparaissent lors de la première perfusion, en dehors de tout contact préalable avec l'allergène.

Prise en charge du choc et mesures de précautions

La clinique peut inclure des symptômes tels que bronchospasme, urticaire, élévation ou diminution de la pression artérielle, perte de conscience ou état de choc. Dans de rares cas, une angine de poitrine, un infarctus du myocarde ou un arrêt cardiaque ont été observés.

Le traitement est celui du choc à savoir l'arrêt de la perfusion (geste fondamental). S'y associent la libération des voies aériennes (intubation, ventilation), une oxygénothérapie et la mise en position de Trendelenbourg. Du point de vue des thérapeutiques, le recours à l'adrénaline injectable est indispensable combiné à un remplissage vasculaire (sérum physiologique) et éventuellement l'utilisation de corticoïdes et d'antihistaminique (bien que non démontré). Enfin, une surveillance est nécessaire pendant 12 à 24 heures en unité intensive compte tenu du risque de récidive.

La gravité potentielle de ces réactions d'HSI a induit un renforcement des règles de surveillance pendant les premières injections de cétuximab, sans que celles-ci ne soient à ce jour formalisées sous formes de recommandations. Ainsi, dans certains établissements, les patients sont hospitalisés pendant la nuit qui suit la perfusion. Il semble au minimum nécessaire de réaliser l'administration du cétuximab au cours d'une hospitalisation complète, avec présence médicale, protocole infirmier précis et chariot de réanimation. La récidive de choc anaphylactique est classique et un patient qui a présenté un choc doit être maintenu en service de réanimation pendant 24 à 48 heures. De plus, une réaction anaphylactique sera une contre-indication absolue à une réintroduction.

Perspectives et tests prédictifs

Plusieurs tests de dosage des IgE spécifiques anti- α Gal existent mais aucun n'est hélas actuellement validé.

Anticorps entier qui sert d'antigène

Une première technique a été publiée par une équipe française de Caen. Cette technique diffère des précédentes dans son principe car c'est l'anticorps entier qui sert d'antigène [33]. Ce test a été réalisé chez 92 patients avant l'injection de cétximab. Un échantillon de 117 donneurs de sang a été également testé. Les IgE ainsi détectées étaient aussi fréquemment présentes dans le sérum des donneurs de sang (population générale) que dans celui des patients (26 % *vs* 28 %). Les réactions d'hypersensibilité étaient observées chez 15 % des patients, mais la moitié seulement était de grade III ou IV (8,7 %). Ce test semble donc assez peu spécifique.

Oligosides α 3-galactosylés

Un deuxième test développé dans le service d'immunologie de Tours est réalisé en utilisant des oligosides α 3-galactosylés. Ce test n'est pas encore validé mais a été testé sur du sérum de 300 donneurs de sang puis sur 50 patients traités par cétximab (données non encore publiées). Dans la cohorte de 300 donneurs de sang, 18 personnes avaient un signal détectable en faveur de l'existence d'IgE anti- α Gal, soit 6 % de sérum considérés comme positifs. Davantage d'hommes que de femmes avaient un test positif (sex-ratio 5/1). Dans la cohorte des 50 patients, 6 patients ont présenté une réaction sévère au cours de la première injection de cétximab, dont 3 véritables chocs anaphylactiques et 3 ont eu des réactions aiguës dont 2 assimilées à un choc (2 chutes tensionnelles avec oppression thoracique, sibilants, tachycardie, désaturation, sueurs et érythème) et une éruption cutanée diffuse, soit 5 réactions anaphylactiques vraies parmi 50 testés (10 %). Les 6 patients avaient un signal fort détectable dans le sérum prétraitement en faveur de la présence d'IgE anti- α Gal. Il s'agissait, là encore, d'hommes. Six patients qui n'avaient pas présenté de réaction clinique avaient un signal faible dont 2 à la limite de la détection. Aucun patient sans IgE anti-alpha-Gal détectables par cette technique n'a fait de réaction au décours de l'injection du cétximab (pas de faux négatif).

Thyroglobuline de bœuf

Enfin, un troisième test utilisant comme antigène la thyroglobuline de bœuf, riche en résidus α 3Gal vient d'être proposé par la firme Phadia, essentiellement pour le diagnostic d'allergie à la viande. Ce test n'est pas validé en prédition de l'anaphylaxie au cétximab, mais pourrait être très intéressant car facilement mis en œuvre en routine de laboratoire.

Conclusion

Sans vouloir faire de jeu de mot, les cliniciens doivent être réellement sensibilisés au risque d'anaphylaxie lors de la perfusion de cétximab et les mesures nécessaires de réanimation doivent être à disposition. Il est maintenant établi que les réactions anaphylactiques sont dues à la présence d'IgE préexistantes dans le sérum des malades et qu'elles sont dirigées vers un motif sucré, le résidu α 3Gal.

Les perspectives de développement de tests biologiques prédictifs doivent être au cœur de nos préoccupations en termes de recherche translationnelle et devront faire l'objet d'une validation scientifique afin d'utiliser en toute sécurité cet anticorps en le contre-indiquant si nécessaire. L'avenir verra peut-être l'arrivée d'autres anticorps de même spécificité et efficacité que le cétximab, mais sans les inconvénients, ce que certains appellent déjà des « *biobetter* », car il ne pourra s'agir d'authentiques biosimilaires [2].

Références

1. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) and Common Toxicity Criteria (CTC) du NCI version 4 (2010) disponible à partir de URL : http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm.
2. Daguet A, Watier H (2011) 2nd Charles Richet et Jules Hericourt Workshop: Therapeutic antibodies and anaphylaxis; May 31-June 1, 2011, Touts, France. MAbs 3: 417-21
3. O'Neil BH, Allen R, Spigel DR *et al.* (2007) High incidence of cetuximab-related infusion reactions in Tennessee and North Carolina and the association with atopic history. J Clin Oncol 25: 3644-8
4. Chung CH, Mirakhur B, Chan E *et al.* (2008) Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. N Engl J Med 358: 1109-17
5. Sutton BJ, Phillips DC (1983) The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G. Biochem Soc Trans 11: 130-2
6. Deisenhofer J (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-A resolution. Biochemistry 20: 2361-70
7. Youings A, Chang SC, Dwek RA, Scragg IG (1996) Site-specific glycosylation of human immunoglobulin G is altered in four rheumatoid arthritis patients. Biochem J 314: 621-30
8. Jefferis R (2005) Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. Biotechnol Prog 21: 11-16
9. Magdelaine-Beuzelin C, Kaas Q, Wehbi V *et al.* (2007) Structure function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment. Crit Rev Oncol Hematol 64: 210-25
10. Qian J, Liu T, Yang L *et al.* (2007) Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. Anal Biochem 364: 8-18
11. Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I (1984) A unique natural human IgG antibody with anti-alphagalactosyl specificity. J Exp Med 160: 1519-31

12. Galili U, Macher BA, Buehler J, Shohet SB (1985) Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1---3)-linked galactose residues. *J Exp Med* 162: 573-82
13. Galili U, Buehler J, Shohet SB, Macher BA (1987) The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J Exp Med* 165: 693-704
14. Galili U (1993) Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 14: 480-2
15. Watier H, Guillaumin JM, Piller F *et al.* (1996) Removal of terminal alpha-galactosyl residues from xenogeneic porcine endothelial cells. Decrease in complement-mediated cytotoxicity but persistence of IgG1-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transplantation* 62: 105-13
16. Tronconi MC, Sclafani F, Rimassa L *et al.* (2011) Fatal infusion reaction to cetuximab: the need for predictive risk factors and safer patient selection. *J Clin Oncol* 29: e680-1
17. Pointreau Y, Commins SP, Calais G *et al.* (2012) Fatal infusion reactions to cetuximab: role of immunoglobulin e-mediated anaphylaxis. *J Clin Oncol* 30: 334
18. Schaapherder AF, Daha MR, van der Woude FJ *et al.* (1993) IgM, IgG, and IgA antibodies in human sera directed against porcine islets of Langerhans. *Transplantation* 56: 1576-9
19. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ *et al.* (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colo-rectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22: 1201-8
20. Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S *et al.* (2006) Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colo-rectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 24: 4914-21
21. Bonner JA, Harari PM, Giralt J *et al.* (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354: 567-78
22. Burtress B, Goldwasser MA, Flood W *et al.* (2005) Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 23: 8646-54
23. Rosell R, Robinet G, Szczesna A *et al.* (2008) Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 19: 362-9
24. Cunningham D, Humblet Y, Siena S *et al.* (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colo-rectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337-45
25. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL *et al.* (2007) Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colo-rectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol* 25: 4557-61
26. Abubakr Y, Eng C, Pautret V *et al.* (2006) Cetuximab plus irinotecan for metastatic colo-rectal cancer (mCRC): Safety analysis of 800 patients in a randomized phase III trial (EPIC). *J Clin Oncol* 24 (suppl 18s): abstr 3556
27. Foley KA, Wang PF, Barber BL *et al.* (2010) Clinical and economic impact of infusion reactions in patients with colo-rectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 21: 1455-61
28. George TJ, Jr., Laplant KD, Walden EO *et al.* (2010) Managing cetuximab hypersensitivity-infusion reactions: incidence, risk factors, prevention, and retreatment. *J Support Oncol* 8: 72-7
29. Commins SP, James HR, Kelly LA *et al.* (2011) The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol* 127: 1286-93 e6

30. Van Nunen SA, O'Connor KS, Clarke LR *et al.* (2009) An association between tick bite reactions and red meat allergy in humans. *Med J Aust* 190: 510-1
31. Jacquet S, Moneret-Vautrin DA, Bihain BE (2009) Mammalian meat-induced anaphylaxis: clinical relevance of anti-galactose-alpha-1,3-galactose IgE confirmed by means of skin tests to cetuximab. *J Allergy Clin Immunol* 124: 603-5
32. Hansen NL, Chandiramani DV, Morse MA *et al.* (2011) Incidence and predictors of cetuximab hypersensitivity reactions in a North Carolina academic medical center. *J Oncol Pharm Pract* 17: 125-30
33. Mariotte D, Dupont B, Gervais R *et al.* (2011) Anti-cetuximab IgE ELISA for identification of patients at a high risk of cetuximab-induced anaphylaxis. *MAbs* 3: 396-401

IV. **Pointreau Y**, Azzopardi N, Ternant D, Calais G, Paintaud G.

Cetuximab pharmacokinetics influences overall survival in head and neck cancer patients.

Manuscrit soumis

Title page

Cetuximab pharmacokinetics influences overall survival in head and neck cancer patients

Yoann Pointreau M.D^{a, b}, Nicolas Azzopardi Ph.D^a, David Ternant M.D, Ph.D^{a, c}, Gilles Calais M.D, Ph.D^b, Gilles Paintaud M.D, Ph.D^{a, c}

^a Université François-Rabelais de Tours, CNRS, GICC UMR 7292, Tours, France

^b CHRU de Tours, Service de Radiothérapie, Tours, France

^c CHRU de Tours, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie

Correspondence: Yoann Pointreau, MD, Department of Radiotherapy 2 Boulevard Tonnellé, 37044 TOURS Cedex 9, FRANCE.

Phone: +33(0) 247 478 265 - Fax: +33(0) 247 476 012 - e-mail: pointr_y@yahoo.fr

Conflict of interest

The authors declared that they have no conflict of interest regarding this paper.

Concise title: Cetuximab pharmacokinetics and survivals in head and neck cancer

Abstract characters count: 1628/2000

Manuscript word count: 2357

References: 27

Figures: 3

Tables: 3

Abstract and Key words

Purpose: A retrospective study was conducted to analyze interindividual variability of cetuximab pharmacokinetics and its influence on survival (Progression Free Survival – PFS and overall survival - OS) in a cohort of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

Methods: **Thirty-four** patients received cetuximab as an infusion loading dose of 400 mg/m^2 followed by weekly infusions of 250 mg/m^2 . Twenty-one patients had locally advanced HNSCC (LAHNSCC) and thirteen had metastatic/recurrent HNSCC (MHNSCC). Cetuximab concentrations were measured by ELISA and its pharmacokinetics was analyzed by a population approach. Survivals were analyzed with the log-rank test.

Results: Cetuximab pharmacokinetics was best described using a two-compartment model with both first-order and saturable (zero order) eliminations. Estimated pharmacokinetic parameters (%CV) were: central volume of distribution $V_1 = 3.18 \text{ L}$ (6%), peripheral volume of distribution $V_2 = 5.4 \text{ L}$ (42%), elimination clearance $CL = 0.57 \text{ L/day}$ (31%), distribution clearance $Q = 0.64 \text{ L/day}$ and zero order elimination rate $k_0 = 6.72 \text{ mg/day}$ (29%). Both V_1 and V_2 increased with body surface area. Adjunction of chemotherapy reduced CL and increased k_0 . Overall survival was inversely related with cetuximab global clearance ($p = 0.007$) and was higher in patients with severe radiation dermatitis ($p = 0.005$).

Conclusions: Cetuximab pharmacokinetics in HNSCC patients can be described using a two compartment model combining linear and nonlinear mechanisms of elimination. Overall survival is associated with both cetuximab global clearance and severe radiation dermatitis.

Key words: head and neck cancer, cetuximab, pharmacokinetics, toxicity, survival analysis.

Introduction

Cetuximab is a chimeric human-mouse immunoglobulin G1 kappa monoclonal antibody directed against the extracellular ligand-binding domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). It is approved in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in association with radiotherapy [1, 2] and in recurrent or metastatic HNSCC in association with chemotherapy [3]. It is also approved in metastatic colorectal cancer alone or in combination with chemotherapy regarding RAS mutations [4-10]. Adjunction of cetuximab for the treatment of these cancers improves overall survival (OS) and/or progression free survival (PFS) [1-3].

Part of the interindividual variability in response to cetuximab may be explained by the interindividual variability in its pharmacokinetics, as reported for all monoclonal antibodies [11, 12]. Fracasso *et al.* observed, in patients treated for different types of carcinomas, that responders had higher trough cetuximab serum concentrations than non-responders [13]. The first population pharmacokinetic study of cetuximab was reported by Dirks *et al.* in HNSCC patients [14]. The authors described all cetuximab elimination as nonlinear, using a Michaelis–Menten type equation. Non parametric analyses of cetuximab pharmacokinetics were also reported [15, 16] but this approach does not allow an analysis of sources of interindividual variability. In metastatic colorectal cancer, cetuximab pharmacokinetics was described using a model combining linear and nonlinear eliminations [17] and its global clearance was found to be negatively related to PFS. Another predictive factor is the occurrence of dermatological adverse side effects. Relationships between skin toxicity (rash or folliculitis) of anti-EGFR monoclonal antibody and cancer response or patient survival were indeed reported [2].

