



HAL
open science

Marqueurs prédictifs de réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique - Exemple d'analyse intégrée de marqueurs multiples

Anne-Sophie Chrétien

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Chrétien. Marqueurs prédictifs de réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique - Exemple d'analyse intégrée de marqueurs multiples. Sciences pharmaceutiques. 2011. hal-01733069

HAL Id: hal-01733069

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733069>

Submitted on 14 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

2011

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de Pharmacie Spécialisée

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 8 Novembre 2011

par Anne-Sophie CHRETIEN
née le 17 Mai 1981

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Marqueurs prédictifs de réponse
aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le
cancer colorectal métastatique
Exemple d'analyse intégrée de marqueurs multiples

Membres du Jury

Président :	Mr Jean-Louis MERLIN,	Professeur,	Faculté de Pharmacie de Nancy 1
Juges :	Mme Geneviève UBEAUD-SEQUIER,	Professeur,	Faculté de Pharmacie de Strasbourg
	Mr Jean VIGNERON,	Pharmacien,	CHU de Nancy
	Mr Renaud FAY,	Pharmacien,	CHU de Nancy

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2010-2011

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :
Pharmaceutique Hospitalier**

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES
HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL.....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL.....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND.....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	Chimie Physique
Cédric BOURA	Physiologie
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Roudayna DIAB.....	Nanotechnologies pharmaceutiques
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie - Génie Biologique
Adil FAIZ.....	Biophysique-acoustique

Luc FERRARI	Toxicologie
Caroline GAUCHER DI STASIO.....	Expertise biopharmacologique
Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	Chimie organique
Frédéric JORAND	Santé et environnement
Olivier JOUBERT.....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	Hématologie biologique
Christophe MERLIN	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDICAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY	Santé publique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Marie SOCHA.....	Pharmacie clinique
Julien PERRIN.....	Hématologie

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	Sémiologie
--------------------------	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	Anglais
--------------------------	---------

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET.....	Directeur
--------------------------	-----------

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin,

Pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour votre disponibilité, vos conseils, votre confiance, et surtout pour votre accueil au sein de votre laboratoire pendant ces quatre années, veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect ainsi que toute ma reconnaissance.

A Madame le Professeur Geneviève Ubeaud-Sequier,

Je tiens à vous remercier sincèrement de me faire l'honneur de consacrer du temps à la lecture et à l'évaluation de ce manuscrit. Je vous suis reconnaissante pour le regard expert et critique que vous pourrez porter sur ce travail.

A Monsieur le Docteur Renaud Fay,

Je vous remercie en particulier pour votre présence dans ce jury de thèse qui représente l'opportunité de soumettre ce travail à votre critique au travers du point de vue du pharmacien et du biostatisticien.

A Monsieur le Docteur Jean Vigneron,

Je suis honorée de vous compter parmi mes juges et vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de toute ma gratitude.

A toute l'équipe de l'Unité de Biologie des Tumeurs,

Je tiens à vous remercier pour tout le travail technique effectué. Merci également pour tous ces bons moments passés ensemble. Vraiment je regretterai longtemps ces quatre années passées au Centre Alexis Vautrin en votre compagnie. Bonne continuation!

A Monsieur le Professeur Laurent-Puig,

Je tiens à remercier tout particulièrement le Pr. Laurent-Puig pour cette collaboration.

A Monsieur le Professeur Jean-Marie Monnez, Thierry Bastogne et Valentin Harter,

Un très grand merci pour l'aspect mathématique que vous m'avez permis d'intégrer à ce travail de thèse, et de manière plus générale à plusieurs de nos travaux et projets.

A Denise,

Encore merci pour ta relecture minutieuse et ton soutien lors de la rédaction de cette thèse.

Bon courage pour ton post doc!

A ma famille,

Un très grand merci pour votre soutien et surtout pour l'intérêt que vous portez à ces travaux de recherche, ainsi que pour toute votre compréhension lors de ces années de thèse.

A Mathieu,

Merci pour ton soutien et toute ton attention pendant ces mois de rédaction. Merci surtout pour ta présence et ton écoute si patiente.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	p. 11
INTRODUCTION GÉNÉRALE	p. 14
CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	p. 16
I. Cancer colorectal – Epidémiologie	p. 17
II. Oncogénèse colorectale	p. 17
III. Cancer colorectal métastatique	p. 19
IV. Thérapies ciblées et cancer colorectal métastatique	p. 26
IV.1. Généralités sur les thérapies ciblées	p. 26
IV.2. Notion de cible thérapeutique	p. 26
IV.3. Inhibiteurs de tyrosine kinase	p. 28
IV.4. Anticorps monoclonaux	p. 28
IV.4.1. Inhibiteurs de l'angiogénèse	p. 29
IV.4.2. Anticorps anti-EGFR	p. 34
IV.4.2.1. Cétuximab	p. 34
IV.4.2.2. Panitumumab	p. 38
V. EGFR, signalisation en aval d'EGFR et mise en évidence de marqueurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR	p. 40
V.1. Généralités sur les biomarqueurs	p. 40
V.2. Généralités sur les récepteurs HER	p. 42
V.3. Fonctionnement des récepteurs HER – Exemple d'EGFR	p. 44
V.3.1. Activation du récepteur par un ligand	p. 46
V.3.2. Transduction du signal en aval des récepteurs HER	p. 48
V.4. Mise en évidence de biomarqueurs prédictifs de résistance aux anti-EGFR	p. 51
V.4.1. Expression d'EGFR	p. 51

V.4.2. Voie des RAS/RAF/MAPK	p. 52
V.4.3. Voie des PI3K/AKT	p. 58
V.4.4. Autres marqueurs	p. 63
CHAPITRE II : PARTIE EXPÉRIMENTALE	p. 67
I. Introduction	p. 68
II. Patients et méthodes	p. 72
III. Résultats	p. 74
III.1. Analyse en composante principale (ACP) et analyse discriminante linéaire (LDA)	p. 74
III.2. Qualité de classement	p. 76
III.3. Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives	p. 76
III.4. Survie globale et survie sans progression	p. 76
IV. Discussion	p. 79
VI. Conclusion	p. 88
ANNEXE I – CLASSIFICATION TNM	p. 90
ANNEXE II – ABSTRACT ET COMMUNICATION AFFICHÉE - Ann Oncol 21 suppl 8, 2010 (abstr 589P)	p. 91
BIBLIOGRAPHIE	p. 94
TABLE DES FIGURES	p. 108
Liste des Tableaux	p. 110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-FU :	5-Fluoro Uracile
ACP :	Analyse en Composante Principale
ADCC :	Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADP :	Adénosine Di-Phosphate
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN :	Acide RiboNucléique
ATP :	Adénosine Tri-Phosphate
AKT :	Protéine kinase B
ARN:	Acide RiboNucléique
ASMR:	Amélioration du Service Médical Rendu
BRAF :	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSC :	Best Supportive Care
CCRm:	Cancer ColoRectal métastatique
CIN :	Chromosomic Instability
CISH :	Chromogenic In Situ Hybridization
CR :	Complete Response
DNA :	DesoxyriboNucleic Acid
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA:	European MEdicines Agency
ERK 1/2 :	Extracellular signal Regulated Kinase 1/2
FDA :	Food and Drugs Administration
FGF2 :	Fibroblast Growth Factor 2
FGFR :	Fibroblast Growth Factor Receptor
FISH :	Fluorescent In Situ Hybridization
FOLFIRI :	5-Fluoro Uracile/Irinotécan
FOLFIRINOX:	5-FU/Acide folinique/Irinotécan/Oxaliplatine
FOLFOX :	5-FU/Oxaliplatine
GAP :	GTPase-Activating Proteins
GIST :	GastroIntestinal Stromal Tumor

GLUT4:	Glucose transporter type 4
Grb2:	Growth factor Receptor Binding protein 2
GSK3 β :	Glycogene Synthase Kinase 3 β
HER :	Human Epidermal growth factor Receptor
HRAS:	Harvey RAAt Sarcoma virus
HRM :	High Resolution Melting
IGF1R:	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IRINOX:	Irinotécan/ Oxaliplatine
iNOS:	Inductible NO Synthase
JAK :	JANus Kinase
<i>KRAS</i> :	Kirsten RAAt Sarcoma virus
LDA :	Linear Discriminant Analysis
LV:	Leucovorin
LV-5FU:	Leucovorin/5-FU
MAPK:	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK1 :	Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase–activating kinase 1
MMR:	MisMatch Repair
MSI:	MicroSatellite Instability
mTOR :	mammalian Target Of Rapamycin
NIH :	National Institute of Health
NRAS:	Neuroblastoma RAAt Sarcoma virus
NRP1:	NeuRoPiline 1
OS:	Overall Survival
P70S6K :	P70 ribosomal protein S6 Kinase
P90RSK:	P90 Ribosomal S6 Kinase
pAKT :	phospho-AKT
pEGFR:	phospho-EGFR
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PD:	Progressive Disease
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR :	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
pERK1/2:	phospho-ERK 1/2
PFS:	Progression Free Survival
pGSK3 β :	phospho-GSK3 β

PI3K :	Phosphatidylinositol 3-OH kinase
PIP2 :	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIP3 :	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
PLC γ :	PhosphoLipase C γ
pMEK1:	phospho-MEK1
pP70S6K:	phospho-P70S6K
pP90RSK:	phospho- P90 Ribosomal S6 Kinase
PR:	Partial Response
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
RAS:	Rat Sarcoma
RAF:	Rat Fibrosarcoma virus
RECIST :	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR:	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
VEGFR:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
SD:	Stable Disease
Src:	Sarcoma
STAT3:	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SVM:	Séparateurs à Vastes Marges
TGF α :	Transforming Growth Factor α
TGF β :	Transforming Growth Factor β
TNM:	Tumor Node Metastasis
TOMIRI:	Raltitrexed/Irinotécan
TOMOX:	Raltitrexed/Oxaliplatine
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
Wnt:	Wingless site
XELOX:	Xeloda oral/Oxaliplatine
XELIRI:	Xeloda pram/Irinotécan

INTRODUCTION GÉNÉRALE:

En cancérologie, la dernière décennie a été marquée par des progrès majeurs : diminution de la mortalité par cancer, augmentation des durées de survies et des pourcentages de rémission complète, émergence de nouvelles options thérapeutiques (4).

D'après le bilan annuel des avancées thérapeutiques, et sur la base des avis rendus par la Commission de transparence de la Haute Autorité de Santé, l'oncologie apparaît comme l'un des domaines les plus porteurs en termes d'innovations. A eux seuls, les cancers représentent près du tiers des situations thérapeutiques améliorées et se voient attribuer la totalité des ASMR (amélioration du service médical rendu) de niveau I et II (respectivement progrès thérapeutique majeur et amélioration importante en termes d'efficacité et/ou de réduction des effets indésirables) en 2008. En 2009, près de 25% des molécules considérées comme améliorant le service médical rendu sont des anticancéreux.

La tendance actuelle, en ce qui concerne les objectifs à court et moyen terme, porte essentiellement sur la compréhension des mécanismes de la cancérogenèse, la prévention, le dépistage, le développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, l'amélioration de la qualité de vie des patients, ainsi que le développement de marqueurs diagnostiques, pronostiques, ou encore prédictifs de réponse aux traitements.

Parmi les progrès techniques les plus marquants se situent les avancées en génomique et protéomique, permettant la caractérisation moléculaire des tumeurs (5). Les conséquences cliniques de ces découvertes donnent accès à une meilleure connaissance de la biologie des cancers, et ont permis la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques aboutissant au développement des thérapies ciblées.

Les thérapies ciblées, qu'il s'agisse d'anticorps monoclonaux ou d'inhibiteurs de tyrosine kinase, ont révolutionné la prise en charge de nombreuses pathologies, telles que les cancers du sein, du rein, du colon ou encore les mélanomes. Cependant, leur efficacité est très variable d'un patient à l'autre, et la nécessité d'identifier les patients à même de présenter une réponse clinique s'est rapidement imposée. Ainsi, le développement des biomarqueurs dits prédictifs de réponse thérapeutique est en plein essor, et les tendances actuelles sont au co-

développement de nouvelles molécules et de leur "companion diagnostics" (6); le but est ainsi de proposer d'emblée une autorisation de mise sur le marché (7) conditionnelle, c'est-à-dire restreinte à des populations cible bien spécifiques chez qui le traitement proposé aura une probabilité non nulle de procurer des bénéfices cliniques significatifs.

Comme nous le verrons, ces approches nécessitent le travail d'équipes transdisciplinaires (oncologues, pathologistes, biologistes) autour de programmes de recherche translationnelle. Ces nouvelles approches ouvrent l'ère de la médecine personnalisée, qui devrait se développer dans les prochaines décennies, et permettre d'adapter les schémas thérapeutiques, les plans de prise, les posologies, en fonction des caractéristiques propres à chaque patient. Dans cette démarche de médecine personnalisée, les paramètres actuellement pris en compte sont essentiellement les paramètres cliniques, ou encore les données histopathologiques, mais les profils moléculaires tumoraux représentent une source importante d'informations et de paramètres conditionnant l'efficacité du traitement. C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail de thèse, qui s'efforce ainsi de donner un aperçu des mécanismes d'action et de résistance aux thérapies ciblées, et d'introduire la notion de biomarqueurs. Une partie expérimentale, réalisée sur des échantillons tumoraux, illustre ce concept au travers d'applications potentielles au traitement du cancer colorectal métastatique par anticorps anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).

CHAPITRE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. CANCER COLORECTAL – EPIDÉMIOLOGIE

Le cancer colorectal en France constitue la première cause de mortalité par cancer et représente le cancer le plus fréquent tous sexes confondus (8). En Europe, le nombre de décès s'élève à 212 000 cas en 2008 (9) ; en France, son incidence est d'environ 37 000 cas par an, dont 53% chez les hommes, et la mortalité par cancer colorectal représente près de 17 000 décès par an (10). Le taux d'incidence corrigé par l'âge est légèrement plus élevé chez les hommes que chez les femmes, (37,7 et 24,5 pour 100 000 habitants respectivement). L'augmentation du nombre de cas de cancer colorectal est en grande partie due à l'augmentation de l'âge moyen de la population française. En effet, à partir de 45 ans, le risque est doublé à chaque décennie (11).

Les taux de mortalité ont diminué depuis les années 80 (10) et les tendances observées ces dernières années se stabilisent. La survie relative à 5 ans est de 57% tous stades confondus (11). La diminution de mortalité au cours de la dernière décennie peut être attribuée au dépistage et à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique. La médiane de survie des patients atteints de cancer colorectal métastatique inclus dans des essais thérapeutiques est passée d'approximativement 6 mois à 2 ans (12). Cette augmentation peut s'expliquer par deux avancées dans la prise en charge des patients: la première est l'introduction de nouvelles molécules dont les agents biologiques. La seconde est l'approche multidisciplinaire du cancer colorectal métastatique, avec une amélioration des techniques de résection, en particulier des métastases hépatiques (Figure 1) (12).

II. ONCOGÈNE COLORECTALE

On estime que plus de 90% des cas de cancer colorectal sont sporadiques. Il existe également des formes familiales, moins fréquentes, telles que le syndrome de Lynch ou encore la polypose adénomateuse familiale. Le syndrome de Lynch est une maladie à transmission autosomique dominante et correspond à l'altération des gènes MMR (Mis-Match Repair), famille de gènes impliquée dans la réparation des mésappariements de l'ADN. La polypose adénomateuse familiale est également une altération à transmission autosomique dominante et représente 1 à 2% des cancers colorectaux, et correspond à une mutation du gène ACP.

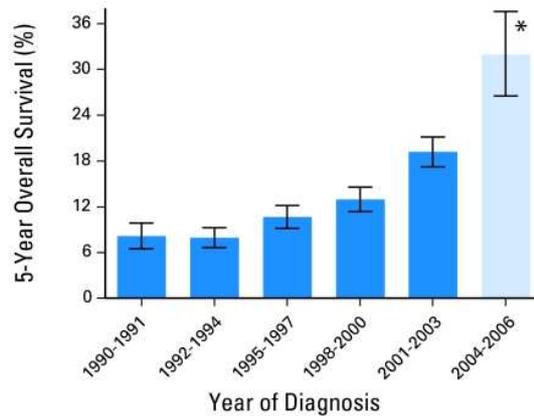


Figure 1 : Résultats d’une étude rétrospective représentant la survie à 5 ans des patients atteints de cancer colorectal métastatique entre 1990 et 2006. L’augmentation de la survie à 5 ans entre 1998 et 2004 est imputable à une modification des pratiques chirurgicales (augmentation des résections de métastases hépatiques). Les variations observées entre 2004 et 2006 sont partiellement associées à une augmentation de l’utilisation de nouveaux agents thérapeutiques. D’après (13).

En ce qui concerne les formes sporadiques, 60 à 80% de ces cancers se développent à partir d’un adénome. Le risque de transformation maligne dépend de plusieurs paramètres tels que la taille, l’importance de la composante villositaire ou encore le degré de dysplasie.

Comme décrit classiquement pour d’autres types tumoraux, l’oncogenèse colorectale s’effectue selon un modèle en plusieurs étapes (14) : des altérations génétiques successives vont conduire à une transformation de la muqueuse normale en adénome puis en cancer *in situ* avant d’aboutir au stade de cancer invasif. On identifie trois phases distinctes lors du développement tumoral : la phase d’initiation cancéreuse, suivie de la phase de promotion puis de la phase de progression (Figure 2). A partir de la fin des années 80, les travaux de Weinberg et Bishop ont permis d’identifier les événements moléculaires à l’origine de ces phénomènes (15).

Si sur le plan histopathologique les cancers colorectaux sont des entités relativement homogènes, l’étude des anomalies génétiques a permis de mettre en évidence deux mécanismes principaux impliqués dans l’oncogenèse colorectale, permettant de classer ces

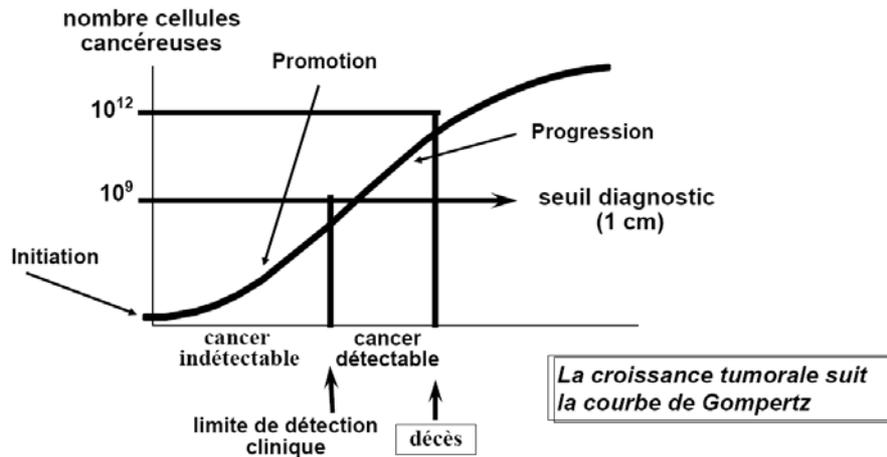


Figure 2 : Phases de progression tumorale selon la courbe de Gompertz

derniers en au moins deux types distincts (16). Deux phénotypes tumoraux sont en effet décrits : le phénotype instabilité chromosomique ou Chromosomic Instability (CIN) (17) et le phénotype instabilité microsatellitaire ou Microsatellite Instability (MSI) (Figure 3). Le phénotype CIN représente le groupe le plus fréquent, soit environ 80% des cancers colorectaux sporadiques et le phénotype MSI représente environ 15% des cancers colorectaux sporadiques (14). Il a récemment été suggéré l'existence d'un troisième groupe, caractérisé par une fréquence importante d'une mutation activatrice du gène *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1). Quelque soit le phénotype considéré, les altérations portant sur les voies de signalisation semblent être similaires (activation des voies Wnt ou Wingless site, RAS/RAF/MAPK ou Rat Sarcoma/ Rat Fibrosarcoma virus/ Mitogen Activated Protein Kinase, ou encore inactivation de la voie du TGF β).

III. CANCER COLORECTAL MÉTASTATIQUE

On observe des métastases dans 40 à 60% des cas de cancer colorectal. Ces métastases sont synchrones, c'est-à-dire présentes au moment du diagnostic, dans 20 à 25% des cas. Chez les patients indemnes de métastases au moment du diagnostic, le risque d'apparition de métastases métachrones, c'est-à-dire de survenue ultérieure, est de l'ordre de 30 à 40% (18). Dans certains cas, ce sont les métastases qui révèlent le cancer (métastases précessives) dont le foyer primitif (préexistant aux métastases par définition) n'est pas connu et doit être identifié.

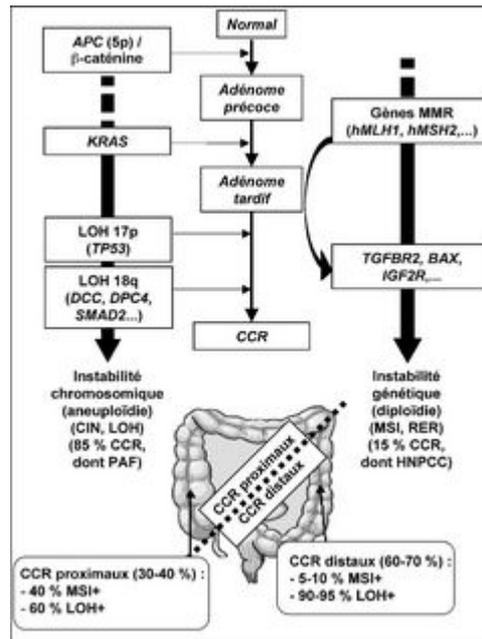


Figure 3 : Principaux mécanismes de l'oncogenèse colorectale : instabilité chromosomique et instabilité génétique. CCR: cancer colorectal; CIN: Chromosomal Instability; HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer; LOH: Loss Of Heterozygosity; MSI: MicroSatellite Instability; MMR: MisMatch Repair; PAF: polypose adénomateuse familiale; RER: Replication Error. D'après (14).

Environ 30 à 50% des patients atteints de cancer colorectal développent des métastases hépatiques, responsables à elles seules de deux tiers des décès par cancer colorectal (19, 20), et le fait de pouvoir envisager leur résection représente un challenge important puisque leur exérèse améliore considérablement la survie des patients (Figure 4). Les localisations extra-hépatiques sont plus rares et sont des facteurs de mauvais pronostic.

La prise en charge du cancer colorectal en situation non métastatique est avant tout chirurgicale : une résection chirurgicale est pratiquée dans 90% des cas (21) (8). Au stade métastatique, en plus de la chirurgie, les possibilités de la chimiothérapie doivent être évaluées. Dans certains cas, une chimiothérapie est envisagée seule. Les taux de survie à 5 ans des patients uniquement traités par chimiothérapie étant inférieurs à 1%, la chirurgie est une perspective recherchée en cas de réponse à la chimiothérapie car elle seule ouvre la possibilité d'une survie prolongée.

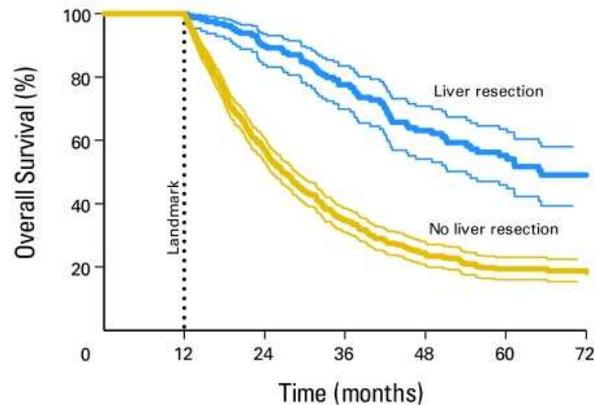


Figure 4: Survie globale de patients atteints de cancer colorectal métastatique diagnostiqué entre 1998 et 2006 en fonction de la possibilité de résection des métastases hépatiques. D'après (13).

A visée curative ou palliative, la chimiothérapie tient une place prépondérante dans la prise en charge du cancer colorectal métastatique. Elle permet dans certains cas d'envisager une résection de métastases non résécables d'emblée, et peut permettre d'envisager une rémission prolongée voire une guérison (13). A défaut, elle permet une réduction du volume tumoral ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie, de la survie et de la survie sans progression.

Le traitement standard des patients atteints de cancer colorectal métastatique inclut une fluoropyrimidine en association à l'irinotécan ou à l'oxaliplatine et une molécule ciblant l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) (cétuximab ou panitumumab) ou un inhibiteur de l'angiogenèse (bévacizumab).

Les options thérapeutiques sont complexes et dépendent de trois critères essentiels (12):

- l'état clinique du patient
- le bilan d'extension de la maladie
- l'évolution clinique de la maladie

A partir de ces critères, il est possible de définir quatre situations principales, ayant chacune un objectif et une prise en charge thérapeutique différents (12).

Le premier cas est celui où la maladie métastatique est limitée à un organe, le foie ou le poumon, permettant ainsi d'envisager une régression tumorale suffisante suite à la chimiothérapie, et donc une résection totale de la métastase. Dans cette situation, le patient est potentiellement curable. Dans l'hypothèse où une cure tumorale n'est pas envisageable, ce qui

représente la majorité des cas de patients atteints de cancer colorectal de stade IV (Tableau I), trois situations supplémentaires sont rencontrées :

- le cas des patients symptomatiques, qui nécessitent une prise en charge thérapeutique rapide à visée palliative.
- le cas des patients asymptomatiques, mais qui sont susceptibles de devenir symptomatiques sur une courte période en raison de la présence d'une masse tumorale importante ou encore d'une évolution rapide de la maladie.
- le cas des patients présentant plusieurs sites métastatiques non résecables, non volumineux ou peu évolutifs depuis une longue période.

Tableau I : Classification proposée par l’American Joint Commitee for Cancer Classification en fonction de la classification TNM (Tumor Node Metastasis) (Annexe 1).

Stades	Regroupements
Stade 0	T0 Tis, N0, M0
Stade IA	T1, N0, M0
Stade IB	T2, N0, M0
Stade IIA	T3, N0, M0
Stade IIB	T4, N0, M0
Stade IIIA	T1-T2, N1, M0
Stade IIIB	T3-T4, N1, M0
Stade IIIC	T1-T4, N2, M0
Stade IV	T1-T4, N1-N3, M1

L'identification de ces quatre situations permet de hiérarchiser les déterminants cliniques conditionnant les choix thérapeutiques (guérison, résecabilité, prévention de l'apparition des symptômes, soins palliatifs) : dans les deux premiers cas se présente la nécessité d'entreprendre rapidement une chimiothérapie intensive ; dans les autres cas, certaines situations peuvent être mieux gérées avec un traitement plus léger. En pratique clinique, une chimiothérapie intensive est largement privilégiée, quel que soit le cas dans lequel on se trouve, en fonction de la préférence du patient (12). Les options thérapeutiques détaillées dans les figures 5 et 6 et les tableaux II et III sont issues du référentiel Oncolor (22).

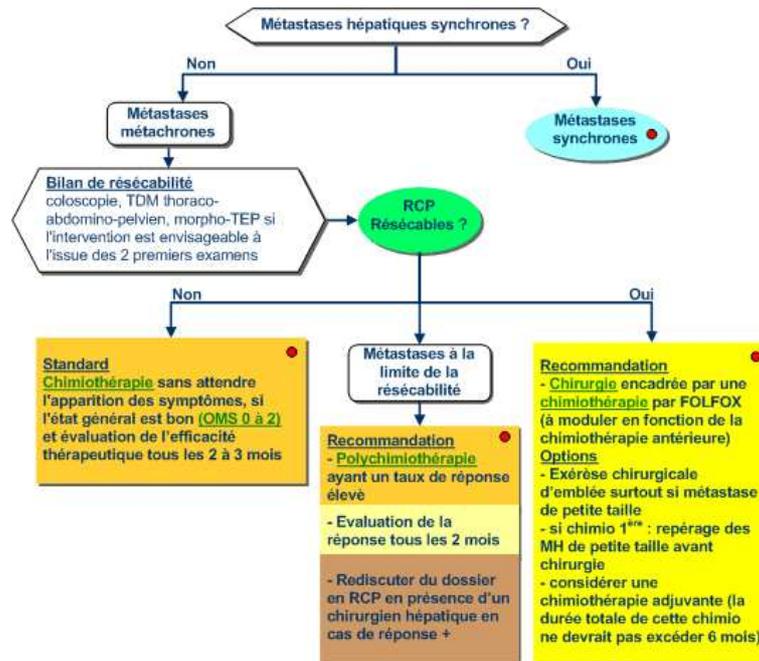


Figure 5 : Prise en charge des métastases métachrones. D'après (22).

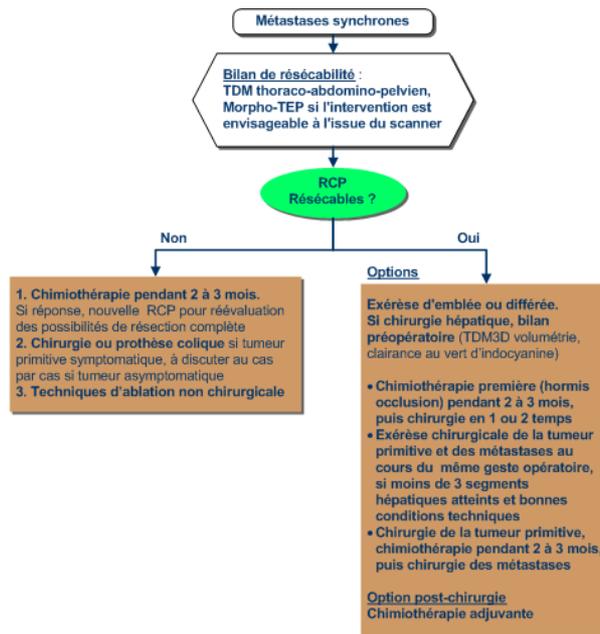


Figure 6 : Prise en charge des métastases synchrones. D'après (22).