The aims of the present study were to analyze both cetuximab pharmacokinetics and cetuximab skin toxicity as predictors of survival in a cohort of HNSCC patients treated by this monoclonal antibody alone or combined with radiotherapy and/or chemotherapy.

Materials and Methods

Patients and treatments

A total of 34 consecutive patients with histologically confirmed stage II to IV HNSCC treated with cetuximab were retrospectively analyzed. Patients had locally advanced HNSCC (LAHNSCC, N = 21) or metastatic/recurrent HNSCC (MHNSCC, N = 13). Cetuximab was given at a loading dose of 400 mg/m² followed by weekly infusions of 250 mg/m². It was combined with radiotherapy (N = 21, plus chemotherapy for one patient), with platinum-based chemotherapy (N = 10) or was administered alone (N = 3).

Cetuximab concentration measurements

As part of routine monitoring of patients treated for HNSCC, blood samples were collected to measure cetuximab serum concentrations [13, 17-18]. Individual results were sent to the prescriber within the framework of a routine therapeutic drug monitoring service and were discussed during clinical interdisciplinary rounds. At each infusion, blood samples were collected to measure cetuximab serum concentrations before and 2 hours after the end of the infusion. Cetuximab serum concentrations were measured using a validated ELISA [18].

Cetuximab pharmacokinetic analysis

Cetuximab serum concentrations were analyzed by population pharmacokinetic approach using the nonlinear mixed-effect modeling software MONOLIX 4.3.2 [19, 20]. One and two-compartment models with first-order and/or saturable elimination from the central compartment were tested. To describe the saturable component of the elimination of cetuximab, two

approaches were compared: a Michaelis-Menten equation with maximum elimination rate (V_{max}) and Michaelis-Menten constant (K_m), and a simple zero-order elimination described by constant k_0 . The other pharmacokinetic parameters were central (V_1 , with concentration C_1) and peripheral (V_2 , with concentration C_2) volumes of distribution, and systemic (CL) and distribution (Q) clearances. The final model included random effects for all pharmacokinetic parameters except Q . A proportional error model gave the best description of residuals.

Tested continuous covariates were: age (AGE), weight (WT), body surface area (BSA), approximated pretreatment volume ($4/3\pi \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot r_3$) and surface ($3 \cdot \text{volume}/4\pi$)^{1/3} of tumors based on measured disease dimensions. Continuous covariates (COV) were centered on their median value. Tested categorical covariates were: sex, treatment (chemotherapy or not). Radiotherapy was not tested because, except for one patient, patients who received radiotherapy did not receive chemotherapy. The covariate model was built using a stepwise forward addition/backward deletion modeling approach [21].

Because only time-independent prognostic factors can be included in a survival model and because our pharmacokinetic model combines concentration dependent and concentration independent elimination rates, we used a global pharmacokinetic parameter to quantify cetuximab elimination. Cumulative area under the cetuximab concentration versus time curve (cumulative AUC) at the time of the event (progression, death or censoring) was computed using estimated model parameters, as described previously [17]. Cetuximab global clearance at the time of the event was calculated by dividing cumulative cetuximab dose by cumulative AUC.

Clinical endpoints

Time to progression was calculated as the delay between the first day of cetuximab infusion and the first observation of disease progression or death from any cause. If a patient had not progressed or died, time to progression was censored at the time of last known follow-up visit.

Overall survival was defined as the time from first cetuximab infusion to death.

Toxicities (radiation dermatitis, mucositis and folliculitis) were graded for severity from grade 1 to 5, according to the CTCAE v4.02 scale [http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm]. Cetuximab-related toxicities were analyzed each week during radiotherapy in curative intent (and its potential impact) only in the LAHNSCC population (N = 21). To analyze the association of radiation dermatitis and mucositis toxicities with survival, low skin and mucositis toxicities were defined as grade 0 to 2 and severe as grade 3 to 4. To analyze the association of folliculitis toxicity with survival, low toxicities were defined as grade 0 to 1 and severe as grade 2 to 3.

Survival analysis

PFS and OS (and their 95% CI) were estimated using the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. The influence of potential prognostic factors on hazard ratios was tested using likelihood ratio with and without the prognostic factor. The following factors were tested: age, cetuximab global clearance (and its value below or above the median value), chemotherapy treatment, and cetuximab-related toxicities.

Results

Patients' description and toxicities

A total of 34 consecutive patients with HNSCC were analyzed (Table 1). Two patients were scored as stage II and the others as stages III or IV. All female patients were LAHNSCC. Cetuximab was administered alone to 3 patients, combined with radiotherapy to 21 patients

(median number of doses was seven during radiotherapy) and combined with chemotherapy alone to 10 patients (details treatments were reported in Table 1). Toxicities were reported in Table 2.

Cetuximab pharmacokinetic analysis

A total of 544 cetuximab serum concentrations (mean of 10 samples per patient; range 2-76) were available. The two-compartment model with both first and zero order eliminations gave better results than that with only Michaelis-Menten elimination. The model was able to describe the concentrations of cetuximab satisfactorily. Estimated pharmacokinetic parameters are displayed in Table 3. Volumes of distribution of the central (V_1) and the peripheral (V_2) compartments increased with BSA. First-order elimination (CL) of cetuximab was 1.6 times lower and saturated elimination rate (k_0) was 3.3 times higher in patients co-treated by chemotherapy.

Other tested covariates did not significantly influence cetuximab pharmacokinetics.

Progression-free survival and Overall survival analysis

Median PFS of the overall cohort of 34 patients was 11.56 months (95% CI: 6.18 to not reached (NR) months). The PFS of MHNSCC and LAHNSCC patients were not significantly different ($p = 0.09$, Log-rank test). In the overall cohort of 34 patients, PFS was longer in patients with cetuximab global clearance below the median value of 0.747 L/day (14.1 months, 95% CI: 7 to NR months) than in the other patients (11.6 months, 95% CI: 3.9 to NR months) ($p = 0.037$, Figure 1). The association between cutaneous toxicity and PFS was analyzed in the 21 LAHNSCC patients treated in curative intent with radiotherapy. Neither radiation dermatitis ($p = 0.251$) nor mucositis ($p = 0.857$) or folliculitis ($p = 0.242$) toxicities were significantly associated with PFS.

Median OS of the overall cohort of 34 patients was 12.4 months (95% CI: 9.3 to 22.1 months). The OS of MHNSCC and LAHNSCC patients were not significantly different ($p = 0.125$, Log-rank test). In the overall cohort of 34 patients, OS (Figure 2) was longer in patients with cetuximab global clearance below the median value (16.56 months, 95% CI: 12.35 to 55.7 months) than in the other patients (6.34 months, 95% CI: 3.88 to NR months) ($p = 0.007$). Patients with LAHNSCC who developed severe radiation dermatitis toxicity (grade more than 3) had a longer OS than the other patients ($p = 0.005$, Figure 3). No association was observed for mucositis ($p = 0.221$) or folliculitis ($p = 0.227$).

Discussion

To our knowledge, this is the first study reporting the influence of cetuximab pharmacokinetics on overall survival in HNSCC patients. Individual exposure to cetuximab was estimated by a population pharmacokinetic approach using a two-compartment model with both first-order and saturable (zero-order) elimination. Survival, as assessed by PFS and OS, was significantly associated with cetuximab global clearance.

A population pharmacokinetic study of cetuximab in HNSCC patients was previously reported by Dirks *et al.* [14]. The authors used a model describing all cetuximab elimination as nonlinear, using a Michaelis-Menten equation. More recently, cetuximab pharmacokinetics in metastatic colorectal cancer was described using a model combining linear and nonlinear eliminations. The saturable elimination of this two-compartment model was described by a zero-order constant k_0 [17]. Similarly to the latter study, we found that cetuximab pharmacokinetics was best described

using a two-compartment model with both first-order and saturable (zero-order) elimination. The elimination of plasma proteins, including IgG and albumin, occurs via intracellular catabolism, following fluid-phase endocytosis, a mechanism which is not saturable at physiological concentrations [22]. Antibodies also undergo receptor-mediated elimination after binding to their target antigen. This latter elimination is, by definition, capacity limited (saturable) because of finite availability of the target antigen. The structural model used in our cohort should therefore provide a more mechanistic description of cetuximab elimination than the other models tested, because it takes into account the different mechanisms of elimination and combines non saturable (first order) and saturable (zero-order) eliminations.

Individual factors were previously reported to influence the pharmacokinetics of cetuximab. Tan *et al.* reported a significant association between cetuximab clearance and both body surface area (BSA) and body weight [13]. Azzopardi *et al.* [17] observed an increase in V_1 , V_2 and k_0 with BSA and an inverse relationship between initial serum albumin concentration and the non-saturable component of cetuximab elimination (CL). In our cohort, we observed the expected influence of BSA on V_1 and V_2 , which justifies that cetuximab dose is adjusted to BSA. We could not test the association between serum albumin concentrations and cetuximab pharmacokinetics parameters. We report for the first time an influence of associated chemotherapy on both first-order elimination clearance (CL) and the saturated elimination rate (k_0) of cetuximab. Compared with patients treated by cetuximab monotherapy, CL was lower and k_0 was higher in patients receiving chemotherapy. The parameter k_0 , should quantify the saturated (specific) component of cetuximab elimination, related to its binding to EGFR. A hypothesis to explain this result on k_0 could be that patients receiving chemotherapy had a more severe disease and therefore more EGFR available for cetuximab binding. In addition, the destruction of cancer cells induced by chemotherapy may have led to an increased release of EGFR. In contrast, CL , which should quantify the first-order (non-specific) elimination of cetuximab, was lower in patients receiving chemotherapy.

Two previous studies have analyzed the relationship between cetuximab pharmacokinetics and efficacy. Fracasso *et al.* observed higher cetuximab trough concentrations in responders than in non-responders, in a cohort of patients treated for different types of carcinomas [13]. The average trough level of patients with both response and stable disease was 60.7 mg/L compared with 33.2 mg/L in patients with progressing disease. Azzopardi *et al.* [17], reported a relationship between cetuximab global clearance (cumulative cetuximab dose divided by cumulative AUC) and progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients. The risk of disease progression increased significantly with decreasing cetuximab global clearance. In the present study, disease progression was significantly associated with cetuximab global clearance, with a longer PFS in patients with cetuximab global clearance below the median value ($p = 0.037$). Overall survival was also significantly associated with cetuximab global clearance, with a longer OS in patients with low cetuximab global clearance ($p = 0.007$). These results are important and can be explained by the fact that patients with a higher exposure to cetuximab had longer PFS and OS.

In patients treated with anti-EGFR monoclonal antibodies for colorectal or HNSCC cancers, skin toxicity (as rash or folliculitis) was previously reported to be associated with response: patients with high grade skin toxicities having better response or survivals, when treated by panitumumab [23, 24] or cetuximab [2, 4, 25]. However, in metastatic HNSCC, Vermorken *et al.* [3] found no significant association between severity of skin toxicity and survival ($p = 0.14$). No study reported an association between radiation dermatitis and survival data.

In our 21 LAHNSCC patients treated with radiotherapy plus cetuximab, mucositis and folliculitis (equivalent to rash) were not significantly related with OS. However, LAHNSCC patients with severe radiation dermatitis (at least grade 3) had longer OS ($p = 0.005$). The

difference between skin toxicities related to radiotherapy or cetuximab in the radiation field is not easy and classifications used in these previous clinical studies were not always described. In our 21 LAHNSCC, the distinction was made with the help of an adapted classification [26, 27].

In our cohort, the PFS and OS were not different between MHNSCC and LAHNSCC patients ($p = 0.09$ and $p = 0.125$, respectively), probably because of relatively small groups. This may also be explained by the fact that many patients in LAHNSCC population with curative intent relapsed precociously and, on the other side, some MHNSCC patients had excellent survival after 1 year.

Conclusion

In conclusion, a model with combined linear and nonlinear mechanisms of elimination allowed a good description of cetuximab pharmacokinetics. Exposure to cetuximab, as assessed by its global clearance, influences PFS and OS for HNSCC patients treated by radiotherapy or chemotherapy. These results strongly indicate that cetuximab dose and dosing regimen could be optimized in such a poor prognosis population, based on an individual assessment of pharmacokinetics, in order to prolong survival. These results need to be confirmed in a prospective study.

References

1. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354:567-78.
2. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 2010;11:21-8.
3. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1116-27.
4. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337-45.
5. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:663-71.
6. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011;22:1535-46.
7. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2015;51:1243-52.
8. Sclafani F, Gonzalez D, Cunningham D, et al. RAS mutations and cetuximab in locally advanced rectal cancer: results of the EXPERT-C trial. *Eur J Cancer* 2014;50:1430-6.
9. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360:1408-17.
10. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011;29:2011-9.
11. Ma P, Yang BB, Wang YM, et al. Population pharmacokinetic analysis of panitumumab in patients with advanced solid tumors. *J Clin Pharmacol* 2009;49:1142-56.
12. Ternant D, Paintaud G. Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5 Suppl 1:S37-47.
13. Fracasso PM, Burris H III, Arquette MA, et al. A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. *Clin Cancer Res* 2007;13:986-93.
14. Dirks NL, Nolting A, Kovar A, et al. Population pharmacokinetics of cetuximab in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pharmacol* 2008;48:267-78.
15. Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, et al. Pharmacokinetics of cetuximab after administration of escalating single dosing and weekly fixed dosing in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006;12:6517-22.
16. Tabernero J, Ciardiello F, Rivera F, et al. Cetuximab administered once every second week to patients with metastatic colorectal cancer: a two-part pharmacokinetic/ pharmacodynamic phase I dose-escalation study. *Ann Oncol* 2010;21:1537-45.
17. Azzopardi N, Lecomte T, Ternant D, et al. Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011;17:6329-37.