Traitement à visée curative

En ce qui concerne les métastases hépatiques, une exérèse chirurgicale est possible dans 25% des cas. La résection est indiquée en fonction des critères anatomiques, techniques et carcinologiques, et n'est envisageable qu'en cas de possibilité de résection complète, mais ne dépend pas du nombre de métastases. Dans ce cas, le taux de survie à 5 ans est de 30%. Une chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante permet une amélioration de la survie, et permet dans certains cas de rendre résécable une métastase initialement non résécable. En cas de carcinose péritonéale, une chirurgie est envisagée, et peut être associée à une chimio-hyperthermie intrapéritonéale.

Traitement à visée palliative

Plusieurs essais randomisés évaluant les traitements palliatifs par chimiothérapie ont pu mettre en évidence des réponses (réduction de la masse tumorale) dans environ 50 % des cas, ainsi qu'un allongement de la survie. En cas d'échec d'une première chimiothérapie, il est habituel de prescrire des traitements de 2^{ème} voire de 3^{ème} ligne si l'état général des patients reste satisfaisant (23).

Tableau II : Options thérapeutiques en cas de métastases opérables d'emblée ou de métastases potentiellement opérables. D'après (22).

	Protocole	Référence
Métastases opérables d'emblée	FOLFOX4 périopératoire	(24)
Métastases potentiellement résécables	FOLFOXIRI	(25)
	FOLFIRI - cétuximab	(26)
	FOLFOX - cétuximab	(27)
	FOLFIRINOX	(28)
	FOLFIRI – bévacizumab	(29)
	Si contre-indication au 5-FU :	(30)
	TOMOX IRINOX	(1)

Tableau III : Options thérapeutiques en situation palliative. D'après (22).

	Protocole	Référence
<p>Situation palliative avec métastases inopérables ou plusieurs sites métastatiques</p> <p>1^{ère} ligne :</p>	<p>FOLFIRI ± bevacizumab FOLFIRI ± cetuximab LV5FU2 ± bevacizumab XELODA ± bevacizumab FOLFOX ± bevacizumab XELOX ± bevacizumab FOLFOX ± cetuximab FOLFOXIRI. Si contre-indication au 5-FU : IRINOX Ralitrexed Irinotécan monothérapie TOMOX TOMIRI</p>	<p>(31) (32) (33)</p>
<p>Situation palliative avec métastases inopérables ou plusieurs sites métastatiques</p> <p>2^{ème} ligne :</p>	<p>FOLFIRI-bévacizumab FOLFOX-bévacizumab XELOX-bévacizumab FOLFIRI-cétuximab FOLFOX-cétuximab FOLFIRI 3 FOLFIRI FOLFOX IRINOX XELOX XELIRI Panitumumab Si contre-indication au 5-Fluorouracile : TOMOX Irinotécan TOMIRI</p>	<p>(34)</p>
<p>Situation palliative avec métastases inopérables ou plusieurs sites métastatiques</p> <p>3^{ème} ligne :</p>	<p>Irinotécan-cetuximab FOLFIRI FOLFOX FOLFIRI 3 XELOX Cetuximab monothérapie TOMOX TOMIRI Irinotécan Panitumumab XELIRI</p>	<p>(1)</p>

IV. THÉRAPIES CIBLÉES ET CANCER COLORECTAL MÉTASTATIQUE

IV.1. Généralités sur les thérapies ciblées

Depuis la découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, le cancer apparaît comme une maladie de la signalisation. En effet, selon le concept proposé par Hanahan et Weinberg (35), les six propriétés caractéristiques des cellules tumorales (indépendance de croissance, insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, résistance à la mort cellulaire, prolifération illimitée, capacité accrue à induire l'angiogenèse et propension à l'invasion et à la dissémination), sont imputables à des anomalies de la signalisation. A ces six propriétés s'ajoutent deux caractéristiques: la capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire (35). Depuis, l'élucidation de mécanismes moléculaires clés a permis d'identifier les principales voies de signalisation impliquées dans l'oncogenèse. On estime qu'environ 20% des 32 000 gènes humains codent des protéines impliquées dans la transduction du signal, incluant des récepteurs transmembranaires, plus de 520 protéines kinases et 130 protéines phosphatases (36).

Deux voies majeures, la voie des RAS/RAF/MAPK et la voie des PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3-OH kinase/ Protéine kinase B) sont impliquées dans la signalisation cellulaire en aval des récepteurs à tyrosine kinase, et font l'objet d'un développement intensif depuis près de 20 ans. L'inhibition de ces voies de signalisation conditionne directement l'activité des thérapies ciblées dirigées contre des récepteurs à tyrosine kinase comme les récepteurs HER. Le contrôle de ces voies de signalisation demeure actuellement un challenge important, et les thérapies ciblées ont été développées pour cibler spécifiquement ces mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération des cellules tumorales, l'apoptose, la réparation de l'ADN ou l'angiogenèse (Figure 7).

IV.2. Notion de cible thérapeutique

L'émergence des thérapies moléculaires ciblées en cancérologie représente un changement important dans le mode de développement de molécules anticancéreuses. Les chimiothérapies

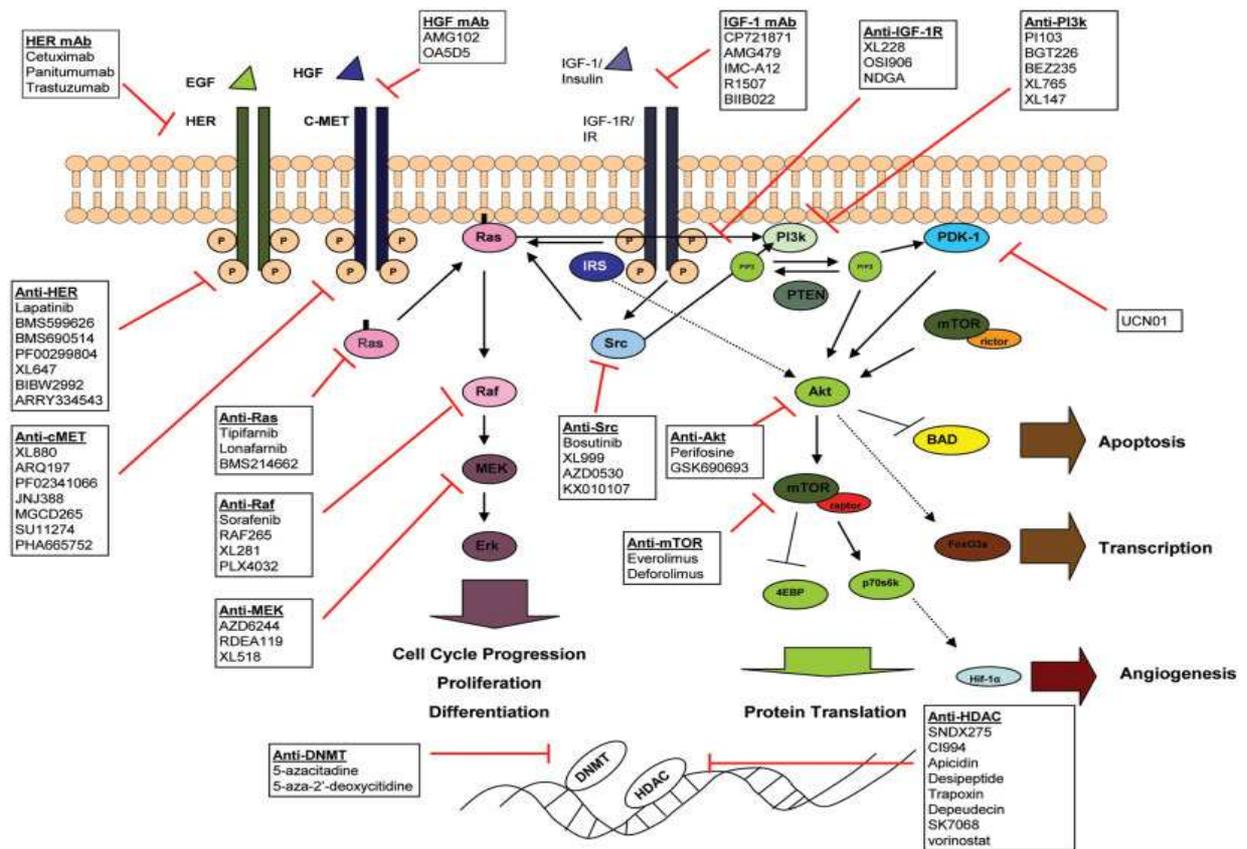


Figure 7 : Thérapies moléculaires ciblées commercialisées ou en cours de développement. Ces molécules ciblent essentiellement les récepteurs HER, cMET, IGF1R, diverses protéines impliquées dans la transduction du signal en aval de ces récepteurs, ainsi que les DNA méthyltransférases et les histones déacétylases. D'après (37).

anticancéreuses classiques étaient initialement sélectionnées en fonction de leur effet cytotoxique potentiel, et l'identification des mécanismes d'action étant secondaire à la mise en évidence de leur activité (38). En ce qui concerne les thérapies ciblées, les molécules sont développées en fonction de cibles thérapeutiques impliquées dans les mécanismes d'oncogenèse et le maintien du phénotype tumoral. L'utilisation de ces molécules en cancérologie a permis une amélioration conséquente du pronostic de plusieurs pathologies cancéreuses.

Les cibles des thérapies ciblées étaient dans un premier temps essentiellement membranaires, puis les molécules ayant pour cible des protéines intracellulaires ou encore l'environnement tumoral ont également fait preuve d'efficacité. Deux grandes classes de thérapies ciblées sont actuellement disponibles: les inhibiteurs de tyrosine kinase et les anticorps monoclonaux.

IV.3. Inhibiteurs de tyrosine kinase

Les inhibiteurs de tyrosine kinase sont des formes orales, de faible poids moléculaire à action intracellulaire et compétiteurs de l'ATP. Ils agissent au niveau du site de fixation de l'ATP, ce qui a pour conséquence l'inhibition de l'autophosphorylation du récepteur. En fonction de la nature de l'inhibiteur de tyrosine kinase, cette fixation est réversible ou non. Les inhibiteurs de tyrosine kinase peuvent avoir une cible unique (erlotinib, Tarcéva[®]; géfitinib, Iressa[®]) ou plusieurs cibles (lapatinib, Tyverb[®]; sunitinib, Sutent[®]).

IV.4. Anticorps monoclonaux

La découverte par Köhler et Milstein en 1975 de la technique des hybridomes a permis la sélection et la production d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre une cible unique. Malgré des essais cliniques décevants dans les années 80, plus de 20 anticorps ont depuis obtenu une approbation par la Food and Drug Administration (FDA) ainsi que l'European Medicines Agency (EMA) dans diverses indications, et plusieurs nouvelles molécules sont en cours de développement dans le traitement des cancers.

Parmi les anticorps monoclonaux actuellement sur le marché, plusieurs spécialités ont été développées en cancérologie, dont 5 ciblent directement ou indirectement les récepteurs à tyrosine kinase. On compte parmi ces 5 spécialités deux anticorps anti-EGFR : cétuximab (Erbix[®]) et panitumumab (Vectibix[®]) ; un anticorps anti-HER2 : trastuzumab (Herceptin[®]) et un anticorps anti-VEGF : bévacizumab (Avastin[®]) (Figure 8).

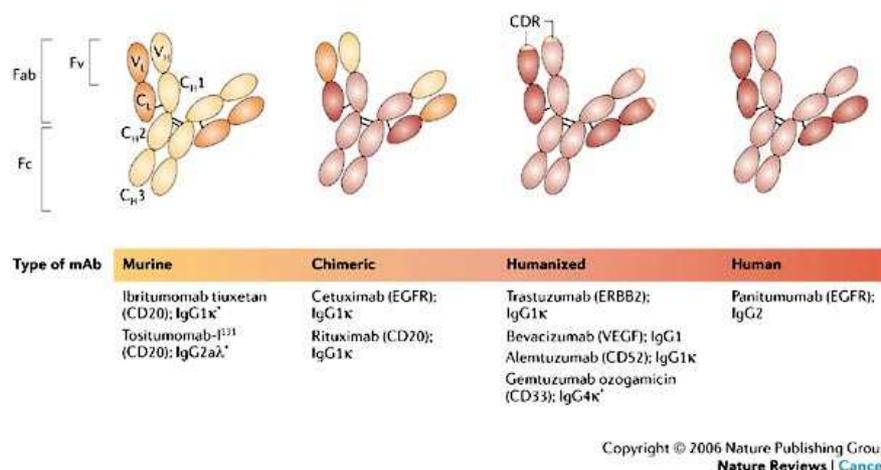


Figure 8 : Classification des anticorps monoclonaux en fonction de leur nature: murins, chimériques, humanisés ou humains. D'après (39).

Deux grandes stratégies sont actuellement validées en situation clinique dans le cancer colorectal métastatique : le ciblage du récepteur EGFR par deux anticorps monoclonaux, le cétuximab et le panitumumab, et le ciblage du VEGF par le panitumumab (Figure 9).

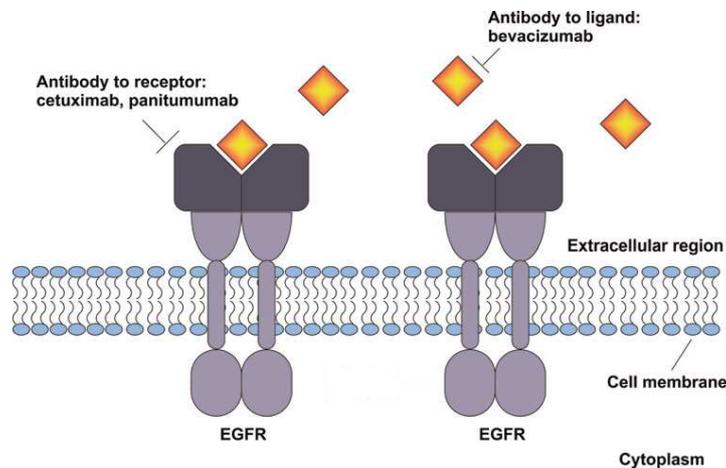


Figure 9 : Les inhibiteurs d'EGFR présentent une action extracellulaire (anticorps monoclonaux : cétuximab et panitumumab) ou intracellulaire (inhibiteurs de tyrosine kinase : géfitinib et erlotinib). D'après (41).

IV.4.1. Inhibiteurs de l'angiogenèse

La seule thérapie anti-angiogénique disposant actuellement d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) dans le cancer colorectal métastatique est le bévacizumab (Avastin®). D'autres molécules sont en cours d'évaluation, mais les résultats préliminaires sont décevants, aussi bien en termes de survie globale qu'en termes de survie dans progression.

Bévacizumab

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, facteur de croissance impliqué dans la vasculogénèse et la néoangiogénèse (42). Il s'agit d'un anticorps humanisé recombinant. Ainsi, 3% de sa séquence est d'origine murine, et correspond au site de reconnaissance du VEGF, et 97% de sa séquence est humaine. La liaison du bévacizumab au VEGF empêche la liaison de ce dernier à ses récepteurs, VEGFR-1 et VEGFR-2, exprimés à la surface des cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux (Figure 10).

Cet anticorps est prescrit en association avec une chimiothérapie classique, et permet une augmentation de la survie globale ainsi que de la survie sans progression de plusieurs mois, (26).

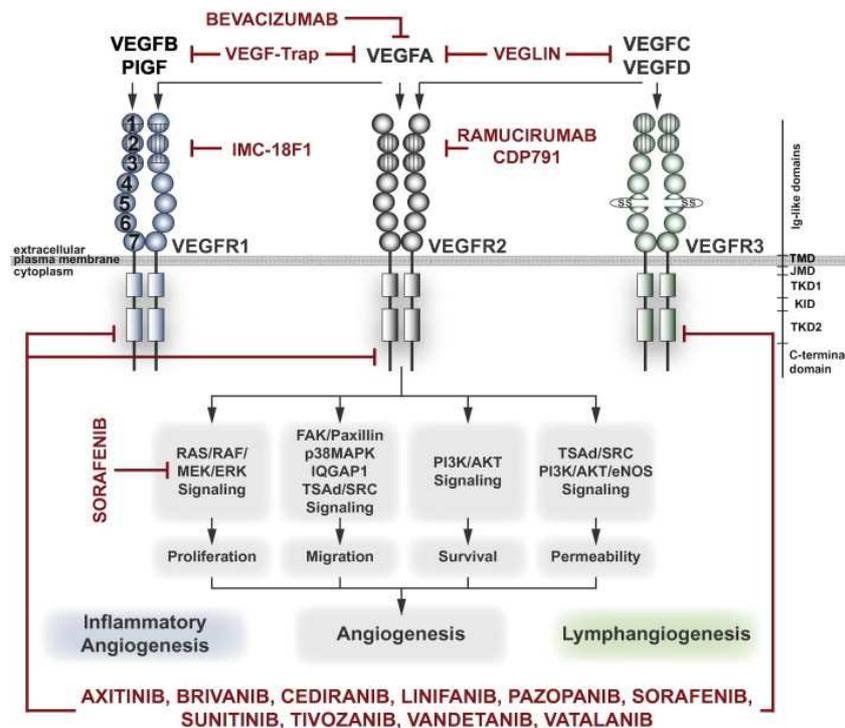


Figure 10: Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'angiogénèse. D'après (43).

Indications

Indiqué initialement dans le cancer colorectal métastatique en association avec une chimiothérapie à base de 5-FU (5-Fluoro Uracile) (26), le bévacizumab est désormais également indiqué dans le cancer du sein métastatique en association à une taxane, dans le cancer du rein avancé ou métastatique en association à l'interféron α , et dans le cancer du poumon en association à un sel de platine (44). Actuellement, plus de 1000 essais cliniques évaluant l'intérêt du bévacizumab dans d'autres situations cliniques sont en cours, mais les effets de cette molécule dans certains types de cancers sont modestes (43). Les principaux résultats d'essais randomisés évaluant l'efficacité du bévacizumab en association dans le cancer colorectal métastatique sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV : Comparaison de l'efficacité du bévacizumab en 1^{ère} ligne dans différents essais randomisés. * Résultat significatif. ND : donnée non disponible. 5-FU : 5-fluorouracile. FOLFOX : 5FU perfusion + oxaliplatine. IFL : irinotécan + 5FU + leucovorin bolus. LV : leucovorin. XELOX : capécitabine + oxaliplatine.

Traitement	N patients	Taux de réponse (%)	Survie sans progression (mois)	Survie globale (mois)	Références
IFL	813	35	6,2	15,6	(26)
IFL + bévacizumab		45*	10,6*	20,3*	
LV-5FU	209	15	5,5	12,9	(45)
LV-5FU + bévacizumab		26*	9,2*	16,6	
XELOX/FOLFOX	1401	38	8,0	19,9	(46)
XELOX/FOLFOX + bévacizumab		38	9,4*	21,3	
Capécitabine	313	ND	5,7	18,9	(47)
Capécitabine + bévacizumab		ND	8,5*	18,9	

Le bévacizumab ne s'administre qu'en association, du fait de son manque d'efficacité en monothérapie par rapport aux chimiothérapies conventionnelles (48). En particulier, son action sur la normalisation de la vascularisation tumorale décrite précédemment, bien qu'encore controversée par certains auteurs, pourrait expliquer cette absence d'efficacité en monothérapie. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque le bévacizumab était utilisé en association aux fluoropyrimidines, seules ou en association à de l'acide folinique. Les essais de combinaison au FOLFIRI sont encore insuffisants pour conclure, et les résultats d'essais en association au FOLFOX sont négatifs (49).

Dans une analyse en sous-groupe de l'étude AVANT, étude de phase III évaluant l'efficacité du bévacizumab en association au FOLFOX en situation adjuvante, les auteurs concluent à une absence d'efficacité dans le bras expérimental FOLFOX bévacizumab par rapport au bras FOLFOX seul. Efficace en situation métastatique, cette combinaison ne l'est pas dans le cas

de patients atteints de cancer colorectal de stade II et III (50). Ces résultats suggèrent que les mécanismes impliqués dans la croissance des néo vaisseaux des sites métastatiques et primitifs est différente et devraient donc être ciblés de manière différente.

Pharmacodynamie

La neutralisation de l'activité biologique du VEGF par le bévacizumab fait régresser les vaisseaux tumoraux, et inhibe la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux, inhibant ainsi la croissance tumorale. Elle permet également une réduction de la perméabilité microvasculaire (48). Le bévacizumab permet également de normaliser la vascularisation des vaisseaux tumoraux, et sensibilise ainsi les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux à l'action des cytotoxiques et de radiations ionisantes (51, 52). D'autre part, cet anticorps présente une activité cytostatique directe sur les cellules tumorales exprimant les récepteurs au VEGF, et favorise le recrutement et la différenciation des cellules dendritiques sur les sites tumoraux (52).

Effets indésirables

Les effets indésirables notables du bévacizumab sont les effets indésirables communs à tous les inhibiteurs de l'angiogenèse. L'administration de bévacizumab ne majore pas la toxicité des autres cytotoxiques qui lui sont associés (26).

Toxicité rénale

L'absence de spécificité du bévacizumab pour le tissu tumoral réduit la disponibilité du VEGFA au niveau du glomérule rénal, entraînant des dommages structurels au niveau de la barrière de filtration glomérulaire (43). On peut donc observer sous bévacizumab une protéinurie et une vasoconstriction consécutives à ce phénomène, pouvant entraîner une hypertension artérielle (43).

Accidents thrombo-emboliques artériels

En ce qui concerne le risque de thrombo-embolie artérielle, une analyse combinée de 5 études a permis d'identifier des groupes de patients à risques : sont particulièrement concernés les patients de plus de 65 ans, les patients ayant des antécédents d'accident thromboembolique artériel, les patients présentant une hypertension artérielle ainsi que les patients présentant une protéinurie (53).

Perforation gastro-intestinale

Le risque de perforation intestinale est quant à lui majoré dans les situations suivantes : abcès abdominal, obstruction, tumeur au site de perforation, ou encore carcinomatose. Un traitement par anti-inflammatoires non stéroïdiens et des antécédents de traitement par radiothérapie pourraient également être des facteurs de risque de perforation digestive. Aucun facteur de risque n'est retrouvé dans environ un tiers de cas.

Mécanismes de résistance au bévacizumab

Actuellement, plusieurs mécanismes de résistance au bévacizumab ont été décrits (43). Après une régression tumorale induite par l'hypoxie consécutive à un traitement anti angiogénique, la croissance tumorale se ferait par le biais de mécanismes alternatifs de formation des vaisseaux. Au niveau moléculaire, l'échappement à un traitement anti-angiogénique pourrait s'expliquer par un rétrocontrôle positif de l'expression du VEGF induit par l'hypoxie. Cette augmentation de la sécrétion de VEGF pourrait impliquer les cellules tumorales ainsi que les fibroblastes constituant le stroma tumoral. Ces cellules produisent également d'autres facteurs impliqués dans la croissance vasculaire (FGF2 ou Fibroblast Growth Factor 2, angiopoïétine, PDGFB ou Platelet Derived Growth Factor B et PDGFC ou Platelet Derived Growth Factor C, ...). Enfin, certaines modifications génétiques et/ou épigénétiques consécutives à un traitement anti-angiogénique au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux ont été mises en évidence (43).

Biomarqueurs prédictifs de réponse au bévacizumab

Contrairement aux thérapies anti-EGFR, aucun biomarqueur prédictif de réponse ne peut être utilisé en routine pour identifier les patients susceptibles de bénéficier d'un traitement par bévacizumab, ou encore pour permettre une adaptation posologique ou mettre en évidence une population particulièrement à risque de développer des effets indésirables graves.

Certains auteurs proposent d'étudier des paramètres systémiques tels que la pression artérielle ou la densité microvasculaire, ou encore des paramètres génomiques, tels que les polymorphismes du VEGF, du VEGFR et de ses co-récepteurs (43). Des approches par imagerie fonctionnelle sont également en cours de développement.

Actuellement, l'expression du VEGFA circulant ou tumoral semble avoir uniquement une valeur pronostique (54, 55). Ces résultats ont été récemment controversés par une sous-étude

de l'essai BRITE, dans laquelle l'expression tumorale du VEGFA pourrait avoir une valeur prédictive de réponse au bévacizumab. Cette étude propose également l'expression de NRP1 (un corécepteur du VEGF), l'expression de CD31 (représentatif de la densité vasculaire) comme des marqueurs prédictifs de réponse potentiels. Les auteurs proposent aussi que le nombre de cellules endothéliales circulantes comme marqueur prédictif ; ces résultats sont confirmés par une étude plus récente, dans laquelle nombre de cellules endothéliales circulantes élevé à la fin du premier cycle pourrait être prédictif de réponse au bévacizumab (56). Ces résultats doivent cependant être confirmés par d'autres études avant d'être utilisés en pratique clinique.

Combinaison de marqueurs :

Les combinaisons d'expression du VEGFA et de ses récepteurs et co-récepteurs n'auraient qu'une valeur pronostique dans les cancers du sein et les cancers du pancréas (57, 58).

La combinaison du niveau d'expression du VEGFA et de VEGFR2 pourrait représenter un biomarqueur prédictif potentiel de réponse à une combinaison bévacizumab – erlotinib dans tumeurs gastrointestinales (59).

IV.4.2 Anticorps anti-EGFR

Considérant l'importance majeure d'EGFR dans l'oncogénèse, ainsi que sa fréquence de surexpression dans de nombreux types tumoraux, ce récepteur constitue une cible thérapeutique de choix, en particulier dans les cancers colorectaux et les cancers des voies aérodigestives supérieures (60, 61). Deux anticorps anti-EGFR disposent d'une AMM dans le cancer colorectal métastatique : le cétuximab (Erbix[®]) et le bévacizumab (Vectibix[®]). Ces anticorps agissent tous deux par inhibition compétitive du site de fixation des ligands d'EGFR. Cette liaison au récepteur a pour conséquence une inhibition de voies de signalisation impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaires ; ce mécanisme sera détaillé ultérieurement.

IV.4.2.1 Cétuximab

Le cétuximab (Erbix[®]) dispose d'une AMM en France depuis juin 2004. Cet anticorps chimérique de la classe des IgG1 est un antagoniste compétitif sélectif pour EGFR et ses hétérodimères (62). Il bloque la dimérisation du récepteur ainsi que sa phosphorylation et sa

liaison avec ses ligands. Après fixation du cétuximab à l'EGFR, le complexe cétuximab-EGFR est internalisé. Le cétuximab recrute également les cellules immunes effectrices cytotoxiques contre les cellules tumorales exprimant EGFR (cytotoxicité médiée par les cellules dépendantes des anticorps ou ADCC (antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity) (63). Dans modèles murins xéno greffés par des cellules humaines, on a pu également montrer une activité antiangiogénique (64-66). Les mécanismes d'action des anticorps anti-EGFR sont résumés dans le tableau V.

Tableau V : Mécanismes d'action anticorps anti-EGFR. ADCC: antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity. NK: Natural Killer. D'après (67).

Mécanismes moléculaires	Mécanismes d'action
Inhibition de la liaison des ligands ou de l'affinité pour les ligands	Encombrement stérique (anticorps monoclonaux) ou variation de l'affinité (inhibiteurs de tyrosine kinase)
Inhibition de la progression dans le cycle cellulaire	Arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par augmentation de p27 et inhibition de PCNA
ADCC	Augmentation de l'ADCC par l'interleukine-2 <i>via</i> activation des cellules NK
Favorisation de l'entrée en apoptose	Altération de la balance Bax (proapoptotique) / Bcl-2 (antiapoptotique) et promotion de l'apoptose
Potentialisation des effets de la radiothérapie	Entrée de la cellule tumorale dans des phases du cycle cellulaire favorisant la radio-sensibilité. Inhibition de la translocation nucléaire d'EGFR consécutive à l'irradiation.
Inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur	Inhibition de la transduction du signal en aval du récepteur

Indications

Le cétuximab est indiqué en cas de cancer épidermoïde de la tête et du cou, en association à la radiothérapie ou à une chimiothérapie à base de platine, ainsi que dans le cancer colorectal métastatique, seul ou en association à une chimiothérapie. La recherche de mutation du gène *KRAS* est depuis 2006 un pré requis indispensable avant l'administration de cétuximab. Des résultats précliniques ont montré l'intérêt du cétuximab dans les cancers de la prostate hormono-résistants. Plusieurs études en cours devraient permettre d'évaluer son activité dans les cancers du sein triple négatifs. Les principaux résultats d'essais randomisés évaluant

l'efficacité du cétuximab seul ou en association dans le cancer colorectal métastatique sont résumés dans le tableau VI.

Tableau VI : Comparaison de l'efficacité du cétuximab en 1^{ère} ou 2^{ème} ligne dans différents essais thérapeutiques. * Résultat significatif. ND : donnée non disponible. †Note des auteurs : Effet potentiellement dû au fait que 47% des patients du bras irinotécan seul ont reçu du cétuximab après l'essai.

Traitement	N patients	Taux de réponse (%)	Survie sans progression (mois)	Survie globale (mois)	Références
Cétuximab	329 (Phase II, patients réfractaire à l'irinotécan)	10,8	1,5	6,9	BOND (68)
Cétuximab + irinotécan		23*	4,1*	8,6	
Irinotécan	1298 (Phase III, patients réfractaires aux fluoropyrimidines et oxaliplatine)	4,2	2,6	10,0	EPIC (69)
Cétuximab + irinotécan		16,4*	4,0*	10,7 [†]	
FOLFOX4	337 (Phase II, 1 ^{ère} ligne)	36	7,2	ND	OPUS (30)
FOLFOX4 + Cétuximab		46	7,2	ND	
FOLFOX4	Sous-groupe de 233 patients non porteurs de mutation <i>KRAS</i>	37	7,2	ND	
FOLFOX4 + Cétuximab		61*	7,7*	ND	
FOLFIRI	1217 (Phase III, 1 ^{ère} ligne)	38,7	8,0	18,6	CRYSTAL (1)
FOLFIRI + Cétuximab		46,9*	8,9*	19,9	
FOLFIRI	Sous-groupe de 348 patients non porteurs de mutation <i>KRAS</i>	43,2	8,7	21,0	
FOLFIRI + Cétuximab		59,3*	9,9	24,9	

Modalités d'administration

L'administration du cétuximab se fait à rythme hebdomadaire. La dose de cétuximab habituellement recommandée est de 400 mg/m² en 2 heures pour la première injection. La dose de maintenance est de 250 mg/m² par semaine. Aucun ajustement posologique n'est nécessaire en cas d'insuffisance rénale ou hépatique (70).

Effets indésirables

Les effets indésirables notables du cétuximab sont essentiellement représentés par une toxicité cutanée, des troubles hydro-électrolytiques et des réactions d'hypersensibilité. La plupart de ces effets peuvent s'expliquer par le fait qu'EGFR, surexprimé à la surface des cellules tumorales, est physiologiquement exprimé par les cellules épithéliales de nombreux tissus (épiderme, follicules pileux, glandes sébacées, muqueuses, cornée et conjonctive) (70). Son administration en combinaison à d'autres cytotoxiques ne majore pas leur toxicité.

Réactions d'hypersensibilité

Les réactions à la perfusion (syndrome pseudo-grippal, nausées, vomissements, flush, céphalées) sont peu fréquentes mais peuvent dans certains cas se manifester sous des formes plus sévères (choc anaphylactique) et sont prévenues par administration préalable de corticoïdes et d'anti-histaminiques (71, 72).

Toxicité cutanée

Le rash cutané est la conséquence du blocage d'EGFR au niveau de l'épiderme. Allant de la simple réaction érythémateuse parfois prurigineuse aux lésions nodulaires profondes et surinfectées, les lésions s'étendent généralement sur la face antérieure du thorax et au niveau des zones séborrhéiques du visage (71). Cet effet, dont l'intensité maximale s'observe autour de la sixième semaine de traitement, peut spontanément s'atténuer, ou encore être partiellement prévenu par administration concomitante de tétracyclines (73). Il apparaît chez 80% des patients et n'empêche généralement pas la poursuite du traitement (71). Cependant, en cas de toxicité cutanée sévère (grade 3-4) ou de surinfection des lésions, un arrêt temporaire du traitement doit être discuté.

Xérose, prurit et fissures cutanées sont des effets indésirables classiquement décrits et peuvent être prévenus par éviction solaire et par l'utilisation de savons gras et d'agents émoullissants adaptés (71). Il est également possible d'appliquer des crèmes cicatrisantes à base de vitamine B5 ou de vitamine A.

Toxicité oculaire

La toxicité oculaire sous anti-EGFR (modifications des sécrétions lacrymales, blépharite épidermoïde, érosion cornéenne) s'observe plus rarement, les formes sévères touchant moins de 1% des patients.

Troubles hydro-électrolytiques

Des hypomagnésémies ont été décrites chez environ 35% des patients (grade 3 à 4 chez 5% des patients) et peuvent être révélées par une asthénie et des crampes musculaires (74). Cette hypomagnésémie peut être associée à d'autres troubles hydro-électrolytiques (hypocalcémie, hypokaliémie), et peut nécessiter une supplémentation en électrolytes. Le mécanisme par lequel le cétuximab provoque cet effet est à l'heure actuelle encore inconnu (74).

IV.4.2.2. Panitumumab

Le panitumumab (Vectibix[®]) est un anticorps monoclonal entièrement humain de la classe des IgG2 (70). Il dispose d'une AMM en France depuis 2007. Tout comme le cétuximab, le panitumumab est un antagoniste compétitif sélectif pour EGFR et bloque sa liaison avec ses ligands, sa dimérisation et sa phosphorylation. La fixation du panitumumab à l'EGFR induit l'internalisation du récepteur (Tableau VII).

Indications

Le panitumumab est indiqué en monothérapie pour le traitement des patients atteints de cancer colorectal métastatique exprimant EGFR et en l'absence de mutation du gène *KRAS*, après échec des protocoles de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine, oxaliplatine et irinotécan.

Modalités d'administration

Le panitumumab est administré à la dose de 6 mg/kg une fois toutes les deux semaines. Compte tenu du fait que cet anticorps est humain, aucune prémédication par antagoniste H1 ou par corticoïde n'est nécessaire (70).

Effets indésirables

Les effets indésirables décrits précédemment pour le cétuximab sont communs à divers anti-EGFR, dont le panitumumab. Ainsi, 90% des patients traités par panitumumab présentent les réactions dermatologiques classiques des inhibiteurs d'EGFR, décrites précédemment pour le cétuximab. A noter toutefois que les réactions à la perfusion sont d'autant plus rares avec le panitumumab qu'il s'agit d'un anticorps humain (71). On observe également des troubles pulmonaires (pneumonie interstitielle) pouvant entraîner l'arrêt du traitement et des troubles électrolytiques (hypomagnésémie et hypokaliémie). Les effets indésirables oculaires semblent moins fréquents qu'avec le cétuximab (70).

En conclusion, après les progrès des années 90 (irinotécan et oxaliplatine) puis des années 2000 (bévacizumab, cétuximab et panitumumab), faute d'innovation thérapeutique importante émergeant clairement des derniers essais thérapeutiques, les avancées et perspectives les plus concrètes sont

- l'évaluation de nouveaux schémas thérapeutiques limitant le temps de traitement afin de conserver l'efficacité tout en limitant la toxicité
- la mise en évidence de marqueurs prédictifs de réponse aux anti-VEGF et anti-EGFR

Nous porterons une attention particulière sur ce second point. En effet, la mise en évidence de marqueurs prédictifs de réponse permet d'administrer des médicaments efficaces aux patients potentiellement répondeurs et ne pas les administrer aux résistants tout en évitant des toxicités inutiles ainsi qu'un retard de prescription d'une seconde ligne de traitement potentiellement efficace. Par conséquent, l'administration d'une chimiothérapie inefficace soit être évitée dans la mesure du possible. C'est dans cette optique que de nombreux travaux de recherche tentent actuellement de mettre en évidence des marqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées. Les premiers résultats ont été obtenus avec les anti-EGFR, avec la première AMM restreinte à des populations spécifiques pour une thérapie ciblée. Le premier exemple d'application validée en situation clinique est celui de la mutation de l'oncogène KRAS, qui sera détaillé dans cette seconde partie.

Avant de décrire les mécanismes de résistance aux anti-EGFR, il est nécessaire de décrire brièvement le fonctionnement du récepteur EGFR et les mécanismes de transduction du signal consécutif à l'activation de ce dernier.

V. EGFR, SIGNALISATION EN AVAL D'EGFR ET MISE EN ÉVIDENCE DE MARQUEURS PRÉDICTIONNELS DE RÉPONSE AUX ANTI-EGFR

V.1. Généralités sur les biomarqueurs

D'après la définition du National Institute of Health (NIH), un biomarqueur se définit comme étant une caractéristique qui se mesure et s'évalue objectivement, et sert d'indicateur d'un processus biologique normal, pathogénique ou de réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (75, 76). Un biomarqueur peut avoir une utilité dans le diagnostic précoce, une valeur pronostique, prédictive, ou encore permettre de monitorer la maladie. Certains auteurs ajoutent encore la notion de biomarqueurs pharmacodynamiques (5). Plusieurs paramètres peuvent servir de biomarqueurs : ADN, ARN, protéines, ou encore cellules tumorales circulantes, imagerie fonctionnelle. Un biomarqueur peut être représenté par un caractère unique ou par un groupe de caractères (signature). Certains auteurs excluent volontairement la notion de sensibilité intrinsèque du patient et excluent de la définition de biomarqueurs les paramètres cliniques tels que le rash acnéiforme dans la réponse aux anti-EGFR, ne définissant ainsi un biomarqueur que comme étant la ou les propriétés d'une tumeur associées au résultat clinique (77)

Un biomarqueur pronostique fournit des informations sur le devenir général du patient (76). Pour Van Cutsem et Sargent, dans le cas d'un marqueur pronostique, l'effet du traitement est bénéfique pour le groupe entier, mais la survie des patients qui expriment le marqueur est plus faible que la survie des patients qui ne l'expriment pas. Le marqueur est associé à une évolution différente entre les 2 groupes, quel que soit le traitement utilisé (Figure 11) (12, 77). Toutefois certains auteurs proposent l'utilisation des marqueurs pronostiques pour orienter une prise en charge thérapeutique (5, 78). D'autre part ces marqueurs peuvent également servir à la stratification des patients lors d'essais cliniques.

Un marqueur prédictif donne des informations sur l'effet d'une intervention thérapeutique (76) et permet de prédire la réponse à un traitement. Pour Sawyers (5), idéalement, un marqueur prédictif de réponse (tout comme un marqueur pharmacodynamique) s'évalue en cours de traitement. Cette approche implique cependant de traiter le patient avant d'obtenir un critère d'exclusion du traitement et ne devrait être utilisée qu'à défaut d'autre approche disponible. De plus, si le marqueur doit être évalué sur du matériel tumoral, une évaluation du marqueur en cours de traitement n'est possible que dans le cas des tumeurs circulantes ou nécessite des biopsies itératives dans le cas des tumeurs solides (5).

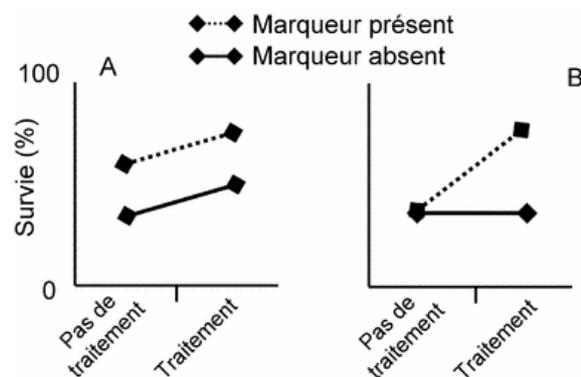


Figure 11 : Marqueurs pronostiques et prédictifs. Un marqueur pronostique renseigne sur le risque évolutif de la maladie (survie sans progression, survie globale) indépendamment de l'administration ou non d'un traitement (A). Un facteur prédictif renseigne sur l'importance du bénéfice à escompter d'un traitement, indépendamment du risque pré-thérapeutique (B). D'après (14).

Actuellement, le seul biomarqueur prédictif de réponse à une thérapie ciblée dans le cancer colorectal métastatique est la présence de mutation du gène *KRAS*, prédictif de la réponse au cétuximab et au panitumumab. Plusieurs autres marqueurs potentiels ont été proposés, dont la valeur pronostique ou prédictive est encore discutée. Parmi ces marqueurs, on retrouve des paramètres dépendant de l'hôte, dits constitutionnels, et des paramètres dépendants de la tumeur, dits somatiques. La seconde catégorie trouve la plupart de ses candidats dans les voies de transduction du signal en aval des récepteurs HER.

V.2. Généralités sur les récepteurs HER

Les récepteurs du facteur de croissance épidermique humain ou Human Epidermal growth factor Receptors (HER) sont parmi les premiers oncogènes identifiés. Ils font partie de la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase, répartis en 20 familles différentes (Figure 12). Plusieurs récepteurs à tyrosine kinase sont des proto-oncogènes et sont de ce fait des cibles potentielles pour des thérapies anticancéreuses (36, 79).

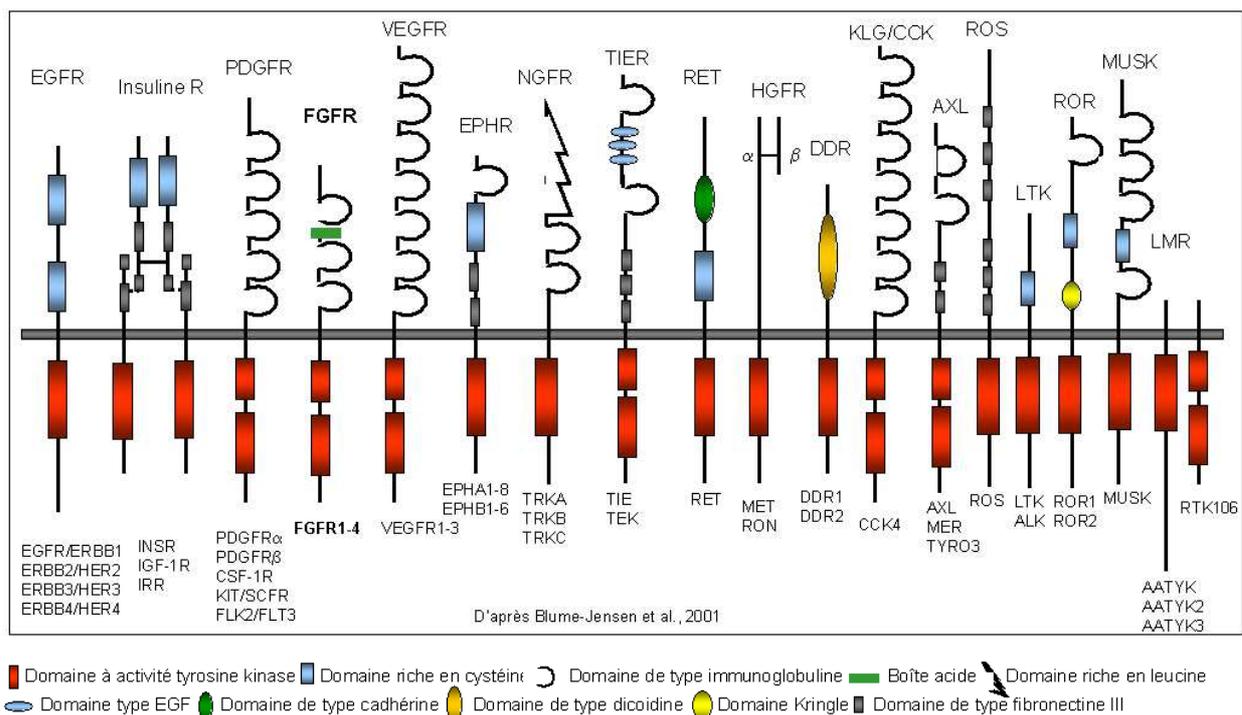


Figure 12 : Classification des récepteurs à activité tyrosine kinase, répartis en 20 familles différentes.

La famille des récepteurs HER comprend quatre récepteurs homologues : HER1 (Erb-B1, EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (Erb-B2), HER3 (Erb-B3), et HER4 (Erb-B4) (Figure 13 A). Ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires présentant un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase (Figure 13 B).

Ces récepteurs sont exprimés à l'état physiologique dans de nombreux types de tissus d'origine épithéliale, mésenchymateuse ou encore neurale, dans lesquels ils jouent un rôle

majeur dans le développement, la prolifération, la différenciation et le métabolisme cellulaire (79-81). Les récepteurs HER sont surexprimés ou présentent des mutations activatrices dans de nombreux types tumoraux (Tableau VII).

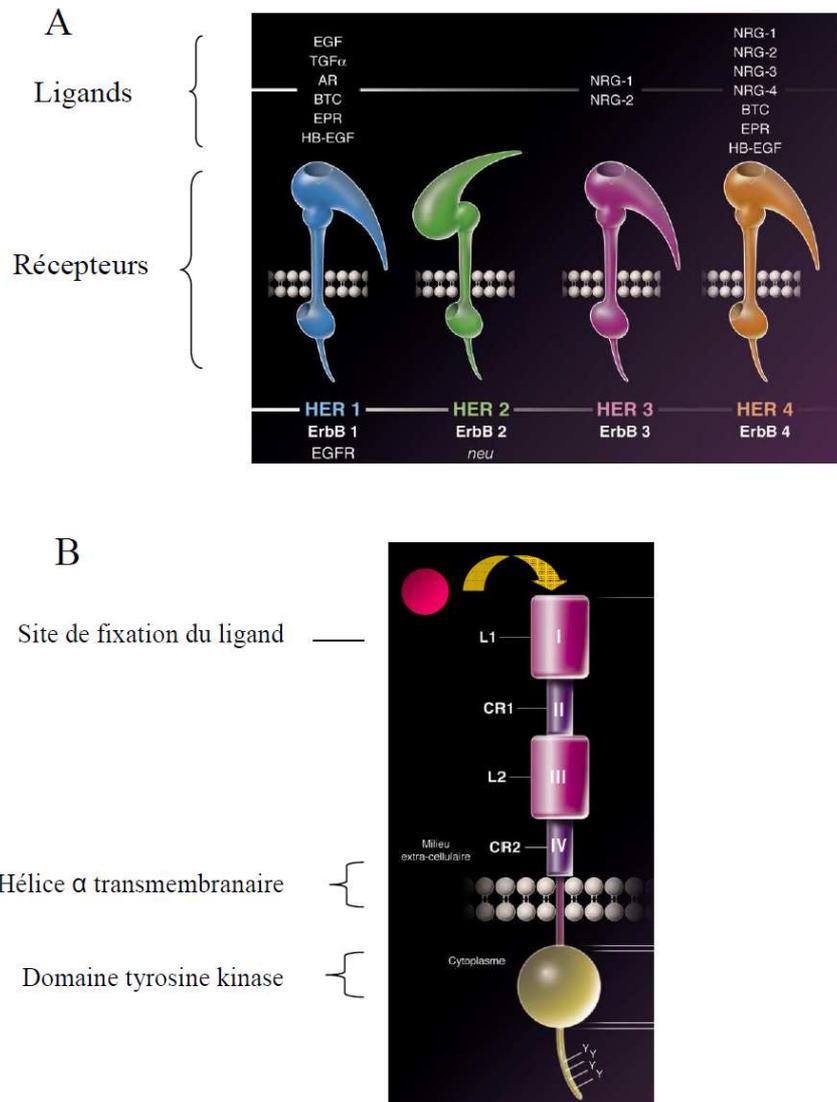


Figure 13: **A:** Famille des récepteur HER comprenant HER1 ou EGFR, HER2, HER3 et HER4. **B:** Structure des récepteurs HER: ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires présentant une partie extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase.

Au cours de ces dernières années, l'étude de ces récepteurs a conduit à une meilleure approche biologique des mécanismes inhérents à la carcinogenèse ainsi qu'au développement de thérapeutiques ciblées (82).

Tableau VII : Fréquence des mutations et de l'amplification des récepteurs HER en fonction du type tumoral. D'après (83).

Gène	Pathologie	Altération	Fréquence
<i>EGFR</i>	Sein, autres	Amplification	5% dans les cancers du sein
	Glioblastomes	Délétion, amplification	40-50%
	Cancer du poumon non à petites cellules	Mutation domaine kinase	10% caucasiens 30-50% asiatiques
<i>HER2</i>	Sein	Amplification	25-30%
	Cancer du poumon non à petites cellules	Mutation domaine kinase	4%
<i>HER3</i>		Pas d'altération significative décrite	
<i>HER4</i>	Divers	Mutation du domaine kinase	1-2% Asie

V.3. Fonctionnement des récepteurs HER – Exemple d'EGFR

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) fut le premier récepteur à tyrosine kinase caractérisé (79, 80), ainsi que l'un des premiers proto-oncogènes identifiés (84). EGFR présente un rôle physiologique préférentiel dans le développement des tissus d'origine épithéliale, contrairement aux récepteurs HER2, HER3 et HER4 qui présentent un rôle dans le développement des tissus nerveux et musculaires squelettiques (80). L'activation d'EGFR a pour conséquences une augmentation de la prolifération cellulaire, de la motilité cellulaire, et une diminution de l'apoptose. EGFR joue également un rôle dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, dans la régulation des métalloprotéases matricielles, du VEGF-A et probablement un rôle dans le maintien des cellules souches (85), ainsi que dans les phénomènes d'angiogenèse tumorale (86).

Des modèles *in vivo* ont confirmé que certaines mutations d'EGFR sont tumorigènes, mais nécessitent la mutation d'autres gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Ainsi EGFR joue un rôle majeur dans l'acquisition du phénotype malin et dans la progression tumorale (60), notamment en ce qui concerne l'oncogenèse colorectale. En clinique, la surexpression d'EGFR est associée à un pronostic péjoratif ainsi qu'à un risque accru de diffusion métastatique (87, 88).

Il existe une fonction nucléaire d'EGFR. Découverte récemment, la fraction intranucléaire d'EGFR permet l'activation directe de la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans le cycle cellulaire et dans l'inflammation (94, 95). La localisation nucléaire d'EGFR est de mauvais pronostic dans les cancers du sein, des voies aérodigestives supérieures ainsi que dans les cancers de l'ovaire, et pourrait avoir un impact sur la réponse aux traitements par chimiothérapie et par thérapies ciblées (94, 96, 97).

Tableau VIII : Surexpression d'EGFR en fonction des tissus. D'après (98).

Tissus	Surexpression d'EGFR (%)	Référence
Cancer des voies aérodigestives supérieures	80-100	(99-101)
Cancer colorectal	70-90	(68)
Cancer du poumon non à petites cellules	40-80	(102)
Cancer de l'estomac	20-80	(103, 104)
Cancer du pancréas	30-90	(105)
Cancer du sein	15-90	(106)
Cancer de l'ovaire	35-70	(107)
Cancer du rein	50-90	(108)
Gliomes	40-50	(3, 109)
Cancer de la prostate	40-80	(110)
Cancer du col de l'utérus	80-100	(111)

V.3.1. Activation du récepteur par fixation d'un ligand

Les récepteurs HER à l'état monomérique sont normalement exprimés à la surface de la cellule. L'activation du récepteur nécessite sa dimérisation, consécutive à la fixation du ligand. EGFR peut, comme tous les récepteurs de la famille HER, s'homo ou s'hétérodimériser, préférentiellement avec HER2 et HER3, très exceptionnellement avec HER4 (112).

La fixation des ligands au récepteur a pour conséquence la stabilisation du domaine extracellulaire dans une conformation favorable à sa dimérisation avec un second monomère (Figure 14) (83). Cette activation est définitive ; sans mécanisme de déphosphorylation actuellement connu, l'activité tyrosine-kinase du récepteur peut se poursuivre indéfiniment. Le récepteur peut être internalisé et dégradé ou recyclé et ré-exprimé à la surface membranaire.

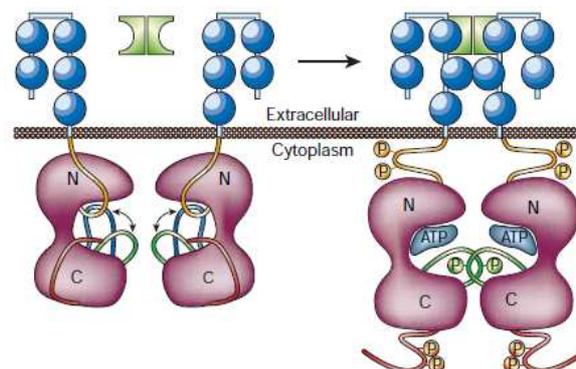


Figure 14 : Mode d'activation des récepteurs HER. Le domaine N-terminal extracellulaire porte le site de fixation du ligand et présente des domaines riches en cystéine permettant l'interaction entre les monomères d'HER. Le domaine C-terminal est riche en résidus tyrosine qui correspondent aux sites de phosphorylation. En l'absence de ligand, le récepteur est inactif. La fixation d'un ligand sur un monomère permet sa dimérisation, ce qui a pour conséquence un rapprochement des domaines kinase, et l'induction de leur transphosphorylation. D'après (36, 83).

Ce système d'homo et hétérodimérisation confère aux récepteurs HER un haut degré de complexité. Différentes combinaisons de récepteurs peuvent aboutir à des réponses biologiques variables (113). Ainsi, les homodimères d'EGFR ou d'HER2 entraînent un signal d'intensité modérée, les homodimères d'HER3 ne permettent pas de transduction du signal.

Les hétérodimères entraînent un signal d'intensité plus forte que les homodimères (114). Les hétérodimères contenant HER2, et plus particulièrement les dimères HER2-HER3 sont les plus actifs (83). Cette dimérisation permet la transphosphorylation du domaine kinase intracellulaire au niveau de résidus tyrosine, permettant ainsi le recrutement de molécules de signalisation et l'activation des voies de signalisation.

Il existe de nombreux ligands spécifiques des récepteurs HER, qui présentent tous un domaine commun, dit EGF (Epidermal Growth Factor)-like, qui leur confère leur spécificité de liaison (115). Ces ligands se divisent en trois groupes en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs (Figure 15).

Ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs ancrés dans la membrane. Leur activation se fait par clivage par des métalloprotéases, générant ainsi des ligands solubles d'environ 55 acides aminés qui vont pouvoir se fixer sur le récepteur (19, 80). Dans certaines circonstances, les précurseurs membranaires sont capables d'activer les récepteurs HER sans protéolyse préalable (80). Plusieurs études mettent en évidence l'importance de ces phénomènes d'activation des précurseurs de ces ligands dans la prolifération et la migration cellulaires et font de ces protéases des cibles thérapeutiques potentielles (116, 117).

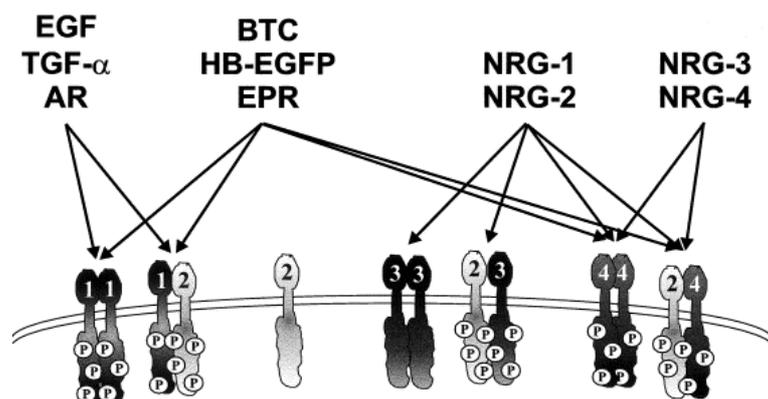


Figure 15 : Principaux ligands responsables de l'activation des récepteurs HER. Ces ligands présentent tous un domaine EGF-like qui leur confère leur spécificité de liaison. Ces ligands se divisent en trois groupes en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs: Il n'existe aucun ligand identifié pour HER2. D'après (115).

V.3.2. Transduction du signal en aval des récepteurs HER

Suite à un stimulus tel que la fixation du ligand sur un récepteur s'impose la nécessité de transmettre l'information depuis le compartiment extracellulaire vers la cible intracellulaire (dans notre cas, le noyau) (Figure 16). Ce phénomène, appelé transduction du signal, s'effectue via un système de phosphorylations en cascade impliquant plusieurs chaînes de protéines.

Les mécanismes de phosphorylation sont des mécanismes de régulation clé chez les eucaryotes, permettant l'activation ou la désactivation de nombreux récepteurs et enzymes impliqués dans la signalisation cellulaire.

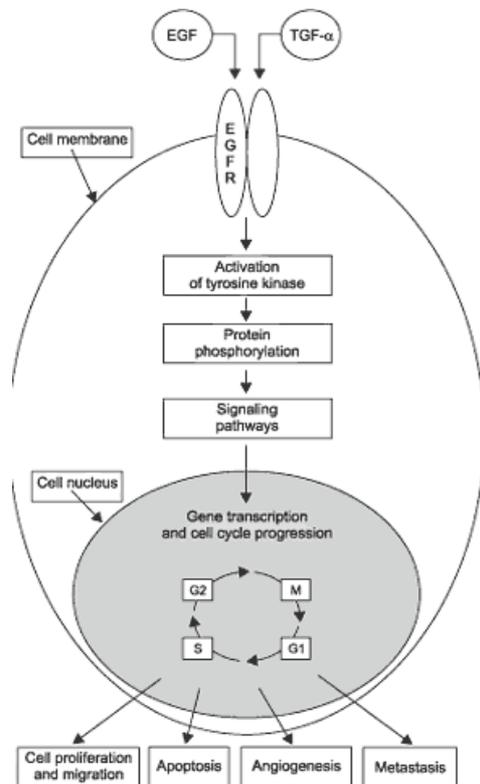


Figure 16 : Transduction du signal en aval des récepteurs HER. D'après (118).

Le phénomène de phosphorylation des phosphoprotéines fait partie des modifications post traductionnelles. Globalement, les modifications post traductionnelles jouent des rôles variables, et peuvent servir à la régulation ou la modulation de la fonction des protéines, à leur étiquetage ou encore à leur encrage ou leur adressage (119).