18. Ceze N, Ternant D, Piller F, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of cetuximab. *Ther Drug Monit* 2009;31:597–601.
19. Lavielle M, Mentre F. Estimation of population pharmacokinetic parameters of saquinavir in HIV patients with the MONOLIX software. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2007;34:229–49.
20. Panhard X, Samson A. Extension of the SAEM algorithm for nonlinear mixed models with 2 levels of random effects. *Biostatistics* 2009;10:121–35.
21. Maitre PO, Buhrer M, Thomson D, et al. A three-step approach combining Bayesian regression and NONMEM population analysis: application to midazolam. *J Pharmacokinet Biopharm* 1991;19:377–84.
22. Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84:548–58.
23. Peeters M, Siena S, Van Cutsem E, et al. Association of progression-free survival, overall survival, and patient-reported outcomes by skin toxicity and KRAS status in patients receiving panitumumab monotherapy. *Cancer* 2009;115:1544–54.
24. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label, phase 3 clinical trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:1658-64.
25. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004;22:1201-8.
26. Bernier J, Bonner J, Vermorken JB, et al. Consensus guidelines for the management of radiation dermatitis and coexisting acne-like rash in patients receiving radiotherapy plus EGFR inhibitors for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol*. 2008;19:142-9.
27. Bernier J, Russi EG, Homey B, et al. Management of radiation dermatitis in patients receiving cetuximab and radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: proposals for a revised grading system and consensus management guidelines. *Ann Oncol*. 2011;22:2191-200.

Figure 1. Kaplan-Meier curves of progression free survival according to cetuximab global clearance in all patients. Continuous and dashed lines correspond to patients with cetuximab global clearance below and above the median value, respectively.

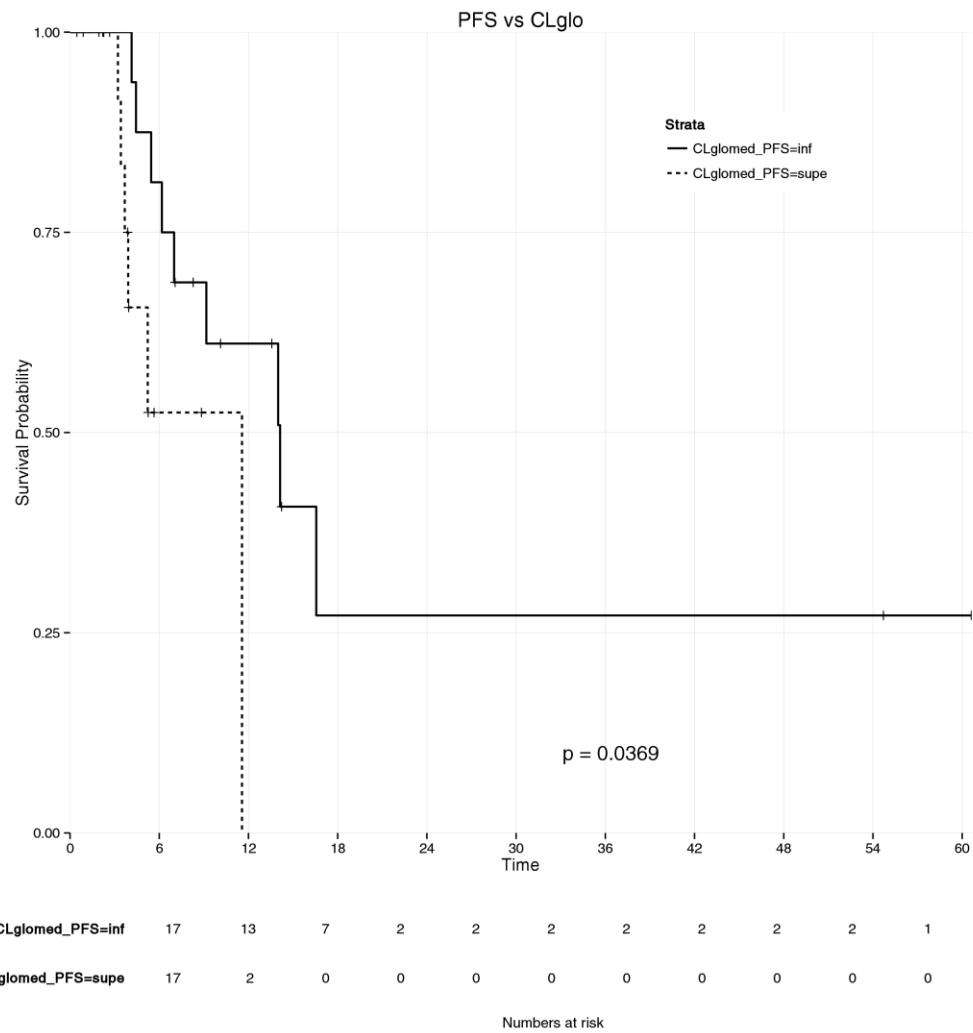


Figure 2: Kaplan-Meier curves of overall survival according cetuximab to global clearance in all patients. Continuous and dashed lines correspond to patients with cetuximab global clearance below and above the median value, respectively.

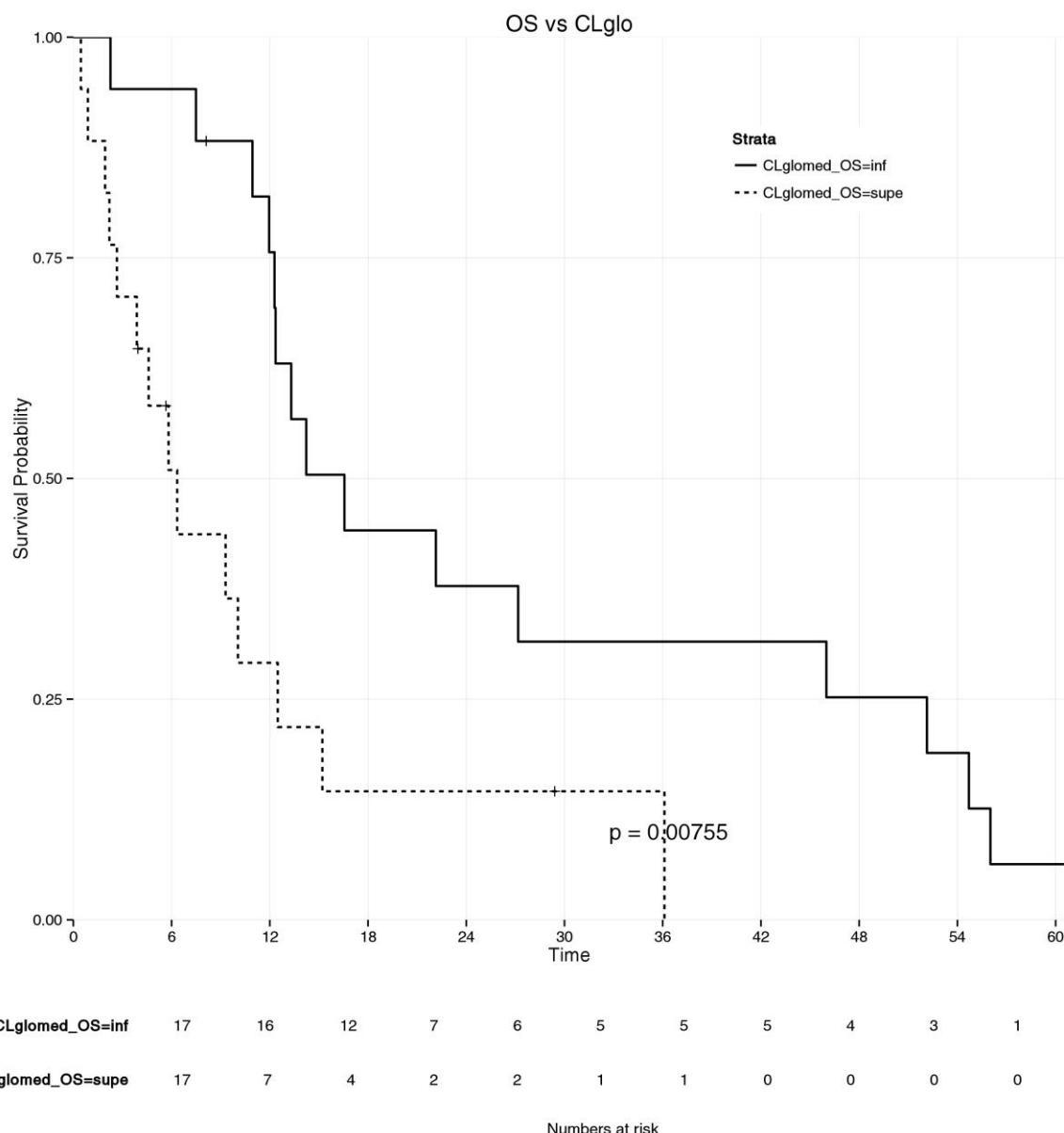


Figure 3: Kaplan-Meier curves of overall survival according to intensity of radiation dermatitis in the 21 LAHNSCC patients; low (solid line) skin toxicities were considered from grade 0 to 2 (N = 8) and severe (dashed line) from grade 3 to 4 (N = 13).

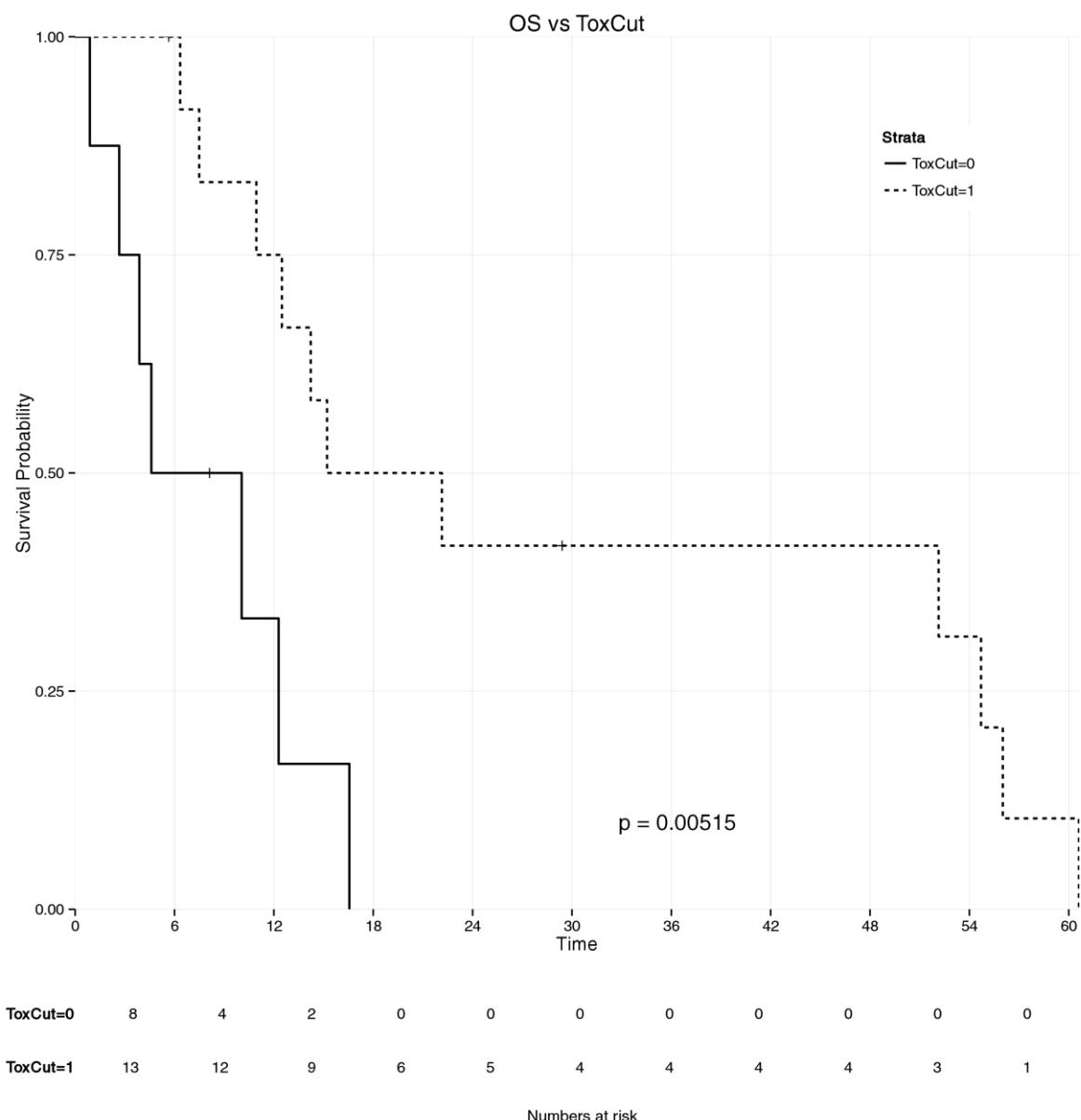


Table 1 - Baseline characteristics of cohort patients

	Total Cohort N=34	LAHNSCC Population N=21	MHNSCC Population N=13
Age – y			
Mean	61	61	61
Range	40 – 84	40 - 84	49 - 74
Sex – no. (%)			
Male	31 (91.2%)	18 (85.7%)	13 (100%)
Female	3 (8.8%)	3 (14.3%)	0 (0%)
Karnofsky Performans Status –no. (%)			
100	18 (53.0%)	12 (57.1%)	6 (46.1%)
90	10 (29.4%)	7 (33.3%)	3 (23.1%)
80	3 (8.8%)	1 (4.8%)	2 (15.4%)
70	3 (8.8%)	1 (4.8%)	2 (15.4%)
Mean	92.6	94.3	90
Primary Tumor Site –no. (%)			
Oral Cavity	3 (8.8%)	1 (4.8%)	2 (15.4%)
Oropharynx	18 (53.0%)	12 (57.1%)	6 (46.1%)
Hypopharynx	7 (20.6%)	5 (23.8%)	2 (15.4%)
Larynx	3 (8.8%)	2 (9.5%)	1 (7.7%)
Unknown primary	1 (2.9%)	1 (4.8%)	0
Cutaneous primary	2 (5.9%)	0	2 (15.4%)
Stage of primary tumor T – no. (%)			
Tx	1 (2.9%)	1 (4.8%)	0
T1	5 (14.7%)	1 (4.8%)	4 (30.75%)
T2	12 (35.3%)	8 (38.1%)	4 (30.75%)
T3	10 (29.4%)	8 (38.1%)	2 (15.4%)
T4	6 (17.7%)	3 (14.2%)	3 (23.1%)
Node Stage (N) – no. (%)			
N0	9 (26.45%)	5 (23.8%)	4 (30.75%)
N1	7 (20.6%)	5 (23.8%)	2 (15.4%)
N2a	2 (5.9%)	2 (9.5%)	0

N2b	9 (26.45%)	5 (23.8%)	4 (30.75%)
N2c	5 (14.7%)	3 (14.2%)	2 (15.4%)
N3	2 (5.9%)	1 (4.9%)	1 (7.7%)
Treatments			
Radiotherapy	21	21	0
Cetuximab alone	3	0	3 ^a
Chemotherapy	11	1	10 ^b

^a one patient for larynx cancer recurrence after chemotherapy failure, one patient for an oropharynx progression cancer after chemoradiation and one patient for a progressive cutaneous cancer.