La phosphorylation des protéines consiste en l'ajout d'un groupement PO_4^{3-} . Chez les eucaryotes, c'est l'un des mécanismes de régulation le plus important et le plus fréquent (120). Ce phénomène est réversible. Ainsi, certaines protéines, les kinases, sont responsables de la phosphorylation d'autres protéines, et d'autres, les phosphatases, sont responsables de la déphosphorylation des protéines, les phosphatases.

Ce système utilise de l'ATP ; le phosphate est transféré sur le résidu cible, générant ainsi de l'ADP. Les protéines ainsi phosphorylées acquièrent une capacité d'interaction avec d'autres protéines. Cette étape clé du système est ciblée par les inhibiteurs de tyrosine kinase.

En ce qui concerne les récepteurs HER, leur activation a pour conséquence l'activation de diverses voies de signalisation intracytoplasmiques ; les plus décrites sont la voie des PI3K/AKT, la voie des RAS/RAF/MAPK, la voie de JAK/STAT3 (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) ainsi que Src/PLC γ (Src/Phospholipase C γ) (Figure 17). Les dysfonctionnements de ces voies de signalisation sont impliqués dans la résistance aux thérapies ciblées anti-EGFR.

Voie des RAS/RAF/MAPK

La voie des RAS/RAF/MAPK présente un rôle central dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire d'un large spectre de tumeurs humaines. Cette voie, après activation des récepteurs, implique l'activation de RAS, à l'origine de la cascade des activités de phosphorylation : RAF (MAP kinase kinase kinase), MEK (mitogen-activated extracellular signal regulated kinase-activating kinase) (MAP kinase kinase) et ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) (MAP kinase) (121). ERK est ensuite transloquée dans le noyau où elle active différents facteurs de transcription de gènes impliqués dans la réplication et dans le cycle cellulaire. De nombreuses molécules ont été conçues pour inhiber différentes étapes de cette voie et sont actuellement en cours d'évaluation dans des essais de phase III.

Voie des PI3K/AKT

Plusieurs fonctions cellulaires sont régulées par la voie de signalisation des PI3K/AKT, telles que le métabolisme cellulaire glucidique *via* GLUT4 (Glucose transporter type 4) et GSK3 (Glycogene Synthase Kinase 3), lipidique, et insulinique au niveau hépatique (122).

L'activation de cette voie en pathologie cancéreuse favorise le développement tumoral et l'angiogenèse, stimule la prolifération cellulaire et réprime l'apoptose (123). Cette voie est également impliquée dans les phénomènes de diffusion métastatique (122, 124).

L'activation de divers récepteurs à tyrosine kinase tels qu'EGFR mais également PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor), FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) et IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), permet d'activer la protéine PI3K. Cette activation de PI3K a pour conséquence la formation de PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate) à partir de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5 diphosphate). PIP3 phosphoryle à son tour AKT, ce qui permet son activation (122). La protéine PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten) permet de réguler ce système en déphosphorylant PIP3 en PIP2. AKT active à son tour les protéines GSK3 β et P70S6K (Figure 17).

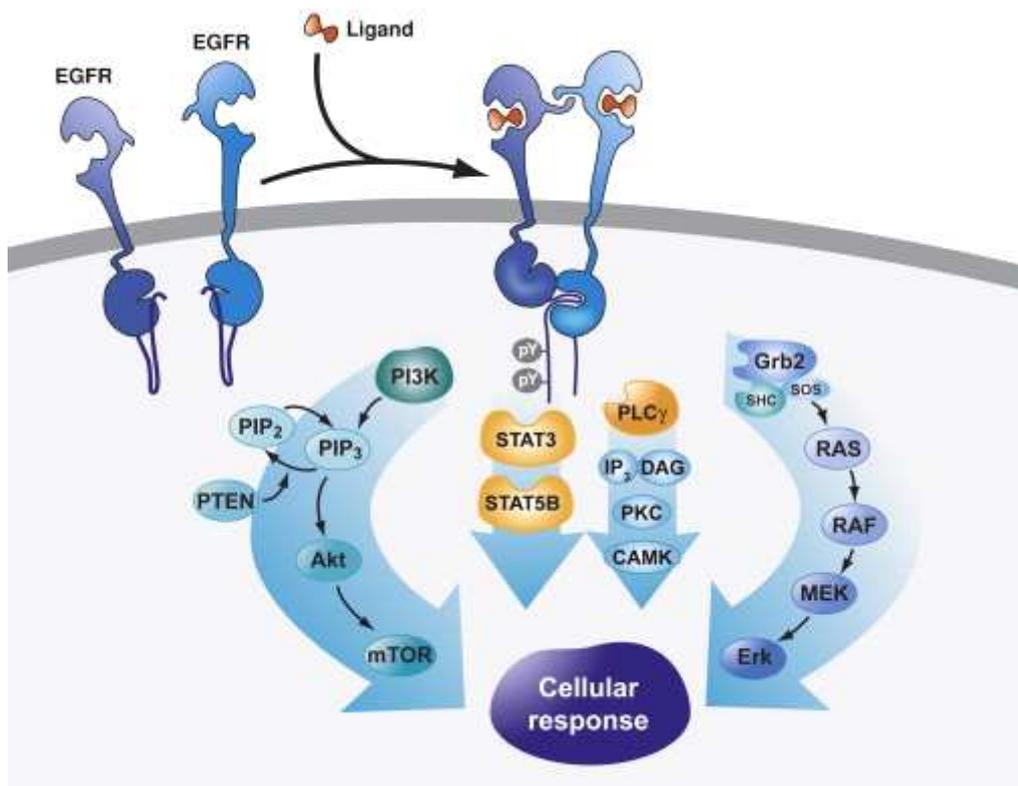


Figure 17 : Principales voies de signalisation en aval des récepteurs HER : voie des PI3K/AKT, la voie des RAS/RAF/MAPK, la voie de JAK/STAT3 et Src/PLC γ . Les résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs HER servent de sites d'ancrage pour des adaptateurs intracellulaires tels que Grb2, des enzymes intracellulaires telles que PLC γ , ou encore des facteurs de transcription tels que STAT3. Le couplage des récepteurs HER à ces voies de signalisation permet une grande diversité de réponses cellulaires (prolifération, survie, migration...). D'après (125).

V.4. Mise en évidence de biomarqueurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR

Les thérapies ciblées semblaient indiquées en cas d'expression de la cible tumorale. Si ceci se vérifie dans le cas de la surexpression du récepteur HER2 en rapport avec la réponse au traitement par trastuzumab dans le cancer du sein (126), en revanche, les limites de ce concept sont rencontrées dès l'utilisation du cétuximab, pour lequel l'expression de la cible thérapeutique ne peut être mise en relation avec une réponse clinique (68, 127-130).

V.4.1. Expression d'EGFR

Aucun lien entre l'expression d'EGFR et la réponse aux anticorps anti-EGFR n'a été clairement mis en évidence; en effet le niveau d'expression d'EGFR ainsi que le pourcentage de cellules exprimant EGFR en immunohistochimie ne corrèlent pas avec les taux de réponse au cétuximab (68, 127-129) ni au panitumumab (130). Notamment une étude clinique a pu mettre en évidence des taux de réponse de l'ordre de 25% chez des patients atteints de cancer des voies aérodigestives supérieures n'exprimant pas EGFR (127).

Plusieurs auteurs ont proposé des hypothèses suite à ces observations. En ce qui concerne l'aspect technique, il serait possible que le statut EGFR varie en fonction des kits d'immunohistochimie utilisés (85, 131). En effet les épitopes reconnus par les anticorps de marquage d'EGFR sont variables en fonction des kits utilisés et leur cross-validation n'a pas été réalisée avant leur commercialisation. De plus les anticorps de marquage d'EGFR marquent indifféremment les récepteurs de haute ou de basse affinité pour les ligands d'EGFR. Or une faible affinité d'EGFR pour son ligand peut être mise en relation avec une faible affinité pour le cétuximab (132). D'autre part, il existe une discordance entre l'expression d'EGFR dans la tumeur primitive et dans les métastases dans plus de 40% des cas (133).

L'expression d'EGFR reste cependant un marqueur pronostique dans les cancers colorectaux (131). D'autres paramètres tels que l'état de phosphorylation du récepteur, son amplification ou encore la présence de mutations ont été évalués dans diverses études.

Amplification d'EGFR

En fonction des études, l'augmentation du nombre de copies d'EGFR (3 à 5 fois) est observée à des fréquences comprises entre 0,6 et 31% (131). Les méthodes principales de mise en

évidence de l'augmentation du nombre de copies d'EGFR sont la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) et la CISH (Chromogenic In Situ Hybridization). L'augmentation du nombre de copies d'EGFR peut également être mise en évidence par PCR quantitative. Les études évaluant l'utilisation potentielle de ce paramètre comme marqueur prédictif de réponse au cétuximab ou au panitumumab sont contradictoires, mais une grande majorité des résultats mettent en évidence un lien avec les taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale des patients atteints de cancer colorectal (131, 134).

Cependant l'utilisation de ce paramètre en pratique clinique nécessite encore une standardisation des techniques d'évaluation du nombre de copies d'EGFR (134). En effet la reproductibilité de ces techniques est limitée et il n'existe pas de protocole standardisé pour l'obtention d'un score représentatif du niveau d'expression d'EGFR (134, 135).

Mutations d'EGFR

EGFRvIII ou Δ EGFR est la mutation la plus commune d'EGFR (125, 136). Cette mutation a pour conséquence l'expression d'une forme tronquée du récepteur. La partie extracellulaire absente empêche ainsi la fixation et donc l'activité des anticorps anti-EGFR (137). Cette mutation est observée dans les glioblastomes, ainsi que dans les cancers du sein et de la prostate (85). Cependant la fréquence de cette mutation dans les cancers colorectaux est très faible (<1%) (85, 131) et les conséquences en termes de résistance au cétuximab ou au panitumumab sont moindres (87, 88).

V.4.2. Voie des RAS/RAF/MAPK

Les effecteurs intracellulaires appartenant à la voie des RAS/RAF/MAPK sont fortement impliqués dans les mécanismes de résistance aux anticorps anti-EGFR. L'activation constitutive de cette voie de signalisation peut résulter de divers mécanismes, tels que l'activation de la protéine RAS ou encore RAF (Figure 18).

RAS

RAS est une protéine à activité GTPasique. Elle existe sous deux formes, une forme active liée au GTP, et une inactive liée au GDP (Figure 19). RAS oscille donc entre ces deux états par hydrolyse du GTP en GDP (139).

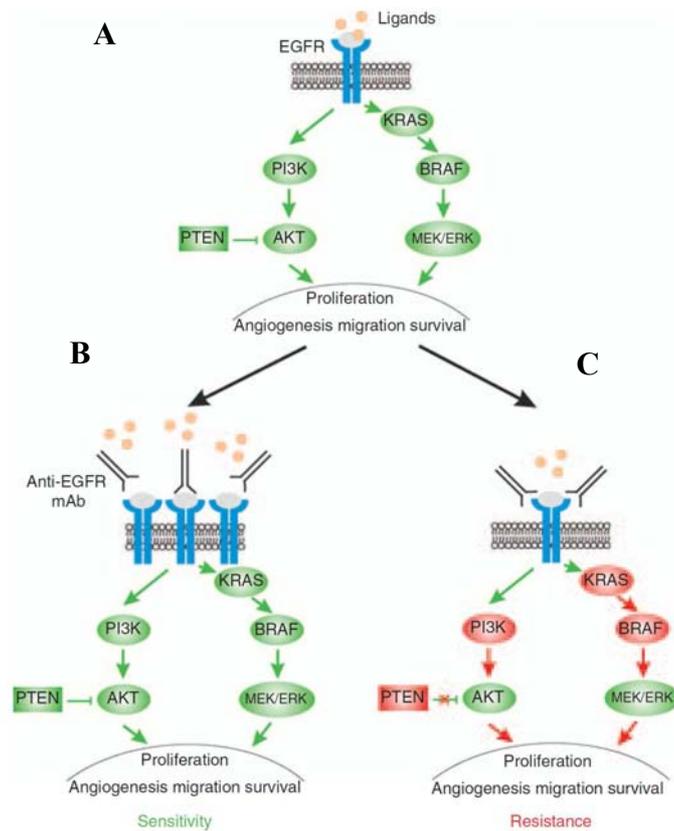


Figure 18 : A: EGFR et principales voies de transduction du signal. B : Fonctionnement normal d'un anticorps anti-EGFR. C : Résistance en cas d'altération d'effecteurs tels que RAS, RAF, PI3K (activations) ou PTEN (inactivation). D'après (138).

Les protéines RAS sont codées par trois proto-oncogènes, *HRAS*, *KRAS* et *NRAS*. Certaines mutations de ces gènes ont pour conséquence l'expression d'une protéine RAS présentant des modifications conformationnelles et fonctionnelles. Les mutations les plus décrites à ce jour

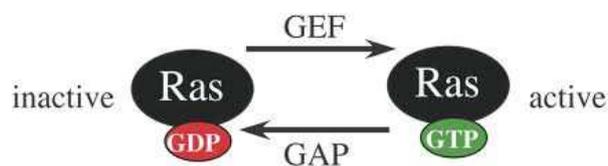


Figure 19 : Fonctionnement de la protéine RAS. Cette protéine peut se trouver sous deux formes : une forme active, liée au GTP, et une forme inactive, liée au GDP ; elle oscille entre ces deux états par son activité GTPasique. D'après (140).

sont les mutations du gène *KRAS*, en particulier les mutations situées dans les codons 12 et 13 de l'exon 2. Ces mutations sont des mutations faux-sens ; il en résulte une substitution d'une glycine par un autre acide aminé, ce qui a pour conséquence une altération de l'activité GTP-ase intrinsèque de la protéine et son accumulation sous sa forme active, RAS-GTP, ainsi qu'une résistance aux protéines GAP (GTPase-activating proteins) (Figure 20) (141).

RAS se trouve donc sous sa forme active de manière constitutive, et ce indépendamment de l'état d'activation du récepteur, ce qui explique le rôle majeur de l'activation de cette protéine dans la résistance au cétuximab et au panitumumab dans les cancers colorectaux métastatiques.

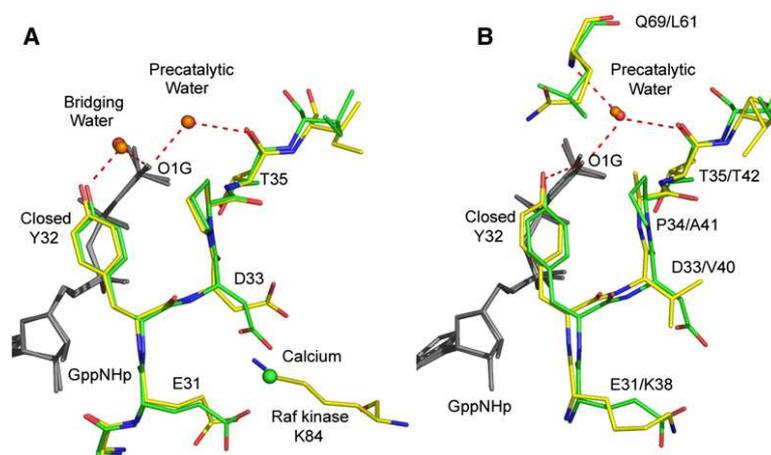


Figure 20 : Les mutations du gène *KRAS* ont pour conséquence l'expression d'une protéine RAS présentant une activité GTP-ase altérée. D'après (140).

Ces mutations, localisées sur les codons 12 et 13 de l'exon 1, ont lieu de manière précoce au cours de l'oncogenèse (15, 142) et concernent 35 à 40% des patients atteints de cancer colorectal métastatique (76). La prévalence de ces mutations est variable en fonction des types tumoraux : 90% des cancers du pancréas, 50% des cancers de la thyroïde, 15% des cancers du poumon, 6% des cancers du sein et des cancers des voies aérodigestives supérieures.

L'impact de ces mutations dans la réponse clinique aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique a été mis en évidence en 2006 (143) et fut depuis confirmé par de nombreuses études (132, 144-152) (tableau IX). Dans ces études, les taux de réponse aux anticorps anti-EGFR évalués par les critères RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) étaient compris entre 0% et 4% parmi les patients porteurs d'une

mutation *KRAS*. La survie globale et la survie sans progression étaient également significativement diminuées parmi les patients porteurs d'une mutation de *KRAS* par rapport aux patients non porteurs d'une mutation *KRAS*.

Tableau IX : Quelques exemples d'essais randomisés évaluant les conséquences de la présence de mutations des codons 12 et 13 du gène *KRAS* et son impact sur la réponse clinique aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique. N : Nombre de patients ; BSC : Best Supportive Care ; FOLFIRI : 5-Fluorouracile/irinotécan ; FOLFOX : 5-Fluorouracile/oxaliplatine ; M: Muté; NM: Non Muté. D'après (141).

Traitement	N	Réponse objective, % (n/N)		Survie sans progression		Survie globale		Références
		<i>KRAS</i> M	<i>KRAS</i> NM	<i>KRAS</i> M	<i>KRAS</i> NM	<i>KRAS</i> M	<i>KRAS</i> NM	
Panitumumab	208	0 (0/84)	17 (21/124)	7,4 semaines	12,3 semaines ($P < 0,0001$)	-	-	(144)
BSC	219	-	-	7,3 semaines	7,3 semaines	-	-	
Cétuximab	198	1,2 (1/81)	12,8 (15/117)	1,8 mois	3,7 mois ($P < 0,001$)	4,5 mois	9,5 mois ($P < 0,001$)	(150)
BSC	196	0 (0/83)	0 (0/113)	1,8 mois	1,9 mois	4,6 mois	4,8 mois	
Cétuximab + FOLFIRI	630	31,3 (67/214)	57,3 (181/316)	7,4 mois	9,9 mois	16,2 mois	23,5 mois	(151)
FOLFIRI	533	36,1 (66/183) ($P = 0,34$)	39,7 (143/360) ($P < 0,0001$)	7,7 mois ($P = 0,26$)	8,4 mois ($P = 0,0012$)	16,7 mois	20,0 mois ($P = 0,0094$)	
Cétuximab + FOLFOX	159	33,8 (27/77)	57,3 (47/82)	5,5 mois	8,3 mois	13,4 mois	22,8 mois	(152)
FOLFOX	166	52,5 (31/59) ($P = 0,029$)	34 (33/97) ($P = 0,0027$)	8,6 mois ($P = 0,015$)	7,2 mois ($P = 0,0064$)	17,5 mois	18,5 mois ($P = 0,38$)	

L'absence de mutation *KRAS* est donc un excellent marqueur prédictif de réponse aux anticorps anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique ; sa valeur prédictive positive est proche de 100%. En revanche, sa valeur prédictive négative est faible, de l'ordre de 50% (153). C'est pourquoi d'autres marqueurs prédictifs de réponse, complémentaires du statut *KRAS*, sont en cours d'évaluation.

Ces résultats ont conduit en 2008 à une modification de l'AMM du cétuximab et du panitumumab; la mise en évidence de l'absence de ces mutations est désormais requise avant toute prescription de l'une de ces deux molécules dans les cancers colorectaux métastatiques.

En ce qui concerne les patients atteints de cancer des voies aérodigestives supérieures, la recherche de ces mutations n'est pas effectuée en raison de leur faible prévalence (76).

D'autres mutations du gène *KRAS* sont également décrites au niveau du codon 61 de l'exon 3 et du codon 146 de l'exon 4 ; contrairement aux mutations décrites dans les codons 12 et 13 de l'exon 2, ces mutations n'affectent pas l'activité GTP-asiqque de la protéine RAS mais augmente d'un facteur 10 (codon 61) et 1000 (codon 146) les échanges GDP-GTP *in vitro* (140, 154). La prévalence de ces mutations est cependant faible et leur implication dans la résistance clinique aux anticorps anti-EGFR, bien que probable, reste à confirmer (141, 155, 156).

RAF

L'activation de la protéine RAS a pour conséquence la phosphorylation de la protéine RAF, proto-oncogène appartenant à la famille des sérine-thréonine kinase (157). Tout comme RAS, la protéine RAF joue un rôle majeur dans la transduction du signal en aval d'EGFR. Il existe des mutations du gène codant la protéine RAF, notamment les mutations du gène *BRAF*. Les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* sont mutuellement exclusives (158).

La fréquence des mutations du gène *BRAF* varie en fonction des tissus (66% dans les mélanomes, 40% dans les cancers de la thyroïde, 20% dans les cancers de l'ovaire, 8% dans les cancers colorectaux) (159, 160). Le rôle de la protéine RAF dans la carcinogenèse colorectale est établi et son rôle de « driver mutation » pourrait expliquer le caractère exclusif des mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* (161).

Plus de 30 mutations somatiques du gène *BRAF* ont été décrites (76). La mutation la plus fréquente de *BRAF* est la mutation *BRAF V600E*, qui représente plus de 90% des mutations. Cette mutation correspond à la substitution d'une valine en position 600 par un acide glutamique ; elle correspond donc à l'insertion d'un acide aminé chargé négativement au niveau du site de phosphorylation de la protéine RAF, ce qui mimerait la phosphorylation de la protéine en position 598 (160). La conséquence de cette mutation est l'expression d'une protéine RAF dont l'activité kinase est multipliée par 10 (161), entraînant ainsi l'activation constitutive de RAF, indépendamment de l'état d'activation de la protéine RAS (160).

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des mutations *BRAF V600E* dans la résistance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR (Figure 21) (145, 162).

En situation clinique, le rôle de la mutation *BRAF V600E* en tant que marqueur pronostique ou marqueur prédictif de réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR reste controversé. Pour Normanno et al., la mutation *BRAF V600E* serait plutôt un marqueur de mauvais pronostic indépendamment du traitement, qu'il s'agisse d'un traitement par chimiothérapie en association ou non à un anti-EGFR. De plus, les auteurs soulignent l'absence d'études prospectives randomisées avec bras témoin dédiée à classer ce marqueur comme marqueur prédictif (163).

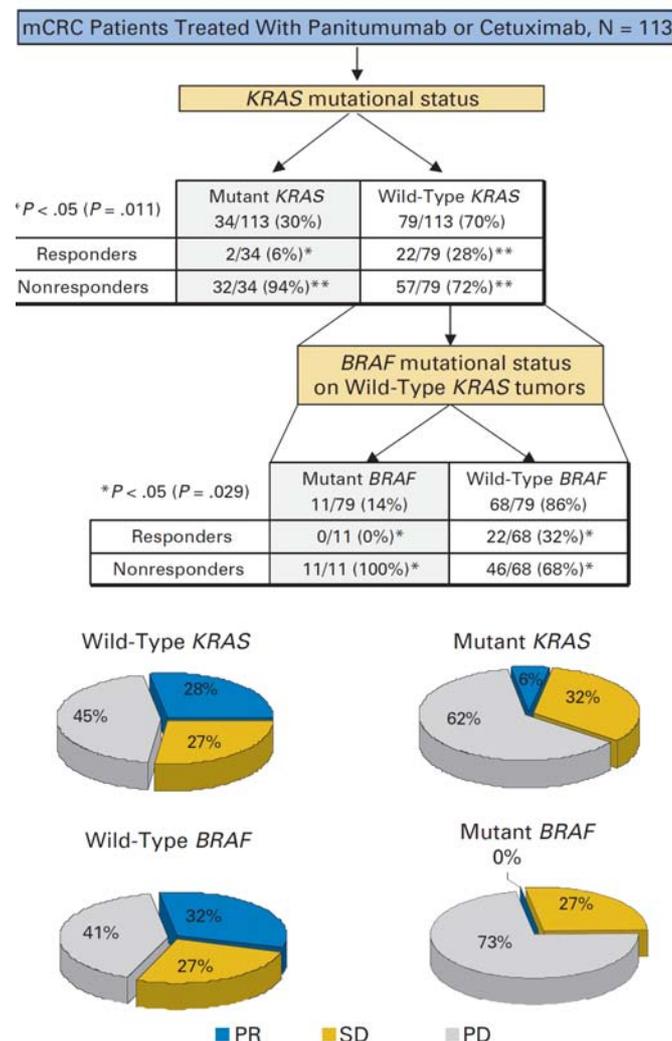


Figure 21 : Les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* sont responsables d'un défaut de réponse au traitement par anticorps monoclonaux anti-EGFR. PR : Partial Response. SD : Stable Disease. PD : Progressive Disease. D'après (162).

En revanche, les arguments de Siena et al. en faveur d'une utilisation de cette mutation comme marqueur prédictif de réponse aux anti-EGFR s'appuient sur les résultats de cinq études cliniques rétrospectives : au cours de ces études, aucun des 38 patients atteints de cancer colorectal métastatique traité par cétuximab ou panitumumab et présentant une mutation *BRAF V600E* n'ont présenté de réponse objective au traitement par anti-EGFR (Tableau X) (164) ; de plus, la survie sans progression ainsi que la survie globale était également significativement plus faibles chez les patients porteurs d'une mutation *BRAF V600E* ; ces résultats sont confirmés par une méta analyse récente (159).

Tableau X : Valeur prédictive négative de la mutation *BRAF V600E*. M: muté. NM: non muté. N: nombre de patients D'après (164).

% Patients <i>BRAF V600E</i> M (N)	% Réponse objective (n/N)		Références
	<i>BRAF V600E</i> M	<i>BRAF V600E</i> NM	
14% (11)	32% (22/69)	0% (0/11)	(162)
4% (5)	47% (52/111)	0% (0/5)	(134)
10% (9)	17% (14/83)	0% (0/9)	(165)
15% (13)	32% (24/74)	0% (0/13)	(156)
Global			
10% (38)	33% (112/342)	0% (0/38)	

A noter qu'un biomarqueur peut être à la fois pronostique et prédictif, ce qui pourrait être le cas de la mutation *BRAF V600E* (12). De plus, la difficulté pour obtenir un niveau de preuve suffisant nécessaire à l'utilisation de ce marqueur comme marqueur prédictif de réponse est probablement lié à la faible prévalence de cette mutation dans les cancers colorectaux métastatiques.

V.4.3. Voie des PI3K/AKT

Tout comme les effecteurs intracellulaires appartenant à la voie des RAS/RAFMAPK, plusieurs protéines de la voie des PI3K/AKT sont impliqués dans les mécanismes de résistance aux anticorps anti-EGFR. L'activation constitutive de cette voie de signalisation

peut résulter de divers mécanismes, tels que l'amplification du gène codant la protéine PI3K, la surexpression de divers effecteurs de cette voie de signalisation tels que AKT et P70S6K, ou encore la perte d'expression de la phosphatase PTEN.

PI3K

Le gène *PIK3CA* codant la sous-unité catalytique p110 de la protéine PI3K est muté dans 10 à 18% des cancers colorectaux. Ces mutations surviennent habituellement sur les exons 9 et 20 (166).

L'activation constitutive de PI3K peut également résulter d'une amplification du gène *PI3KCA*, en particulier dans les cancers des voies aérodigestives supérieures. Ces altérations ont pour conséquence une activité accrue de la transduction du signal *via* la voie des PI3K/AKT, mais également *via* la voie des RAS/RAF/MAPK (86).

In vitro, l'association d'un inhibiteur de PI3K au géfitinib dans des lignées cellulaires résistantes au géfitinib permet de restaurer leur sensibilité (86). Ces résultats sont reproductibles dans des lignées cellulaires résistantes au cétuximab (167).

A nouveau, les études cliniques évaluant la valeur prédictive des mutations de *PIK3CA* sont contradictoires (Tableau XI), bien que dans leur ensemble en faveur d'une valeur prédictive de réponse, de survie sans progression ou de survie globale chez les patients traités par cétuximab ou panitumumab.

Tableau XI : Fréquence des mutations *PIK3CA* chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique. D'après (131).

Pourcentage de mutations	N	Impact clinique	Références
7 %	30	Non	(143)
6 %	30	Non	(145)
18 %	450	Survie globale	(165)
13,6 %	110	Survie sans progression	(168)
13 %	32	Taux de réponse	(169)

Cependant la prévalence de ces mutations est faible. Ceci pourrait expliquer pourquoi les résultats obtenus dans des populations de faible effectif sont non significatifs. De plus, les mutations de *PIK3CA* et des gènes *KRAS*, *BRAF* et *PTEN* ne sont pas mutuellement exclusives (Figure 22), ce qui rend délicate l'interprétation des résultats obtenus dans ces études. La validation éventuelle de ce paramètre pour une prise en compte dans la pratique clinique nécessitera donc une phase de validation sur de larges cohortes de patients (166). Cependant, bien que la valeur prédictive de ces mutations est probable, sa puissance devrait rester inférieure à celles des mutations *KRAS* et *BRAF* (166).

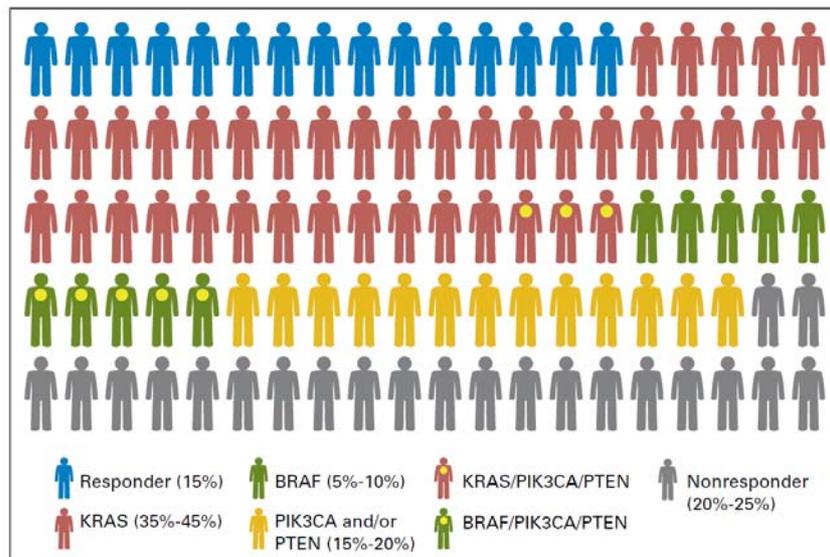


Figure 22 : Représentation graphique d'une cohorte de 100 patients atteints de cancer colorectal traités par cétuximab ou panitumumab. Fréquence d'expression des mutations *KRAS*, *BRAF V600E*, et *PIK3CA* et fréquence de la perte d'expression de la protéine *PTEN*. D'après (166).