^b 7 patients received the validated EXTREME regimen or equivalent [3] with platinum-based chemotherapy plus fluorouracil, 1 patient received carboplatin plus fluorouracil (and radiotherapy in a protocol study – the only non-metastatic patient receiving chemotherapy), 1 patient received carboplatin only (unfit patient) and 1 patient received cisplatin plus docetaxel (in a protocol study).

Table 2 - Graded toxicities in LAHNSCC treated with radiotherapy (N = 21)

	Dermatitis	Mucositis	Folliculitis	
Grades				
0	2	2	5	
1	3	1	4	
2	3	6	10	
3	11	11	2	
4	2	1	0	
	Low = 8		Low = 9	
	Severe = 13		Severe = 12	

Table 3 - Estimated cetuximab pharmacokinetics parameters

parameter	Standard error	Relative Standard Error ^a (%)	p
V_1 (L)	3.18	0.09	3
CL (L/day)	0.57	0.07	12
V_2 (L)	5.40	0.82	15
Q (L/day)	0.64	0.09	15
k_0 (mg/day)	6.72	3.70	56
$\beta_{V1}(\text{BSA})$	1.28	0.26	21
$\beta_{V2}(\text{BSA})$	5.54	1.4	25
$\beta_{k0}(\text{TTT})$	1.2	0.59	49
$\beta_{CL}(\text{TTT})$	-0.45	0.25	0.037
ω^2_{V1}	0.06	0.05	78
ω^2_{CL}	0.30	0.05	17
ω^2_{V2}	0.41	0.15	38
ω^2_Q	-	-	-
ω^2_{k0}	0.28	0.13	45
σ^2_{prop}	0.32	0.01	3

Abbreviations: V_1 and V_2 , respectively central and peripheral volumes of distribution; CL and Q , respectively elimination and distribution clearances; k_0 , zero-order elimination; BSA, Body Surface Area; TTT, treatment = chemotherapy.

^a(%) Relative standard error: (standard error/parameter value) x 100.

V. **Pointreau Y**, Fréneaux C, Bejan-Angoulvant T, Ternant D, Calais G, Watier H.

Clinical usefulness of anti- α Gal IgE assays for cetuximab-mediated anaphylaxis in head and neck cancer.

Manuscrit rédigé.

Title page

Worded title:

Clinical usefulness of anti- α Gal IgE assays for cetuximab-mediated anaphylaxis in head and neck cancer

Running title

IgE assays to predict cetuximab anaphylaxis

1. All authors of this paper have directly participated in the writing.
2. All authors of this paper have read and approved the final submitted version.
3. The contents of this manuscript have not been copyrighted or published previously.
4. The contents of this manuscript are not now under consideration for publication elsewhere.
5. The contents of this manuscript will not be copyrighted, submitted, or published elsewhere while acceptance by the Journal is under consideration.

Authors:

Yoann POINTREAU^{1,2,3} M.D

Claire FRENEAUX¹, Pharm.D

Theodora BEJAN-ANGOULVANT^{1,2,3}, M.D, Ph.D

David TERNANT^{1,2,3} Pharm.D, Ph.D

Gilles CALAIS^{1,3}, M.D, Ph.D

Hervé WATIER^{1,2,3} M.D, Ph.D

Affiliations:

¹CHRU de Tours, Service de radiothérapie (YP, GC), Service d'immunologie (CF, HW), Service de pharmacovigilance (TBA) and Laboratoire de pharmacologie-toxicologie (DT), Tours, France

²CNRS, UMR 7292, team « Antibodies Fc receptors and clinical responses », Tours, France

³Université François-Rabelais de Tours, France

Corresponding author:

Hervé WATIER M.D, Ph.D

Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine 10 Boulevard Tonnellé 37032 Tours cedex France

Email : watier@med.univ-tours.fr Tel + 33 2 47 47 87 36 Fax +33 2 34 38 94 12

Keywords: Cetuximab, Infusion reaction, Assays, Hypersensitivity, Head and neck cancer, Anti- α Gal IgE

Conflict of interest: The authors have declared their conflicts of interest

No disclaimers / No previous presentation

Acknowledgments:

This work was supported by the French Higher Education and Research ministry under the program “Investissements d’avenir” Grant Agreement: LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01. We are grateful to Dr Anita Köber (Thermo Fisher Scientific) for the critical reading of the manuscript and to her company for kindly providing the reagents. We are undebted to Dr. Marc Ohresser for designing the tridimensional structural model of an alpha-galactosylated molecule of cetuximab. We sincerely thank Mrs Céline Vigneron, Audrey Farnault-Dabert and Michèle Pérez for their technical assistance.

ABSTRACT

Purpose

Cetuximab is indicated in head and neck cancer patients in association with radiotherapy and chemotherapy. Anaphylaxis reactions with fatal outcomes were described during first infusion and were correlated with the presence of preexisting anti-cetuximab IgE against the galactose- α 1,3-galactose epitope (α 3Gal). We aimed at comparing two assays and determining predictive factors for preexisting anti- α Gal IgE.

Patients and Methods

For measuring anti- α Gal IgE, an assay (70BP assay) was developed and compared to commercial assay (bTG assay). Both assays were applied in two cohorts: 299 healthy blood donors (to determine prevalence of positive assay in our area) and 41 head and neck cancer patients treated with cetuximab.

Results

In healthy blood donors, the prevalence of anti- α Gal IgE was 6% using the 70BP assay and 5% using the bTG assay with an excellent correlation for median range value of signal ($r^2 = 0.91$). An anaphylaxis reaction occurred in 9.76% of cancer patients. Seven had a positive signal using the 70BP assay (17.1 %) and 6 using the bTG assay (14.6%) with an excellent correlation for median range value of signal ($r^2 = 0.99$). The sensitivity and negative predictive values were 100% for both assays. The specificity was 91.9% and 94.6%, the positive predictive value 57.1% and 66.6% in 70BP and bTG assays respectively.

Conclusion

We showed that predictive values of anti- α Gal IgE measured using two assays were excellent. Use of these specific assays could be helpful to oncologists in clinical practice.

INTRODUCTION

For more than fifteen years, twenty monoclonal antibodies have been approved for cancer treatment; all of them display a favorable benefit-to-risk ratio despite frequent adverse effects, particularly infusion reactions.¹ Anaphylaxis is mostly due to a single agent, cetuximab (Erbitux®, Imclone-Eli Lilly and Merck Serono), with potential fatal outcomes.^{2,3}

Cetuximab is a chimeric human-mouse immunoglobulin G1 kappa monoclonal antibody directed against the extracellular ligand-binding domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). It was approved for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in association with radiotherapy,^{4,5} for recurrent or metastatic HNSCC in association with chemotherapy,⁶ and for metastatic colorectal cancer alone or in association with chemotherapy.⁷⁻¹¹ Adjunction of cetuximab to the treatment of these cancers improved overall and/or progression free survival.^{4,11} In head and neck cancer, cetuximab is the only approved monoclonal antibody, without biopharmaceutical therapeutic alternative as might be panitumumab, bevacizumab or afibbercept in digestive cancers. Some publications showed that infusion reactions during the first infusion of cetuximab occurred more frequently in head and neck cancer than in colorectal cancer patients.³ It is therefore of outmost importance to secure the use of cetuximab in head and neck cancers.

Hypersensitivity reactions to cetuximab usually occur within minutes after patient's first exposure^{3,12} and are related to the presence of preexisting anti-cetuximab IgE well deciphered in a major and landmark publication.¹³ Incidence of severe hypersensitivity reactions to cetuximab was reported in 3% to 22% of patients.¹⁴⁻¹⁶ Environmental factors, such as tick bites, have been proposed to explain the heterogeneous proportion of individuals with preexisting anti-cetuximab IgE¹⁷ and the heterogeneous incidence of anaphylactic reactions to cetuximab among studies and geographic areas.^{13, 15, 17, 18} A history of atopy, age, sex, ethnicity, smoking and additional therapies, *i.e.* chemotherapy or radiotherapy, have also been proposed as factors favoring anaphylaxis to cetuximab, but they all remain controversial.^{16, 13, 18}

Anti-cetuximab IgE are specific for an oligosaccharide, galactose- α 1,3-galactose (α 3Gal), terminating a *N*-glycan present in the variable domain of the cetuximab heavy chains (Figure 1).^{13, 19-21} More precisely, depending on the tested batches and the methods used, 62 to 75% of cetuximab Fab *N*-glycans carried at least one α 3Gal-terminated antenna (Figure 1).¹⁹⁻²¹ Therefore, 38 to 56% of cetuximab molecules could expose very accessible α 3Gal residues on their two Fab arms (Figure 1). This could probably explain their ability to bridge mastocyte-bound anti- α 3Gal IgE and to trigger the anaphylactic reaction, a feature not shared by other biopharmaceuticals expressing isolated α 3Gal-containing *N*-glycans.^{22, 23}

The risk of fatal anaphylactic reaction using cetuximab is so worrying that an international congress devoted to this issue was held in France in order to discuss practical measures to be taken.²⁴ We also pointed out the need for accurate assays²⁵ after the published report in this journal of a fatal infusion reaction to cetuximab.² Following the initially described assay,¹³ Mariotte *et al.* proposed an ELISA technique based on IgE binding to the Fab fragment of cetuximab.²⁶ Using this assay, anti-cetuximab IgE were frequently detected in blood donors and cancer patients (28.2% and 26.1% respectively), although only 8.7% grade III hypersensitivity reactions were observed in treated patients. Therefore, despite a very good negative predictive value (98.5%), the low positive predictive value (33.3%) of this assay could lead to overdiagnosis of putative risk of cetuximab-induced anaphylaxis. This overdiagnosis may lead to decreased survival of cancer patients, if cetuximab would be erroneously contra-indicated, particularly in head and neck cancer where no therapeutic alternatives exist.

We have developed an alternative assay based on IgE binding to α Gal glycans ("70BP assay"). In parallel, a commercial assay, used to detect red meat allergic patients, was developed by ThermoFischer Scientific ("bTG assay"),²⁴ based on IgE binding to bovine thyroglobulin, a protein well known to be heavily α -galactosylated.²⁷

We therefore aimed at comparing the prevalence of anti- α 3Gal IgE using 70BP and bTG assays in a cohort of healthy blood donors and in head and neck cancer patients treated with cetuximab, and to determine their predictive values of anaphylaxis in cetuximab treated patients. We also searched for factors associated with the development of anti- α 3Gal IgE.

PATIENTS AND METHODS

Patients

For this study, two local cohorts were investigated. The first one contained sera from 299 healthy anonymous blood donors. The only available characteristics were age, sex and ABO blood group determination. The second cohort was created from 41 consecutive patients with head and neck cancer enrolled in the radiotherapy unit of the Henry-Kaplan center from the University Hospital Center of Tours. All patients received cetuximab and radiotherapy and/or chemotherapy. All patients received premedication with a corticosteroid and antihistaminic as recommended.²⁸ Data collected included: age, sex, past history of allergy (drugs, food, animals...), tobacco and alcohol usage, and occurrence of hypersensitivity reaction. Grading of the hypersensitivity reactions was based on the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.03.²⁹ In this terminology, grading scale was grade 3 for symptomatic bronchospasm, with or without urticarial, parenteral intervention indicated, allergy-related edema/angioedema or hypotension; grade 4 for life-threatening consequences with urgent intervention indicated and grade 5 corresponding to death.

Serum samples

A pretreatment serum sample was routinely collected for each patient before cetuximab infusion. In the two cohorts, total IgE concentration and ImmunoCap Phadiatop[®] (routinely used to detect specific IgE against common allergens) were determined, as atopic biological markers. Tryptase measurements were carried out in patients who developed an anaphylactic reaction to cetuximab.

Immunoassays

The anti- α 3Gal IgE were measured using two assays. Both assays were based on the ImmunoCap systemTM (Phadia ThermoFischer Scientific).

Developed 70BP assay:

The α 3Gal epitope being the only xenogeneic cetuximab antigen explaining preexisting (“natural”) IgE,¹³ we decided to set up our assay based on synthetic α -galactosylated antigens (Figure 2). To develop our assay, preliminary experiments were performed with sera collected from 3 patients having presented grade 3 or 4 reactions to the first cetuximab infusion (with the hypothesis that their sera contained anti- α 3Gal IgE).

In order to optimize the detection of anti- α 3Gal IgE in our assay, we tested a panel of different α -galactosylated antigens from Lectinity (Moscow, Russia), containing either α 3Gal or α 4Gal terminal residues (Figure 2). The α 4Gal oligosaccharides were chosen as negative controls since they do not bind anti- α 3Gal antibodies.³⁰ All tested antigens were biotinylated to allow their capture by the streptavidin-coated solid phase. They were used either in monomeric (70BM for α 3Gal and 8BM for α 4Gal), or polymeric form, with 4 trisaccharides bound to poly[N-(2-hydroxyethyl)acrylamide], as shown in Figure 2. The polymeric antigens were based either on an *N*-acetyllactosamine (70BP for α 3Gal and 8BP for α 4Gal), or on a lactose structure (10BP for α 3Gal and 37BP for α 4Gal) (Figure 2).

Experiments were conducted with an ImmunoCap 100TM (ThermoFischer Scientific) instrument with the appropriate reagents, following manufacturer’s instructions. Streptavidin-coated ImmunoCaps (ThermoFischer Scientific) were incubated with 50 μ L of the different biotinylated and α -galactosylated antigens at different dosages (1 to 33.33 μ g) in phosphate buffered saline

solution (PBS) during 30 minutes at 37°C and washed. Fifty μ l of serum were then added during 30 minutes at 37°C, and systems were washed again. To assess the specificity of the detection, a negative control was performed using antigen-free wells (PBS only). Bound IgE were revealed using an anti-human IgE (50 μ L) mouse monoclonal antibody coupled to β -galactosidase (ThermoFischer Scientific) incubated during 24 minutes at 37°C. After a wash, 50 μ L enzyme substrate (4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside) was added. The fluorescence signal was converted using a total IgE calibration curve into arbitrary units (kAU/L), with a detection threshold of 0.1kAU/L.

The three sera were tested against the three α 3-galactosylated antigens (70BM, 70BP and 10BP) and in parallel with their α 4 counterparts (8BM, 8BP and 37BP, respectively) (Table 1). Different dosages (1; 3.33; 10 and 33 μ g/cap) of each antigen were tested. In case of binding, the signal reached a plateau from 3.33 μ g antigen/Cap (data not shown). This coating value was therefore chosen for subsequent experiments. Sera from two patients, untreated with cetuximab but having very high total IgE concentrations (1879 and 1326 kU/L, respectively; normal range <150kU/L) were also tested. Whatever the antigen tested, no signal was obtained (data not shown), demonstrating the absence of non-specific IgE binding to the Caps. Anti- α 3Gal IgE were detected in the three sera whatever the α 3-galactosylated oligosaccharides, whereas none of the sera reacted with α 4-galactosylated antigens or with unliganded streptavidin-coated Caps, demonstrating the α 3Gal specificity of binding (Table 1). Regardless of the α 3-galactosylated oligosaccharide, the highest concentration was always seen with the serum from patient 1. For two sera (patients 1 and 2), the binding to the α 3Gal epitope in a polymeric form (70BP) was much higher than the binding to the α 3Gal epitope in a monomeric form (70BM). However, the use of an alternative oligosaccharide with a terminal α 3Gal connected to a lactose structure (Gal β 4Glc) (8BP) instead of the “normal” *N*-acetyllactosamine structure (Gal β 4GlcNAc) (70BP) (Figure 2), both being exposed at the same density (4 oligosaccharides per PAA molecule), provides lower anti- α 3Gal IgE concentrations for all three sera, demonstrating that the α 3Gal epitope must be exposed in the correct oligosaccharide context to maximize IgE binding. In the 70BP at 3.33 μ g antigen/Cap has therefore been selected for validation of our developed assay (hence referred as “70BP assay”) in larger cohorts of individuals and patients.

Commercial bTG assay:

In parallel, while trying to develop a reagent for the diagnosis of both red meat/offal allergy and cetuximab anaphylaxis, Thermo Fischer Scientific went to the conclusion that bovine thyroglobulin (bTG) was a reliable and robust model glycoprotein, exposing the α 3Gal epitope in the right manner.²⁴ This bTG assay was performed with the ImmunoCap250™ instrument (ThermoFischer) and the appropriate reagents using an entire automatic procedure. The Caps used are coated with bovine thyroglobulin. This test was now applied to sera from patients allergic to red meat (beef) and demonstrated a good correlation with Caps coated with cetuximab and α Gal-conjugated human serum albumin (neoglycoconjugate).²⁴ Using the same calibration curve, fluorescence signal was converted into arbitrary units (kAU/L) with a detection threshold of 0.1 kAU/L.

Statistical Analysis

In both cohorts, age and total IgE were compared using Mann-Whitney test. ABO groups, gender, total IgE <150 or >150 kU/L and Phadiatop® results were compared using Fisher’s exact test.

Using the 0.1 kAU/L threshold as cut-off value to define positive signal, were analyzed positivity and negativity of 70BP and bTG assays for healthy blood donors and cancer patients. The correlation between specific IgE measured using bTG and 70BP tests was measured using Pearson linear correlation coefficient (R). Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated for both assays.

All tests were bilateral with an alpha risk fixed at 5%. The tests were significant if p value was < 5%. Statistical tests were assessed using R software version 3.2.2 (Vienna, Austria).

RESULTS

Healthy blood donors

We applied both assays on sera from a cohort of blood donors to determine the prevalence of positive sera in our area (Table 2). Among the 299 blood donors, using the threshold of signal detection (0.1kAU/L), 18 were found to be positive using the 70BP assay (6% prevalence) and 15 using the bTG assay (5% prevalence). Ten donors were found to be positive with both assays (3.3% prevalence). Using the 70BP assay, median range value of signal was 0.049 (range 0-4.81) and 0.81kAU/L (range 0.11-4.81) in the 299 donors and among those with a positive signal, respectively. Using the bTG assay, median range value of signal was 0.026 (range 0-2.71) and 0.55kAU/L (range 0.10-2.71) in the 299 donors and among those with a positive signal respectively. The three sera presenting the highest value in the bTG assay (range 1.72-2.71) also presented the highest value in the 70BP assay (range 2.32-4.81). The results of the two assays regarding the presence of IgE were well correlated ($r^2 = 0.91$) (Figure 3).

Cancer patients

Among the 41 patients, 4 had an anaphylaxis reaction after receiving the first infusion of cetuximab (9.76%). Reaction were one grade 5 (one patient died 5 days after the infusion, despite mechanical ventilation with oxygen), one grade 4 (one patient alive at the time of analysis and dead during follow-up) and two grade 3. All four patients were readministered corticosteroid and antihistamine drugs, and two patients required adrenalin infusion and hospitalization in intensive care unit. Two patients were treated for a metastatic disease including the patient who died. He was an alcoholic and tobacco user, and was known to be allergic to giblets. Serum tryptase concentrations were available for 3 out of 4 patients, displaying very high levels: 90, 125 and 198 μ g/L (normal range, 0-11.4 μ g/L), witnessing mastocyte degranulation. Reintroduction of cetuximab was not allowed in these three patients who survived to anaphylaxis reactions. A fifth patient showed a generalized skin reaction (rash grade 2, no anaphylaxis reaction) with a favorable evolution after corticosteroids and anti-H1 readministration. An anaphylactic reaction was excluded for this patient since cetuximab was continued without recurrence of symptoms. The 36 other patients of the cohort did not experience adverse reaction to cetuximab. Characteristics of the patients were reported in table 3 and assays results in table 4.

Using the 70BP assay, median range value of signal was 2.89kAU/L (range 0-77.1), 16.78kAU/L (range 0.22-77.1) and 28.94kAU/L (range 7.55-77.1) in the 41 patients, among patients with a positive signal (>0.1kAU/L) and among patients with anaphylactic reaction, respectively. Using the bTG assay, median range value of signal was 1.66kAU/L (range 0-44.1), 11.32kAU/L (range 0.14-44.1) and 16.88kAU/L (range 5.35-44.1) in the 41 patients, among patients with a positive signal (>0.1kAU/L) and among patients with anaphylactic reaction, respectively. None of the patients who presented a clinical reaction was found negative with either assay (no false negative patient).

In cancer patients cohort, the results of the two assays regarding the presence of IgE were highly correlated ($r^2 = 0.99$) (Figure 4).

Out of the 41 cancer patients, 7 were found to be positive using the 70BP assay (17.1 %) and 6 of them using the bTG assay (14.6%), (Table 5). The only patient showing a discrepancy between the two assays did not experience any clinical reaction. The patient with grade 2 skin reaction was found to be positive for both assays (could be viewed as false positive patient regarding anaphylaxis).

Predictive values of the 70BP and bTG assays for anaphylactic events were calculated using the threshold for a positive signal as cut-off value (0.1kAU/L): both assays have a sensitivity of 100% and a negative predictive value of 100%. The 70BP assay has a specificity of 91.9% and a positive predictive value of 57.1%; whereas bTG assay has a specificity of 94.6% and a positive predictive value of 66.6%. ROC curves were not performed regarding the low rate of anaphylaxis events.

Factors associated with the development of anti-IgE antibodies

To search for individual factors predisposing to the development of anti- α 3Gal IgE in the general population (blood donors), we analyzed the prevalence of serum positivity according to available variables: age, blood group, sex and biological atopic markers (total IgE, more or less than 150 kU/L of total IgE and Phadiatop® test results). Although blood group B and AB donors constitutively express a fucosylated α 3Gal epitope in their tissues and could be at lower risk to develop anti- α 3Gal IgE antibodies, ABO blood group had no influence whatever the assay used. Whereas age had not influence, the male sex was associated with the presence of α Gal IgE using the 70BP assay with a male/female sex ratio of 5 in favor of male sex ($p < 0.05$) and a trend was observed with the bTG assay (sex ratio at 4; $p = 0.06$). Using bTG assay, the other factor associated with the presence of α Gal IgE was the mean total IgE concentration ($p = 0.03$) and a trend for an IgE level more than 150 kU/L ($p = 0.09$).

For cancer patients, we searched for individual factors associated with development of anti- α Gal IgE by analyzing the repartition of the population regarding age, sex, metastatic status, alcohol and tobacco consummation, clinical allergy and atopic biological markers (total IgE, IgE more or less than 150 kU/L of total IgE and Phadiatop® test results). The only factor associated with the risk of grade 3 to 5 clinical reactions was the total IgE concentration, which was higher in patients with anaphylactic reaction ($p = 0.05$). A trend for a similar association was found with the results of the Phadiatop® test ($p = 0.07$). For the 70BP assay, the only factor found to be associated with the presence of α Gal IgE using the 70BP assay was age ($p = 0.05$) and, in a non-significant way, total IgE ($p = 0.09$). For the bTG assay, factors associated with the presence of α Gal IgE were total IgE ($p = 0.02$), results of the Phadiatop® test ($p = 0.05$) and, in a non-significant way, IgE>150 kU/L ($p = 0.07$).

No significant influence of sex was found for both assays but all patients with anaphylactic reaction and positive signal were male (lack of power); female gender was poorly represented (only 5 patients out of 41).

DISCUSSION

Using two cohorts, we performed two assays to detect anti- α Gal IgE as tests predicting the risk of anaphylactic reaction with cetuximab. Both assay detected the presence of IgE against the Gal- α 3Gal pattern. In our 70BP assay, for two sera (patients 1 and 2), the binding to the α 3Gal epitope in a polymeric form (70BP) was much higher than the binding to the α 3Gal epitope in a monomeric form (70BM), an observation that could be explained by a higher amount of available α 3Gal epitopes on the surface of the Cap. The bovine thyroglobulin well known to be heavily α -galactosylated and have done similar results. Indeed, the two assays were well correlated in a cohort of healthy blood donors and in head and neck cancer patients who have been treated by cetuximab with available clinical data.

We found a sensitivity and a negative predictive value of 100% for both assay in the cancer cohort and an excellent specificity of 91.9 and 94.6% for the 70BP and the bTG assays respectively. Positive predictive values were 57.1 and 66.6% respectively. In this cohort, the bTG assay has done the best results regarding specificity and positive predictive value.

None of the patients developed clinical reaction to cetuximab when one of the assays was found negative. Our results showed that all severe hypersensitivity reactions to cetuximab occurred in patients with IgE antibodies against galactose- α -1,3-galactose detected by both assays.

In the cohort of healthy blood donors (without clinical data regarding cetuximab infusion), we found approximately a 5% prevalence of positive results with a good correlation between the two assays. The only individual factor found to be associated with the presence of α Gal IgE was the male sex, with a sex ratio >4 (4 or 5 depending of the assay) in favor of male sex ($p < 0.05$). This factor, which is rarely found in allergy, is in accordance with the higher incidence of severe reaction to cetuximab in head and neck cancer compared with colon cancer patients.³ An explanation of the predominance of this incidence in head and neck cancer could be that these patients have a higher IgE.^{31,32} Concentration of anti- α Gal IgE was correlated with that of total IgE ($p = 0.03$), only for the bTG assay. An explication could be the predominance of anti- α Gal IgE among total IgE. Another explication could be a non-specific signal in this assay by a high level of IgE and could be tested by an addition of polyclonal IgE.

In the cohort of cancer patients (with precise clinical data regarding cetuximab infusion), we found a 9.8% risk of anaphylaxis reaction after the first infusion of cetuximab, including one grade 5. The only individual factor associated with the presence of anti- α Gal IgE was the total IgE, which were higher level in patients with anaphylactic reaction ($p = 0.05$). A non-significant similar association was found with the result of the Phadiatop® test ($p = 0.07$), without explication. The only factor associated with the presence of α Gal IgE using the 70BP assay was the mean age ($p = 0.05$) and a trend for the mean total IgE ($p = 0.09$). For the bTG assay, factors associated with the presence of α Gal IgE was the mean total IgE ($p = 0.02$) and the Phadiatop® test ($p = 0.05$) and a trend for an IgE level more than 150kU/L ($p = 0.066$). An explication for the mean total IgE could be the predominance of anti- α Gal IgE among them.

The detection of pre-existing IgE antibodies against galactose- α -1,3-galactose is a major issue because of the large utilization of cetuximab, particularly in locally advanced, recurrent or metastatic head and neck cancer where no effective alternative is possible.

To secure the use of cetuximab regarding this frail population, the employment of predictive assays must to be extended and need to be readily available. In our experience, the risks of fatal outcome of anaphylaxis can be prevented by a close monitoring of patients during the first infusion but is not totally sufficient for safety.

We need to alert oncologist regarding possible fatal outcomes during the first cetuximab infusion and we must to inform them for the use of predictive assay to secure their practice. Recently official instance as EMA, but not FDA, have recommended the detection of anti-cetuximab IgE before the first infusion. To find a precisely cut-off value for these assays and to analyze the cost-effectiveness, additional research must be conducted in large cohort.

In conclusion, we showed that predictive values of anti- α Gal IgE measured using two assays in two cohorts were excellent with similar results.

REFERENCES

1. Klastersky J: Adverse effects of the humanized antibodies used as cancer therapeutics. *Curr Opin Oncol* 18:316-20, 2006
2. Tronconi MC, Sclafani F, Rimassa L, et al : Fatal infusion reaction to cetuximab: the need for predictive risk factors and safer patient selection. *J Clin Oncol* 29:e680-e681, 2011
3. Grandvillain A, Disson-Dautriche A, Miremont-Salamé G, et al : Cetuximab infusion reactions: French pharmacovigilance database analysis. *J Oncol Pharm Pract* 19:130-137, 2012
4. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-578, 2006
5. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11:21-28, 2010
6. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al: Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359:1116-1127, 2008
7. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-345, 2004
8. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al: Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:663-671, 2009
9. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al: Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 22:1535-1546, 2011
10. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al: Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360:1408-1417, 2009
11. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al: Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 29:2011-2019, 2011
12. Hopps S, Medina P, Pant S, et al: Cetuximab hypersensitivity infusion reactions: Incidence and risk factors. *J Oncol Pharm Pract.* 19:222-7, 2013
13. Chung CH, Mirakhur B, Chan E, et al: Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 358:1109-17, 2008
14. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al: Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 23:1803-10, 2005
15. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-45, 2004
16. O'Neil BH, Allen R, Spigel DR, et al: High incidence of cetuximab-related infusion reactions in Tennessee and North Carolina; association with atopic history. *J Clin Oncol* 25:3644-8, 2007
17. Commins SP, James HR, Kelly LA, et al: The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose- α -1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol*, 127:1286-93, 2011
18. George TJ Jr, Laplant KD, Walden EO, et al: Managing cetuximab hypersensitivity-infusion reactions: incidence, risk factors, prevention, and retreatment. *J Support Oncol* 8:72-7, 2010

19. Qian J, Liu T, Yang L, et al: Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Anal Biochem* 364:8-18, 2007
20. Toyama A, Nakagawa H, Matsuda K, et al: Quantitative structural characterization of local N-glycan microheterogeneity in therapeutic antibodies by energy-resolved oxonium ion monitoring. *Anal Chem* 84:9655-62, 2012
21. Ayoub D, Jabs W, Resemann A, et al: Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques. *MAbs* 5:699-710, 2013
22. Bosques CJ, Collins BE, Meador JW 3rd, et al: Chinese hamster ovary cells can produce galactose- α -1,3-galactose antigens on proteins. *Nat Biotechnol* 28:1153-6, 2010
23. Lammerts van Bueren JJ, Rispens T, Verploegen S, et al: Anti-galactose- α -1,3-galactose IgE from allergic patients does not bind α -galactosylated glycans on intact therapeutic antibody Fc domains. *Nat Biotechnol* 29:574-6, 2011
24. Daguet A, Watier H : 2nd Charles Richet et Jules Héricourt workshop: therapeutic antibodies and anaphylaxis. *MAbs* 3:417-21, 2011.
25. Pointreau Y, Commins SP, Calais G, et al: fatal infusion reactions to cetuximab: role of immunoglobulin E-mediated anaphylaxis. *J Clin Oncol* 30:334, 2012
26. Mariotte D, Dupont B, Gervais R, et al: Anti-cetuximab IgE ELISA for identification of patients at a high risk of cetuximab-induced anaphylaxis. *MAbs* 3:396-401, 2011
27. Kirkeby S and Moe D. Lectin interactions with alpha-galactosylated xenoantigens. *Xenotransplantation* 9:260-7, 2002
28. Erbitux label, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf Accessed date
29. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0 Published: May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010) http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-4_QuickReference_5x7.pdf
30. Galili U, Macher BA, Buehler J, et al: Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1----3)-linked galactose residues. *J Exp Med* 162:573-82, 1985
31. Lal H, Singh B, Wig U, et al: Serum immunoglobulin E levels in patients with head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 102:432-4, 1988
32. Vinzenz K, Schöenthal E, Zekert F, et al: Diagnosis of head and neck carcinomas by means of immunological tumour markers (Beta-2-microglobulin, immunoglobulin E, ferritin, N-acetyl-neuraminic acid, phosphohexose-isomerase). *J Craniomaxillofac Surg* 15:270-7, 1987
33. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, et al: Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7:301-11, 2005

FIGURES AND FIGURE LEGENDS

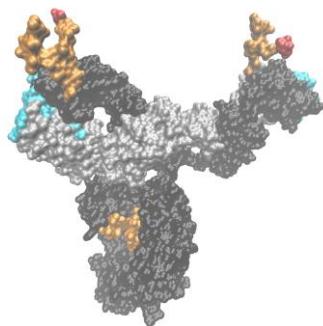


Figure 1. **Tridimensional model of an entire molecule of cetuximab with its Fc- and VH-associated biantennary N-glycans (orange); the antennae of the VH-associated N-glycans are terminated with α 3Gal residues (in red).** This surface representation has been built with the VMD software (University of Illinois), starting from the structure of the only available entire human IgG1kappa monoclonal antibody (anti-HIV-1 gp120 clone b12, pdb #1hzh) with the κ light and γ 1 heavy chains in grey and black, respectively. The two Fc N-glycans are depicted in orange. Its Fab fragments were replaced by those of cetuximab (pdb #1yy9).³³ The CDR residues from the light and heavy chains forming the antigen-binding sites are shown in cyan. The crystalized cetuximab Fab fragments having been produced in mammalian cells, they harbour the VH N-glycan; however, only the first GlcNAc residue was resolved because the remaining part of the glycan was too mobile to be adopt a unique conformation (pdb #1yy9).³³ To visualize a given conformation of these VH N-glycans, a Fc-derived digalactosylated N-glycan of pdb #1hzh was superimposed on the GlcNAc residue and represented in orange. Finally, to represent an α 3Gal residue (in red) ending one of the arms of the biantennary glycans, as commonly observed in cetuximab, a Gal α 3Gal β 4GlcNAc β trisaccharid originally crystalized in *Clostridium difficile* A toxin (pdb #2G7) was superimposed to the corresponding arms of the VH N-glycans.

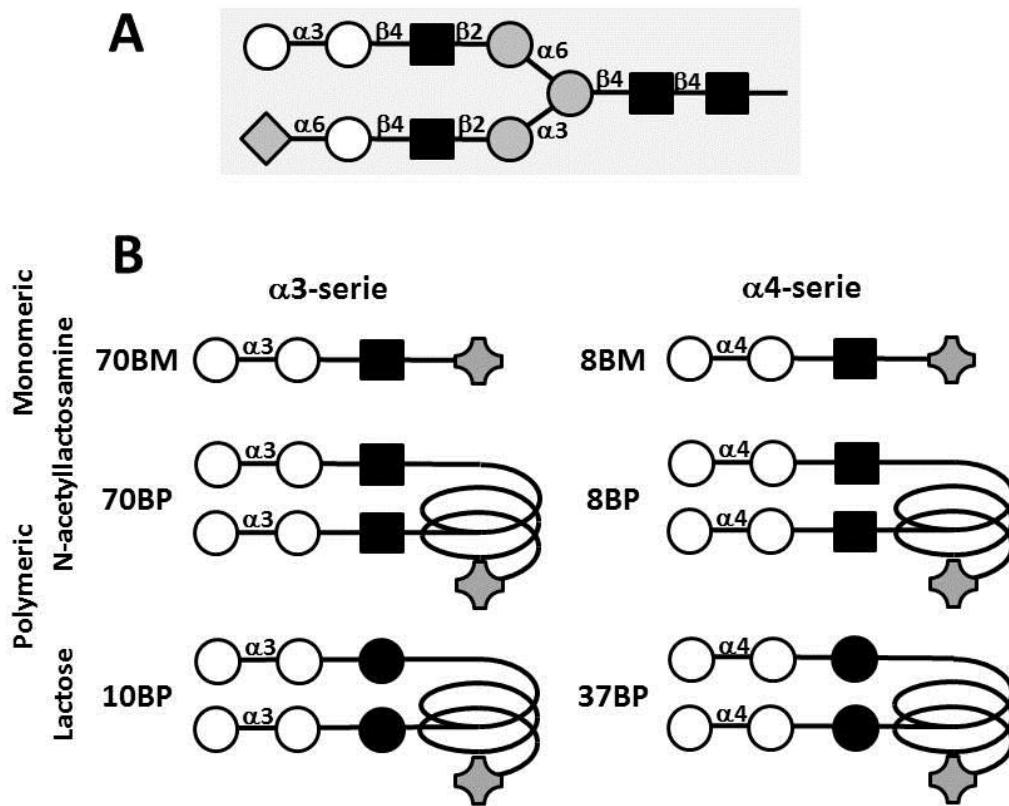


Figure 2. Schematic representation of a typical biantennary *N*-glycan from cetuximab Fab or bovine thyroglobulin (A), and oligosaccharides initially tested to set up our developed assay (B). A. *N*-glycans are linked to an asparagine residue (Asn) via a first *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residue (■, on the right), then another GlcNAc and three mannose (Man, ●), form the trimannosyl core. One to three (typically two as in the figure) antennae are then formed, each starting with a β 2-linked GlcNAc and a β 4-linked galactose (Gal, ○). Antennae may then be terminated, or not, with an α 3-linked Gal or an α 6-linked sialic acid residue that could be Neu5Gc as is the case of cetuximab Fab. In cetuximab Fab, *N*-glycans carrying one, two or even three α 3Gal-terminated antennae represent 30 to 38%, 29 to 40% and 2.5 to 5%, respectively, of all the cetuximab Fab glycoforms (20-22). B. The α 3-galactosylated antigens (left column) and the α 4-galactosylated antigens used as controls (right column) have been classified depending on their monomeric (1st line) or polymeric forms (2nd and 3rd lines), the latter being coupled to poly[N-(2-hydroxyethyl)acrylamide] (PAA) (schematized as a spiral). Note that 4 trisaccharides are coupled to each molecule of TAA, although only two are represented. In all cases, the accessible Gal is connected to another one with an α -linkage, this one being itself connected to (■) GlcNAc, as in the natural *N*-glycans (1st and 2nd lines), or to a glucose (●) (3rd line). All tested oligosaccharides are coupled to a biotin (■) to allow the capture by the streptavidin-coated solid phase. The 70BP antigen was finally chosen for subsequent experiments.

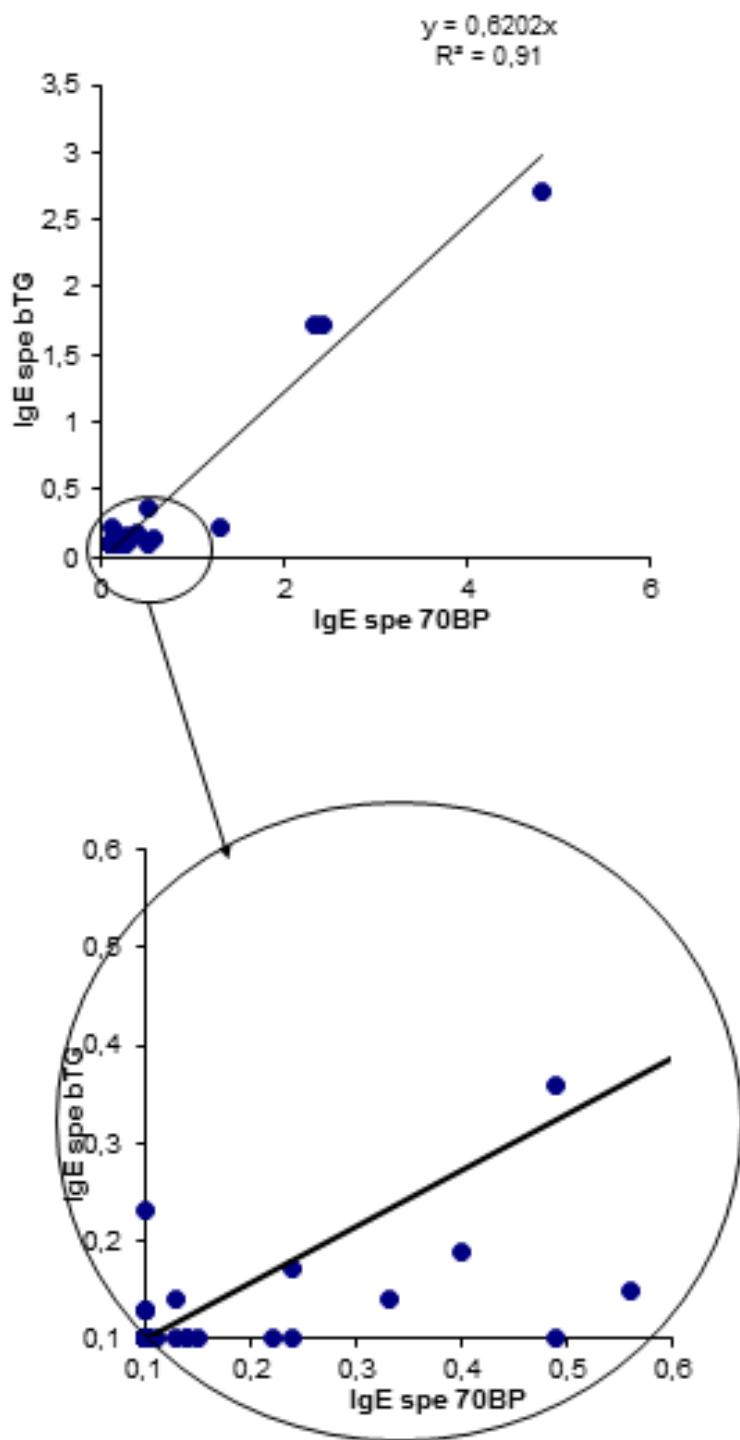


Figure 3. Correlation between the two assays (70BP and bTG) to detect presence of IgE in the sera of 299 blood donors ($r^2 = 0.91$).

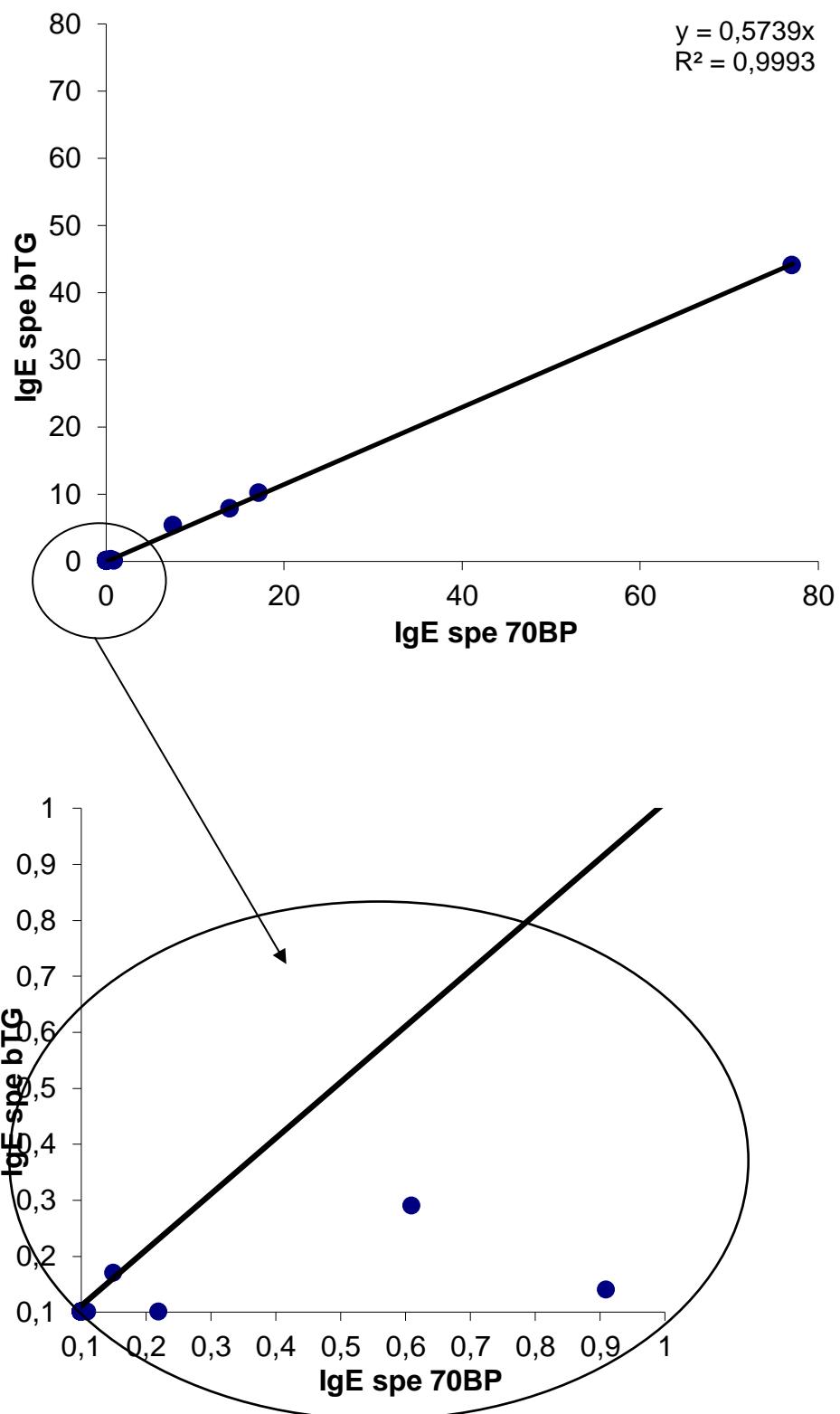


Figure 4. Correlation between the two assays (70BP and bTG) to detect presence of IgE in the 41 cancer patients ($r^2 = 0,99$).

TABLES

Table 1. Selection of the best α -galactosylated antigen in our developed assay*.

	70BM / 8BM	70BP / 8BP	10BP / 37BP	PBS
Serum 1	1.26 / <0.10	3.17 / <0.10	1.42 / <0.10	<0.10
Serum 2	0.27 / <0.10	0.76 / <0.10	0.39 / <0.10	<0.10
Serum 3	0.37 / <0.10	0.37 / <0.10	0.35 / <0.10	<0.10

*Concentrations measured for three representative sera with the three antigen pairs described in Fig 2.

Table 2. Detection of anti- α 3Gal IgE in a cohort of blood donors with our developed (70BP) and commercial (bTG) assays: Prevalence of anti- α 3Gal IgE depending on age, gender, blood groups and atopic markers (Total IgE and Phadiatop®).

	70 BP assay				bTG assay		
	Total	Positive	Negative	<i>p</i>	Positive	Negative	<i>p</i>
Number	299	18	281	-	15	284	-
Mean age	38.4	42.1	38.1	0.33	39.5	38.3	0.84
B or AB groups	39	1	38	0.49	0	39	0.23
O or A groups	260	17	243		15	245	
Gender M/F	164/135	15/3	149/132	0.014	12/3	152/132	0.06
Mean total IgE	114.2	135.7	112.8	0.11	198.0	109.7	0.03
Total IgE >150/<150	61/238	4/14	57/224	0.77	6/9	55/229	0.09
Phadiatop® +/-	96/203	7/11	89/192	0.60	3/12	93/191	0.4

Table 3. Cancer patient characteristics.

	Total	Grade 3-5 anaphylactic reaction	No anaphylactic reaction	p
Number	41	4	37	-
Mean age	63.6	56.4	63.8	0.11
Gender Male/Female	36/5	4/0	32/5	1
Metastasis: Yes/No	18/23	2/2	16/21	1
Alcohol: Yes/No	29/12	4/0	25/12	0.30
Tobacco: Yes/No	31/10	4/0	27/10	0.56
Allergy: Yes/No	11/30	1/3	10/27	1
Mean total IgE*	353.9	1042.5	279.4	0.05
Total IgE>150/<150*	17/24	3/1	14/23	0.29
Phadiatop® +/-	12/29	3/1	9/28	0.07

* Dosage before cetuximab first infusion.

Table 4. Detection of anti- α 3Gal IgE in a cohort of 41 head and neck cancer patients treated with cetuximab, with our developed (70BP) and commercial (bTG) assays.

		70BP assay			bTG assay			
		Total	Positive	Negative	p	Positive	Negative	p
Number		41	7	34	-	6	35	-
Mean age		63.0	57.4	64.2	0.05	59.3	63.7	0.18
Gender M/F		36/5	7/0	29/5	0.57	6/0	30/5	1
Mean total IgE*		353.9	725.3	277.4	0.09	844.2	269.8	0.02
IgE>150/<150*		17/24	5/2	12/22	0.11	5/1	12/23	0.07
Phadiatop® +/-		12/29	4/3	8/26	0.17	4/2	8/27	0.05

* Dosage before cetuximab first infusion.

Table 5. Repartition of positive and negative signal for both assays regarding anaphylactic reaction.

Grade 3-5 anaphylactic reaction			No anaphylactic reaction	Total	Grade 3-5 anaphylactic reaction			No anaphylactic reaction	Total
70BP	4		3	7	bTG	4		2	6
+					+				
70BP	0		34	34	bTG	0		35	35
-					-				
Total	4		37	41	Total	4		37	41

VI. **Pointreau Y, Azzopardi N, Ternant D, Calais G, Paintaud G.**

Influence of infusion intervals on cetuximab concentrations: a simulation study in head and neck cancers.

Manuscrit rédigé.

Title page

Influence of infusion intervals on cetuximab concentrations: a simulation study in head and neck cancers

Yoann Pointreau^{a, b}, Nicolas Azzopardi^a, David Ternant^{a, c}, Gilles Calais^b, Gilles Paintaud^{a, c}

^a Université François-Rabelais de Tours, CNRS, GICC UMR 7292, Tours, France

^b CHRU de Tours, Service de Radiothérapie, Tours, France

^c CHRU de Tours, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie

Correspondence: Yoann Pointreau, MD, Department of Radiotherapy 2 Boulevard Tonnellé, 37044 TOURS Cedex 9, FRANCE. Phone: +33(0) 247 478 265 - Fax: +33(0) 247 476 012 - e-mail: pointr_y@yahoo.fr

Concise title: Cetuximab simulation pharmacokinetics

Key words: head and neck cancer, cetuximab, pharmacokinetics simulation.

Abstract

Purpose: In first indications, cetuximab, an anti-EGFR monoclonal antibody, is administered once a week. However, it is often administered every two weeks intervals in metastatic colorectal cancers to gain treatment flexibility when combined with chemotherapy regimens given with two weeks intervals.

The aim of our study was to compare the serum concentrations of cetuximab following its infusion with different injection intervals in patients treated for head and neck cancer, using pharmacokinetic simulation.

Methods: Population pharmacokinetic parameters of cetuximab were obtained from a study performed in metastatic head and neck cancer, and a virtual cohort of 5,000 patients was generated. This cohort was used to study three different dosing schedules. Dosage 1 was the standard 400 mg/m² loading dose followed by 250 mg/m² every week. Dosages 2 and 3 were every two or three week infusions of 500 mg/m² and 750 mg/m² of cetuximab, respectively.

Results: No significant difference was observed between AUCs and global clearance of the three dosages. But patients treated with 750 mg/m² every three weeks had the lower residual concentrations: 5% of them had no circulated cetuximab at 84 days.

Conclusions: The influence of non-linearity in elimination is especially apparent with the every three weeks infusion of 750 mg/m² of cetuximab, since it leads to the lowest residual concentrations. Additional studies are therefore warranted to select the proper dose of cetuximab if infusion interval is increased.

Introduction

Cetuximab is a chimeric human-mouse immunoglobulin G1 kappa monoclonal antibody directed against the extracellular ligand-binding domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). It is approved in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in association with radiotherapy [1,2] and in recurrent or metastatic HNSCC in association with chemotherapy [3]. It is also approved in metastatic colorectal cancer (mCRC) alone or in combination with chemotherapy regarding RAS mutations [4-10]. Adjunction of cetuximab for the treatment of these cancers improves overall survival (OS) and/or progression free survival (PFS) [1-3]. In both indications, registered dosing regimen is an intravenous (IV) loading dose of 400 mg/m² followed by a 250 mg/m² weekly infusion.

Several studies reported a wide interindividual variability of cetuximab pharmacokinetics [11,12]. A relationship between cetuximab residual concentrations and both objective response and progression-free survival was described. Fracasso et al. observed, in patients treated for different types of carcinomas, that responders had higher cetuximab trough serum concentrations than non-responders [13]. In mCRC, cetuximab global clearance was found to be negatively related to PFS and cetuximab trough serum concentration on day 14 as factors influencing progression-free survival [12]. In HNSCC, PFS and OS were also significantly associated with cetuximab global clearance [14].

Cetuximab is currently used in combination with chemotherapy, the latter being administered every two weeks in mCRC [15-20] and every three weeks in HNC [3]. The adjustment of cetuximab injection interval to that of chemotherapy is very appealing. It would represent an undeniable comfort for the patient and substantial cost savings for medical services. In mCRC, a dosing regimen of 500 mg/m² every two weeks is indeed already widely used. A dosing regimen of 500 mg/m² every two weeks was used in clinical trial for HNSCC [21]. Concentrations obtained with these two dosing regimens were compared but not in a formal bioequivalence study [15]. Skin toxicity grade, clinical response or progression-free survival observed with the two dosing regimens were reported to be similar [16-18]. However, they included a small number of patients.

Infusion intervals of three weeks are used for others monoclonal antibodies as trastuzumab or bevacizumab. However, such a dosing regimen was not reported for cetuximab. Indeed, alteration of infusion intervals is complex because cetuximab pharmacokinetics are dose-dependent [11,15,22-24]. This dose-dependency may lead to under-exposure of patients if thrice the weekly dose (750 mg/m²) of cetuximab is administered every three weeks.

Because cetuximab concentrations influence clinical response in HNSCC and mCRC patients, a reasoned optimization of cetuximab dosage should be based on both its pharmacokinetics and concentration–effect relationship. We have recently developed a pharmacokinetic model describing cetuximab concentrations of HNSCC patients [14]. Clinical trial simulation does not replace “real” clinical trials but it is the best method to test different doses and dosing regimens *in silico* to optimize the design of future clinical trials. Indeed, clinical trial simulation is increasingly used in drug development [25,26]. The aim of the present study was to compare through serum concentrations and cumulative area under concentrative-time curves (AUC) and global clearance of cetuximab obtained by different dosing regimens using simulation.

Methods

Pharmacokinetic model

Cetuximab pharmacokinetic parameters of 5,000 virtual patients were generated using our population model developed in patients treated for HNSCC [14]. This is a two-compartment model with both first-order and saturable (zero-order) elimination. For simulation, no covariate was included. Mean (standard deviation of exponential interindividual variability model) parameters were: central and peripheral volumes of distribution $V_1 = 3.18$ L (0.09) and $V_2 = 5.40$ L (0.82); distribution and elimination clearances $Q = 0.64$ L/day (0.09) and CL

= 0.57 L/day (0.07); and zero order elimination rate $k_0 = 6.72$ mg/day (3.70). Body surface area (BSA) was simulated for all patients with a mean of 1.72m².

Dosing regimens

For all 5.000 virtual patients, three simulations were performed using different dosing regimens. Dosage 1 was the recommended one, (i.e. 400 mg/m² loading dose followed by 250 mg/m² every week). Dosage 2 were 500 mg/m² of cetuximab every two weeks interval injections. Dosage 3 were 750 mg/m² of cetuximab every three weeks interval injections.

Simulations and statistical analyses

Simulations were performed using R. Concentrations, global clearance and cumulative AUC were estimated every hour for 84 days. For the three dosing regimens, residual concentrations on day 84 and cumulative AUC at day 84 were compared.

Results

The distribution of cumulative AUC obtained with the three dosages was compared without objective difference (Figure 1 and Table 1).

The distribution of global clearance obtained with the three dosages was compared without objective difference (Figure 2 and Table 1).

The three tested dosing regimens lead to widely different profiles of cetuximab residual concentrations : patients treated with 750 mg/m² every three weeks had the lower residual concentrations with 5% of them had no circulated cetuximab at day 84 (Figure 3 and Table 1) with a potential impact on efficacy for patients.

Discussion

Pharmacokinetic simulations use models and estimated parameters to predict concentration-time profiles in large populations of patients. This technique provides information for decision making and is beneficial for different situations: sparse data, predictions from single dosing to multiple dosing, formulation changes or simulation of further clinical trials [27-29]. Simulation methods are increasingly used [26,30,31]. Simulation is notably recommended in specific populations (e.g. paediatric studies and studies with obese patients) to replace empirically based dose selection [32]. In addition, experts agree that modelling and simulation methods are very useful in the development and use of anti-cancer drugs [28]. Simulation may be particularly useful for drug with dose-dependent pharmacokinetics once a satisfactory model is developed. Because there is a trend towards the spacing of cetuximab infusions, we tested the consequences of such dosage alterations.

The influence of cetuximab non-linearity in elimination is especially apparent with the 750 mg/m² infusion every three weeks, where a deviation from log-linear concentration decrease is observed at low values. since concentrations remains relatively high. The administration of 400-250 mg/m² cetuximab weekly and of 500 mg/m² cetuximab every other week lead to similar cumulated AUCs and global clearance. However, 750 mg/m² every three weeks did not lead to significantly different cumulated AUCs and global clearance as compared with Dosage 1 and 2, it lead to residual concentrations significantly lower than those obtained with standard dosage. These low residual concentrations may indeed be relevant since Fracasso et al. observed [13], in patients treated for different types of carcinomas, that progressive disease patients had a low median cetuximab through concentration (around 30 mg/L) than stable and responder patients. In addition, Dosages 2 and 3 lead to cetuximab peak concentrations higher than those obtained by dosage 1. Cetuximab binds to EGFR, a membrane transduction signal protein which is present in limited quantities at the surface of tumor cells as well as of epithelial cells, and was shown in in vitro studies to stop the transduction signal. However, some in vitro studies have demonstrated that high cetuximab concentrations can phosphorilate EGFR and thus could be responsible for signal transduction [33,34] . An agonist effect of cetuximab may therefore be observed at high peak concentrations.

The results of the present simulations can be used to design clinical trials testing different dosing regimens. The potential influence of low residual concentrations or of high peak concentrations should indeed be tested in prospective clinical trials.

References

1. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354: 567-78.
2. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 2010; 11: 21-8.
3. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1116-27.
4. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-45.
5. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 663-71.
6. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol* 2011; 22: 1535-46.
7. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2015; 51: 1243-52.
8. Sclafani F, Gonzalez D, Cunningham D, et al. RAS mutations and cetuximab in locally advanced rectal cancer: results of the EXPERT-C trial. *Eur J Cancer* 2014; 50: 1430-6.
9. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 1408-17.
10. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2011-9.
11. Dirks NL, Nolting A, Kovar A, et al. Population pharmacokinetics of cetuximab in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pharmacol* 2008; 48: 267-78.
12. Azzopardi N, Lecomte T, Ternant D, et al. Cetuximab pharmacokinetics influences progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6329-37.
13. Fracasso PM, Burris H III, Arquette MA, et al. A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 986-93.
14. Pointreau Y, Azzopardi N, Ternant D, Calais C, Paintaud G. Cetuximab pharmacokinetics influences overall survival in head and neck cancer patients. *Ther Drug Monit* 2015; submitted article.

15. Tabernero J, Ciardiello F, Rivera F, et al. Cetuximab administered once every second week to patients with metastatic colorectal cancer: a two-part pharmacokinetic/pharmacodynamic phase I dose-escalation study. *Ann Oncol* 2010; 21: 1537-45.
16. Shitara K, Yuki S, Yoshida M, et al. Phase II study of combination chemotherapy with biweekly cetuximab and irinotecan for wild-type KRAS metastatic colorectal cancer refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *Invest New Drugs* 2012; 30: 787-93.
17. Schoennemann KR, Bjerregaard JK, Hansen TP, et al. Biweekly cetuximab and irinotecan as second-line therapy in patients with gastro-esophageal cancer previously treated with platinum. *Gastric Cancer* 2011; 14: 219-25.
18. Kang MJ, Hong YS, Kim KP, et al. Biweekly cetuximab plus irinotecan as second-line chemotherapy for patients with irinotecan-refractory and KRAS wild-type metastatic colorectal cancer according to epidermal growth factor receptor expression status. *Invest New Drugs* 2012; 30: 1607-13.
19. Fernandez-Plana J, Pericay C, Quintero G, et al. Biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 in the first-line treatment of wild-type KRAS metastatic colorectal cancer: final results of a phase II, open-label, clinical trial (OPTIMIX-ACROSS Study). *BMC Cancer* 2014; 14: 865.
20. Pfeiffer P, Sorbye H, Qvortrup C, et al. Maintenance Therapy With Cetuximab Every Second Week in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: The NORDIC-7.5 Study by the Nordic Colorectal Cancer Biomodulation Group. *Clin Colorectal Cancer* 2015; 14: 170-6.
21. Guigay J, Fayette J, Dillies AF, et al. Cetuximab, docetaxel, and cisplatin as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a multicenter, phase II GORTEC study. *Ann Oncol* 2015; 26: 1941-7.
22. Baselga J, Pfister D, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000; 18: 904-14.
23. Robert F, Ezekiel MP, et al. Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3234-43.
24. Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, et al. Pharmacokinetics of cetuximab after administration of escalating single dosing and weekly fixed dosing in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6517-22.
25. Girard P, Cucherat M, et al. Clinical trial simulation in drug development. *Therapie* 2004; 59: 287-304.
26. Holford N, Ma SC, et al. Clinical trial simulation: a review. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88: 166-82.
27. Aarons L, Karlsson MO, et al. Role of modelling and simulation in Phase I drug development. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13: 115-22.
28. Rombout F, Aarons L, et al. Modelling and simulation in the development and use of anti-cancer agents: an underused tool? *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2004; 31: 419-40.
29. Bruno R, Washington CB, et al. Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2+ metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 361-9.
30. Gieschke R and Steimer JL. Pharmacometrics: modelling and simulation tools to improve decision making in clinical drug development. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2000; 25: 49-58.

31. Bauer R, Guzy JS, et al. A survey of population analysis methods and software for complex pharmacokinetic and pharmacodynamic models with examples. *Aaps J* 2007; 9: E60-83.
 32. Anderson BJ, Allegaert K, et al. "Population clinical pharmacology of children: general principles. *Eur J Pediatr* 2006; 165: 741-6.
 33. Mandic R, Rodgarkia-Dara CJ, et al. Treatment of HNSCC cell lines with the EGFR-specific inhibitor cetuximab (Erbitux) results in paradox phosphorylation of tyrosine 1173 in the receptor. *FEBS Lett* 2006; 580: 4793-4800.
 34. Yoshida T, Okamoto I, et al. Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by Akt or Erk. *Int J Cancer* 2008; 122: 1530-8.
- .

Figures

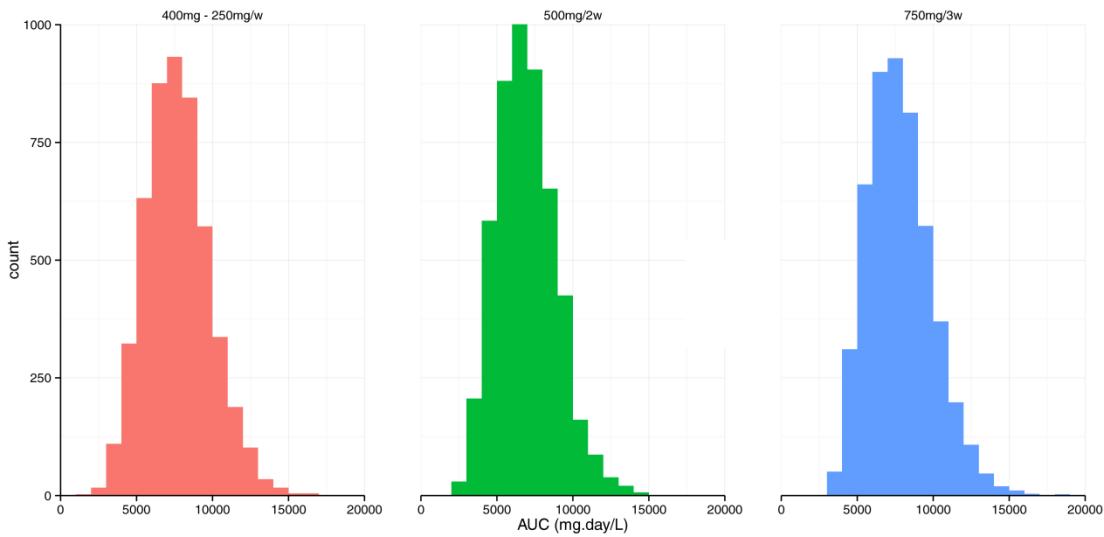


Figure 1: Distribution of cetuximab AUC simulation at day 84 for three different cetuximab dosages. – In red, 400 mg/m² followed by 250 mg/m² every week – In green, 500 mg/m² every two weeks – In blue, 750 mg/m² every three weeks.

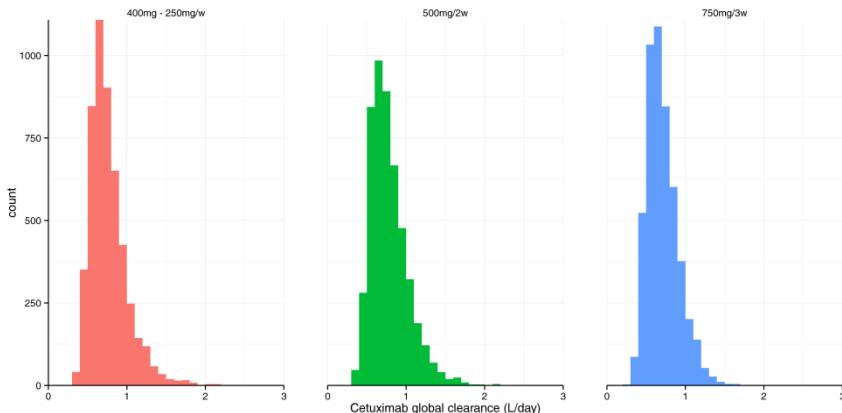


Figure 2: Distribution of cetuximab global clearance simulation at day 84 for three different cetuximab dosages. – In red, 400 mg/m² followed by 250 mg/m² every week – In green, 500 mg/m² every two weeks – In blue, 750 mg/m² every three weeks.

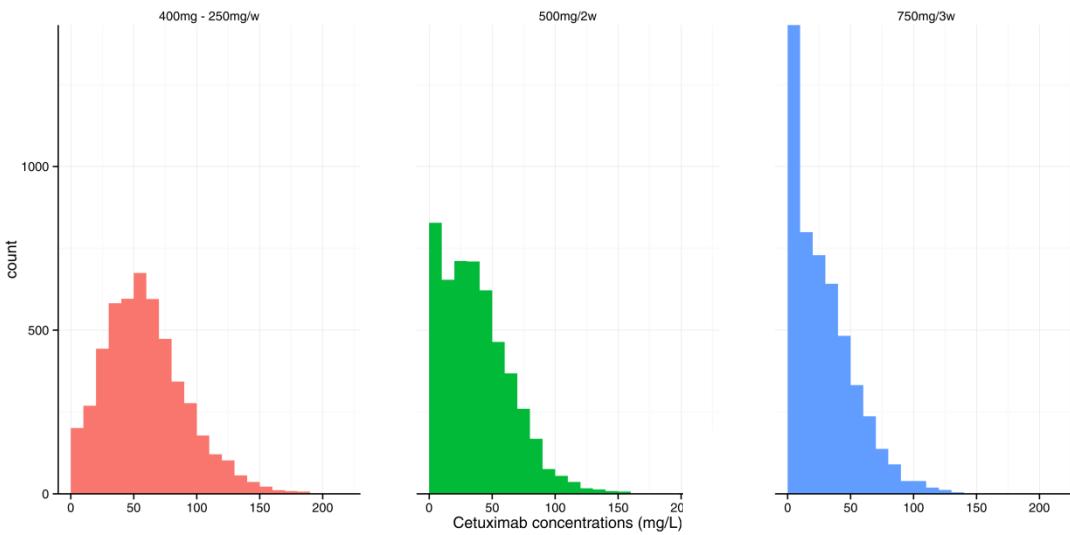


Figure 3: Distribution of cetuximab residual concentration simulation at day 84 for three different cetuximab dosages. – In red, 400 mg/m² followed by 250 mg/m² every week – In green, 500 mg/m² every two weeks – In blue, 750 mg/m² every three weeks.

Table

- Table 1: Quantile of the distribution of cumulative AUC, global clearance and residual concentrations at day 84 regarding the cetuximab dosages into a 5000 virtual patients.

		Quantile of cetuximab residual concentration at day 84(mg/L)					Quantile of cetuximab cumulative AUC at day 84 (g/L/jour)				
Dosages (mg/m ²)	τ in week	5%	25%	50%	75%	95%	5%	25%	50%	75%	95%
400 - 250	1	12,7	36,1	56,4	78,0	119,4	4,5	6,2	7,6	9,0	11,5
500	2	0,0	16,5	34,0	54,1	87,3	4,0	5,5	6,8	8,2	10,3
750	3	0,0	7,6	23,8	42,6	76,3	4,7	6,3	7,6	9,2	11,8

Quantile of cetuximab global clearance at day 84 (L/j)

Dosages (mg/m ²)	τ in week	5%	25%	50%	75%	95%
400 - 250	1	0,47	0,60	0,72	0,87	1,22
500	2	0,48	0,60	0,73	0,91	1,23
750	3	0,44	0,57	0,68	0,82	1,09

Etude des sources de variabilité de l'efficacité et des effets indésirables du cetuximab chez les patients traités pour un carcinome épidermoïde de la tête et du cou

Résumé

Le cetuximab (CTX) est un anticorps monoclonal anti-EGFR indiqué dans les cancers ORL dont les modalités de prescription pourraient être améliorées. Après chimiothérapie d'induction (étude Tremplin), en comparaison au cisplatine, il était moins毒ique mais sans améliorer la préservation laryngée. À la première injection, le CTX peut déclencher un choc anaphylactique lié à la préexistence d'IgE anti- α Gal. Des tests prédictifs détectant ces IgE ont été développés et réalisés chez 41 patients avec une sensibilité et une valeur prédictive négative de 100%. La relation entre concentrations sériques et efficacité/toxicité a été étudiée chez 34 patients. La pharmacocinétique a été décrite à l'aide d'un modèle combinant des mécanismes d'élimination non saturable (CL) et saturable (k_0). La clairance globale du CTX, reflet de l'exposition des patients, était reliée aux survies sans progression et globale (SG). Le grade de radiodermite était associé à la SG. Une simulation pharmacocinétique suggère, qu'en comparaison à l'injection standard de CTX, une injection toutes les trois semaines entraînera des AUC proches mais des concentrations résiduelles différentes.

Mots clés : Cetuximab, cancers ORL, anaphylaxie, IgE anti- α Gal, pharmacocinétique, toxicité, survie, relation dose-réponse.

Résumé en anglais

Cetuximab (CTX) is an anti-EGFR monoclonal antibody approved in head and neck cancer, which prescription modalities may be improved. After induction chemotherapy (Tremplin study), compared to cisplatin, CTX was less toxic but did not improve larynx preservation. During first infusion, CTX can induce an anaphylaxis reaction due to the presence of preexisting anti- α Gal IgE. Predictive assays detecting these IgE were developed and tested in 41 patients, with sensitivity and negative predictive values of 100%. Relationship between serum concentrations and efficacy/toxicity was studied in 34 patients. CTX pharmacokinetics was described using a model combining non-saturable (CL) and saturable (k_0) eliminations. Global clearance, which reflects patient exposure, was related to progression free and overall (OS) survivals. Severe radiation dermatitis was also associated with OS. A pharmacokinetic simulation suggests that, in comparison to standard CTX infusion, an infusion every three weeks will lead to similar AUC but to different residual concentrations.

Keywords: Cetuximab, head and neck cancers, anaphylaxis, anti- α Gal IgE, pharmacokinetics, toxicity, survival, dose-response relationship.