PTEN

La protéine *PTEN* présente une activité lipide phosphatase en N-Terminal et apparaît comme le régulateur négatif majeur de la voie des *PI3K/AKT*. Le gène *PTEN* localisé sur le chromosome 10q23.3, fut identifié en 1997 comme étant un gène suppresseur de tumeur. Shen et al. ont démontré le rôle de *PTEN* dans la stabilité du génome (170). Les mutations somatiques de *PTEN* sont détectées à une fréquence variable selon le type de cancer. La

fréquence des mutations alléliques est estimée de 50 à 80% dans les tumeurs sporadiques; c'est le gène le plus fréquemment muté après *P53*.

Dans la majorité des cancers humains, les altérations génétiques de *PTEN* sont somatiques. Les altérations observées sont essentiellement des mutations non-sens, des mutations faux sens et des mutations responsables d'une altération du cadre de lecture : délétions, insertions ou mutations du site d'épissage. Il existe également des réarrangements chromosomiques ainsi que des amplifications géniques. *PTEN* peut également être inactivé par des modulations épigénétiques (166).

PTEN est muté dans divers types de cancers dont les cancers de prostate (171-173), les mélanomes (174, 175) et les lymphomes (176). Dans le cas des cancers du sein, les mutations somatiques sont associées à la progression de la tumeur et non à son initiation (177). Des anomalies structurales de la protéine PTEN sont présentes dans 37% des tumeurs primaires de cancers colorectaux (178).

L'implication de PTEN dans la réponse à diverses thérapies ciblées anti-HER a été largement décrite *in vitro*. Plusieurs études réalisées sur des modèles cellulaires délétés pour *PTEN* résistants au cétuximab au panitumumab, ou encore au trastuzumab mettent en évidence une restauration de la sensibilité de ces lignées par transfection de *PTEN*. De même, d'autres études ont mis en évidence une variation de la sensibilité de différentes lignées de cancer du poumon au géfitinib en fonction de la présence ou de la perte d'expression de PTEN (86).

La transposition de ces résultats en pratique clinique reste difficile. Lors d'une étude réalisée chez 27 patients atteints de cancer colorectal métastatique traités par cétuximab, parmi les 11 patients présentant une perte d'expression de PTEN, aucun bénéfice du traitement par cétuximab n'était mis en évidence (148).

Une autre étude a été réalisée chez 173 patients atteints de cancer colorectal métastatique et traités par cétuximab ou panitumumab (134). Dans cette étude, parmi les 116 patients non porteurs de mutation *KRAS*, l'étude de l'expression de PTEN en immunohistochimie mettait en évidence une différence de survie globale entre les patients exprimant PTEN et les patients présentant une perte de l'expression de PTEN, mais aucun lien avec la survie sans progression et les taux de réponse n'était mis en évidence.

Une étude plus récente a été réalisée chez 112 patients atteints de cancer colorectal métastatique traités par cétuximab. L'étude de l'expression de PTEN en immunohistochimie n'a pas mis en évidence de différence significative en termes de survie sans progression ou de survie globale entre les patients dont la tumeur exprimait normalement ou faiblement PTEN (179).

Comme dans le cas des études évaluant la valeur prédictive de l'expression d'EGFR, se posent ici des limites techniques. Là encore les anticorps de marquage de PTEN utilisés sont variables d'une étude à l'autre, et l'attribution d'un score représentatif de l'intensité de marquage dépend, selon les études, du marquage cytoplasmique et/ou nucléaire, et d'un pourcentage variable de cellules marquées. Ces limitations techniques pourraient être à l'origine de ces discordances entre les différentes études cliniques. Ces discordances se retrouvent également dans les études sur la valeur prédictive de PTEN dans la réponse aux anti-HER2 dans les cancers du sein (131, 179-181).

Activation de récepteurs et voies de signalisation alternatifs

Plusieurs études ont démontré que le blocage d'EGFR peut entraîner une activation des mêmes fonctions cellulaires par d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, tels que IGF1R, VEGFR, PDGFR ou encore c-MET activant ainsi des voies de signalisation redondantes (182-184).

Tout comme EGFR, IGF1R est responsable de l'activation des voies des PI3K/AKT et RAS/RAF/MAPK. IGF1R est surexprimé dans de nombreux cancers. Son implication dans la résistance au cétuximab et aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR a été démontrée dans diverses lignées cellulaires *in vitro*. Dans plusieurs études cliniques réalisées chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique, la surexpression d'IGF1R ou la présence de polymorphisme a pu être mis en relation avec une augmentation des taux de réponse au cétuximab, ainsi qu'une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale (183, 184). Actuellement, le ciblage simultané d'IGF1R et EGFR semble être une approche thérapeutique intéressante (117).

V.4.4. Autres marqueurs

P53

Les mutations du gène suppresseur de tumeurs *P53* pourraient également être prédictives de la sensibilité au cétuximab. Les mutations de *P53* comptent parmi les plus fréquentes dans la plupart des types tumoraux. Dans une étude récente, la présence de mutations de *P53* était significativement associée à des taux de réponse plus élevés au cétuximab chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique (185).

Amphirégulines et épirégulines

L'affinité de l'épiréguline pour EGFR et HER4 est plus faible que celle de l'EGF. En revanche, contrairement à l'EGF, sa fixation entraîne un état d'activation prolongé du récepteur. Une élévation des niveaux d'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline pourrait jouer un rôle important dans la croissance et la survie tumorales par stimulation autocrine d'EGFR (149). Plusieurs études réalisées chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique suggèrent un lien entre des niveaux d'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline élevés et l'absence de réponse clinique au cétuximab. Les résultats sont similaires en termes de survie sans progression et de survie globale (149, 186).

Il existe également des paramètres non dépendant des caractéristiques tumorales, dépendantes des caractéristiques propres au patient, et qui représentent des candidats potentiels comme marqueurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR.

ADCC et polymorphisme des gènes *FcγRIIa* et *FcγRIIIa*

Les récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines sont des récepteurs de surface pour les IgG situés sur les cellules immunes effectrices (natural killers et macrophages). Ces récepteurs joueraient un rôle dans l'ADCC, qui ferait partie des mécanismes d'action secondaires des anticorps monoclonaux de type IgG1, tels que le cétuximab et le trastuzumab (187). Bien que le panitumumab soit une IgG2, ce phénomène d'ADCC a été décrit récemment dans les cancers des voies aérodigestives supérieures, à des concentrations analogues à des doses thérapeutiques (188). Le polymorphisme des gènes codant ces récepteurs, *FcγRIIa* et *FcγRIIIa*, peut faire varier l'affinité des récepteurs pour les IgG. Ainsi, il a été démontré que les génotypes *FcγRIIa*-131HH et *FcγRIIIa*-158VV pouvaient avoir un

impact sur la survie sans progression chez des patients traités par cétuximab atteints de cancer colorectal métastatique (63). Ces résultats ont été confirmés dans une étude récente (189).

Angiogenèse

Dans les cellules tumorales, EGFR contrôle partiellement la production de certains facteurs pro-angiogéniques, dont la production de VEGF. L'inhibition d'EGFR a pour conséquence une inhibition de l'angiogenèse médiée par le VEGF ainsi que de nombreux médiateurs de l'angiogenèse (86). L'induction de résistance à des anticorps monoclonaux, dont le cétuximab, ou encore à des inhibiteurs de tyrosine kinase, par injections itératives à des souris xénogreffées a permis de mettre en évidence une augmentation des niveaux d'expression du VEGF associée à une augmentation de l'angiogenèse (66, 190), sans modification majeure des niveaux d'expression d'autres protéines telles que EGFR, p53, MDM2 et AKT. Cette augmentation des niveaux d'expression de VEGF pourrait être responsable d'une résistance au cétuximab chez l'homme (191).

Rash acnéiforme

Plusieurs études ont démontré que cet effet indésirable est un facteur de réponse aux anti-EGFR chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique (Figure 23) (68, 128, 132, 191, 192). Cependant, l'apparition de toxicité cutanée de grades 3 et 4 est observée dans moins de 5% des cas. L'étude Everest évaluait l'efficacité du cétuximab en escalade de dose jusqu'à apparition d'une toxicité cutanée et suggérait également une relation effet-dose du cétuximab. En effet, dans le bras escalade de dose, la réponse tumorale était supérieure au bras témoin (30 vs 13 %) ainsi que la survie sans progression (4,8 vs 3,9 mois) (193). Cependant, la sensibilité et la spécificité de ce paramètre ne sembleraient pas suffisantes pour l'utiliser en pratique clinique (132). De plus, la proportion de patients présentant une toxicité cutanée de grade 3 ou 4 est faible. Un dernier inconvénient de ce marqueur est le fait qu'il n'est évaluable qu'*a posteriori*.

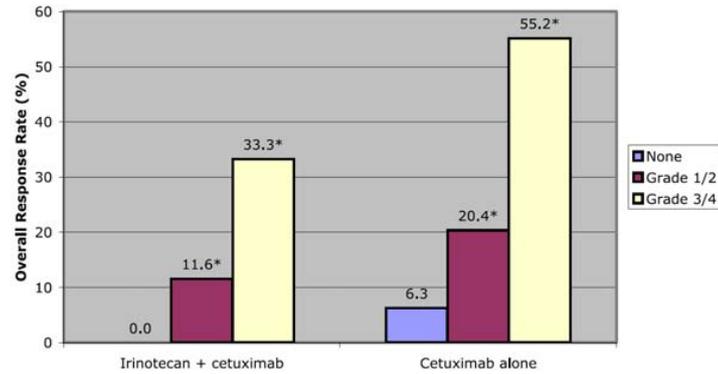
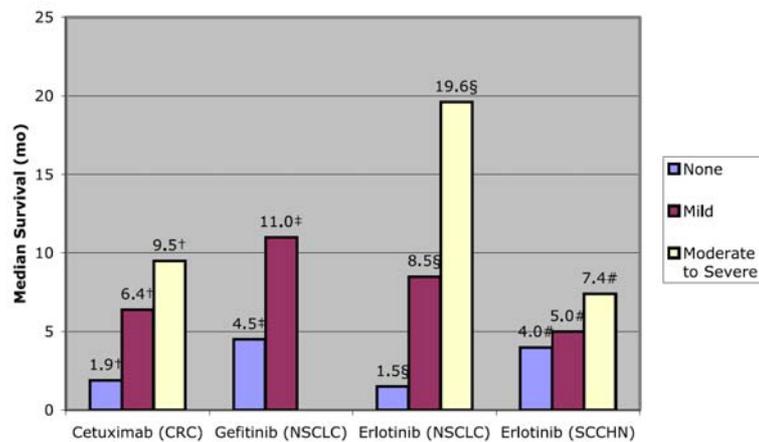
A**B**

Figure 23 : Taux de réponse (A) et survie globale (B) en fonction de la toxicité cutanée des anti-EGFR. D'après (194).

La recherche sur les biomarqueurs est en plein essor. Cependant, si le nombre de publications sur ce sujet est en constante augmentation, le nombre de biomarqueurs validés par la FDA chaque année diminue (195). En effet la méthodologie de mise en évidence puis de validation d'un biomarqueur est délicate et nécessite une approche particulière et le design d'essais cliniques spécifiques et adaptés (77, 196-198).

Les techniques en -omics, c'est-à-dire l'étude du génome, du transcriptome ainsi que du protéome, sont en pleine révolution technologique, ceci permettant leur mise à disposition en pratique clinique (qualitativement parlant mais également en termes de coût). Les applications potentielles pour la recherche de biomarqueurs sont nombreuses.

La génomique est considérée comme l'approche la plus fiable et présente des qualités de robustesse, de sensibilité et de spécificité difficilement égalables. Ces approches ont démontré leur intérêt manifeste.

Cependant, si au cours de l'oncogenèse l'acquisition des caractéristiques des cellules tumorales résulte de l'accumulation de nombreuses altérations génétiques (activation de proto-oncogènes ou inactivation de suppresseurs de tumeurs et des mécanismes de réparation de l'ADN), un inventaire précis de l'état des mutations à un instant donné ne peut rendre compte de la complexité de la cellule tumorale, et ceci pour deux raisons essentielles. D'une part de nombreuses altérations génétiques résultent de l'instabilité du génome et font partie des caractéristiques de la cellule tumorale. Ce sont des mutations dites "passenger", qui n'influencent en rien le phénotype tumoral, contrairement aux mutations dites "driver". D'autre part il est nécessaire de considérer les modulations épigénétiques et les différents facteurs responsables des variations d'expression des ARNm ; de même l'expression des ARNm ne corrèle pas nécessairement avec le niveau d'expression des protéines, et ne peut rendre compte des modifications post traductionnelles telles que la phosphorylation (195, 199). L'approche que nous allons proposer tente de tenir compte de ce constat. Nous verrons cependant que les approches de protéomique présentent de nombreuses limites techniques.

CHAPITRE II – PARTIE EXPÉRIMENTALE

Evaluation intégrative de la fonctionnalité de la signalisation en aval d'EGFR

Application à la prédiction de la réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR
dans le cancer colorectal métastatique

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Laurent-Puig (Hopital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris) et a déjà fait l'objet d'une publication (200). Cette partie propose un mode d'interprétation des données par une approche multidimensionnelle, l'analyse en composante principale.

I. INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu précédemment, actuellement, le seul marqueur prédictif de réponse aux anticorps anti-EGFR est le statut mutationnel *KRAS*, qui présente une valeur prédictive positive (VPP) élevée mais une valeur prédictive négative (VPN) insuffisante. C'est pourquoi il est nécessaire de mettre en évidence d'autres marqueurs complémentaires du statut *KRAS* afin d'améliorer la sélection des patients candidats à une thérapie par anticorps anti-EGFR.

Les approches les plus fréquentes pour tenter de mettre en évidence des sous-groupes de patients susceptibles de répondre aux anticorps anti-EGFR utilisent la présence ou l'absence de mutations de gènes impliqués dans la fonctionnalité de la signalisation en aval d'EGFR. Cependant la présence ou l'absence de mutation ne reflète pas systématiquement l'expression ou la fonctionnalité des protéines codées par ces gènes. En effet des phénomènes épigénétiques tels que la méthylation ou l'acétylation de l'ADN, et des modifications post traductionnelles telles que la phosphorylation sont susceptibles d'influencer la fonctionnalité des protéines. C'est pourquoi nous avons choisi dans cette étude de nous baser sur les niveaux d'expression des formes phosphorylées, c'est-à-dire fonctionnelles, des protéines de signalisation des voies RAS/RAF/MAPK et des PI3K/AKT.

L'interprétation des jeux de données issus de systèmes biologiques complexes peut nécessiter l'utilisation d'outils mathématiques particuliers. En effet, la possibilité de réaliser *a posteriori*, au sein d'un essai, des analyses par sous-groupes est souvent et à juste titre critiquée : ces analyses peuvent entraîner une augmentation du risque de faux-positifs (inflation du risque alpha) et de faux-négatifs (manque de puissance dans les petits sous-groupes). Elles sont très fréquemment réalisées, mais ne peuvent ainsi qu'être exploratoires et indicatives, donnant des pistes pour de futurs essais.

Ici nous proposons l'utilisation de l'analyse en composante principale (ACP) pour l'exploitation des données. L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode d'analyse de données faisant partie du groupe des méthodes exploratoires multidimensionnelles, également appelées méthodes factorielles. Les méthodes factorielles sont des méthodes descriptives qui ne s'appuient pas sur un modèle probabiliste mais dépendent d'un modèle géométrique (201). Elles permettent, entre autres, de classer les populations en sous-groupes, et de prédire l'appartenance d'individus à des groupes.

L'ACP permet de réduire la dimensionnalité d'un jeu de données quantitatives, tout en conservant au mieux la variabilité présente dans ce jeu de données et de faire la synthèse de l'information contenue dans un grand nombre de variables (202).

Cet outil permet également de :

- mettre en évidence des tendances
- décrire de façon synthétique les relations entre les variables
- étudier les structures de liaisons linéaires sur l'ensemble des variables considérées
- déterminer les relations entre les variables étudiées, et voir si ces relations sont vérifiées pour tous les éléments du groupe
- faire émerger une structure, non connue *a priori* au sein d'un groupe
- distinguer des sous-populations
- détecter des points aberrants ou des individus au comportement original dans un ensemble de données d'après un grand nombre de paramètres (201-204).

Jolliffe propose un exemple simple pour illustrer l'utilisation de l'ACP dans la détection de valeurs aberrantes (203). En effet une valeur aberrante est simple à mettre en évidence dans un jeu de données, par représentation graphique ; cette valeur se distingue parfaitement des autres valeurs et se repère visuellement. Si l'on considère maintenant deux paramètres, le poids et la taille d'enfants de 5 à 15 ans, et que l'un des sujets présente une taille de 175 cm et un poids de 25 kg : ces valeurs sont tout à fait cohérentes avec les valeurs du jeu de données. En revanche la combinaison 175cm/25kg n'est pas conforme à la corrélation globale du jeu de données observées. Ce résultat est visuellement évident, mais ne l'est plus lorsque le nombre de variables est élevé, et il est possible qu'aucun point n'apparaisse aberrant de manière évidente (203).

L'ACP permet donc de synthétiser les données en construisant de nouvelles variables, les composantes principales (204). Par exemple, on considère deux variables A et B correspondant au niveau d'expression de deux phosphoprotéines, toutes deux appartenant au réseau de kinases de signalisation intracellulaire en aval d'EGFR. Puisque ces protéines fonctionnent en réseau, leur niveau d'expression est globalement corrélé. On représente les individus chez qui on a évalué ces niveaux d'expression dans un repère à deux dimensions, A en abscisses (x) et B en ordonnées (y). On obtient un nuage de points, et il existe des individus pour lesquels cette corrélation ne se vérifie pas (Figure 24 A).

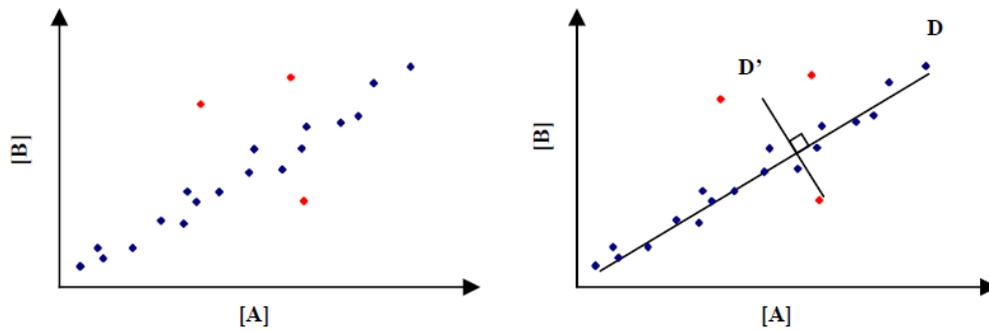
On trace une droite D (qui correspond sous certaines conditions à la droite de corrélation entre A et B). Cette droite est notre première composante principale. On trace alors une seconde droite D' perpendiculaire à D, et décrivant au mieux le nuage de points dans sa largeur. D' est notre seconde (et dernière) composante principale. D' représente les individus pour lesquels les niveaux d'expression de A et de B sont moins bien corrélés. Les équations de chaque droite D et D' sont les combinaisons linéaires de variables A et B.

On effectue alors un changement de repère ; les droites D et D' deviennent les axes (x') et (y') en remplacement des axes (x) et (y). Le long de l'axe (x') vont donc se répartir les points pour lesquels les corrélations entre A et B sont fortes, et le long de l'axe (y') vont se répartir les points pour lesquels les corrélations entre A et B sont faibles. La détection des valeurs aberrantes se fait donc classiquement sur les dernières composantes principales (ici y') (Figure 24 B).

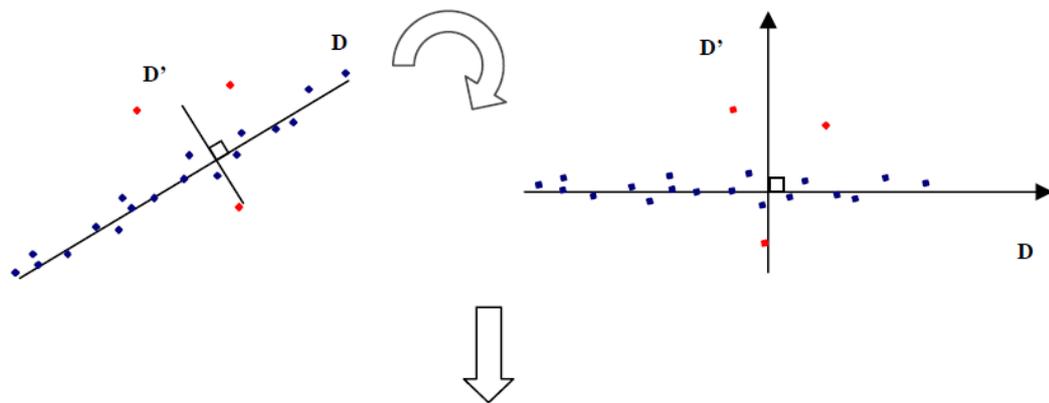
Pour résumer, les derniers axes obtenus par analyse en composante principale sont les axes permettant de décrire des phénomènes très décorréllés, contrairement aux premiers axes qui mettent en évidence les corrélations fortes entre différents paramètres (203).

L'ACP n'est qu'une méthode descriptive que nous couplons ici à une méthode de classification, l'analyse discriminante linéaire. La projection orthogonale des points sur le dernier axe permet d'obtenir une valeur numérique appelée score d'analyse discriminante linéaire ou score LDA (Linear Discriminant Analysis) (Figure 24 C). Plus les paramètres A et B sont décorréllés pour un individu, et plus ce score LDA sera élevé.

A



B



Analyse discriminant linéaire
(Score LDA):

C

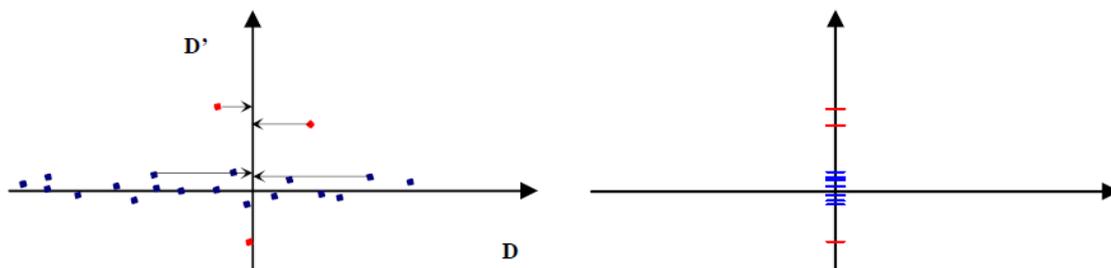


Figure 24 : Principe de l'analyse en composante principale (ACP) couplée à l'analyse discriminante linéaire (LDA). **A :** Une première droite D correspond à la droite de corrélation entre les paramètres A et B. Une seconde droite D' correspond à la perpendiculaire à D. **B :** Un changement de repère est réalisé: D et D' deviennent les nouveaux axes également appelés "composantes principales". **C :** Analyse discriminante linéaire: la projection orthogonale des points sur D' permet l'obtention d'un score, le score LDA.

Objectifs de l'étude

Le but de cette étude est d'évaluer la fonctionnalité des protéines de signalisation en aval d'EGFR dans des échantillons de tumeurs de patients atteints de cancer colorectal métastatique non porteurs de mutation *KRAS* et de mettre en relation ce paramètre avec la réponse clinique aux anticorps monoclonaux anti-EGFR.

II. PATIENTS ET MÉTHODES

Patients

Des échantillons tumoraux congelés de 45 patients (âge moyen : 61,4 ans) présentant un adénocarcinome colorectal métastatique traité par cétuximab (n=44) ou panitumumab (n=1) ont été analysés. L'analyse de l'expression d'EGFR a été réalisée par immunohistochimie et considérée comme positive si au moins 1% des cellules tumorales étaient marquées (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA or Dako, Glostrup, Denmark). Cette étude rétrospective a été réalisée en accord avec les lois d'éthique.

Le traitement anti-EGFR a été administré en seconde, troisième, quatrième ou cinquième ligne dans 19, 17, 5 et 3 cas respectivement. Deux patients ont reçu du cétuximab en première ligne sans chimiothérapie. La médiane de suivi est de 11,3 mois. La réponse tumorale est évaluée par tomодensitométrie et selon les critères RECIST. Dans cette étude, les patients présentant une réponse complète (CR) ou partielle (PR) au traitement sont considérés comme répondeurs, et les patients présentant une maladie stable (SD) ou en progression (PD) sont considérés comme non répondeurs aux anti-EGFR.

Génotypage *KRAS*, *BRAF* et *PIK3CA*

L'ADN est extrait des échantillons tumoraux obtenus avant traitement. Le statut *KRAS* est déterminé rétrospectivement par PCR TaqMan de l'exon 2 (codons 12 et 13) et vérifié par séquençage. Les mutations *BRAF V600E* sont également recherchées par PCR TaqMan. Les mutations *PIK3CA* sont mises en évidence par séquençage direct. Toutes les mutations somatiques mises en évidence ont fait l'objet d'une confirmation par une nouvelle amplification indépendante et par séquençage.

Phosphoprotein array

Les niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation de la voie des PI3K (pAKT, pP70S6K et pGSK3 β) et des MAPK (pERK1/2 et pMEK1), ainsi que pEGFR et pP38MAPK, sont analysés en multiplex par Bioplex[®] phosphoprotein array (BioRad, Ivry-sur-Seine, France), système de cytométrie en flux exploité pour un essai protéique (205). Dans un premiers temps, les fragments de tumeurs congelées d'une taille minimale de 15 mg sont broyés. Les protéines sont extraites à l'aide d'un kit (Biorad Dc Protein Assay, BioRad) et sont dosées selon la méthode de Lowry par détermination de l'absorbance à 690 nm (Multiskan Ascent, LabSystem, Helsinki, Finlande).

Les extraits protéiques sont ensuite analysés en BioPlex. L'essai consiste en une détection des protéines sur la base d'une double réaction immunitaire. La mesure est réalisée en milieu liquide grâce à des billes. Celles-ci sont dotées d'une identité de fluorescence propre qui émet dans le rouge (mesure à 635nm) ; à chaque phosphoprotéine analysée correspond donc une série de billes possédant une adresse spectrale spécifique. Ces billes sont couplées à un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre les protéines d'intérêt et la détection des protéines se fait via un anticorps secondaire couplé à de la biotine. L'ajout de streptavidine provoque une émission de fluorescence dans le vert (mesure à 532nm) ce qui permet une quantification des protéines marquées.

L'essai est réalisé dans une plaque de 96 puits équipée d'un filtre. Dans un premier temps, les billes couplées aux anticorps sont réparties sur la surface poreuse des puits de la plaque préalablement rincée. Puis le lysat protéique est ajouté dans les puits sur les billes. Le tout est mis à incuber durant la nuit à température ambiante, l'anticorps de capture réagit avec la protéine d'intérêt.

Le volume contenu dans les plaques est aspiré. Trois lavages permettent d'éliminer l'excès de réactif et le complexe protéine/bille est retenu au niveau du filtre. L'anticorps de détection est mis au contact des échantillons pendant 30 minutes. Après trois nouveaux lavages, le substrat de l'anticorps de détection est mis à réagir pendant 10 minutes, puis l'appareil réalise la lecture de l'essai et donne un résultat semi-quantitatif en niveau de fluorescence.

Méthodes de classification :

Les variables (pAKT, pGSK3 β , pP70S6K, pMEK1, pERK1/2, pP38MAPK, pP90RSK et pEGFR) sont centrées et réduites. Une ACP est réalisée (logiciel R) est suivie de la détermination du score d'analyse discriminante linéaire ou score LDA (Linear Discriminant

Analysis), compris entre 0 et 1. Une limite à 0,5 est fixée et correspond au barycentre des 2 sous-populations. Les patients sont alors classés en 2 groupes en fonction de ce score ($>0,5$ ou $<0,5$).

La classification est ensuite validée en appliquant l'algorithme de leave-one out : l'analyse est répétée 22 fois (autant qu'il y a de patients). La première analyse est réalisée sur 21 patients, le 22^{ème} patient est classé en fonction des résultats obtenus avec les 21 premiers, et ainsi de suite. La prédiction de réponse ainsi obtenue est alors comparée à la réponse clinique évaluée par les critères RECIST.

Analyse statistique :

Un test de Mann Whitney est utilisé pour la comparaison des scores LDA. L'influence des critères retenus sur la survie globale et la survie sans progression est évaluée par un test du log-rank. Un résultat est considéré comme significatif si $P < 0,05$.

III. RÉSULTATS

III.1. Analyse en composante principale (ACP) et analyse discriminante linéaire (LDA)

Le pouvoir discriminant des 8 axes obtenus par ACP a été testé. Seul le 7^{ème} axe est discriminant et sera retenu pour la suite de l'analyse. Les paramètres qui composent majoritairement ce 7^{ème} axe sont les niveaux d'expression des phosphoprotéines pGSK3 β (46,1%) et pP70S6K (48,2%). Cependant la prise en compte de la totalité des données est nécessaire à l'obtention d'une classification correcte.

Les scores LDA calculés lors des 22 analyses sont détaillés dans la figure 25 et se répartissent entre les valeurs 0 et 1. Les patients sont ici représentés en fonction de leur score LDA et de la réponse clinique selon les critères RECIST (en bleu les patients ayant présenté une réponse clinique partielle ou complète au traitement (patients répondeurs); en rouge les patients ayant présenté une stabilisation ou une progression de la maladie sous traitement (patients non répondeurs)).

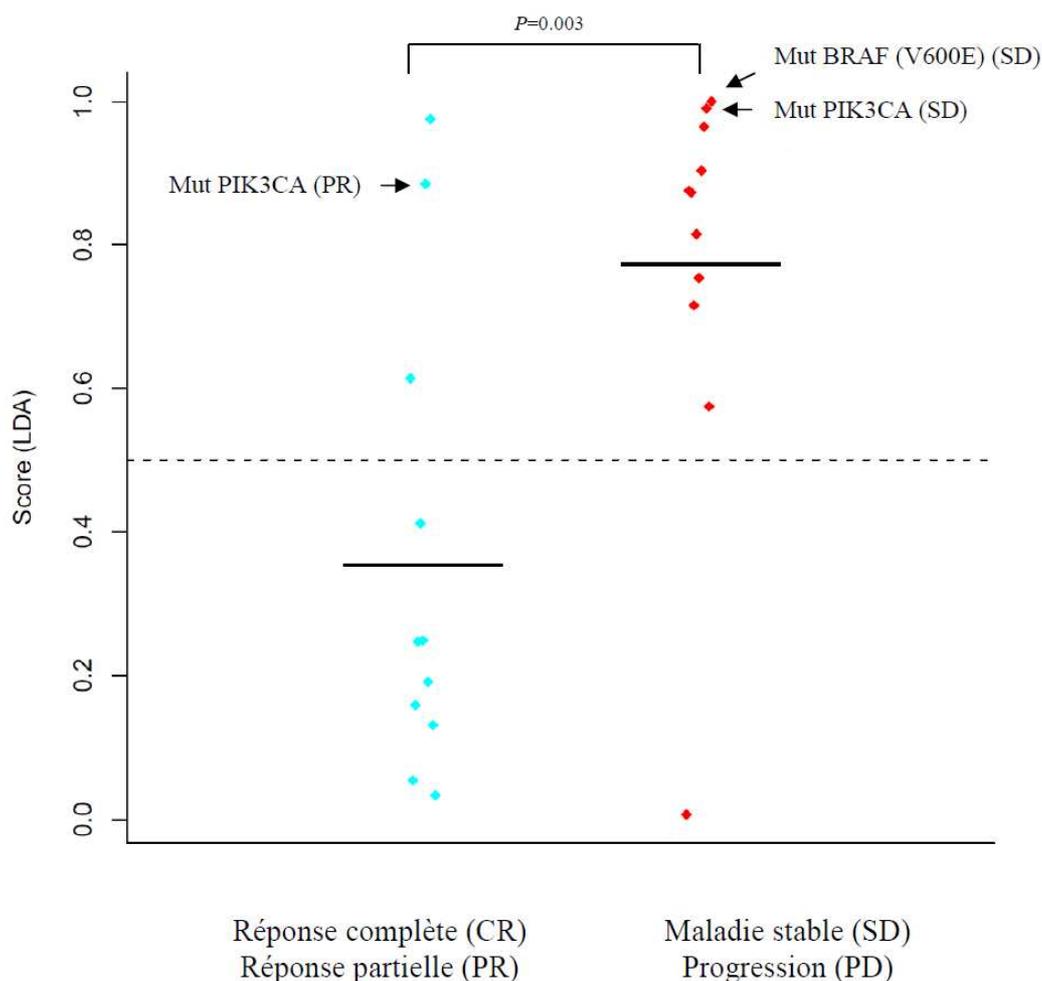


Figure 25 : Score LDA (Linear Discrimination Analysis) obtenu par ACP (Analyse en Composante Principale) réalisée sur les niveaux d'expression de pAKT, pGSK3 β , pP70S6K, pMEK1, pERK1/2, pP38MAPK, pP90RSK et pEGFR. Le seuil est fixé à 0,5 et correspond au barycentre des deux sous-populations. La différence est significative entre les scores des 2 sous-populations ($P=0,003$). ◆ Patients ayant présenté une réponse clinique partielle ou complète au traitement (patients répondeurs). ◆ Patients ayant présenté une stabilisation ou une progression de la maladie sous traitement (patients non répondeurs).

Le score LDA moyen est significativement plus bas chez les patients répondeurs que chez les patients non répondeurs aux anti-EGFR (respectivement $0,36 \pm 0,32$ vs $0,77 \pm 0,28$, $P = 0,003$). Les patients présentant une mutation activatrice de la voie de signalisation des MAPK (mutation *BRAF V600E* ou *PIK3CA*) sont identifiés sur la figure 25. Tous les patients (4/4) présentant l'une des ces mutations activatrices présentent un score LDA élevé ($>0,5$). Un de ces patients présentant un score LDA élevé ainsi qu'une mutation activatrice *PIK3CA*, a tout de même présenté une réponse partielle au traitement par cétuximab.

III.2. Qualité de classement

Parmi les 22 patients *KRAS* sauvages traités par anti-EGFR, 50% des patients (11/22) ont présenté une réponse (partielle ou complète) au traitement, et 50% (11/22) une stabilisation ou progression de la maladie sous traitement.

Parmi les patients *KRAS* sauvages présentant un score LDA bas ($<0,5$), 88,9% (8/9) ont présenté une réponse partielle ou complète au traitement. Parmi les patients *KRAS* sauvages présentant un score LDA élevé ($>0,5$), 76,9% (10/13) présentaient une stabilisation ou une progression de la maladie sous traitement. Le tableau XII résume les qualités de classement des 45 patients inclus dans cette étude en fonction de leur statut *KRAS* (Tableau XII A) ou de la combinaison du statut *KRAS* et du score LDA (Tableau XII B).

III.3. Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives

Le tableau XII compare les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative des deux approches : d'une part le statut *KRAS*, d'autre part le statut *KRAS* combiné au score LDA. Le statut *KRAS* seul présente une spécificité de 100% et une valeur prédictive positive de 100%. En revanche, la sensibilité et la valeur prédictive négative sont faibles (respectivement 68% et 50%).

La combinaison du statut *KRAS* et du score LDA diminue la spécificité (73%) ainsi que la valeur prédictive positive (92%) mais augmente la sensibilité (97%) ainsi que la valeur prédictive négative (89%). Parmi les 22 patients *KRAS* sauvages traités par anti-EGFR, 11 patients ont présenté une réponse au traitement, et 11 patients une stabilisation ou une progression de la maladie.

III.4. Survie globale et survie sans progression

La figure 26 compare la survie sans progression (26 A) et la survie globale (26 B) des patients *KRAS* mutés, des patients *KRAS* sauvages présentant un score LDA élevé et des patients *KRAS* sauvages présentant un score LDA bas.

Tableau XII : Classification des patients en répondeurs (réponse partielle (PR) ou complète (CR)) ou non répondeurs (maladie stable (SD) ou progression (PD)) aux thérapies anti-EGFR. Le tableau A nous donne les résultats du classement en fonction du statut *KRAS*. Le tableau B représente les résultats obtenus en combinant le statut *KRAS* et le score LDA. Le tableau C compare les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN) des deux approches.

A

		Réponse		Total
		SD PD	CR PR	
Statut <i>KRAS</i>	mut	23	0	23
	NM	11	11	22
Total		34	11	45

B

	Réponse		Total
	SD PD	CR PR	
<i>KRAS</i> mut ou NM+ score LDA >0.5	33	3	36
<i>KRAS</i> NM + score LDA <0.5	1	8	9
Total	34	11	45

C

	Statut <i>KRAS</i>	Score LDA + Statut <i>KRAS</i>
Sensibilité	68%	97%
Spécificité	100%	73%
VPP	100%	92%
VPN	50%	89%

La médiane de survie sans progression des patients *KRAS* mutés est significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA bas, et significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA élevé (respectivement $8,6 \pm 6,6$ semaines vs $16,0 \pm 18,6$ semaines ($P = 0,0187$) et $33,0 \pm 11,6$ semaines ($P < 0,0001$)) (Figure 26 A).

En ce qui concerne la survie globale, les patients *KRAS* mutés présentent une médiane de survie qui n'est pas significativement différente de celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA bas, et significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA

élevé (respectivement $7,8 \pm 5,0$ mois vs $9,6 \pm 12,3$ mois ($P = 0,125$) et $21,0 \pm 6,9$ mois ($P = 0,0007$)) (Figure 26 B).

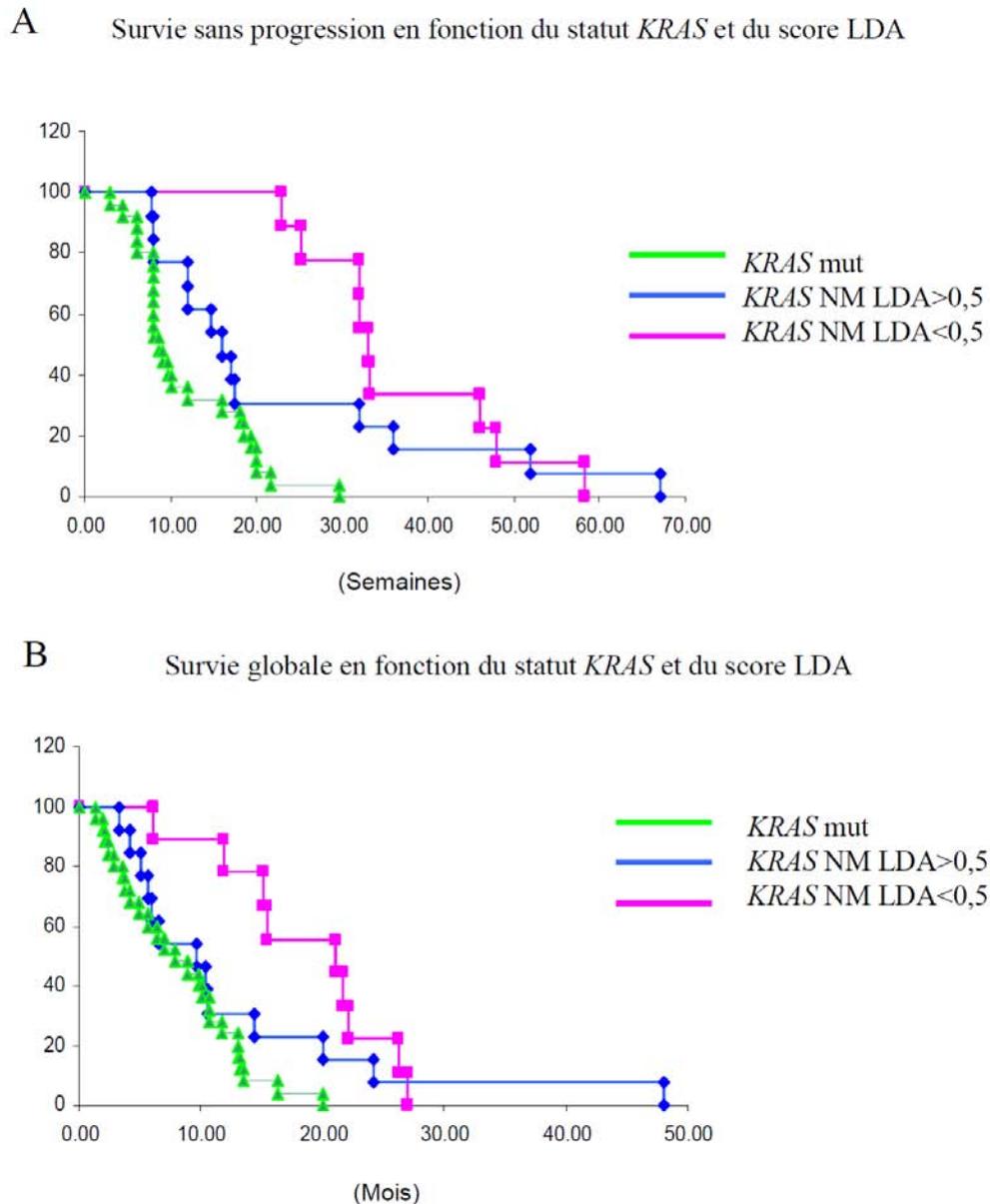


Figure 26 : A: La médiane de survie sans progression des patients *KRAS* mutés est significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA bas, et significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA élevé (respectivement $8,6 \pm 6,6$ semaines vs $16,0 \pm 18,6$ semaines ($P = 0,0187$) et $33,0 \pm 11,6$ semaines ($P < 0,0001$)).

B: Survie globale: les patients *KRAS* mutés présentent une médiane de survie globale qui n'est pas significativement différente de celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA bas, et significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA élevé (respectivement $7,8 \pm 5,0$ mois vs $9,6 \pm 12,3$ mois ($P = 0,125$) et $21,0 \pm 6,9$ mois ($P = 0,0007$)).

IV. DISCUSSION

L'analyse en composante principale (ACP) représente une approche potentiellement adaptée à l'étude de systèmes complexes tels que les réseaux de protéines de signalisation, et à la mise en évidence de biomarqueurs diagnostiques (206) ou encore de marqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées (198, 207, 208). Cette méthode présente l'avantage de minimiser les risques de surapprentissage sur de petites séries de données. En ce qui concerne la réponse aux thérapies anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique, ces résultats préliminaires permettent de classer des patients non mutés *KRAS* en répondeurs (réponse partielle ou complète) ou non répondeurs (stabilisation ou progression de la maladie) aux thérapies anti-EGFR (cétuximab et panitumumab) dans 82% des cas, en fonction des données issues de paramètres représentatifs de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval du récepteur à l'EGF. La valeur prédictive négative de la combinaison du statut *KRAS* et du score LDA est augmentée, en revanche la valeur prédictive positive est diminuée. Ceci pose la question de la priorité à donner lors du développement d'un biomarqueur entre la sensibilité et la spécificité.

Ces résultats suggèrent l'importance de la fonctionnalité de la signalisation en aval d'EGFR et l'intérêt potentiel de l'évaluation des niveaux d'expression des kinases de signalisation chez les patients à même de bénéficier d'une thérapie ciblant EGFR. Ces résultats doivent cependant être validés par une seconde série de données. Cette étape de validation est en cours. Les applications potentielles de cette approche permettraient d'adapter les traitements anti-EGFR aux caractéristiques biologiques des tumeurs et pourraient ainsi diminuer le risque d'administrer aux patients des traitements inefficaces et potentiellement toxiques.

Les perspectives d'amélioration de ce modèle portent sur l'intégration d'autres paramètres biologiques tels que les niveaux d'expression de PTEN, ou encore des paramètres mutationnels tels que les mutations de gènes codant des protéines de la voie des MAPK (mutation *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, mutations de *KRAS* hors codons 12 et 13) ou de la voie des PI3K telles que les mutations *PIK3CA*. D'autres paramètres tels que les polymorphismes des récepteurs FC γ , également impliqués dans la réponse au cétuximab (11) pourraient représenter un moyen d'augmenter la puissance de prédiction de ce modèle, de même que la surexpression de l'amphiréguline et de l'épiréguline, qui seraient également prédictifs de la réponse aux anti-EGFR (149). A noter cependant que ces paramètres sont binaires (présence

ou absence de mutation, présence ou absence de polymorphisme) et impliquent d'utiliser une ACP dite généralisée (également appelée analyse factorielle multiple) (209), c'est-à-dire applicable aux variables qualitatives et quantitatives.

D'autres approches comme la régression logistique, non abordées ici, sont également adaptées à ces données, mais nécessitent de binariser la totalité des données et ne prennent pas en compte la variabilité importante de certains niveaux d'expression des kinases de signalisation.

Enfin les approches les plus adaptées à ces questions biologiques sembleraient être les approches par séparateurs à vastes marges (SVM) (199, 210) ou encore par réseaux de neurones. Ces approches étaient dans notre étude inutilisables en raison du faible effectif de notre population. En effet les risques de surapprentissage sont trop importants sur des effectifs de quelques dizaines de sujets.

La découverte de l'implication de la mutation *KRAS* dans la résistance aux anti-EGFR a marqué une étape importante dans la progression vers la médecine personnalisée des cancers colorectaux métastatiques. Il reste à développer de nombreux biomarqueurs, pour les anti-EGFR mais également pour les autres thérapies ciblées et les chimiothérapies cytotoxiques, tant dans le domaine des prédictions de réponse que dans le domaine des prédictions de toxicité.

Actuellement, la plupart des biomarqueurs validés, prédictifs de réponse aux thérapies ciblées, présentent de bonnes performances en termes de valeur prédictive négative. C'est le cas de la présence de mutation du gène *KRAS* impliqué dans la résistance au cétuximab et au panitumumab. Ces marqueurs sont cependant encore insuffisants en terme de valeur prédictive positive, c'est à dire pour prédire la réponse thérapeutique. Il est par conséquent nécessaire de les compléter par des marqueurs additionnels prédictifs de réponse afin de rationaliser la prescription des thérapies ciblées. A terme, cette démarche doit permettre d'améliorer la prise en charge personnalisée des patients en fonction des caractéristiques moléculaires des tumeurs.

Cette approche présente également un avantage majeur : parmi les thérapies ciblées, de nombreuses molécules en cours de développement ciblent les voies de signalisation étudiées ici, qu'il s'agisse de stratégies d'inhibition des récepteurs ou des kinases de signalisation en aval de ces récepteurs. Ainsi les récepteurs HER2 sont préférentiellement ciblés dans les

cancers du sein et de l'estomac, les récepteurs HER1 dans les cancers colorectaux, les cancers du poumon et des voies aérodigestives supérieures, et de nouveaux inhibiteurs de récepteurs HER sont en cours de développement et ciblent plusieurs types de récepteurs HER (inhibiteurs mixtes HER1/2, pan inhibiteurs de HER) ou plusieurs voies de signalisation en aval de ces récepteurs. L'approche que nous proposons ici reste valable, qu'il s'agisse d'une cible unique ou de cibles multiples, et que la cible soit le ligand, le récepteur ou un intermédiaire de signalisation intracellulaire, puisque l'ensemble des éléments impliqués dans la signalisation est pris en considération. Ceci est également potentiellement transposable à l'étude des mécanismes de résistance aux inhibiteurs d'autres récepteurs tels que IGF1R, activant les mêmes voies de signalisation que les récepteurs HER. Cette approche est donc transposable à l'étude des mécanismes de résistance au trastuzumab ou au lapatinib dans les cancers du sein, au cétuximab et au panitumumab dans les cancer colorectaux et ORL, à l'imatinib dans les GIST, mais également aux inhibiteurs de mTOR, de PI3K ou encore d'IGF1R en cours de développement.

Cependant, plusieurs limites s'imposent en ce qui concerne l'étude des phosphoprotéines sur des échantillons cliniques. La première concerne les problèmes de variabilité pré-analytique des échantillons. Souvent considérée comme une boîte noire, elle est pourtant réelle et peut grandement influencer les résultats obtenus, particulièrement en ce qui concerne les ARNm et les épitopes labiles tels que les phosphoprotéines (211). En effet plusieurs variables per- et post-opératoires vont influencer la qualité du prélèvement, et en particulier l'hypoxie peropératoire ainsi que le temps d'ischémie froide. Rimm et al. ont montré sur des pièces opératoires d'utérus que le temps entre l'exérèse de la pièce et l'analyse peut faire varier les niveaux d'expression des phosphoprotéines, notamment en ce qui concerne les niveaux d'expression de pAKT, pEGFR, pERK, pGSK et pP38MAPK (212). Ceci s'explique par la grande sensibilité de ces protéines aux phosphatases. pP70S6K est cependant moins sensible que les autres phosphoprotéines, et serait même insensible aux temps d'ischémie froide. A noter que la vitesse de dégradation des phosphoprotéines est, de plus, fonction de l'organe étudié (211). D'autre part la dégradation des phosphoprotéines est précédée d'une augmentation de leur concentration dans l'échantillon. La qualité des échantillons est donc primordiale. En ce qui concerne l'analyse des phosphoprotéines, elle nécessite de disposer de tissus congelé à -80°C. Lors de la phase de validation du BPA, des essais de stabilité des phosphoprotéines réalisés dans notre laboratoire sur pEGFR, pAKT, pGSK3 β , pP70S6K, pERK1/2, pMEK1, pP90RSK et pP38MAPK, ont également mis en évidence une variation

rapide des niveaux d'expression des phosphoprotéines dans des échantillons laissés à température ambiante, et nous ont amené à restreindre les temps avant congélation. Ainsi, les échantillons doivent être congelés dans des délais inférieurs à une heure post exérèse (résultats non publiés).

Il existe de nombreuses autres variables pré-analytiques parfois difficilement maîtrisables. Par exemple lors d'une exérèse tumorale, le temps d'ischémie chaude, entre le moment du clampage et la congélation de la pièce opératoire est très variable et impossible à maîtriser, et nécessiterait a minima de connaître l'heure du clampage lors de chaque opération pour pouvoir estimer ce paramètre afin d'en tenir compte dans la phase analytique.

Pour plusieurs auteurs, une solution potentielle est la quantification de protéines témoins d'hypoxie et de souffrance tissulaire, qui pourraient être les protéines les plus sensibles aux changements qui interviennent pendant le temps d'ischémie froide (213, 214). Plusieurs protéines seraient à même de remplir cette fonction de "chronographes moléculaires" : pJak1, pPAK 1/2, pGSK $\alpha\beta$, pATF2 ainsi que peNOS (214). Ainsi ces marqueurs d'ischémie pourraient permettre de s'affranchir de cette difficulté, qui représente encore une limite au développement des techniques de protéomique en pratique clinique, et qui ont des conséquences directes en termes de reproductibilité des résultats. L'utilisation de ces protéines comme marqueur de dégradation ne sera toutefois possible que s'il existe une protéine parmi celles citées précédemment dont l'expression basale est constante chez tous les patients, au moins pour une pathologie donnée.

La détection des protéines par des techniques autres que l'immunohistochimie présente un inconvénient majeur : l'absence de possibilité de localisation subcellulaire des protéines. En effet celle-ci présente une importance pour la recherche de marqueurs. Ceci peut s'illustrer par une étude portant sur 500 mélanomes pour lesquels ont été testés 70 marqueurs potentiels par des algorithmes génétiques (214). Parmi ces 70 marqueurs potentiels, cinq marqueurs se sont révélés pertinents dans l'évaluation du pronostic, et deux de ces cinq marqueurs, deux facteurs de transcription, n'étaient exploitables qu'associés aux informations sur leur localisation, nucléaire ou cytoplasmique. Il a également été démontré que la compartimentation de certaines protéines, par exemple nucléaire, peut avoir des conséquences sur leur fonction. C'est le cas par exemple d'EGFR et de PTEN (94, 96, 97, 122).

La question de l'hétérogénéité tumorale est également soulevée par de nombreux auteurs. La quantité de cellules tumorales, bien que les zones tumorales sélectionnées dans notre étude contiennent au moins 50% de cellules tumorales, représente une source importante de variabilité. En effet le stroma est présent en proportions variables dans le tissu tumoral (Figures 27 et 28).

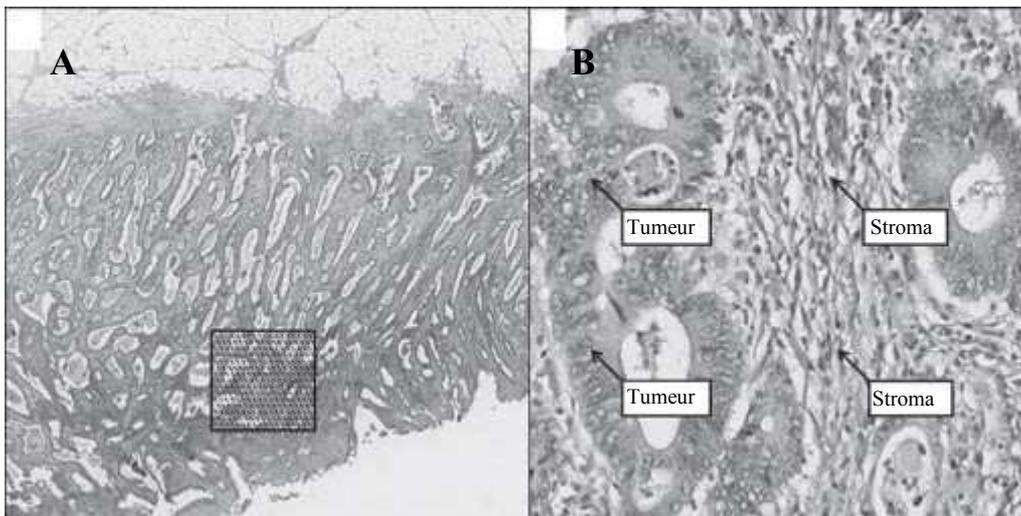


Figure 27 : A: Coupe histologique de cancer colorectal (coloration HES) sur une surface de 9mm². B: Composition hétérogène en cellules stromales et tumorales. D'après (215).

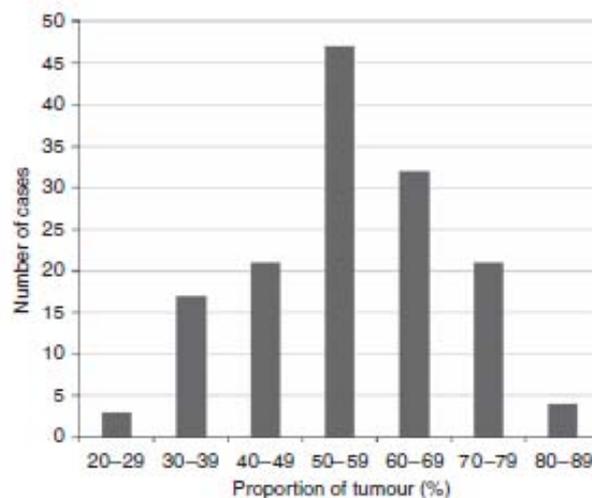


Figure 28 : Distribution de la proportion de cellules tumorales chez les patients atteints de cancer colorectal. D'après (215).

En revanche, l'utilisation du BPA couplée à l'analyse en composante principale permet de s'affranchir des problèmes de cellularité des échantillons, puisque l'on considère les niveaux d'expression des phosphoprotéines les uns par rapport aux autres et non plus de manière

absolue. Par exemple si l'on dispose de cinq échantillons dans lesquels on dose deux protéines A et B et que l'on obtient les résultats suivants :

Echantillon n°	[Protéine A]	[Protéine B]
1	2	4
2	3	6
3	4	8
4	5	10
5	6	6

La corrélation entre [A] et [B] (Figure 29) est respectée en cas de dilution de l'échantillon 4 au ½, et un point aberrant (échantillon 4), dilué au ½ ou non, reste aberrant.

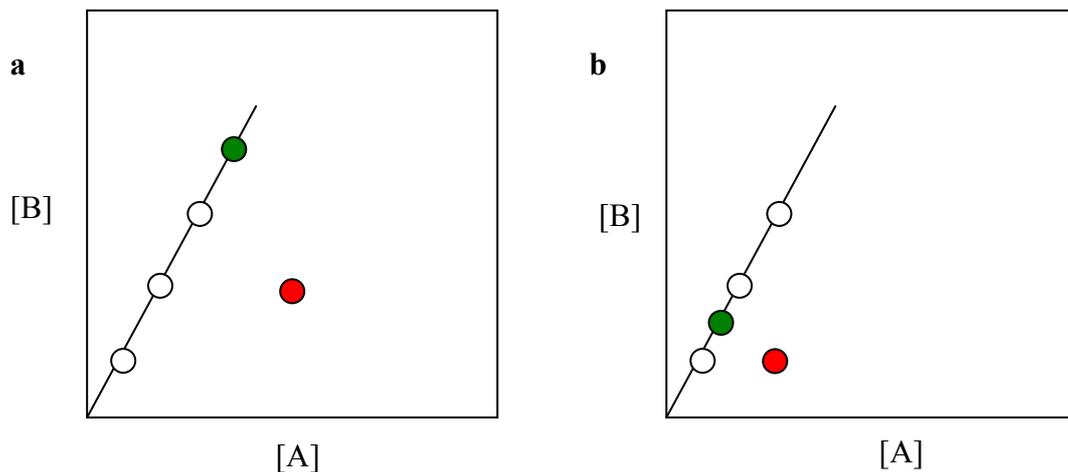


Figure 29 : Corrélation entre les concentrations des protéines A et B avant (a) et après (b) dilution.

De ce fait, si le matériel non tumoral n'est pas un tissu qui exprime excessivement les phosphoprotéines d'intérêt, alors la « dilution » du matériel tumoral dans le stroma conjonctif n'aura pas de conséquence sur la détection des individus aberrants.

Les questions qui restent à prendre en compte de manière générale sur ces approches portent sur le design des études à proposer pour une validation fiable et sur le niveau de preuve à atteindre pour ces nouveaux marqueurs.

Les études rétrospectives présentent des limites. Les nouvelles molécules sont typiquement évaluées chez des patients présentant un stade avancé de la maladie, et ces mêmes patients ne

sont pas nécessairement re-biopsiés; si un marqueur apparaît tardivement au cours de l'évolution de la pathologie, une analyse réalisée sur un échantillon de tissus plus ancien pourrait empêcher la mise en évidence d'un marqueur pertinent. En ce qui concerne le statut *KRAS*, l'apparition de mutations est un événement précoce dans l'oncogenèse. Ainsi l'analyse peut être réalisée sur des prélèvements très antérieurs à la prescription d'une thérapie anti-EGFR. Ceci n'est pas vrai en ce qui concerne d'autres paramètres. Sawyers et al. citent l'exemple d'une étude réalisée chez des patients atteints de cancer du poumon traités par géfitinib ou par erlotinib. Une résistance secondaire au traitement était associée à un changement dans le statut mutationnel du domaine kinase d'EGFR par rapport à la biopsie primaire (5). D'autres auteurs ont également pu mettre en évidence une variation de l'expression des pAKT et pERK en IHC entre la tumeur primitive et les métastases correspondantes dans plus de 10% des cas (17).

D'autre part, les études prospectives adaptées à la recherche de biomarqueurs sont difficiles à mettre en œuvre, et la plupart des essais cliniques ne prévoient pas encore suffisamment de collecte de matériel tumoral. Une des raisons évoquées par Sawyers et al. est la lenteur d'inclusion dans les essais qui présentent cette contrainte supplémentaire. Un autre problème évoqué par Ratain et al. est le coût engendré par l'évaluation de biomarqueurs au cours des essais (s'élevant en moyenne à 6700\$ par patient) (216). Ratain propose ainsi de ne commencer l'étude des biomarqueurs qu'en phase IIb et uniquement sur des molécules ayant fait preuve d'efficacité. Ainsi, on estime qu'actuellement seulement 4 à 5% des essais de phase III prévoient l'analyse d'un biomarqueur dans le but d'améliorer la sélection des patients.

En ce qui concerne les études rétrospectives, l'évaluation des niveaux d'expression des phosphoprotéines présente d'autres difficultés. En effet ces études ne peuvent être réalisées que sur matériel tumoral congelé, en raison des problèmes de stabilité des phosphoprotéines évoqués précédemment; or la congélation de matériel tumoral n'est pas systématique. L'utilisation de nouveaux fixateurs tels que le RCL2 épargnant les ARN et les phosphoprotéines tout en garantissant une stabilité de l'ADN ainsi qu'une morphologie cellulaire semblable à celle obtenue classiquement avec les fixateurs formolés, apparaît comme une alternative intéressante au stockage de tissus congelé (217, 218). Ainsi, les études rétrospectives pourraient être réalisées sur des séries beaucoup plus larges, et ce mode de conservation permettrait de s'affranchir des problèmes inhérents à la manipulation de tissu congelé tels que les décongélations itératives des échantillons.

Au-delà des considérations techniques que nous venons d'évoquer, se posent des questions d'ordre analytique. En effet les mécanismes de résistance aux thérapies anticancéreuses relèvent de phénomènes complexes et multiparamétriques. L'interprétation des données doit tenir compte de cette complexité.

Cette question fait l'objet de la troisième partie de ce travail, qui a pour but de transposer en situation clinique le travail réalisé *in vitro*. Dans cette étude réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Laurent-Puig¹, les niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation ont été analysées par BPA sur des échantillons de tumeurs de patients atteints de cancer colorectal métastatique et traités par cétuximab ou panitumumab.

Les résultats de cette étude publiés récemment mettent en évidence un lien entre l'expression de pMEK1, pP70S6K, et la survie sans progression, ainsi qu'un lien entre l'expression de pP70S6K et la survie globale chez les patients non porteurs de mutation *KRAS* (200).

L'approche complémentaire que nous proposons ici a pour but de prendre en compte la globalité des variables étudiées, c'est-à-dire le statut mutationnel *KRAS* associé à un score représentatif de la fonctionnalité du réseau de signalisation en aval d'EGFR. Ce score est obtenu par analyse en composante principale (ACP) couplée à une analyse discriminante linéaire (LDA). Les patients présentant un score élevé sont considérés comme non-répondeurs, et les patients présentant un score bas sont considérés comme répondeurs au traitement par anti-EGFR. Globalement, la qualité de classement des patients en répondeurs et non répondeurs obtenue est légèrement supérieure à 80%. De plus, la différence de survie sans progression et de survie globale en fonction de ce score dans le groupe de patients porteurs de tumeurs *KRAS* non mutées est significative.

L'interprétation des données pourrait se faire de la manière suivante. Le score LDA est obtenu par analyse discriminante des derniers axes résultant de l'analyse en composante principale. Les derniers axes obtenus par ACP sont des axes représentant des paramètres très décorrélés. En d'autres termes, ces axes servent à mettre en évidence des individus pour lesquels la corrélation globale entre les paramètres mesurés ne se vérifie pas, ce qui pourrait correspondre aux patients présentant une rupture à un endroit quelconque du réseau de signalisation en aval du récepteur. On entend ici par rupture une élévation anormalement élevée du niveau d'expression d'une phosphoprotéine, indépendamment de l'état d'activation de la protéine en amont de celle-ci.

¹ INSERM UMRS 775, Paris Descartes, APHP, HEGP.

Cependant, le modèle que nous proposons présente des limites, notamment en ce qui concerne le nombre de sujets inclus dans l'étude, et nécessite plusieurs étapes de validation avant d'envisager une application clinique.

Plusieurs auteurs tendent également à utiliser des approches multiparamétriques pour la prédiction de réponse aux thérapies ciblées. Ainsi, plusieurs études récentes mettent en évidence une complémentarité des données de génétique constitutionnelle, de génétique somatique et des données fonctionnelles, qui sont complémentaires et font l'objet d'analyses intégrées (63, 158, 210, 219-221). Les résultats obtenus tendent à mettre en évidence que le pouvoir prédictif de marqueurs combinés est supérieur au pouvoir prédictif de ces mêmes paramètres utilisés seuls (210, 220, 222, 223). De ces approches émerge depuis quelques années le concept d'interactome (224). Les données de protéomique ne se combinent pas comme des paramètres dont l'effet est cumulatif, mais les interactions entre les paramètres mesurés contiennent des informations qu'il est utile de considérer. Tandis que certains auteurs proposent d'éliminer les variables très corrélées entre elles avant de réaliser les analyses, d'autres en revanche proposent d'étudier et de modéliser les interactions entre les protéines étudiées (225, 226). Ces travaux devraient à terme permettre de modéliser finement les réseaux de signalisation en aval des récepteurs HER, en tenant compte de paramètres complexes tels que les rétrocontrôles ou encore les cinétiques d'interactions entre les protéines, et pourraient permettre d'étudier *in silico* l'efficacité d'un traitement en fonction des caractéristiques moléculaires d'un patient donné. Cette approche devrait également permettre d'évaluer l'efficacité de combinaisons de thérapies ciblées ayant pour cibles plusieurs récepteurs, ou un récepteur et plusieurs autres kinases en aval de ce récepteur, ce qui est conforme aux démarches en cours d'évaluation en pratique clinique, mais dont les choix se font actuellement de manière empirique. D'autre part, la méthodologie de mise en évidence puis de validation d'un biomarqueur est délicate et nécessite une approche particulière et le design d'essais cliniques spécifiques et adaptés (77, 196-198, 215, 227, 228).

CONCLUSION

Les thérapies ciblées, anticorps monoclonaux et inhibiteurs de kinase, dirigées contre les récepteurs HER représentent un progrès majeur en cancérologie. Indépendamment de l'expression de la cible moléculaire, l'activité des thérapies ciblées est tributaire de la présence dans le tissu tumoral d'anomalies génétiques capables de perturber la signalisation cellulaire tumorale en aval des récepteurs.

L'utilisation des biomarqueurs en pratique clinique permet d'adapter des traitements aux caractéristiques individuelles de chaque patient. La découverte de l'implication de la mutation *KRAS* dans la résistance aux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique a marqué une étape importante dans la progression vers la médecine personnalisée en cancérologie. Avec d'autres exemples marquants tels que l'expression d'HER2 et la réponse au trastuzumab dans le cancer du sein, ou encore les mutations de cKIT et la réponse à l'imatinib dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, le développement de la recherche sur les biomarqueurs est actuellement en plein essor.

Cependant, le nombre de biomarqueurs validés reste insuffisant, en particulier en ce qui concerne les biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées. La mise en évidence de ces marqueurs est pourtant nécessaire à une prise en charge des patients conforme à une démarche de médecine personnalisée. En effet, l'adaptation des traitements aux caractéristiques cliniques et histopathologiques n'est pas suffisante, et nécessite le recours à l'analyse des profils moléculaires tumoraux. Il reste donc à développer de nombreux biomarqueurs, pour les anti-EGFR mais également pour les autres thérapies ciblées et les chimiothérapies cytotoxiques, tant dans le domaine des prédictions de réponse que dans le domaine des prédictions de toxicité.

La mise en évidence de marqueurs prédictifs de réponse à une thérapie ciblée n'est donc pas un problème qui se résume à faire la preuve de la présence de la cible thérapeutique. Cette question est bien plus complexe et nécessite une compréhension fine des mécanismes d'action de ces nouvelles molécules.

Les révolutions techniques que connaît actuellement la biologie moléculaire devraient permettre de mettre à disposition des cliniciens les moyens de choisir de manière rationnelle les thérapies ciblées, dont le nombre devrait augmenter extrêmement rapidement dans les prochaines années. Les techniques de protéomique évoluent vers une plus grande automatisation, et présentent des améliorations en termes de reproductibilité et de robustesse. Elles pourraient ainsi très rapidement satisfaire les critères requis pour le diagnostic clinique. Ces évolutions permettront de réaliser l'analyse intégrée des données de génétique constitutionnelle, de génétique somatique et des données fonctionnelles.

Notre travail a consisté à évaluer l'intérêt de l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation par analyse multiplexe des niveaux d'expression des formes phosphorylées des principales kinases intracellulaires en aval des récepteurs HER sur échantillons de tumeurs. Les résultats obtenus dans le cadre d'une étude clinique rétrospective dans les cancers colorectaux métastatiques suggèrent que l'utilisation des données issues de l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval des récepteurs HER pourraient à terme trouver des applications en qualité de marqueurs prédictifs de réponse clinique aux thérapies ciblées anti-HER. De plus, l'approche que nous proposons est potentiellement transposable à l'étude des mécanismes de résistance à diverses thérapies ciblées, inhibiteurs de tyrosines kinase ou anticorps monoclonaux, ciblant les récepteurs HER et les voies de signalisation des RAS/RAF/MAPK et des PI3K/AKT.

En conclusion, un travail transdisciplinaire est nécessaire pour la mise en évidence et la validation de nouveaux marqueurs potentiels. Ce travail nécessite la coopération de cliniciens, de pathologistes et de biologistes autour de projets de recherche translationnelle. D'autre part, les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées mettent en jeu des systèmes complexes, et la mise en évidence de biomarqueurs, prédictifs ou pronostiques, nécessite également l'utilisation d'outils mathématiques adaptés.

ANNEXE I – CLASSIFICATION TNM

Cette classification s'applique uniquement aux carcinomes. La définition des catégories, T, N et M repose sur l'examen clinique, l'imagerie, l'endoscopie et/ou l'exploration chirurgicale. T : Etendue de la tumeur primaire. N : Envahissement ganglionnaire. M : Métastases. D'après (22).

TNM		Description
T – Tumeur primaire	Tis	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria (chorion de la muqueuse)
	T0	Pas de signe de tumeur primitive
	T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
	T2	Tumeur envahissant la musculature
	T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péricoliques ou péri-rectaux non péritonisés
	T4	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures et/ou perforant le péritoine viscéral T4a : tumeur perforant le péritoine viscéral T4b : tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures
N – Atteinte ganglionnaire	N0	Pas d'atteinte ganglionnaire
	N1	Atteinte de 1 à 3 ganglions péricoliques ou périrectaux
	N2	Atteinte de 4 ou plus ganglions péricoliques ou périrectaux ou le long d'un axe vasculaire
M – Métastases à distance	M0	Pas de métastases à distance
	M1	Présence de métastases à distance
		M1a : Métastases dans un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) non régional(aux)) M1b : Métastases dans plus d'un organe ou dans le péritoine.

ANNEXE II

Evaluation intégrative de la fonctionnalité de la signalisation en aval d'EGFR

Application à la prédiction de la réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR

dans le cancer colorectal métastatique

Chretien AS, Perkins G, Lievre A, Harter V, Laurent-Puig P, Merlin JL.

ESMO 2010

Ann Oncol 21 suppl 8, 2010 (abstr 589P)

Integrative evaluation of EGFR downstream signalling functionality to predict response to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type mCRC

A.-S. Chretien¹, G. Perkins², A. Lievre³, V. Harter¹, P. Laurent-puig², J.-L. Merlin¹

¹Vandoeuvre Les Nancy/FR, ²Paris/FR, ³Boulogne Billancourt/FR

Type : Abstract

Category : Colorectal cancer

Background: KRAS mutational status was shown to be a highly predictive marker for tumour response to anti-EGFR monoclonal antibodies (cetuximab, panitumumab) in metastatic colorectal cancer (mCRC). However, KRAS status has a poor negative predictive value (NPV), which clearly suggests that additional mechanisms of resistance to EGFR inhibitors exist. Therefore, additional biomarkers are needed to further optimise the selection of KRAS wild-type patients for personalized targeted therapy.

Methods: 45 patients (mean age: 61.4 years) with histologically proven metastatic colorectal adenocarcinoma were treated with either cetuximab or panitumumab. KRAS mutations were detected in 23 (51%) patients. In the 22 KRAS wild-type patients, the expression of signaling phosphoproteins belonging to Ras/Raf/MAPK pathway (pMEK1, pERK1/2, pP90RSK) and PI3K/AKT pathway (pAKT, pGSK3 β , pP70S6K) as well as pP38MAPK and pEGFR were retrospectively analyzed using phosphoprotein array. KRAS wild-type patients were blindly classified as responders (complete response or partial response) or non responders (stable disease or progressive disease) using principal component analysis (PCA) based on phosphoprotein expression, followed by a linear discrimination analysis (LDA). Quality of classification was assessed by the leave-one-out method.

Results: As compared with KRAS status, PCA of phosphoprotein data had a higher sensitivity (97 vs 68%) and NPV (89 vs 50%), but lower specificity (73 vs 100%) and positive predictive value (PPV) (92 vs 100%). Mean LDA scores were significantly higher in responders patients (0.36 ± 0.32) than in non responders (0.77 ± 0.28) ($P=0.003$) and allow to blindly predict response in 81% KRAS WT patients.

Conclusion: Multiparameter analysis tools such as PCA are key approaches to evaluate multiple biomarkers. This is of particular concern with targeted therapies since their mechanism of action involves complex biological systems such as cell signaling. These preliminary results may emphasize the interest of evaluation of EGFR downstream functionality as predictive marker of response to anti-EGFR therapy.

Keywords:

Cetuximab, metastatic colorectal cancer, phosphoprotein, principal component analysis.



Integrative evaluation of EGFR downstream signalling functionality to predict response to anti-EGFR monoclonal antibodies in *KRAS* wild-type mCRC



Anne-Sophie Chrétien¹, Geraldine Perkins^{3,4}, Astrid Lièvre^{3,4,5}, Valentin Harter², Pierre Laurent-Puig^{3,4,5}, Jean-Louis Merlin¹.

¹Unité de Biologie des Tumeurs, ²Unité d'épidémiologie et biostatistique, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France, ³Institut National de la Recherche et de la Santé Médicale (INSERM), UMR-5775, Paris, France ⁴Université Paris Descartes, Paris, France, ⁵Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

INTRODUCTION

KRAS mutational status was shown to be a highly predictive marker for tumour response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies (cetuximab, panitumumab) in metastatic colorectal cancer (mCRC). However, *KRAS* status has a poor negative predictive value (NPV), which clearly suggests that additional mechanisms of resistance to EGFR inhibitors exist. Therefore, additional biomarkers are needed to further optimise the selection of *KRAS* wild-type patients for personalized targeted therapy.

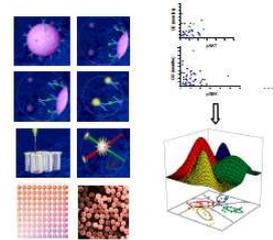
PATIENTS AND METHODS

- N= 45 patients (mean age: 61.4 years)
- histologically proven metastatic colorectal adenocarcinoma
- treated with either cetuximab or panitumumab
- *KRAS* mutations were detected in 23 (51%) patients.
- Retrospective analysis of expression of signaling phosphoproteins in 22 *KRAS* wild-type patients :
 - pEGFR
 - Ras/Raf/MEK/ERK pathway (pMEK1, pERK1/2, pP90RSK)
 - PI3K/AKT pathway (pAKT, pGSK3β, pP70S6K)
 - pP38MAPK

- Response to anti-EGFR therapy was evaluated according to RECIST criteria

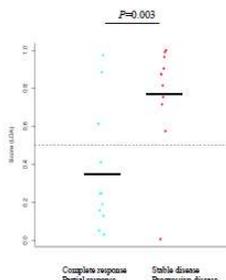
- Data analysis:

KRAS wild-type patients were blindly classified as responders (complete response or partial response) or non responders (stable disease or progressive disease) using principal component analysis (PCA) based on phosphoprotein expression, followed by a linear discrimination analysis (LDA). Quality of classification assessed by the leave-one-out method.



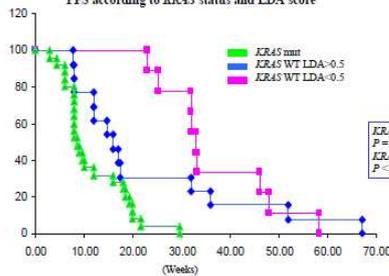
RESULTS

Patients classification according to LDA scores



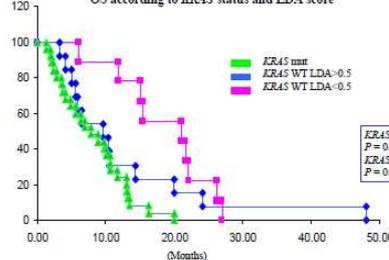
Linear Discrimination Analysis (LDA) scores following Principal Component Analysis (PCA) on the expression level of 8 phosphoproteins (pAKT, pGSK3β, pP70S6K, pMEK1, pERK1/2, pP38MAPK, pP90RSK et pEGFR) in 22 wild-type *KRAS* patients. The threshold (0.5) was determined as the barycenter of the 2 populations. Mean LDA score : 0.36±0.32 vs 0.77±0.28, $P = 0.003$ (Mann-Whitney)

PFS according to *KRAS* status and LDA score



KRAS mut vs *KRAS* WT LDA-0.5:
 $P = 0.0187$
KRAS mut vs *KRAS* WT LDA-0.5:
 $P = 0.0001$

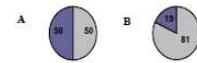
OS according to *KRAS* status and LDA score



KRAS mut vs *KRAS* WT LDA-0.5:
 $P = 0.125$
KRAS mut vs *KRAS* WT LDA-0.5:
 $P = 0.0007$

Patients classification:

LDA score allows correct classification of patients as responders or non responders in 81% of cases (A), compared to 50% for WT *KRAS* status (B).



A

<i>KRAS</i> status	Response			Total
	SD	PD	CR, PR	
mut	23	0	23	23
WT	11	11	22	22
Total	34	11	45	45

B

<i>KRAS</i> mut or WT+ PCA score -0.5	Response			Total
	SD	PD	CR, PR	
<i>KRAS</i> mut or WT+ PCA score -0.5	33	3	36	36
<i>KRAS</i> WT+ PCA score -0.5	1	8	9	9
Total	34	11	45	45

C

<i>KRAS</i> status	PCA + <i>KRAS</i> status
Se	68% / 97%
Sp	100% / 73%
VPP	100% / 92%
VPN	50% / 89%

Patients classification using *KRAS* status (A), or a combination of *KRAS* status and LDA score among WT *KRAS* patients (B). Table C compares sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the two approaches.

CONCLUSION

Multiparameter analysis tools such as PCA are key approaches to evaluate multiple biomarkers. This is of particular concern with targeted therapies since their mechanism of action involves complex biological systems such as cell signaling. In this study, PCA and LDA analysis allows to predict 81% of responses to anti-EGFR therapy in wild-type *KRAS* patients. These preliminary results may emphasize the interest of integrative evaluation of EGFR downstream functionality as predictive marker of response to anti-EGFR therapy.

ACKNOWLEDGMENTS: Tchao Méatchi³, Aurélien de Reynies⁴, Jean-François Emile^{5,6}, Valérie Boige⁷, Gorana Tomasic⁷, Jean-Baptiste Bachet^{5,6}, Frédéric Bibeau⁸, Olivier Bouché^{9,10}, Frédérique Penault-Llorca^{11,12}

¹ Institut National de la Recherche et de la Santé Médicale (INSERM), UMR-5775, Paris, France ² Université Paris Descartes, Paris, France ³ Assistance Publique – Hôpital de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France ⁴ Programme Care d'Intensité des Tumeurs (CIT), Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France ⁵ Assistance Publique – Hôpital de Paris, Hôpital Antoine Béraud, Paris, France ⁶ Université de Versailles, Saint-Quentin-en-Yvelines, Versailles, France ⁷ Institut Gustave Roussy, Villejuif, France ⁸ Centre Val d'Aurès Montpellier, France ⁹ CHU Nancy, Hôpital Robert Debré, Nancy, France ¹⁰ Université Nancy, Campus A-Debré, Nancy, France ¹¹ Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France ¹² Université Artois, Europe-Associé EA4133, Clermont-Ferrand, France.

Financial support: Merck Serono - Ligue contre le cancer, Comités Lorrains



BIBLIOGRAPHIE

1. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Apr 2;360(14):1408-17.
2. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III 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 May 1;25(13):1658-64.
3. Pelloski CE, Ballman KV, Furth AF, Zhang L, Lin E, Sulman EP, et al. Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 1;25(16):2288-94.
4. Byers T. Two decades of declining cancer mortality: progress with disparity. *Annu Rev Public Health*. 2010 Apr 21;31:121-32.
5. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):548-52.
6. Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. The role of companion diagnostics in the development and use of mutation-targeted cancer therapies. *Nat Biotechnol*. 2006 Aug;24(8):985-95.
7. Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, et al. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non--small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15;22(16):3238-47.
8. Uhry Z, Colonna M, Remontet L, Grosclaude P, Carre N, Couris CM, et al. Estimating infra-national and national thyroid cancer incidence in France from cancer registries data and national hospital discharge database. *Eur J Epidemiol*. 2007;22(9):607-14.
9. Quirke P, Risio M, Lambert R, von Karsa L, Vieth M. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis-European recommendations. *Virchows Arch*. 2011 Nov 9.
10. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2008 Jun;56(3):159-75.
11. HAS. Guide Affection Longue Durée - Cancer colorectal; 2008.
12. Van Cutsem E, Dicato M, Arber N, Berlin J, Cervantes A, Ciardiello F, et al. Molecular markers and biological targeted therapies in metastatic colorectal cancer: expert opinion and recommendations derived from the 11th ESMO/World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2009. *Ann Oncol*. 2010 Jun;21 Suppl 6:vi1-10.
13. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 1;27(22):3677-83.
14. Boige V, Malka D, Taieb J, Pignon JP, Ducreux M. [Colorectal cancer: prognostic molecular markers]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2004 Jan;28(1):21-32.
15. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
16. Laurent-Puig P, Agostini J, Maley K. [Colorectal oncogenesis]. *Bull Cancer*. 2010 Nov;97(11):1311-21.
17. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Pierantoni C, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway in primary colorectal tumours and related metastatic sites: optimising EGFR-targeted treatment options. *Br J Cancer*. 2007 Jul 2;97(1):92-7.

18. Thésaurus National de Cancérologie Digestive. 2011.
19. Abdalla EK, Adam R, Bilchik AJ, Jaeck D, Vauthey JN, Mahvi D. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol*. 2006 Oct;13(10):1271-80.
20. Faivre J, Manfredi S, Bouvier AM. [Epidemiology of colorectal cancer liver metastases]. *Bull Acad Natl Med*. 2003;187(5):815-22; discussion 22-3.
21. Phelip JM, Grosclaude P, Launoy G, Colonna M, Danzon A, Velten M, et al. Are there regional differences in the management of colon cancer in France? *Eur J Cancer Prev*. 2005 Feb;14(1):31-7.
22. Référentiel Oncolor - <http://www.oncolor.org>. [cited; Available from:]
23. Lévy P. Hépatogastro-entérologie - Editions Masson; 2009.
24. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1007-16.
25. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1670-6.
26. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
27. Masi G, Cupini S, Marcucci L, Cerri E, Loupakis F, Allegrini G, et al. Treatment with 5-fluorouracil/folinic acid, oxaliplatin, and irinotecan enables surgical resection of metastases in patients with initially unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2006 Jan;13(1):58-65.
28. Ychou M, Viret F, Kramar A, Desseigne F, Mitry E, Guimbaud R, et al. Tritherapy with fluorouracil/leucovorin, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX): a phase II study in colorectal cancer patients with non-resectable liver metastases. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Jul;62(2):195-201.
29. Fuchs CS, Marshall J, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 1;26(4):689-90.
30. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 10;27(5):663-71.
31. Koopman M, Antonini NF, Douma J, Wals J, Honkoop AH, Erdkamp FL, et al. Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2007 Jul 14;370(9582):135-42.
32. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, Topham C, James R, Gwyther SJ, et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007 Jul 14;370(9582):143-52.
33. Hochster HS, Hart LL, Ramanathan RK, Childs BH, Hainsworth JD, Cohn AL, et al. Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE Study. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 20;26(21):3523-9.

34. Bidard FC, Tournigand C, Andre T, Mabro M, Figer A, Cervantes A, et al. Efficacy of FOLFIRI-3 (irinotecan D1,D3 combined with LV5-FU) or other irinotecan-based regimens in oxaliplatin-pretreated metastatic colorectal cancer in the GERCOR OPTIMOX1 study. *Ann Oncol.* 2009 Jun;20(6):1042-7.
35. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
36. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):355-65.
37. Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2009 Mar-Apr;59(2):111-37.
38. Vignot S, Soria JC. Thérapies moléculaires ciblées - De la biologie aux applications.: John Libbey; 2008.
39. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Sep;6(9):714-27.
40. Van Cutsem E, Rougier P, Kohne C, Stroh C, Schlichting M, Bokemeyer C. A meta-analysis of the CRYSTAL and OPUS studies combining cetuximab with chemotherapy (CT) as 1stline treatment for patients with metastatic colorectal cancer : results according to KRAS and BRAF mutation status. *Eur J Cancer;* 2009; 2009.
41. Moon C, Chae YK, Lee J. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010 Aug;235(8):907-20.
42. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):669-76.
43. Tugues S, Koch S, Gualandi L, Li X, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol Aspects Med.* 2011 Apr;32(2):88-111.
44. Leite de Oliveira R, Hamm A, Mazzone M. Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol Aspects Med.* Apr;32(2):71-87.
45. Kabbinavar FF, Hurwitz HI, Yi J, Sarkar S, Rosen O. Addition of bevacizumab to fluorouracil-based first-line treatment of metastatic colorectal cancer: pooled analysis of cohorts of older patients from two randomized clinical trials. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):199-205.
46. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2008 Apr 20;26(12):2013-9.
47. Price TJ, Hardingham JE, Lee CK, Weickhardt A, Townsend AR, Wrin JW, et al. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 1;29(19):2675-82.
48. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006 Jan;3(1):24-40.
49. Kohne CH. How to integrate molecular targeted agents in the continuum of care. *Ann Oncol.* 2010 Oct;21 Suppl 7:vii134-vii9.
50. Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Colangelo LH, et al. Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *J Clin Oncol.* 2011 Jan 1;29(1):11-6.
51. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008 Aug;8(8):579-91.

52. Feige JJ. [Tumor angiogenesis: recent progress and remaining challenges]. *Bull Cancer*. 2010 Nov;97(11):1305-10.
53. Scappaticci FA, Skillings JR, Holden SN, Gerber HP, Miller K, Kabbinavar F, et al. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Aug 15;99(16):1232-9.
54. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 1;20(21):4368-80.
55. Thomas MB. Toward improved outcomes in hepatocellular carcinoma: overcoming the challenges of an "orphan" tumor. *Gastrointest Cancer Res*. 2009 Mar;3(2):73.
56. Malka D, Boige V, Jacques N, Vimond N, Adenis A, Boucher E, et al. Clinical value of circulating endothelial cell levels in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy and bevacizumab. *Ann Oncol*. 2011 Aug 8.
57. Ghosh S, Sullivan CA, Zerkowski MP, Molinaro AM, Rimm DL, Camp RL, et al. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. *Hum Pathol*. 2008 Dec;39(12):1835-43.
58. Chang YT, Chang MC, Wei SC, Tien YW, Hsu C, Liang PC, et al. Serum vascular endothelial growth factor/soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 ratio is an independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2008 Aug;37(2):145-50.
59. Rohrberg KS, Pappot H, Lassen U, Westman M, Olesen RK, Pfeiffer P, et al. Biomarkers in tissue from patients with upper gastrointestinal cancers treated with erlotinib and bevacizumab. *Cancer Biol Ther*. 2011 Apr 15;11(8):732-9.
60. Penault-Llorca F, Bibeau F, Arnould L, Bralet MP, Rochaix P, Sabourin JC. [EGFR expression in colorectal cancer and role in tumorigenesis]. *Bull Cancer*. 2005 Aug;92(Spec no):S5-11.
61. Baselga J. Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol*. 2001 Sep 15;19(18 Suppl):41S-4S.
62. Cidon EU. The challenge of metastatic colorectal cancer. *Clin Med Insights Oncol*. 2010;4:55-60.
63. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard 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 Mar 1;27(7):1122-9.
64. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol*. 1997 Dec;151(6):1523-30.
65. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Caputo R, Pomatico G, et al. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2000 Sep;6(9):3739-47.
66. Vilorio-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppli JM, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13):5090-101.
67. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Sep;7(9):493-507.

68. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jul 22;351(4):337-45.
69. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, 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 May 10;26(14):2311-9.
70. Ouwerkerk J, Boers-Doets C. Best practices in the management of toxicities related to anti-EGFR agents for metastatic colorectal cancer. *Eur J Oncol Nurs*. 2010 Sep;14(4):337-49.
71. Bouche O, Scaglia E, Reguiat Z, Singha V, Brix-Benmansour H, Lagarde S. [Targeted biotherapies in digestive oncology: management of adverse effects]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2009 Apr;33(4):306-22.
72. Siena S, Glynne-Jones R, Adenis A, Thaler J, Preusser P, Aguilar EA, et al. Reduced incidence of infusion-related reactions in metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab plus irinotecan with combined corticosteroid and antihistamine premedication. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1827-37.
73. Scope A, Agero AL, Dusza SW, Myskowski PL, Lieb JA, Saltz L, et al. Randomized double-blind trial of prophylactic oral minocycline and topical tazarotene for cetuximab-associated acne-like eruption. *J Clin Oncol*. 2007 Dec 1;25(34):5390-6.
74. Cao Y, Liao C, Tan A, Liu L, Gao F. Meta-analysis of incidence and risk of hypomagnesemia with cetuximab for advanced cancer. *Chemotherapy*. 2010;56(6):459-65.
75. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95.
76. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer*. 2008 May;44(7):946-53.
77. Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):2020-7.
78. Buyse M. Statistical issues in identifying, validating, and using molecular markers in clinical trials. *ESMO - Impakt Breast cancer conference; 2009 7-9 may 2009; Brussel; 2009*.
79. Hubert P. [Growth factors of the EGF family and their receptors]. *Bull Cancer*. 2007;94(7 Suppl):F137-45.
80. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. 2005 Oct;17(10):1183-93.
81. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:195-217.
82. Azria D, Spano J. *Thérapies ciblées en cancérologie: Libbey Eurotext; 2006*.
83. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med*. 2007 Dec;13(12):527-34.
84. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 May;4(5):361-70.
85. Gusterson BA, Hunter KD. Should we be surprised at the paucity of response to EGFR inhibitors? *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):522-7.
86. Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardiello F, Tortora G. Mechanisms of resistance to EGFR inhibitors. *Targeted Oncology*. 2007;2(1):31-7.
87. Azuma M, Danenberg KD, Iqbal S, El-Khoueiry A, Zhang W, Yang D, et al. Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor variant III gene expression in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2006 Sep;6(3):214-8.
88. Spindler KL, Olsen DA, Nielsen JN, Brandslund I, Poulsen HS, Villingshoj M, et al. Lack of the type III epidermal growth factor receptor mutation in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2006 Nov-Dec;26(6C):4889-93.

89. Defize LH, Boonstra J, Meisenhelder J, Kruijer W, Tertoolen LG, Tilly BC, et al. Signal transduction by epidermal growth factor occurs through the subclass of high affinity receptors. *J Cell Biol.* 1989 Nov;109(5):2495-507.
90. Ozcan F, Klein P, Lemmon MA, Lax I, Schlessinger J. On the nature of low- and high-affinity EGF receptors on living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 11;103(15):5735-40.
91. Ringerike T, Stang E, Johannessen LE, Sandnes D, Levy FO, Madshus IH. High-affinity binding of epidermal growth factor (EGF) to EGF receptor is disrupted by overexpression of mutant dynamin (K44A). *J Biol Chem.* 1998 Jul 3;273(27):16639-42.
92. Krall JA, Beyer EM, MacBeath G. High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways. *PLoS One.* 2011;6(1):e15945.
93. Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol.* 2000 Mar;2(3):168-72.
94. Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):1103-14.
95. Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer.* 2007;96 Suppl:R16-20.
96. Lo HW. Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications. *Discov Med.* 2010 Jul;10(50):44-51.
97. Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res.* 2005 Jan 1;65(1):338-48.
98. Rivera F, Vega-Villegas ME, Lopez-Brea MF, Marquez R. Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol.* 2008;47(1):9-19.
99. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 2006 Sep 1;24(25):4170-6.
100. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol.* 1993 Oct;11(10):1873-8.
101. Hitt R, Ciruelos E, Amador ML, Benito A, Sanchez JJ, Ballestin C, et al. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2005 Feb;41(3):453-60.
102. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res.* 2001 Jul;7(7):1850-5.
103. Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Benedetti JK, Baker AF, et al. Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 20;24(30):4922-7.
104. Lordick F, Luber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Woll E, et al. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer.* Feb 2;102(3):500-5.
105. Burtneß B. Her signaling in pancreatic cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2007 Jun;7(6):823-9.

106. Giltnane JM, Ryden L, Cregger M, Bendahl PO, Jirstrom K, Rimm DL. Quantitative measurement of epidermal growth factor receptor is a negative predictive factor for tamoxifen response in hormone receptor positive premenopausal breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 20;25(21):3007-14.
107. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control*. 2007 Jul;14(3):295-304.
108. Cohen D, Lane B, Jin T, Magi-Galluzzi C, Finke J, Rini BI, et al. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in clear-cell renal cell carcinoma: a call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clin Genitourin Cancer*. 2007 Mar;5(4):264-70.
109. Raizer JJ. HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2005 Aug;74(1):77-86.
110. Edwards J, Traynor P, Munro AF, Pirret CF, Dunne B, Bartlett JM. The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 1;12(1):123-30.
111. Bellone S, Frera G, Landolfi G, Romani C, Bandiera E, Tognon G, et al. Overexpression of epidermal growth factor type-1 receptor (EGF-R1) in cervical cancer: implications for Cetuximab-mediated therapy in recurrent/metastatic disease. *Gynecol Oncol*. 2007 Sep;106(3):513-20.
112. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):669-72.
113. Cai W, Niu G, Chen X. Multimodality imaging of the HER-kinase axis in cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 Jan;35(1):186-208.
114. Amin DN, Campbell MR, Moasser MM. The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Dec;21(9):944-50.
115. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):99-110.
116. Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25;96(11):6235-40.
117. Kataoka H. EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci*. 2009 Dec;56(3):148-53.
118. Galizia G, Lieto E, De Vita F, Orditura M, Castellano P, Troiani T, et al. Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3654-60.
119. Hunter T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell*. 2007 Dec 14;28(5):730-8.
120. Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):635-48.
121. Robert J. *Signalisation cellulaire et cancer*; 2010.
122. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res*. 2009;102:19-65.
123. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug;9(8):550-62.
124. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res*. 2005;94:29-86.
125. Pines G, Kostler WJ, Yarden Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett*. 2010 Jun 18;584(12):2699-706.

126. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 1;20(3):719-26.
127. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, 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*. 2005 Mar 20;23(9):1803-10.
128. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004 Apr 1;22(7):1201-8.
129. Hebbar M, Wacrenier A, Desauw C, Romano O, Cattani S, Triboulet JP, et al. Lack of usefulness of epidermal growth factor receptor expression determination for cetuximab therapy in patients with colorectal cancer. *Anticancer Drugs*. 2006 Aug;17(7):855-7.
130. Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, Burris HA, 3rd, Swanson P, Lopez T, et al. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Apr 1;16(7):2205-13.
131. Garcia-Saenz JA, Sastre J, Diaz-Rubio Garcia E. Biomarkers and anti-EGFR therapies for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol*. 2009 Nov;11(11):737-47.
132. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 20;26(3):374-9.
133. Krause M, Baumann M. Clinical biomarkers of kinase activity: examples from EGFR inhibition trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Sep;27(3):387-402.
134. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5924-30.
135. Richman SD, Hutchins GG, Seymour MT, Quirke P. What can the molecular pathologist offer for optimal decision making? *Ann Oncol*. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii123-vii9.
136. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol*. 1997 Dec;8(12):1197-206.
137. Chopra A. [177Lu]-Labeled [(R)-2-amino-3-(4-isothiocyanatophenyl)propyl]-trans-(S,S)-cyclohexane-1,2 -diamine-pentaacetic acid (CHX-A"-DTPA) conjugated monoclonal antibody L8A4 against epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII). 2010.
138. Di Fiore F, Sesboue R, Michel P, Sabourin JC, Frebourg T. Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010 Dec 7;103(12):1765-72.
139. Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res*. 2010 Jul 1;16(13):3329-34.
140. Buhrman G, Wink G, Mattos C. Transformation efficiency of RasQ61 mutants linked to structural features of the switch regions in the presence of Raf. *Structure*. 2007 Dec;15(12):1618-29.
141. Lievre A, Blons H, Laurent-Puig P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene*. 2010 May 27;29(21):3033-43.
142. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Dec 15;85(24):2004-7.
143. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):3992-5.

144. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
145. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*. 2007 Mar 15;67(6):2643-8.
146. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol*. 2008 Mar;19(3):508-15.
147. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*. 2007 Apr 23;96(8):1166-9.
148. Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2007 Oct 22;97(8):1139-45.
149. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 1;25(22):3230-7.
150. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
151. Van Cutsem E. A meta-analysis of the CRYSTAL and OPUS studies combining cetuximab with chemotherapy (CT) as 1stline treatment for patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): results according to KRAS and BRAF mutation status. *Eur J Cancer* 7(Suppl): 345. 2009.
152. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann J, De Braud F, Schuch G, Zobel A. Cetuximab plus 5-FU/FA/oxaliplatin (FOLFOX-4) versus FOLFOX-4 in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): OPUS, a randomised phase II study. *J Clin Oncol* 25 (172 suppl) (2007) abstr 4035. 2007.
153. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2008 Oct;9(10):962-72.
154. Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, et al. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2006 Aug;5(8):928-32.
155. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet Oncology*. 2010;11(8):753-62.
156. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009 Aug 18;101(4):715-21.
157. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3100-12.

158. Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Di Nicolantonio F, Pozzi F, Funaioli C, Gambi V, et al. Integrated molecular dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR) oncogenic pathway to predict response to EGFR-targeted monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer. *Target Oncol.* 2010 Mar;5(1):19-28.
159. Mao C, Liao RY, Qiu LX, Wang XW, Ding H, Chen Q. BRAF V600E mutation and resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2011 Apr;38(4):2219-23.
160. Russo A, Rizzo S, Bronte G, Silvestris N, Colucci G, Gebbia N, et al. The long and winding road to useful predictive factors for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal carcinoma: the KRAS/BRAF pathway. *Oncology.* 2009;77 Suppl 1:57-68.
161. Lievre A, Rouleau E, Buecher B, Mitry E. [Clinical significance of BRAF mutations in colorectal cancer]. *Bull Cancer.* 2010 Dec;97(12):1441-52.
162. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5705-12.
163. Normanno N, Tejpar S, Ciardiello F. Re: Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Apr 21;102(8):573; author reply -5.
164. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Response: Re: Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Apr 21;102(8):573-5.
165. Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009 Aug 4;101(3):465-72.
166. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Mar 1;28(7):1254-61.
167. Kim SM, Kim JS, Kim JH, Yun CO, Kim EM, Kim HK, et al. Acquired resistance to cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells. *Cancer Lett.* 2010 Oct 28;296(2):150-9.
168. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 2009 Mar 1;69(5):1851-7.
169. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* 2009 Jan;20(1):84-90.
170. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell.* 2007 Jan 12;128(1):157-70.
171. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 1997 Nov 15;57(22):4997-5000.
172. Feilolter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene.* 1998 Apr 2;16(13):1743-8.
173. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5246-50.
174. Guldberg P, Thor Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res.* 1997 Sep 1;57(17):3660-3.

175. Robertson GP, Furnari FB, Miele ME, Glendening MJ, Welch DR, Fountain JW, et al. In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9418-23.
176. Gronbaek K, Zeuthen J, Guldborg P, Ralfkiaer E, Hou-Jensen K. Alterations of the MMAC1/PTEN gene in lymphoid malignancies. *Blood*. 1998 Jun 1;91(11):4388-90.
177. Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PL, et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol*. 1999 Oct;155(4):1253-60.
178. Nassif NT, Lobo GP, Wu X, Henderson CJ, Morrison CD, Eng C, et al. PTEN mutations are common in sporadic microsatellite stable colorectal cancer. *Oncogene*. 2004 Jan 15;23(2):617-28.
179. Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, Sfakianaki M, Pega F, Kalikaki A, et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in ≥ 2 line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. *PLoS One*. 2011;6(1):e15980.
180. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004 Aug;6(2):117-27.
181. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol*. Jan 10;29(2):166-73.
182. Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*. 2008 Jun 26;27(28):3944-56.
183. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C, et al. Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2008 Jul 8;99(1):83-9.
184. Winder T, Zhang W, Yang D, Ning Y, Bohanes P, Gerger A, et al. Germline polymorphisms in genes involved in the IGF1 pathway predict efficacy of cetuximab in wild-type KRAS mCRC patients. *Clin Cancer Res*. 2010 Nov 15;16(22):5591-602.
185. Oden-Gangloff A, Di Fiore F, Bibeau F, Lamy A, Bougeard G, Charbonnier F, et al. TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy. *Br J Cancer*. 2009 Apr 21;100(8):1330-5.
186. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 20;27(30):5068-74.
187. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Oct 7;101(19):1308-24.
188. Lopez-Albaitero A, Ferris RL. Immune activation by epidermal growth factor receptor specific monoclonal antibody therapy for head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 Dec;133(12):1277-81.
189. Paez D, Pare L, Espinosa I, Salazar J, del Rio E, Barnadas A, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy? *Cancer Sci*. 2010 Sep;101(9):2048-53.

190. Ciardiello F, Bianco R, Caputo R, Caputo R, Damiano V, Troiani T, et al. Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to antiepidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 15;10(2):784-93.
191. Vallbohmer D, Zhang W, Gordon M, Yang DY, Yun J, Press OA, et al. Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3536-44.
192. Vincenzi B, Santini D, Rabitti C, Coppola R, Beomonte Zobel B, Trodella L, et al. Cetuximab and irinotecan as third-line therapy in advanced colorectal cancer patients: a single centre phase II trial. *Br J Cancer*. 2006 Mar 27;94(6):792-7.
193. Tejpar S, Peeters M, Humblet Y, Gelderblom H, Vermorken J, Viret F. Phase I/II study of cetuximab dose-escalation in patients with metastatic colorectal cancer with no or slight skin reactions on cetuximab standard dose treatment (Everest) : pharmacokinetic, pharmacodynamic and efficacy data. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007 ; 25 : 4037.
194. Sipples R. Common side effects of anti-EGFR therapy: acneform rash. *Semin Oncol Nurs*. 2006 Feb;22(1 Suppl 1):28-34.
195. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005 Nov;5(11):845-56.
196. Mandrekar SJ, Sargent DJ. Clinical trial designs for predictive biomarker validation: theoretical considerations and practical challenges. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 20;27(24):4027-34.
197. Freidlin B, Simon R. Adaptive signature design: an adaptive clinical trial design for generating and prospectively testing a gene expression signature for sensitive patients. *Clin Cancer Res*. 2005 Nov 1;11(21):7872-8.
198. Marko-Varga G, Ogiwara A, Nishimura T, Kawamura T, Fujii K, Kawakami T, et al. Personalized medicine and proteomics: lessons from non-small cell lung cancer. *J Proteome Res*. 2007 Aug;6(8):2925-35.
199. Okano T, Kondo T, Fujii K, Nishimura T, Takano T, Ohe Y, et al. Proteomic signature corresponding to the response to gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 1;13(3):799-805.
200. Perkins G, Lievre A, Ramacci C, Meatchi T, de Reynies A, Emile JF, 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 Sep 1;127(6):1321-31.
201. DUBY C, Robin S. Analyse en composantes principales. Grignon; 2006.
202. Falissard B. Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie: Masson; 2005.
203. Jolliffe JT. Principal component analysis, second edition: Springer; 2002.
204. Cassin P. Analyse des données et des panels de données: De Boeck Université; 1999.
205. Chergui F, Chretien AS, Bouali S, Ramacci C, Rouyer M, Bastogne T, et al. Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. *Clin Chem*. 2009 Jul;55(7):1327-36.
206. Pan J, Chen HQ, Sun YH, Zhang JH, Luo XY. Comparative proteomic analysis of non-small-cell lung cancer and normal controls using serum label-free quantitative shotgun technology. *Lung*. 2008 Jul-Aug;186(4):255-61.
207. Boyd ZS, Wu QJ, O'Brien C, Spoerke J, Savage H, Fielder PJ, et al. Proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes and biomarkers of response to targeted kinase inhibitors using reverse-phase protein microarrays. *Mol Cancer Ther*. 2008 Dec;7(12):3695-706.

208. Verhoeckx KC, Bijlsma S, de Groene EM, Witkamp RF, van der Greef J, Rodenburg RJ. A combination of proteomics, principal component analysis and transcriptomics is a powerful tool for the identification of biomarkers for macrophage maturation in the U937 cell line. *Proteomics*. 2004 Apr;4(4):1014-28.
209. Pagès J. Analyse factorielle multiple appliquée aux variables qualitatives et aux données mixtes. *Revue de Statistique Appliquée*. 2002;L(4):5-37.
210. Miyanaga A, Gemma A, Noro R, Kataoka K, Matsuda K, Nara M, et al. Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jul;7(7):1923-30.
211. Pinhel IF, Macneill FA, Hills MJ, Salter J, Detre S, A'Hern R, et al. Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010 Sep 28;12(5):R76.
212. Siddiqui S, Rimm DL. Pre-analytic variables and phospho-specific antibodies: the Achilles heel of immunohistochemistry. *Breast Cancer Res*. 2010 Dec 20;12(6):113.
213. Espina V, Mueller C, Edmiston K, Sciro M, Petricoin EF, Liotta LA. Tissue is alive: New technologies are needed to address the problems of protein biomarker pre-analytical variability. *Proteomics Clin Appl*. 2009 Aug 1;3(8):874-82.
214. Rimm DL. Beyond IHC: Accurate, Reproducible, and Quantitative Measurement of Protein Analyte Concentrations in Fixed Tissue. College of American Pathologists Foundation's Futurescape conference; 2009; Rosemont; 2009.
215. West NP, Dattani M, McShane P, Hutchins G, Grabsch J, Mueller W, et al. The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2010 May 11;102(10):1519-23.
216. Ratain MJ, Glassman RH. Biomarkers in phase I oncology trials: signal, noise, or expensive distraction? *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 15;13(22 Pt 1):6545-8.
217. Belief V, Boissiere F, Bibeau F, Desmetz C, Berthe ML, Rochaix P, et al. Proteomic analysis of RCL2 paraffin-embedded tissues. *J Cell Mol Med*. 2008 Oct;12(5B):2027-36.
218. Delfour C, Roger P, Bret C, Berthe ML, Rochaix P, Kalfa N, et al. RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells. *J Mol Diagn*. 2006 May;8(2):157-69.
219. Gruson D, Bodovitz S. Rapid emergence of multimarker strategies in laboratory medicine. *Biomarkers*. 2010 Jun;15(4):289-96.
220. Galleges Ruiz MI, Floor K, Steinberg SM, Grunberg K, Thunnissen FB, Belien JA, et al. Combined assessment of EGFR pathway-related molecular markers and prognosis of NSCLC patients. *Br J Cancer*. 2009 Jan 13;100(1):145-52.
221. Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One*. 2009;4(10):e7287.
222. De Petris P. Discovery and validation of protein biomarkers for lung cancer. Thèse. 2010.
223. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*. 2005 Nov 10;353(19):2012-24.
224. Bonetta L. Protein-protein interactions: Interactome under construction. *Nature*. 2010 Dec 9;468(7325):851-4.
225. Kholodenko B. *Employing Systems Biology to Quantify Receptor Tyrosine Kinase Signaling in Time and Space* Springer; 2010.
226. Kholodenko BN, Hancock JF, Kolch W. Signalling ballet in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jun;11(6):414-26.

227. Simon R. Clinical trial designs for evaluating the medical utility of prognostic and predictive biomarkers in oncology. *Per Med.* 2010 Jan 1;7(1):33-47.
228. Vickers AJ, Jang K, Sargent D, Lilja H, Kattan MW. Systematic review of statistical methods used in molecular marker studies in cancer. *Cancer.* 2008 Apr 15;112(8):1862-8.

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Survie à 5 ans des patients atteints de cancer colorectal métastatique entre 1990 et 2006	p. 18
Figure 2 : Phases de progression tumorale selon la courbe de Gompertz	p. 19
Figure 3 : Principaux mécanismes de l'oncogenèse colorectale	p. 20
Figure 4 : Survie globale de patients atteints de cancer colorectal métastatique diagnostiqué entre 1998 et 2006	p. 21
Figure 5 : Prise en charge des métastases métachrones	p. 23
Figure 6 : Prise en charge des métastases synchrones	p. 23
Figure 7 : Thérapies moléculaires ciblées commercialisées ou en cours de développement	p. 27
Figure 8 : Classification des anticorps monoclonaux en fonction de leur nature: murins, chimériques, humanisés ou humains	p. 28
Figure 9 : Les inhibiteurs d'EGFR présentent une action extracellulaire ou intracellulaire	p. 29
Figure 10 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'angiogenèse	p. 30
Figure 11 : Marqueurs pronostiques et prédictifs	p. 41
Figure 12 : Classification des récepteurs à activité tyrosine kinase	p. 42
Figure 13 A : Famille des récepteur HER comprenant HER1 ou EGFR, HER2, HER3 et HER4	p. 43
Figure 13 B : Structure des récepteurs HER	p. 43
Figure 14 : Mode d'activation des récepteurs HER	p. 46
Figure 15 : Principaux ligands responsables de l'activation des récepteurs HER	p. 47
Figure 16 : Transduction du signal en aval des récepteurs HER	p. 48
Figure 17 : Principales voies de signalisation en aval des récepteurs HER	p. 50
Figure 18 A : EGFR et principales voies de transduction du signal	p. 53
Figure 18 B : Fonctionnement normal d'un anticorps anti-EGFR	p. 53
Figure 18 C : Résistance en cas d'altération d'effecteurs tels que RAS, RAF, PI3K ou PTEN	p. 53
Figure 19 : Fonctionnement de la protéine RAS	p. 53
Figure 20 : Les mutations du gène <i>KRAS</i> ont pour conséquence l'expression d'une protéine RAS présentant une activité GTP-asiqque altérée	p. 54
Figure 21 : Mutations des gènes <i>KRAS</i> et <i>BRAF</i> et réponse au traitement par anticorps monoclonaux anti-EGFR	p. 57
Figure 22 : Représentation graphique d'une cohorte de 100 patients atteints de cancer colorectal traités par cétuximab ou panitumumab	p. 60
Figure 23 A : Taux de réponse en fonction de la toxicité cutanée des anti-EGFR	p. 65
Figure 23 B : Survie globale en fonction de la toxicité cutanée des anti-EGFR	p. 65
Figure 24 : Principe de l'analyse en composante principale (ACP) couplée à l'analyse discriminante linéaire	p. 71
Figure 25 : Score LDA (Linear Discrimination Analysis) obtenu par ACP (Analyse en Composante Principale)	p. 75
Figure 26 A : Survie sans progression en fonction du statut <i>KRAS</i> et du score LDA	p. 78
Figure 26 B : Survie globale en fonction du statut <i>KRAS</i> et du score LDA	p. 78

Figure 27 A : Coupe histologique de cancer colorectal (coloration HES)	p. 83
Figure 27 B : Composition hétérogène en cellules stromales et tumorales	p. 83
Figure 28 : Distribution de la proportion de cellules tumorales chez les patients atteints de cancer colorectal	p. 83
Figure 29 : Corrélation entre les concentrations des protéines A et B avant et après dilution	p. 84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification proposée par l’American Joint Committee for Cancer Classification en fonction de la classification TNM	p. 22
Tableau II : Options thérapeutiques en cas de métastases opérables d’emblée ou de métastases potentiellement opérables	p. 24
Tableau III : Options thérapeutiques en situation palliative	p. 25
Tableau IV : Comparaison de l’efficacité du bévacizumab en 1 ^{ère} ligne dans différents essais randomisés	p. 31
Tableau V : Mécanismes d’action anticorps anti-EGFR	p. 35
Tableau VI : Comparaison de l’efficacité du cétuximab en 1 ^{ère} ou 2 ^{ème} ligne dans différents essais thérapeutiques	p. 36
Tableau VII : Fréquence des mutations et de l’amplification des récepteurs HER en fonction du type tumoral	p. 44
Tableau VIII : Surexpression d’EGFR en fonction des tissus	p. 45
Tableau IX : Quelques exemples d’essais randomisés évaluant les conséquences de la présence de mutations des codons 12 et 13 du gène <i>KRAS</i>	p. 55
Tableau X : Valeur prédictive négative de la mutation <i>BRAF V600E</i>	p. 58
Tableau XI : Fréquence des mutations <i>PIK3CA</i> chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique	p. 59
Tableau XII : Classification des patients en répondeurs (réponse partielle (PR) ou complète (CR)) ou non répondeurs (maladie stable (SD) ou progression (PD)) aux thérapies anti-EGFR	p. 77

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 8 Novembre 2011

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par Anne-Sophie CHRETIEN

Sujet :

Marqueurs prédictifs de résistance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique – Exemple d'analyse intégrée de marqueurs multiples.

Jury :

Président - Directeur :

M. MERLIN Jean-Louis (Biologiste, Centre Alexis Vautrin, Professeur des Universités, Université Henri Poincaré, Nancy)

Juges :

Mme UBEAUD-SEQUIER Geneviève (Praticien Hospitalier, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Strasbourg)

M. FAY Renaud (Résident, CHU Nancy)

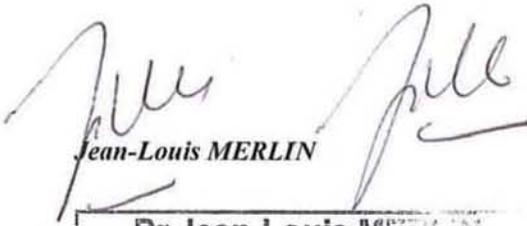
M. VIGNERON Jean (Praticien Hospitalier, CHU Nancy)

Vu,

Nancy, le 10.10.11

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse


 Jean-Louis MERLIN

Pr Jean-Louis MERLIN

Unité de Biologie des Tumeurs

Centre Alexis Vautrin

Avenue de Bourgogne

54511 Vandœuvre lès Nancy - France

jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

Vu et approuvé,

Nancy, le 14.10.11

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

 Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 21.10.2011

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,


 Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 3800

N° d'identification :

TITRE

Marqueurs prédictifs de réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique - Exemple d'analyse intégrée de marqueurs multiples

Thèse soutenue le 8 Novembre 2011

Par Anne-Sophie CHRETIEN

RESUME :

L'étude des récepteurs HER (Human Epidermal growth factor Receptor) a récemment conduit à une meilleure compréhension des mécanismes inhérents à la carcinogénèse ainsi qu'au développement des thérapeutiques ciblées (anticorps monoclonaux et inhibiteurs de tyrosine kinase). L'émergence de ces thérapies ciblées représente un progrès majeur en cancérologie. Leur efficacité, leur toxicité amoindrie, en font des médicaments de choix dans la plupart des prises en charge de ces pathologies.

Indépendamment de l'expression de la cible moléculaire, l'activité des thérapies ciblées est tributaire de la présence dans le tissu tumoral d'anomalies génétiques capables de perturber la signalisation cellulaire tumorale en aval des récepteurs dont la recherche fait maintenant partie des critères de prescription. Ainsi, l'efficacité des thérapies ciblées est limitée à des populations restreintes pour lesquelles les critères prédictifs de réponse à ces traitements restent à préciser ou à définir selon les cas.

La fonctionnalité de la signalisation en aval des récepteurs HER est impliquée dans les phénomènes de résistance aux thérapies ciblées anti-HER. Ce travail a pour but de mettre en relation entre la fonctionnalité de deux voies de signalisation majeures, la voie des PI3K /AKT et la voie des RAS/RAF/MAPK, et la réponse clinique aux anticorps anti-EGFR, le cétuximab et le panitumumab. Cette étude rétrospective, réalisée chez 45 patients atteints de cancer colorectal métastatique, propose une approche multiparamétrique basée sur la détection des phosphoprotéines clé de ces voies de signalisation.

Nos résultats suggèrent que l'utilisation des données issues de l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval des récepteurs HER pourraient à terme trouver des applications en qualité de marqueurs prédictifs de réponse clinique aux thérapies ciblées anti-HER.

MOTS CLES :

Mots clé : cancer, cétuximab, panitumumab, EGFR, signalisation cellulaire

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<u>Pr. Jean-Louis MERLIN</u>	<u>Unité de Biologie des Tumeurs</u> <u>Centre Alexis Vautrin</u>	Expérimentale ■ Bibliographique □ Thèmes 3-5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle