Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

ALICJA PUSZKIEL

Le 4 novembre 2019

Pharmacocinétique et pharmacogénétique du tamoxifène et du létrozole chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Dr Mélanie WHITE-KONING et Dr Fabienne THOMAS

Jury

Pr Chantal CSAJKA, Rapporteur
Pr Michel TOD, Rapporteur
Pr Florence DALENC, Examinateur
Pr Nicolas PICARD, Examinateur
Dr Mélanie WHITE-KONING, Directeur de thèse
Dr Fabienne THOMAS, Directeur de thèse

Remerciements

A Madame le Professeur Chantal CSAJKA,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse ainsi que du temps que vous avez accordé à examiner ce travail. C'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Michel TOD,

Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à mon travail en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

A Madame le Professeur Florence DALENC,

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examinateur et de participer à mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Nicolas PICARD,

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et de faire partie de mon jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Alexandre EVRARD,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon comité de thèse et pour toutes vos remarques pertinentes qui m'ont aidé à réaliser ces travaux. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Xavier DECLÈVES,

Tout d'abord je voudrais vous remercier de m'avoir donné la possibilité d'intégrer votre laboratoire de pharmacologie à l'Hôpital Cochin il y a 5 ans. Ceci était ma première expérience de recherche clinique à l'origine de mes futurs choix professionnels qui m'ont conduit à effectuer cette thèse. Je vous remercie également d'avoir participé à mon comité de thèse et pour tous vos commentaires pertinents

qui m'ont aidé à effectuer ces travaux. Veuillez trouver ici le témoignage de ma plus profonde gratitude.

A ma Directrice de thèse, Madame le Docteur Fabienne THOMAS,

Fabienne, j'aimerais te remercier de m'avoir confié ce projet de recherche et de m'avoir encadré durant ma thèse. Je suis ravie d'avoir eu la possibilité de travailler avec toi et de profiter de tes connaissances en pharmacogénétique et pharmacocinétique. J'ai particulièrement apprécié ta capacité de réflexion scientifique et tes explications claires. Ainsi, cette thèse était une période de mon aboutissement professionnel mais aussi personnel. Je te remercie pour le temps que tu m'as consacré, pour ta disponibilité pour résoudre les problèmes et pour tout ce que tu m'as appris. Trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

A ma Directrice de thèse, Madame le Docteur Mélanie WHITE-KONING,

Mélanie, tout d'abord, je te remercie d'avoir accepté il y a 5 ans de m'encadrer dans mon projet de Master 2 qui a été à l'origine de ma motivation pour effectuer cette thèse de sciences. Je te suis reconnaissante de m'avoir encadré sur le projet PHACS et de m'avoir transmis tes connaissances en statistiques et ta réflexion scientifique tellement importantes pour ma future vie professionnelle. Je tiens à te remercier de m'avoir consacré ton temps non seulement pour discuter des problèmes scientifiques mais aussi pour me soutenir dans cette période difficile qu'est la thèse. Trouve ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Étienne CHATELUT,

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir donné la possibilité d'effectuer ma thèse de sciences dans votre équipe. Je vous remercie également de m'avoir confié les projets de recherche grâce auxquels j'ai développé mes connaissances scientifiques et gagné en confiance professionnelle. Même en tant que chef d'équipe avec un emploi du temps chargé, vous avez toujours été disponible pour une discussion scientifique (ou sur les footballeurs polonais) et pour répondre à mes questions. Je tiens également à vous remercier de m'avoir guidé dans les choix concernant mon parcours professionnel. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Henri ROCHÉ,

Je tiens à vous remercier de m'avoir permis de travailler sur les données de l'étude PHACS dont vous étiez l'investigateur principal. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude.

A Cécile ARELLANO et Christelle VACHOUX,

Je voudrais vous remercier pour votre gentillesse pendant les trois ans que j'ai passés au laboratoire et surtout d'avoir effectué les dosages de tamoxifène dans le cadre de l'étude PHACS. C'est grâce à vous que j'ai pu effectuer une grande partie de ces travaux. Je vous en suis très reconnaissante.

A toutes les personnes qui ont participé à l'étude PHACS: les investigateurs, les pharmaciens et biologistes, le personnel de Bureau des Essais Cliniques, les IDE et techniciens mais surtout aux patientes incluses dans cette étude. Je vous remercie pour votre implication et motivation qui ont rendu possible d'effectuer ces travaux de thèse et de faire avancer les connaissances concernant l'hormonothérapie adjuvante du cancer du sein.

A tous les membres de l'équipe 14 du CRCT et du Laboratoire de Pharmacologie de l'IUCT,

Premièrement, je voudrais remercier Ben ALLAL, Sabrina MARSILI, Isabelle LOCHON, Thierry LAFFONT, Caroline DELMAS et Anaïs ANTON avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pendant la première année de ma thèse en tant que FFI. Je vous remercie pour votre gentillesse et bienveillance (Thierry – aide au déménagement ☺) et pour tout ce que vous m'avez appris concernant le travail au laboratoire de pharmacologie. Je voudrais également remercier Malika YAKOUBI, Aurélie BRICE, Aurélia DOUSSINE et Hélène SIRGUE, avec qui je n'ai pas travaillé directement mais qui ont toujours été très gentilles avec moi. Malika, merci pour ton soutien et pour les discussions sur la vie.

Aux étudiants,

Je tiens à remercier Alejandro, Fanny, Marie, Félicien, Maud, Sotheara, Marie-Noëlle, Marine, Kateryna et Lorraine ainsi que tous les autres étudiants et externes qui sont passé par le laboratoire pendant mes trois ans de thèse. Je vous remercie de m'avoir appris le vocabulaire français plus approfondi, de m'avoir appris à skier (ou au moins essayé), de m'avoir montré Calimero (Félicien !) ainsi que de votre soutien et de tous les beaux moments que nous avons passés ensemble au

laboratoire et à l'occasion de différentes sorties et excursions. Je garderai ces beaux souvenirs pour toute ma vie.

A Benoit,

Benoit, depuis que je t'ai rencontré il y a plus de 5 ans, tu m'as toujours montré ta bienveillance et ton soutien qui m'ont aidé à prendre des décisions professionnelles et personnelles. Je te remercie pour cette amitié et pour me faire progresser. J'étais très contente d'avoir pu collaborer avec toi sur des différents projets de recherche et je te remercie de m'avoir fait confiance. C'est aussi grâce à toi que j'ai pu louer un appartement à Toulouse comme une grande ☺.

A Gaëlle,

Kot, je te remercie pour ton soutien pendant ces trois ans de thèse, nos appels téléphoniques m'ont toujours fait garder le moral. Je te remercie également pour la collaboration si sympathique sur l'écriture des revues bibliographiques. J'ai toujours apprécié travailler avec toi et profiter de tes connaissances.

A Gosia,

Na zawsze zachowam wspomnienie tych wszystkich chwil, które spędziłyśmy razem w Tuluzie. Jak bardzo poprawia nastrój świadomość, że jest ktoś, na kogo zawsze można liczyć i z kim wspólne lepienie pierogów to najlepiej spędzony czas.

A Doriane,

Je te remercie pour ton amitié depuis déjà plus de 5 ans. C'est grâce à toi que je me suis sentie intégrée en France pour la première fois. Tu es comme ma deuxième famille française.

A Tiphaine,

Je tiens à te remercier pour ta compréhension et ton soutien durant ces trois ans de thèse ainsi que d'avoir relu ce manuscrit de thèse et d'avoir amélioré mon français (tu n'oublieras surement pas toutes ces différentes manières d'utiliser le verbe « entraîner » ☺).

A ma Famille,

Mojej Rodzinie,

Mojej Kuzynce Agacie, za bycie moim najwytrwalszym gościem z Polski i coroczny przyjazd na Wielkanoc, ktory był dla mnie zawsze najmilszym oderwaniem od rzeczywistości.

Mojej Siostrze Renacie, bez ktorej nie byłoby tego doktoratu, gdyby około 15 lat temu nie podrzuciła mi pomysłu, aby zacząć uczyć się języka francuskiego ☺. Dziękuję za Twoje wsparcie i za przyjazdy do Francji, za paryski szyk, żartowanie z Francuzików (szczególnie tych niemiłych z Paula…) i za moje ulubione wizyty w Warszawie.

Moim Rodzicom, za umożliwienie mi podążania za marzeniami, za wiarę w moje możliwości i za wsparcie, które tak wiele dla mnie znaczy.

A Viktor,

You are the only one who knows how much support I needed during this PhD and I got it from you. Thank you for being so close while living so far.

Table des matières

Introduction **10**

Partie bibliographique **13**

1 Cancer du sein **13**

1.1 Cancers du sein ER+ et/ou PR+ 14

1.2 Cancers du sein ERBB2+ 15

1.3 Cancers du sein triple négatifs 16

2 Hormonothérapie du cancer du sein **18**

2.1 Modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes 19

2.2 Inhibiteurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes 19

2.3 Inhibiteurs de l'aromatase 20

2.4 Stratégies thérapeutiques 21

3 Généralités sur le tamoxifène **23**

3.1 Propriétés physico-chimiques 23

3.2 Propriétés pharmacodynamiques 24

3.3 Efficacité clinique 27

3.3.1 Cancer du sein métastatique 28

3.3.2 Cancer du sein au stade précoce 28

3.3.2.1 Durée de thérapie 29

3.3.3 Prévention du cancer du sein chez les femmes à haut risque 30

3.4 Effets bénéfiques 30

3.5 Effets indésirables 31

3.5.1 Profil de toxicité 31

3.5.2 Cancer de l'endomètre 32

3.5.3 Événements thromboemboliques veineux 32

3.6 Adhérence au traitement 33

3.7 Propriétés pharmacocinétiques 34

3.7.1 Absorption 34

3.7.2 Distribution 35

3.7.3 Métabolisation 36

3.7.4 Elimination 38

3.8 Facteurs influençant la pharmacocinétique du tamoxifène 39

3.8.1 Alimentation 39

3.8.2 Ethnie 39
3.8.3 Facteurs démographiques 39
3.8.4 Insuffisance hépatique 40
3.8.5 Insuffisance rénale 40
3.8.6 Polymorphismes génétiques 40
3.8.6.1 CYP2D6 40
3.8.6.2 CYP3A4/5 46
3.8.6.3 CYP2C9 48
3.8.6.4 CYP2C19 48
3.8.6.5 CYP2B6 49
3.8.6.6 SULT 49
3.8.6.7 UGT 50
3.8.6.8 Transporteurs d'efflux de la famille ABC 52
3.8.6.9 Régulateurs de transcription 53
3.8.7 Interactions médicamenteuses 53
3.8.7.1 Inhibiteurs du CYP2D6 53
3.8.7.2 Inhibiteurs du CYP3A4 54
3.8.7.3 Inducteurs enzymatiques 55
3.8.7.4 Inhibiteurs de l'aromatase 56
3.8.7.5 Phytothérapie 57
3.8.8 Saison 58
3.9 Méthodes de dosage 58
3.10 Relation pharmacogénétique-pharmacodynamie 60
3.10.1 CYP2D6 60
3.10.1.1 Efficacité 60
3.10.1.2 Toxicité 61
3.10.2 CYP3A4/5 62
3.10.3 CYP2C19 63
3.10.4 CYP2C9 63
3.10.5 CYP2B6 63
3.10.6 SULT 63
3.10.7 UGT 64
3.10.8 Transporteurs d'efflux de la famille ABC 64
3.11 Relation pharmacocinétique-pharmacodynamie 65
3.11.1 Efficacité 65
3.11.2 Toxicité 67
3.12 Individualisation de traitement par tamoxifène 68
3.12.1 Faisabilité de l'adaptation de dose 69

4 Généralités sur le létrozole 72
4.1 Propriétés physico-chimiques 72
4.2 Propriétés pharmacodynamiques 72
4.3 Efficacité clinique 73
4.3.1 Cancer du sein au stade avancé 73
4.3.2 Cancer du sein en situation adjuvante 74
4.3.3 Cancer du sein en situation néoadjuvante 77
4.4 Effets indésirables 77
4.4.1 Profil de toxicité 77
4.4.2 Accidents cardiovasculaires 78
4.4.3 Ostéoporose et fractures 80
4.5 Propriétés pharmacocinétiques 81
4.5.1 Absorption 81
4.5.2 Distribution 81
4.5.3 Métabolisme 82
4.5.4 Elimination 82
4.6 Facteurs influençant la pharmacocinétique du létrozole 83
4.6.1 Alimentation 83
4.6.2 Ethnie 83
4.6.3 Facteurs démographiques 84
4.6.4 Insuffisance hépatique 84
4.6.5 Insuffisance rénale 84
4.6.6 Polymorphismes génétiques 84
4.6.6.1 CYP2A6 84
4.6.6.2 CYP3A4/5 88
4.6.7 Interactions médicamenteuses 88
4.7 Méthodes de dosage 89
4.8 Biomarqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique 89
4.9 Relation pharmacocinétique-pharmacodynamie 90
5 Pharmacocinétique de population 91
5.1 Approche en deux étapes 91
5.2 Modèles non-linéaires à effets mixtes 91
5.3 Modèle de structure 92
5.4 Modèle statistique 93
5.4.1 Variabilité interindividuelle 93
5.4.2 Variabilité inter-occasion 94
5.4.3 Variabilité résiduelle 94

5.5 Modèle de covariables 95
5.6 Modèles de mixture 97
5.7 Expression générale du modèle 99
5.8 Méthodes d'estimation 99
5.9 Estimation bayésienne des paramètres individuels 100
5.10 Evaluation d'un modèle 102
5.10.1 Graphiques diagnostiques 102
5.10.2 Précision de l'estimation 102
5.10.3 Visual Predictive Check 103
5.11 Application à l'analyse pharmacocinétique d'une molécule parent et de ses métabolites 104
Travaux personnels 108
1 Objectifs 108
2 Etude de la relation pharmacocinétique-pharmacogénétique du tamoxifène 109
2.1 Introduction 109
2.2 Evaluation de l'impact des polymorphismes génétiques sur les concentrations plasmatiques de tamoxifène et ses métabolites 111
2.2.1 Article scientifique n°1 111
2.3 Analyse des données longitudinales du tamoxifène et métabolites par approche de pharmacocinétique de population 134
2.3.1 Article scientifique n°2 134
2.4 Discussion 195
3 Etude de la relation pharmacocinétique-pharmacogénétique du létrozole 200
3.1 Introduction 200
3.2 Analyse des données longitudinales du létrozole par approche de pharmacocinétique de population 201
3.2.1 Article scientifique n°3 201
3.2.2 Résultats complémentaires 242
3.3 Discussion 246
Conclusion générale et perspectives 249
Références bibliographiques 252

Liste des abréviations

ABC	ATP-binding cassette
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
AUC	Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps
AUC_{τ}	Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps dans l'intervalle de dose
BCRP	Breast cancer resistance proteine
BRCA1	Breast cancer 1 protein
BRCA2	Breast cancer 2 protein
CAR	Récepteur constitutif des androstanes
CDK 4-6	Kinases 4 et 6 dépendantes des cyclines
CI	Interval de confiance
CL	Clairance
C_{max}	Concentration plasmatique maximale
CoA	Co-activateurs
CoR	Co-répresseurs
C_{ss}	Concentration plasmatique à l'état d'équilibre
C_{trough}	Concentration plasmatique résiduelle
CV	Coefficient de variation
CYP	Cytochrome P450
DV	Variable dépendante
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
EBE	Empirical Bayes Estimate
ER	Récepteur à l'estrogène
ERBB2	Epidermal growth factor 2
ERE	Elément de réponse à l'estrogène
ESI	Ionisation en electrospray
ESMO	European Society for Medical Oncology
ETEV	Evénements thromboemboliques veineux
F	Biodisponibilité

FDA	Food and Drug Administration
FMO	Flavine mono-oxygénase
FSH	Hormone folliculo-stimulante
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HLM	Microsomes de foie humain
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HR	Hazard ratio
IA	Inhibiteur de l'aromatase
IANS	Inhibiteur d'aromatase non-stéroïdien
IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane
IM	Métaboliser intermédiaire
IMC	Indice de masse corporelle
IPRED	Prédictions individuelles
IWRES	Résidus pondérés individuels
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LLOQ	La limite de quantification basse
LnRH	Hormone de libération de la lutéinostimuline
MCF-7	Lignée cellulaire Michigan Cancer Foundation – 7
MCF-7Ca	Lignée cellulaire MCF-7 transfectée avec le gène de l'aromatase
MRM	Multiple reaction monitoring
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
NM	Métaboliser normal
OFV	Fonction objective
PARPi	Inhibiteur des enzymes poly (ADP-ribose) polymérase humaines
PBPK	Modélisation pharmacocinétique-physiologique
PD	Pharmacodynamie
P-gp	P-glycoprotéine
PFS	Survie sans progression
PK	Pharmacocinétique
PM	Métaboliser lent

PR	Récepteur à la progestérone
PRED	Prédictions au niveau de population
PXR	Pregnane X receptor
RR	Risque relatif
RSE	Relative standard error
SD	Ecart-type
SE	Erreur standard d'estimation
SERD	Inhibiteur sélectif des récepteurs aux estrogènes
SERM	Modulateur sélectif des récepteurs aux estrogènes
SNP	Single nucleotide polymorphism
SRM	Selective reaction monitoring
SULT	Sulfotransferases
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
TGF-β	Facteur de croissance transformant
T_{max}	Temps pour atteindre la concentration plasmatique maximale
UGT	UDP-glucuronosyltransférase
UTR	Région 3′ non traduite
UM	Métaboliser ultra-rapid
UPLC	Chromatographie liquide à ultra haute performance
V	Volume de distribution
VPC	Visual Predictive Check

Tableaux

Tableau 1 Structures chimiques du tamoxifène et ses métabolites majeurs de phase I. D'après Teunissen *et al.* [24]. 25

Tableau 2 Caractéristiques pharmacologiques des métabolites majeurs du tamoxifène [25]. 26

Tableau 3 Variants génétiques de CYP2D6 [126–128]. 42

Tableau 4 Classement des variants génétiques de CYP2D6 en fonction de leur activité [127]..... 43

Tableau 5 Classement de diplotype CYP2D6 en phénotype [129]. 44

Tableau 6 Variants génétiques des UGTs intervenant dans la glucuronidation du tamoxifène. 51

Tableau 7 Variants génétiques du CYP2A6 et leur fréquence dans la population caucasienne. D'après Tanner *et al.* [328]..... 86

Tableau 8 Résultats de l'analyse PK/PD (concentrations observées) du létrozole à la visite à 6 mois. 242

Tableau 9 Résultats de l'analyse PK/PD ($AUC_{ss,\tau}$) du létrozole à la visite à 6 mois. 244

Figures

Figure 1 La transcription des gènes ER-dépendante et les effets de l'hormonothérapie sur les voies de signalisation des ER. D'après Patel *et al.* [11]. 18

Figure 2 Stratégies thérapeutiques actuellement recommendées en France pour la prise en charge du cancer du sein ER+ et/ou PR+. 22

Figure 3 Structure chimique du tamoxifène. 23

Figure 4 Schéma de la métabolisation du tamoxifène d'après Murdter *et al.* [23]. 37

Figure 5 Distribution des concentrations plasmatiques de l'endoxifène en fonction du phénotype CYP2D6 en prenant en compte la prévalence de chaque phénotype (l'aire sous la distribution représente la proportion de la population avec le phénotype donné). D'après Lyon *et al.*[125]. 45

Figure 6 Structure chimique du létrozole. 72

Figure 7 Schéma de métabolisation du létrozole [321]. 82

Figure 8 Exemple d'un modèle structural à un compartiment avec administration par voie iv. 92

Figure 9 Histogramme présentant une distribution bimodale de la clairance. D'après Bonate [343]. 98

Figure 10 Visual Predictive Check d'un modèle pharmacocinétique de population pour un médicament administré par voie orale. 104

Figure 11 Schéma de modèle de structure décrivant les données de parent et son métabolite. 105

Figure 12 Schéma de modèle de structure décrivant les concentrations plasmatiques de sunitinib est son métabolite N-desethylsunitinib (SU12662) proposé par Yu *et al.* [345] 106

Figure 13 Schéma de modèle de structure décrivant les concentrations plasmatiques d'un médicament antipsychotique et son métabolite actif proposé par Bertrand *et al.* [346]. 107

Figure 14 Schéma de métabolisation du tamoxifène et des métabolites analysés dans l'étude PHACS. 109

Introduction

La découverte des récepteurs aux estrogènes dans les cellules cancéreuses du sein ainsi que la meilleure compréhension de leur implication dans cette pathologie ont conduit dans les années 1970 à l'introduction de l'hormonothérapie. Ces médicaments inhibent la croissance tumorale estrogèno-dépendante du cancer du sein par inhibition compétitive des récepteurs aux estrogènes (modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes, notamment le tamoxifène) ou la diminution des taux d'estrogènes circulants (inhibiteurs de l'aromatase, notamment le létrozole). Dans le cas du cancer du sein dépisté au stade précoce, la durée recommandée de traitement adjuvant est de 5 ans. L'introduction du tamoxifène dans la thérapie adjuvante du cancer du sein hormonodépendant a significativement réduit le taux de récurrence et de mortalité liée au cancer du sein. Toutefois, approximativement 25% des patientes présentent une récidive dans les 15 ans suivant le premier diagnostic du cancer. Par ailleurs, le caractère longitudinal et les effets indésirables fréquents de l'hormonothérapie (notamment les bouffées de chaleur pour le tamoxifène et l'arthralgie et la myalgie pour le létrozole) sont à l'origine de la diminution de la qualité de vie des patients. Ceci s'accompagne souvent d'un arrêt volontaire de traitement ou d'une mauvaise adhérence. La problématique du traitement par l'hormonothérapie repose également sur une importante variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique. En effet, la métabolisation du tamoxifène et du létrozole est influencée par la présence des polymorphismes génétiques dans les cytochromes P450. Ceci est d'autant plus important dans le cas du tamoxifène puisque son activité antitumorale dépend de sa biotransformation par le CYP2D6 en métabolites actifs, notamment l'endoxifène. Au vu de la variabilité interindividuelle de la réponse clinique au tamoxifène et au létrozole ainsi que d'une forte variabilité interindividuelle de leur pharmacocinétique, la thérapie adjuvante par ces deux médicaments pourrait être optimisée par une individualisation de posologie. Néanmoins, des résultats contradictoires sur la relation entre d'une part les polymorphismes génétiques de CYP2D6, d'autre part l'exposition à l'endoxifène et l'efficacité ont été rapportés. En conséquence, l'individualisation de dose du tamoxifène a été remise en cause. Pour ce qui concerne le létrozole, à ce jour il n'y pas d'études montrant une association entre l'efficacité ou les effets indésirables et sa

pharmacocinétique chez les patientes en situation adjuvante. De ce fait, la relation pharmacocinétique-pharmacogénétique du tamoxifène et celle du létrozole doivent être étudiées dans des études prospectives basées sur un nombre de patientes important afin de mieux comprendre les facteurs influençant la pharmacocinétique de ces médicaments et probablement la réponse clinique. Pour répondre à cet objectif, l'étude PHACS, une étude prospective incluant 2000 patientes débutant un traitement par hormonothérapie et suivies pendant 3 ans a été réalisée entre juin 2010 et octobre 2017. Son objectif était d'évaluer les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacogénétiques de l'hormonothérapie adjuvante du cancer du sein et de les corréler à la survenue des effets indésirables. Le grand nombre de patientes incluses, l'exhaustivité des données recueillies et le caractère longitudinal font de cette étude une des plus grandes études prospectives internationales dans cette indication.

Ces travaux de thèse débutent par une revue bibliographique présentant tout d'abord la physiopathologie du cancer du sein puis les traitements actuellement utilisés dans la prise en charge des cancers du sein hormonodépendants. Nous poursuivrons par la présentation des propriétés pharmacologiques de deux médicaments utilisés dans le cadre de l'hormonothérapie: le tamoxifène et le létrozole. Enfin, le principe de la modélisation non linéaire à effets mixtes – méthodologie utilisée pour l'analyse des données pharmacocinétiques – sera exposé.

Les travaux personnels seront présentés selon deux parties:

- La première partie exposera les résultats des analyses sur les données de l'étude PHACS portant sur le tamoxifène. L'objectif de ces travaux était d'identifier et de quantifier l'impact des polymorphismes génétiques, des traitements concomitants et des caractéristiques démographiques sur la pharmacocinétique du tamoxifène et de ses métabolites. Ces analyses ont été réalisées par une approche standard sur les données préliminaires de l'étude (première visite de suivi). Dans un deuxième temps, la totalité des données (incluant les 6 visites sur 3 ans) a été analysée par l'approche de population.
- La deuxième partie portera sur les résultats de l'analyse pharmacocinétique-pharmacogénétique du létrozole effectuée par approche de population sur la totalité des données avec une évaluation

de l’adhérence par différentes méthodes de modélisation. Les résultats de l’analyse PK/PD en termes d’effets indésirables seront également exposés.

Partie bibliographique

1 Cancer du sein

Le cancer du sein est la première cause de mortalité liée au cancer chez la femme. En 2017 en France, environ 59 000 nouveaux cas de cancer du sein ont été détectés et 12 000 décès ont été attribués à ce cancer [1]. Les méthodes de dépistage telles que la mammographie et l'examen clinique du sein ont significativement augmenté le nombre de patientes diagnostiquées au stade précoce de la maladie. En effet, approximativement 60% des cancers du sein sont diagnostiqués au stade local tandis qu'environ 30% présentent en plus une atteinte ganglionnaire. Seulement 6% des cancers du sein sont métastatiques au moment du diagnostic [2].

D'un point de vue histologique, les cancers du sein peuvent être divisés en carcinomes invasifs canalaires (concernent 50 à 75% des patientes) et lobulaires (5 à 15%). Les carcinomes impliquant à la fois les canaux et le lobule ainsi que d'autres types histologiques représentent les types plus rares.

Les cancers du sein sont caractérisés par une grande hétérogénéité moléculaire. Deux cibles moléculaires dans la pathologie du cancer du sein ont été identifiées:

- Récepteur aux estrogènes et/ou à la progestérone,
- Protéine ERBB2 (*epidermal growth factor* 2, ancien HER2 ou HER2/neu).

On peut distinguer deux isoformes majeures de récepteur aux estrogènes – ERα et ERβ. Ces derniers sont à la fois des récepteurs des hormones stéroïdiens et des facteurs de transcription qui, stimulés par les estrogènes, activent les voies de signalisation intracellulaires. Les ERα et ERβ sont responsables de plusieurs processus physiologiques dans le corps, notamment du développement du système reproducteur féminin, du maintien de la masse osseuse, de la protection du système cardiovasculaire et du système nerveux central [3,4]. Le dysfonctionnement de la signalisation ERα-dépendante dans le tissu mammaire, utérin et dans les ovaires est à l'origine de développement des cancers de ces tissus. Le rôle des ERβ dans le développement du cancer du sein est moins bien connu, de ce fait, l'isoforme ERα est la cible des thérapies antiestrogéniques et dans cette revue elle sera par la suite appelée ER. Le récepteur à la progestérone (PR) est également un marqueur de la signalisation hormonodépendante.

L'ERBB2 est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase qui active des voies de signalisation intracellulaires en réponse à des signaux extracellulaires. La surexpression de la protéine ERBB2 due aux mutations ou l'amplification du gène *ERBB2* entraîne une augmentation de l'activité de la protéine et en conséquence la suractivation des voies de signalisation oncogéniques. Ceci mène à une prolifération cellulaire non contrôlée et à une croissance tumorale.

Les cancers du sein sont classés en trois catégories en fonction de la présence des récepteurs aux estrogènes (ER+) ou à la progestérone (PR+) et de l'expression de la protéine *ERBB2* et/ou de plusieurs copies du gène *ERBB2* (ERBB2+). Ces trois types comprennent les cancers du sein:

- hormonodépendants (ER+ et/ou PR+),
- ERBB2+,
- triples négatifs (absence de ces trois types de récepteurs).

La catégorie à laquelle appartient un cancer détermine les facteurs de risque, la réponse thérapeutique, la progression de maladie et les sites préférentiels des métastases.
Différentes stratégies thérapeutiques sont proposées en fonction du stade (précoce ou avancé) et du type du cancer du sein. La stratégie thérapeutique chez les femmes diagnostiquées d'un cancer du sein au stade précoce consiste à éradiquer la tumeur et éventuellement les ganglions lymphatiques. Une radiothérapie post-opératoire peut être envisagée. Ensuite, un traitement adjuvant dépendant du type moléculaire du cancer est instauré. Dans certaines situations, un traitement néoadjuvant (chimiothérapie, radiothérapie ou hormonothérapie) est initié afin de diminuer la taille de la tumeur avant la chirurgie de l'éradication. Le traitement des cancers du sein au stade métastatique consiste à utiliser des traitements de chimiothérapie pour prolonger la survie avec un but palliatif.

1.1 Cancers du sein ER+ et/ou PR+

Les cancers hormonodépendants représentent la majorité des cancers du sein et concernent environ 75% des patientes [5]. D'après les recommandations américaines, l'expression d'ER ou PR dans au moins 1% des cellules cancéreuses permet de catégoriser le cancer en hormonodépendant [6]. Néanmoins, ce seuil a été fixé à 10% en Europe. Ce type de cancer est généralement moins agressif que les cancers ERBB2+

ou triples négatifs. La croissance tumorale est favorisée par la fixation des estrogènes ou de la progestérone aux récepteurs ER et/ou PR sur la surface des cellules tumorales. Chez les patientes diagnostiquées au stade précoce de maladie (stade I), la survie spécifique au cancer du sein à 5 ans est estimée supérieure ou égale à 99% [7]. Chez les patientes diagnostiquées au stade métastatique, la survie globale médiane est de 4 à 5 ans.

La stratégie thérapeutique consiste à bloquer les effets des hormones auprès des récepteurs. De ce fait, le traitement utilisé dans ce type de cancer est appelé l'hormonothérapie.

1.2 Cancers du sein ERBB2+

Ce type de cancer est diagnostiqué chez 15 à 20% des patientes [5]. Approximativement la moitié de ces tumeurs sont également ER+ et/ou PR+. La physiopathologie des cancers ERBB2+ est liée à la suractivation de l'oncogène *ERBB2*, codant pour la protéine ERBB2 à l'activité tyrosine kinase. Une meilleure compréhension de la biologie des tumeurs et des voies de signalisation a permis de développer les médicaments agissant directement sur les voies de signalisation suractivées dans les cellules cancéreuses. Plusieurs nouvelles thérapies ciblées ont été introduites dans le traitement des cancers du sein ERBB2+ et sont utilisées en monothérapie ou en association avec la chimiothérapie conventionnelle. Ces traitements incluent notamment:

- le trastuzumab (un anticorps monoclonal anti-ERBB2),
- le pertuzumab (un anticorps monoclonal anti-ERBB2 avec un autre site de liaison que le trastuzumab),
- l'ado-trastuzumab emantsine (un anticorps monoclonal conjugué à un agent cytotoxique – emantsine, un inhibiteur de microtubules),
- le lapatinib (un inhibiteur de tyrosine kinase ERBB2 et EGFR).

L'introduction de ces nouvelles molécules thérapeutiques lors des 15 dernières années a révolutionné la prise en charge des patientes avec ce type de cancer en augmentant la survie globale d'environ 20 mois à 5 ans [8,9]. La survie spécifique au cancer du sein à 5 ans chez les patientes diagnostiquées au stade précoce est supérieure ou égale à 94% [7].

Dans le cas du cancer du sein ERBB2+ au stade précoce, la stratégie thérapeutique consiste en un traitement néoadjuvant par une association de chimiothérapie conventionnelle et une thérapie ciblée anti-ERBB2 suivie par une chirurgie ou une radiothérapie et 12 mois supplémentaires de traitement. Dans le cas d'une tumeur ERBB+ et ER+ et/ou PR+, un traitement par hormonothérapie est également instauré [2].

1.3 Cancers du sein triple négatifs

Les cancers du sein triple négatifs se caractérisent par l'absence de cible moléculaire (ER-, PR- et ERBB2-). Ils concernent environ 15% des patientes et sont les cancers les plus agressifs et difficiles à traiter. La survie spécifique au cancer du sein à 5 ans chez les femmes diagnostiquées au stade précoce est estimée à 85%. Dans le cas de diagnostic au stade métastatique, la survie globale médiane est de 10 à 13 mois. La pathophysiologie moléculaire des cancers triples négatifs n'est pas encore bien connue. Toutefois, les études récentes montrent que les mutations de type loss-of-function dans les gènes *BRCA1* (« *breast cancer 1 protein* ») et *BRCA2* (« *breast cancer 2 protein* ») sont présentes dans environ 15 à 20% des cancers triples négatifs [10]. Les mutations germinales de *BRCA1/2* sont associées à une augmentation de risque de développement d'un cancer du sein et de l'ovaire. En effet, les *BRCA1/2* produisent les protéines essentielles au fonctionnement de la réparation par recombinaison homologue, un mécanisme de réparation des cassures simple- et double-brin d'ADN. De ce fait, chez les patientes présentant une mutation du gène *BRCA1* ou *BRCA2*, les cassures double brin ne peuvent pas être fidèlement réparées. A la place, les voies alternatives entraînant une instabilité génomique sont activées. La détection de mutations *BRCA1/2* dans les cancers du sein permet d'identifier les patientes pouvant bénéficier de traitements spécifiques (i.e. chimiothérapie à base de platine et inhibiteurs des enzymes poly (ADP-ribose) polymérase humaines (PARPi)). Les PARP sont les enzymes impliquées dans la réparation des cassures simple-brin. Leur inhibition entraîne la transformation de cassures simple-brin en double-brin lors de la phase de réplication. Dans les cellules normales, ces cassures sont réparées par la recombinaison homologue. En revanche, dans les cellules *BRCA1/2*-mutées, les mécanismes alternatifs seront impliqués et contribuent à l'augmentation de l'instabilité génomique entraînant une mort cellulaire. L'olaparib (PARPi) a été approuvé par FDA en 2018 pour le traitement des cancers du

sein ERBB2- au stade métastatique présentant une mutation germinale de *BRCA1/2*. Néanmoins, en France à l'heure actuelle la seule option thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif quelque soit le stade de la maladie est la chimiothérapie conventionnelle.

2 Hormonothérapie du cancer du sein

La transcription des gènes hormonodépendante est représentée sur la Figure 1. La liaison de 17β-estradiol, un estrogène d'origine endogène, sur l'ER entraîne l'homo-dimérisation de récepteur [11]. L'homo-dimère ER se fixe sur les éléments de réponse à l'estrogène (« *estrogen response element* », ERE) dans les régions promotrices de l'ADN. L'interaction de ce complexe transcriptomique avec les co-régulateurs (co-activateurs, CoA et co-répresseurs, CoR) entraîne une régulation de la transcription des gènes. Le dysfonctionnement de la signalisation ER-dépendante dans le tissu mammaire est à l'origine de développement des cancers.

La découverte des récepteurs aux estrogènes dans les cellules cancéreuses du sein ainsi que la meilleure compréhension de la pathologie de cette maladie ont été à l'origine de la recherche de molécules pouvant inhiber l'activité stimulatrice des estrogènes auprès des cellules tumorales [12].

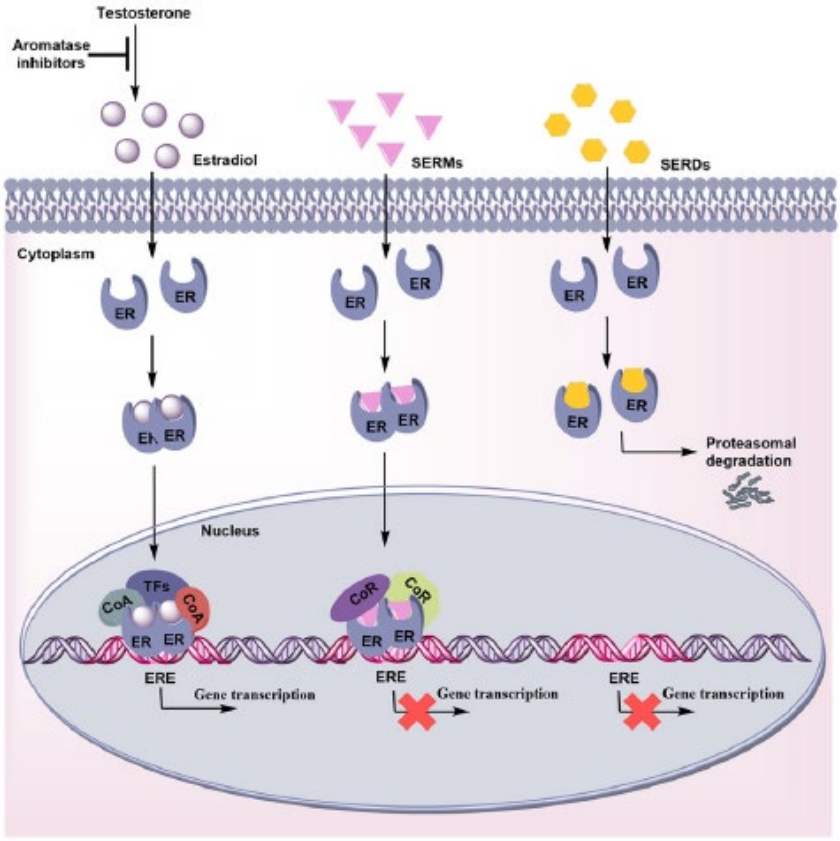


Figure 1 La transcription des gènes ER-dépendante et les effets de l'hormonothérapie sur les voies de signalisation des ER. D'après Patel *et al.* [11].

L'ethamoxytriphetol a été le premier composé non stéroïdien qui a démontré l'inhibition des ER *in vivo* dans les années 50 [13]. Depuis cette découverte, plusieurs molécules ont été étudiées pour leur efficacité dans le traitement des cancers du sein mais ne se sont pas avérées bénéfiques, notamment à cause d'effets indésirables touchant le système nerveux central [13]. Par la suite, d'autres inhibiteurs de la signalisation ER-dépendante ont été développés et peuvent être catégorisés en fonction de leur mécanisme d'action (Figure 1):

- Modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes (SERM)
- Inhibiteurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes (SERD)
- Inhibiteurs de l'aromatase

2.1 Modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes

Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes peuvent exercer une activité antagoniste ou agoniste en fonction de tissu ciblé. L'inhibition des récepteurs aux estrogènes dans les cellules cancéreuses du sein est à l'origine de leur activité antitumorale. Les effets agonistes dans les os, le profil lipidique sérique et le système cardiovasculaire sont à l'origine de leurs effets bénéfiques [14]. Le tamoxifène est un modulateur sélectif des récepteurs aux estrogènes de la première génération. Il a été initialement synthétisé en 1962 comme un médicament contraceptif et s'est avéré efficace dans le traitement du cancer du sein [13]. En revanche, son activité agoniste dans le tissu d'endomètre augmente le risque de développement du cancer. Ceci a contribué à la recherche d'autres dérivés de tamoxifène avec moins d'effets indésirables. Ainsi, plusieurs nouveaux SERMs ont été développés dont le toremifène qui s'est montré efficace dans le traitement en première ligne de cancer du sein ER+ et/ou PR+ au stade métastatique et le raloxifène qui a été approuvé dans la prévention de l'ostéoporose chez la femme ménopausée. Le tamoxifène reste le SERM le plus utilisé dans le traitement du cancer du sein ER+ et/ou PR+.

2.2 Inhibiteurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes

Le mécanisme d'action des inhibiteurs sélectifs des ER se base sur la diminution des taux d'expression de la protéine de l'ER. Le fulvestrant est un antagoniste compétitif des ER avec une forte affinité

comparable à celle de l'estradiol. Il ne possède pas d'activité agoniste envers les ER. Il entraîne une dégradation des ER et accélère le renouvellement des ER par le système ubiquitin/protéasome. Le fulvestrant est actuellement indiqué en monothérapie des cancers du sein ER+ et/ou PR+ localement avancés ou métastatiques chez les patientes qui n'ont pas été précédemment traitées par une chimiothérapie ou qui ont eu une progression de la maladie après ou pendant le traitement par un antiestrogène. Le fulvestrant peut être également utilisé en association avec le palbociclib (inhibiteur des kinases 4 et 6 dépendantes des cyclines, CDK 4-6) dans le traitement du cancer du sein ER+ et/ou PR+ et ERBB2- localement avancé ou métastatique chez les patientes qui ont été précédemment traitées par une hormonothérapie. Le traitement chez les patientes non ménopausées doit être accompagné d'une suppresion de la fonction des ovaires par un agoniste de l'hormone de libération de la lutéinostimuline (LnRH).

2.3 Inhibiteurs de l'aromatase

Chez la femme ménopausée, la source majeure d'estrogènes est la conversion de l'androstènedione et testostérone en estrone et estradiol respectivement catalysée par l'enzyme de l'aromatase (CYP19) dans les tissus périphériques (la peau, les muscles, le tissu adipeux, la tumeur bénigne et maligne du sein) [15,16]. L'activité de l'aromatase est observée dans environ 60% des cancers du sein [17]. La synthèse des estrogènes à l'intérieur de la tumeur est à l'origine des fortes concentrations d'estrogènes *in situ* capables de stimuler la croissance tumorale. Les inhibiteurs de l'aromatase diminuent les taux d'estrogènes circulant et intratumoraux et en conséquence ils inhibent la prolifération des cellules tumorales estrogèno-dépendante. L'aminoglutéthimide a été le premier inhibiteur de l'aromatase qui a démontré son efficacité clinique dans le traitement du cancer du sein au stade avancé [18]. Cependant, il présente un profil de toxicité défavorable en raison de son manque de spécificité envers l'aromatase. En conséquence, d'autres anti-aromatases plus puissants et sélectifs ont été développés, avec notamment le formestane et le fadrazole (deuxième génération) ainsi que le létrozole, l'anastrozole et l'exemestane (troisième génération). Enfin, les inhibiteurs de l'aromatase stéroïdiens (type I) tels que l'exemestane, sont des analogues de l'androstènedione et sont capables de se fixer sur le même site de liaison que le substrat entraînant ainsi une inhibition irréversible de l'enzyme. Les inhibiteurs de l'aromatase non-

stéroïdiens (type II) tels que l'aminoglutéthimide, l'anastrozole et le létrozole, interagissent compétitivement avec le groupement hème situé dans le site actif de l'aromatase.

2.4 Stratégies thérapeutiques

Le choix de l'hormonothérapie entre ces différentes classes médicamenteuses dépend principalement du stade de la maladie, du statut ménopausique, des traitements antérieurs et des facteurs de risque de rechute. Les recommandations actuelles d'après European Society for Medical Oncology (ESMO) et les structures françaises [19,20] pour la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant sont présentées sur la Figure 2.

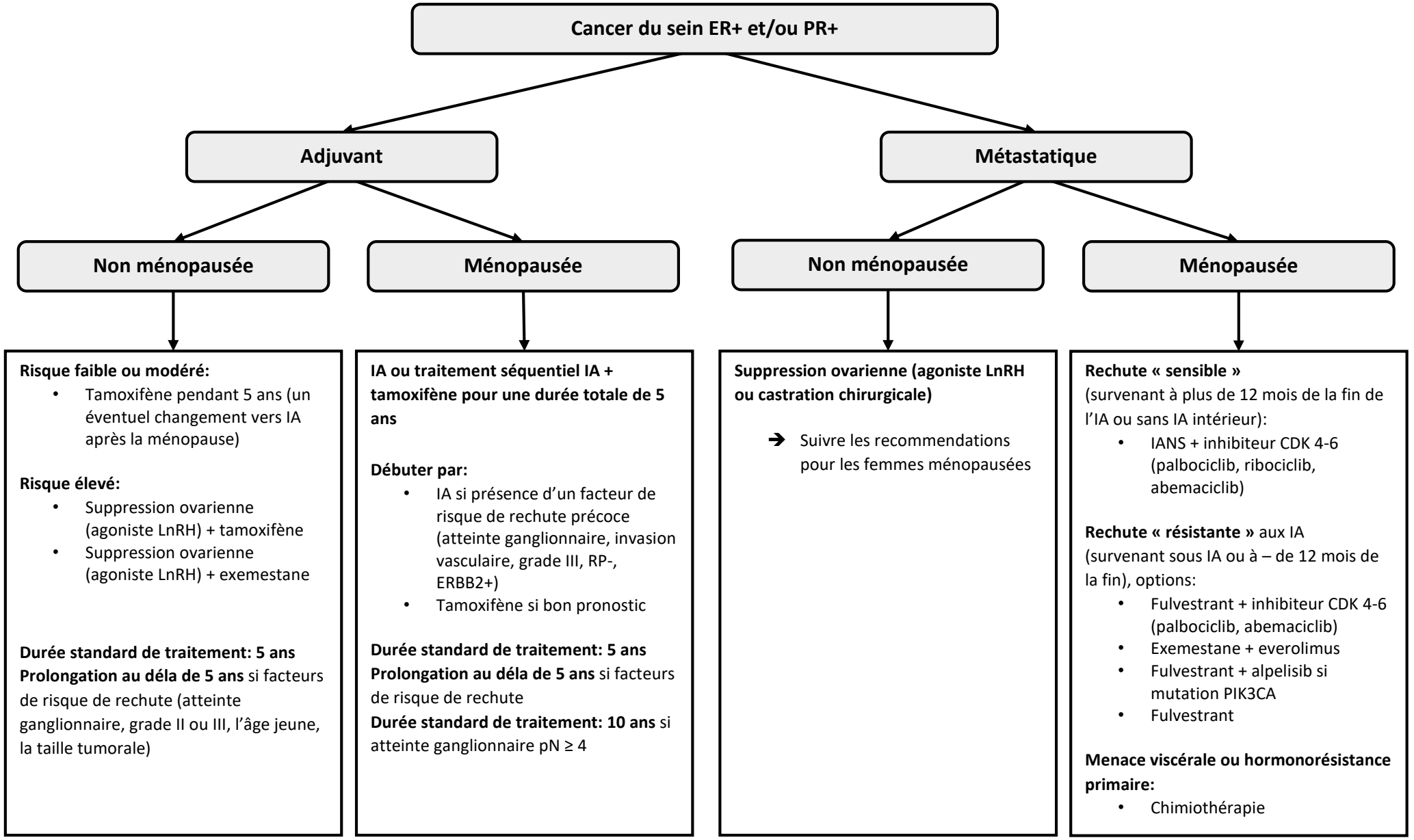


Figure 2 Stratégies thérapeutiques actuellement recommendées en France pour la prise en charge du cancer du sein ER+ et/ou PR+.

CDK 4-6, kinases 4 et 6 dépendantes des cyclines; IA, inhibiteur de l'aromatase; IANS, inhibiteur de l'aromatase non-steroïdien; LnRH, hormone de libération de la lutéinostimuline; PIK3Ca, unité α de la phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate kinase.

3 Généralités sur le tamoxifène

3.1 Propriétés physico-chimiques

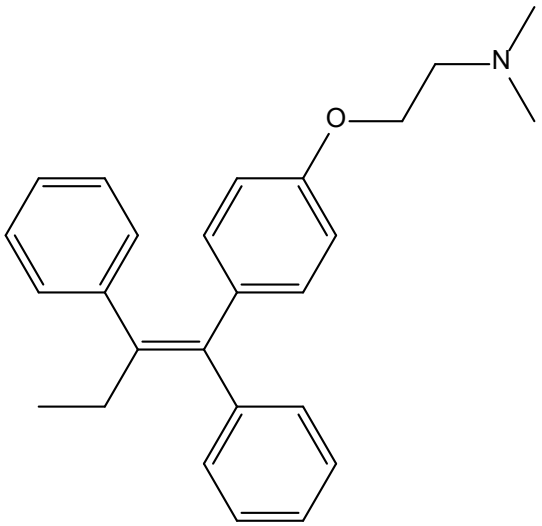


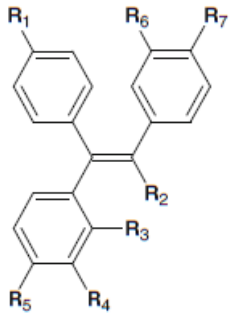
Figure 3 Structure chimique du tamoxifène.

Le (Z)-tamoxifène (trans-1-(4-beta-dimethylaminoethoxyphenyl)-1,2-diphenylbut-1-en) est caractérisé par la formule chimique $C_{26}H_{29}NO$ et une masse molaire de 371.5 g/mol. Sa structure chimique est présentée sur la Figure 3. Le tamoxifène est une poudre blanche pratiquement insoluble en milieu aqueux et soluble dans du méthanol, éthanol et 2-propanol. Il présente un log P de 7.1. Le tamoxifène est commercialisé sous forme de sel de citrate sous le nom Nolvadex® par les laboratoires Astra Zeneca (le médicament princeps). Le citrate de tamoxifène ($C_{26}H_{29}NO,C_6H_8O_7$ – masse molaire = 563.64 g/mol) est une poudre cristalline blanche qui se caractérise par un pKa de 8.85. Il est légèrement soluble en milieu aqueux et soluble dans de l'acétone, du méthanol et de l'éthanol. Selon la classification BCS, le citrate de tamoxifène est un composé de classe II avec une bonne perméabilité et faible solubilité en milieu aqueux. La solution de citrate de tamoxifène est sensible à la lumière UV. Les produits de la photolyse sont les isomères (E) du tamoxifène et des métabolites. Le tamoxifène est administré par voie orale à une dose recommandée de 20 mg/jour.

3.2 Propriétés pharmacodynamiques

Le tamoxifène est un faible antiestrogénique et son activité antitumorale dépend de sa métabolisation en métabolites actifs. Plus de 20 métabolites du tamoxifène ont été identifiés dont certains présentent une activité agoniste et/ou antagoniste envers les récepteurs aux estrogènes et d'autres sont inactifs [21–23]. Le Tableau 1 présente les structures chimiques du tamoxifène et de ses métabolites majeurs de phase I.

Tableau 1 Structures chimiques du tamoxifène et ses métabolites majeurs de phase I. D'après Teunissen *et al.* [24].



Composé	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	Formule chimique	Masse molaire
Tamoxifène	O-CH_2-CH_2-N(CH_3)$_2$	CH_2-CH_3	H	H	H	H	H	$C_{26}H_{29}NO$	371.5
N-desmethyltamoxifène	O-CH_2-CH_2-NH-CH_3	CH_2-CH_3	H	H	H	H	H	$C_{25}H_{27}NO$	357.5
N,*N*-didesmethyltamoxifène	O-CH_2-CH_2-NH_2	CH_2-CH_3	H	H	H	H	H	$C_{24}H_{25}NO$	343.5
4-hydroxytamoxifène	O-CH_2-CH2-N(CH_3)$_2$	CH_2-CH_3	H	H	OH	H	H	$C_{26}H_{29}NO_2$	387.5
4'-hydroxytamoxifène	O-CH_2-CH2-N(CH_3)$_2$	CH_2-CH_3	H	H	H	H	OH	$C_{26}H_{29}NO_2$	387.5
N-desmethyl-4-hydroxytamoxifène (endoxifène)	O-CH_2-CH_2-NH-CH_3	CH_2-CH_3	H	H	OH	H	H	$C_{25}H_{27}NO_2$	373.5
N-desmethyl-4'-hydroxytamoxifène (Z'-endoxifène)	O-CH_2-CH_2-NH-CH_3	CH_2-CH_3	H	H	H	H	OH	$C_{25}H_{27}NO_2$	373.5
N,*N*-didesmethyl-4-hydroxytamoxifène (norendoxifène)	O-CH_2-CH_2-NH_2	CH_2-CH_3	H	H	OH	H	H	$C_{24}H_{25}NO_2$	359.5
α-hydroxytamoxifène	O-CH_2-CH_2-N(CH_3)$_2$	CH(OH)-CH_3	H	H	H	H	H	$C_{26}H_{29}NO_2$	387.5
3-hydroxytamoxifène	O-CH_2-CH_2-N(CH_3)$_2$	CH_2-CH_3	H	OH	H	H	H	$C_{26}H_{29}NO_2$	387.5
N-oxyde tamoxifène	O-CH_2-CH_2-NO(CH_3)$_2$	CH_2-CH_3	H	H	H	H	H	$C_{26}H_{29}NO_2$	387.5

Tableau 2 Caractéristiques pharmacologiques des métabolites majeurs du tamoxifène [25].

Composé	C_{ss} (nmol/L)[a]	Activité anti-ER	Affinité envers les ER[b]
Tamoxifène	428.3 ± 157.3	+	+ (2%)
N-desmethyltamoxifène	762.8 ± 297.5	+	+ (1%)
N,*N*-didesmethyltamoxifène	98.0 ± 42.1	+	Faible
4-hydroxytamoxifène	5.81 ± 2.17	+++	+++
4'-hydroxytamoxifène	9.12 ± 3.53	+	---
Endoxifène	29.1 ± 14.4	+++	+++
Z'-endoxifène	21.3 ± 8.0	+	---
α-hydroxytamoxifène	1.03 ± 0.59	-	-
3-hydroxytamoxifène	0.72 ± 0.33	+	---
N-oxyde tamoxifène	31.2 ± 16.1	+	+

+ faible, +++ forte, - absente, --- inconnue

[a] concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre chez les patientes traitées par une dose de 20 mg/jour, d'après Murdter *et al.* [23], moyenne ± écart type

[b] estradiol = 100%

Le *N*-desmethyltamoxifène est le métabolite majeur dans le plasma humain mais son activité antiestrogénique est comparable à celle de la molécule mère [22,26] (Tableau 2). Le 4-hydroxytamoxifène et le 4-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifène (endoxifène) ont une affinité environ 100 fois plus importante envers les récepteurs aux estrogènes et une activité antiestrogénique environ 30 à 100 fois plus importante que la molécule mère [21,27,28]. En revanche, les concentrations plasmatiques de 4-hydroxytamoxifène sont 5 à 10 fois plus faibles que celles de l'endoxifène [29]. De ce fait, il est suggéré que l'endoxifène est le métabolite majeur responsable de l'effet antitumoral du tamoxifène.

L'endoxifène et le 4-hydroxytamoxifène sont des métabolites à l'activité SERM [28]. Dans les études *in vitro* sur les lignées cellulaires MCF-7, l'endoxifène inhibe l'activité transcriptomique des récepteurs aux estrogènes et la prolifération cellulaire induite par l'estrogène de manière dose-dépendante [30]. Son activité antitumorale est également expliquée en partie par la dégradation des récepteurs aux estrogènes par le protéasome dans les cellules cancéreuses du sein [30]. L'endoxifène et le 4-hydroxytamoxifène inhibent les récepteurs aux estrogènes avec les valeurs d'IC_{50} de 3 et 7 nmol/L respectivement [23].

Dans les études *in vivo,* l'endoxifène a montré une inhibition dose-dépendante de la croissance tumorale chez la souris xénogreffée avec les cellules MCF-7. Les simulations avec un modèle PK/PD chez la souris xénogreffée MCF-7 ont démontré que la concentration d'endoxifène de 53 nmol/L entraîne une inhibition complète de la croissance tumorale [31].

Les métabolites 4′-hydroxytamoxifène, Z'-endoxifène, 3-hydroxytamoxifène et 3-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifène ont montré une très faible activité antiestrogénique *in vitro* et leurs IC_{50} n'ont pas été atteints même pour des concentrations beaucoup plus fortes que celles observées dans le plasma des patientes [23]. L'activité antiestrogénique de *N*-oxyde tamoxifène est comparable à celle du tamoxifène [32]. Les isomères (E) de métabolites 4-hydroxylés sont des faibles agonistes des ER avec < 1% de l'affinité de leurs respectifs isomères (Z) [21].

Le tamoxifène et ses métabolites exercent des effets pharmacologiques multiples qui pourraient tous contribuer à son efficacité contre le cancer du sein. *In vitro*, le norendoxifène, l'endoxifène et le *N*-desmethyltamoxifène inhibent l'activité de l'aromatase avec des IC_{50} de 0.03, 6.1 et 20.7 μmol/L, respectivement [33]. Ainsi, le norendoxifène est un fort inhibiteur de l'aromatase et pourrait contribuer à l'efficacité antitumorale du tamoxifène. Des mécanismes d'action alternatifs ont également été proposés pour le tamoxifène et comprennent notamment la fixation sur les sites à l'activité antiestrogénique différents des récepteurs aux estrogènes [34], l'induction de facteur de croissance transformant TGF-β [35], l'inhibition de calmoduline [36] et de la protéine kinase C [37–39].

Les effets agonistes du tamoxifène et de l'endoxifène ont été observés chez le rat ovariectomisé où les deux molécules stimulaient la prolifération cellulaire estrogéno-dépendante entraînant un cancer de l'endomètre [40]. *In vitro*, le tamoxifène bisphenol et le métabolite E stimulent la prolifération estrogéno-dépendante des cellules tumorales du cancer du sein [41,42]. Ces métabolites ont été retrouvés dans les tissus cancéreux des patientes présentant une résistance au tamoxifène [43].

3.3 Efficacité clinique

En France, le tamoxifène est actuellement indiqué dans:

- le traitement préventif des récidives du carcinome mammaire (traitement adjuvant)

- le traitement des formes évoluées du carcinome mammaire avec progression locale et/ou métastatique.

Le tamoxifène est un « gold standard » dans le traitement adjuvant des cancers du sein ER+ et/ou PR+ chez la femme pré-ménopausée avec un risque de rechute faible ou modéré. Bien que les inhibiteurs de l'aromatase soient devenus le traitement adjuvant en première ligne chez les femmes ménopausées, le tamoxifène reste toujours une option thérapeutique chez les patientes à faible risque. Enfin, le tamoxifène peut également être utilisé en prévention du cancer du sein chez les femmes à haut risque.

3.3.1 Cancer du sein métastatique

Le tamoxifène a montré une bonne efficacité clinique dans le traitement en première ligne du cancer du sein ER+ et/ou PR+ au stade métastatique avec un taux de réponse globale de 30 à 35% [44]. De plus, il présente un profil de toxicité plus favorable que l'aminoglutéthimide et mégestrol (un progestatif avec l'activité antiestrogénique) [45,46]. Néanmoins, les études de phase 3 randomisées en double aveugle comparant l'efficacité du tamoxifène à l'anastrozole, le létrozole et l'exemestane ont mis en évidence la supériorité des inhibiteurs de l'aromatase et un profil de toxicité plus favorable en termes d'accidents thromboemboliques [47–49]. De ce fait, d'après les nouvelles recommandations, le traitement en première ligne chez les femmes ménopausées atteintes d'un cancer du sein ER+ au stade métastatique consiste en un inhibiteur de l'aromatase non-stéroïdien avec une association à un inhibiteur CDK 4-6 [19].

3.3.2 Cancer du sein au stade précoce

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) a effectué en 1985, 1990, 1998 et 2011 des méta-analyses des études cliniques évaluant la thérapie adjuvante dans le cancer du sein.
La méta-analyse de 55 études cliniques (n = 37 000 patientes) publiée en 1998 a mis en évidence un impact significatif de la durée du traitement par tamoxifène sur la réponse clinique chez les patientes avec des tumeurs ER+ ou avec un statut ER inconnu [50]. Après un suivi médian de 10 ans, la thérapie par tamoxifène pendant un an, deux ans et cinq ans a permis une réduction des rechutes (définie comme la première réapparition du cancer du sein sur le site local, controlatéral ou à distance) de 21%, 29% et 47% respectivement, et une réduction de la mortalité de 12%, 17% et 26% respectivement par rapport

au placebo. Parmi les patientes avec les tumeurs ER- et PR-, le bénéfice du tamoxifène n'a pas été clairement démontré. Par ailleurs, les patientes avec un envahissement ganglionnaire ont montré un meilleur bénéfice absolu de 5 ans de tamoxifène que les patientes sans envahissement ganglionnaire (10.9% versus 5.6% respectivement, $p < 0.00001$). Le bénéfice de tamoxifène était similaire indifféremment de l'âge, du statut ménopausal, de la dose quotidienne (la majorité des patientes étaient traitées par une dose de 20 mg/jour) ou du traitement concomitant par une chimiothérapie.

La mise à jour de l'EBCTCG basée sur un ensemble de 20 études randomisées a été publiée en 2011 et a confirmé les résultats précédents après un suivi médian de 15 ans [51]. Il a été conclu que le traitement de 5 ans par le tamoxifène réduisait significativement le risque de rechute et de mort à 15 ans.

3.3.2.1 Durée de thérapie

Les résultats rapportés par EBCTCG en 1998 préconisaient une durée de thérapie de 5 ans. Cependant, étant donné que les patientes atteintes d'un cancer du sein présentent un risque de rechute même plusieurs années après le diagnostic de la maladie, des études évaluant le bénéfice d'une prolongation de la thérapie par tamoxifène ont été effectuées.

Dans l'essai ATLAS (Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter), les patientes ayant terminé 5 ans de tamoxifène ont été randomisées pour continuer le tamoxifène pendant 5 années supplémentaires ou arrêter le traitement à 5 ans [52]. Parmi les patientes avec les tumeurs ER+, l'allongement du traitement par tamoxifène jusqu'à 10 ans a significativement réduit le risque de rechute (18% versus 20.8% de patientes ont rechuté dans le bras continuation versus le bras contrôle, $p = 0.002$), la mortalité liée au cancer du sein (9.6% versus 11.6%, $p = 0.01$) et la mortalité générale (18.6% versus 21.1%, $p = 0.01$). La mortalité liée au cancer du sein a été réduite de 13% chez les patientes qui continuaient la thérapie jusqu'à 10 ans (HR = 0.87, CI95% = 0.78 – 0.97). L'étude ATLAS a ainsi démontré la supériorité de 10 ans de traitement adjuvant par le tamoxifène par rapport au traitement de 5 ans.

En revanche, des résultats contradictoires ont été rapportés dans l'étude NSABP B-14. Au cours de cet essai, les patientes qui ont été randomisées pour recevoir 5 ans de tamoxifène ou placebo et qui n'avaient pas eu de récidive après 5 ans, ont été randomisées à nouveau pour 5 ans supplémentaires de tamoxifène ou placebo [53]. Après 7 ans de suivi médian suivant la re-randomisation, un léger bénéfice a été observé

chez les patientes ayant arrêté la thérapie par tamoxifène versus les patientes qui l'ont continuée (la survie sans maladie était de 82% et 78% respectivement, p = 0.03 et la survie globale était de 94% et 91% respectivement, p = 0.07). Ainsi, cette étude a montré l'absence de bénéfice du traitement de 10 ans par le tamoxifène par rapport à 5 ans.

En cohérence avec ces résultats, une étude écossaise comparant 5 ans de tamoxifène à une durée indéfinie a rapporté après un suivi médian de 15 ans une supériorité de traitement de 5 ans par rapport au traitement à durée indéfinie [54]. A ce jour, la durée recommandée de traitement par tamoxifène est de 5 ans mais une prolongation au-delà peut être envisagée en fonction de la présence de facteurs de risque de rechute.

3.3.3 Prévention du cancer du sein chez les femmes à haut risque

L'étude NSABP P-1 est une étude randomisée en double aveugle contrôlée contre placebo. Son objectif était d'évaluer l'efficacité de 5 ans de tamoxifène dans la diminution de l'incidence de cancer du sein invasif chez les femmes avec un risque supérieur à 1.67% de développer un cancer du sein à 5 ans [55]. Après un suivi médian de 4.2 ans, l'incidence du cancer du sein invasif a été réduite de 44% chez les femmes traitées par tamoxifène (RR = 0.56, CI95% = 0.43 – 0.72).

Une méta-analyse de quatre études cliniques évaluant l'efficacité du tamoxifène dans la prévention primaire du cancer du sein chez les femmes à haut risque a mis en évidence une réduction de 38% de l'incidence du cancer du sein (CI95% = 28 – 46%, p < 0.0001) [56].

En 1998, le tamoxifène a été approuvé par la FDA dans le traitement préventif de cancer du sein chez les femmes à haut risque.

3.4 Effets bénéfiques

Au cours des essais cliniques, des effets bénéfiques sur le profil lipidique et la densité minérale osseuse ont été observés. Ces effets sont attribués à l'activité agoniste du tamoxifène sur les ER.

Dans une méta-analyse de 12 études comparant le tamoxifène au placebo, une réduction de risque cardiovasculaire a été notée dans le groupe tamoxifène (RR = 0.62, CI95% = 0.41 – 0.93) [57]. De plus, il a été démontré qu'au bout de 5 ans de traitement, la densité minérale osseuse au niveau du rachis

lombaire était préservée chez les patientes ménopausées [58]. Cela pourrait expliquer la moindre fréquence des fractures osseuses dans le bras tamoxifène par rapport au placebo observée au cours des études cliniques en prévention du cancer du sein [55].

3.5 Effets indésirables

3.5.1 Profil de toxicité

Dans les essais cliniques de phase 3, le tamoxifène a montré un profil de toxicité généralement tolérable. Cependant, environ 11% des patientes ont arrêté le traitement du fait de la survenue des toxicités. Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés étaient: bouffées de chaleur (37.4%), hypercholestérolémie (24.6%), sueurs nocturnes (17%), arthralgie (13.5%), hémorragies vaginales (8.3%), nausées (9.4%), myalgie (6.1%), fractures des os (5.8%), accidents cardiovasculaires (5%), accidents thromboemboliques (3.8%) et vomissements (3.1%) [59]. La majorité de ces effets indésirables sont de grades 1 à 2 tandis que les toxicités de grade >3 les plus fréquentes étaient les événements thromboemboliques (2.0%), les accidents cérébraux-vasculaires (1.4%) et les accidents cardiaques (1.4%). De plus, au cours de l'étude NSABP P-1, le traitement par tamoxifène a été associé à une augmentation de risque de cataracte par rapport au placebo (RR = 1.14, CI95% = 1.01 – 1.29) [55].

Une grande partie des effets indésirables du tamoxifène est attribuée à ses effets antiestrogéniques qui induisent une ménopause artificielle (bouffées de chaleur, transpiration nocturne, sécheresse du vagin, symptômes dépressifs, libido réduite, insomnies, prise de poids). De plus, l'activité agoniste envers les récepteurs aux estrogènes est à l'origine de l'augmentation de risque du cancer de l'endomètre et des événements thromboemboliques [60].

En pratique clinique courante, la survenue des effets indésirables est un problème majeur de la thérapie adjuvante par le tamoxifène. La majorité des patientes rapportent des effets indésirables dont les bouffées de chaleur sont les toxicités les plus fréquentes et concernent 70 à 80% des patientes [61–64]. Ainsi, la survenue des toxicités est une raison importante de la mauvaise adhérence et de la non-persistance au traitement [65,66].

3.5.2 Cancer de l'endomètre

L'activité estrogénique du tamoxifène est à l'origine de la prolifération endométriale bénigne et maligne pouvant entraîner une hyperplasie endométriale, des polypes, des cancers de l'endomètre et des sarcomes utérins. Plusieurs études ont observé l'augmentation de l'incidence du cancer de l'endomètre chez les patientes sous tamoxifène [55,67]. Une méta-analyse des essais adjuvants rapportée par l'EBCTCG a montré que l'incidence du cancer de l'endomètre était approximativement doublée chez les patientes traitées par tamoxifène pendant 1 ou 2 ans et quadruplée chez les patientes traitées pendant 5 ans [50]. De plus, une méta-analyse des essais cliniques de prévention primaire par 5 ans de tamoxifène a démontré une augmentation de 2.4 fois de risque de développement de cancer de l'endomètre (CI95% = 1.5 – 4.0, p = 0.0005) [56]. Cependant, l'apparition des cancers de l'endomètre reste un évènement rare et est surtout observé chez les patientes de plus de 50 ans [55]. Chez les patientes sous tamoxifène, un examen gynécologique annuel est recommandé.

3.5.3 Événements thromboemboliques veineux

Le traitement à long terme par tamoxifène est associé à une augmentation du risque des événements thromboemboliques veineux (ETEV) tels que la thrombose veineuse profonde, l'embolie pulmonaire ou l'accident vasculaire cérébral [50,68,69]. Au cours des études cliniques de phase 3, les ETEV ont été observés chez 3.9% des patientes traitées par le tamoxifène dont 2.3% correspondaient aux grades 3 à 5 [70]. Dans une méta-analyse des essais cliniques de prévention primaire par tamoxifène, parmi 28 406 femmes, 118 ETEV graves ont été observés dans le groupe tamoxifène versus 62 ETEV dans le groupe placebo (RR = 1.9, CI95% = 1.04 – 2.06) [56]. Une embolie pulmonaire fatale est survenue chez 6 femmes contre 2 dans les groupes tamoxifène et placebo respectivement. Une autre étude évaluant les facteurs de risque des ETEV parmi les patientes sous tamoxifène a rapporté que les patientes traitées par doses supérieures ou égales à 40 mg/jour avaient un risque plus important d'avoir un ETEV que les patientes traitées par doses inférieures à 40 mg/jour [69]. Les troubles thromboemboliques sont réversibles à l'arrêt du traitement. L'étude clinique IBIS-I (International Breast Cancer Intervention Study) comparant 5 ans de traitement préventif par tamoxifène à placebo, a démontré que bien que le risque d'un ETEV fût plus

important dans le groupe tamoxifène versus placebo pendant le traitement (RR = 2.26, CI95% = 1.36 – 3.87), après la fin de traitement, il était similaire entre les deux bras (RR = 1.14, CI95% = 0.52 – 2.53) [60]. En règle générale, les troubles thromboemboliques peuvent être gérés avec les anticoagulants [68].

3.6 Adhérence au traitement

La thérapie par tamoxifène est une thérapie longue associée à de multiples effets indésirables. De ce fait, de nombreuses patientes arrêtent volontairement le traitement ou ne respectent pas le schéma d'administration définit comme l'adhérence (la prise d'au moins 80% de traitement prescrit) [71,72]. Hershman *et al.* ont rapporté que seulement 50% des patientes qui ont reçu la prescription de 5 ans de tamoxifène ont été adhérentes au schéma d'administration et la durée de thérapie [73]. Chez 20 à 50% des patientes la non-persistance (arrêt volontaire de traitement) se manifeste déjà après un an de traitement [73–76]. McCowan *et al.* ont souligné que l'adhérence moyenne au bout d'un an de thérapie de tamoxifène était de 93% [77]. Ce pourcentage augmente avec la durée de la thérapie. Une méta-analyse de 29 études évaluant l'hormonothérapie adjuvante (tamoxifène et inhibiteurs de l'aromatase), a montré qu'après 5 ans de thérapie, 41 à 72% des patientes étaient non-adhérentes et 31 à 73% des patientes avaient volontairement arrêté le traitement [78]. Enfin, une étude française récente a mis en évidence que seulement la moitié des patientes avec les concentrations plasmatiques de tamoxifène faibles ou non-détectables avait rapporté la non-adhérence [79]. La non-adhérence et la non-persistance constituent donc un problème sous-estimé et sous-rapporté alors que leurs conséquences sur l'efficacité du traitement ne sont pas négligeables. En effet, deux études ont montré que les patientes non-adhérentes présentaient une moins bonne réponse thérapeutique [77,80]. De ce fait, l'évaluation des facteurs de risque et l'éducation thérapeutique des patientes susceptibles d'être non-adhérentes est nécessaire pour assurer la meilleure prise en charge. Généralement, les facteurs de risque de non-adhérence sont l'âge très jeune ou très âgé, une mastectomie, un stade précoce de la maladie et le suivi par un médecin non-oncologue [73,78,81].

3.7 Propriétés pharmacocinétiques

3.7.1 Absorption

Après administration par voie orale, le tamoxifène est rapidement absorbé par le tube digestif avec un temps pour atteindre la concentration maximale (T_{max}) d'environ 3 heures [82–84]. Après administration d'une dose unique de 10 mg, l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps de 0 à l'infini ($AUC_{0\text{-}inf}$) moyenne est de 577 ± 97 ng/mL.h tandis qu'après administration répétée pendant 21 jours, l'$AUC_{0\text{-}12}$ moyenne est de 1597 ± 205 ng/mL.h [82]. L'état d'équilibre pharmacocinétique est atteint après environ 4 semaines de traitement. A l'état d'équilibre, le tamoxifène et son métabolite *N*-desmethyltamoxifène montrent une cinétique linéaire dans l'intervalle des doses 1 – 20 mg/jour [85]. De plus, une étude d'escalade de dose a montré que les concentrations de l'endoxifène augmentent proportionnellement à la dose administrée dans l'intervalle de doses 20 – 40 mg/jour [86]. Pour la dose recommandée de 20 mg/jour, la médiane de l'$AUC_{0\text{-}24}$ à l'état d'équilibre est de 6303 nmol/L.h (intervalle: 2402 – 17775) pour le tamoxifène, 11682 (5084 – 36041) pour le *N*-desmethyltamoxifène et de 424 nmol/L.h (146 – 1220) pour l'endoxifène [87]. Une forte variabilité interindividuelle de l'exposition au tamoxifène et ses métabolites est observée avec l'$AUC_{0\text{-}24}$ variant d'environ 7 et 8 fois pour le tamoxifène et l'endoxifène, respectivement, et les C_{trough} d'endoxifène variant de 10 à 20 fois [87,88] entre les patientes. L'exposition plasmatique au *N*-desmethyltamoxifène à l'état d'équilibre est en moyenne 1.6, 10.8 et 73.4 fois plus importante que celle du tamoxifène, endoxifène et 4-hydroxytamoxifène, respectivement, tandis que les concentrations plasmatiques de l'endoxifène sont en moyenne 6.8 fois plus élevées que celles du 4-hydroxytamoxifène [23,89].

En l'absence de données sur l'administration du tamoxifène par voie intraveineuse, sa biodisponibilité absolue est inconnue. Cependant, Dickschen *et al.* ont estimé à l'aide d'un modèle pharmacocinétique-physiologique (PBPK) que l'absorption orale du tamoxifène était de 97% et son premier passage hépatique de 3%, donnant une biodisponibilité de 94% [90].

La biodisponibilité relative a été évaluée dans plusieurs études. La vitesse et l'intensité de l'absorption suivant l'administration des comprimés et la solution aqueuse était similaire [91]. La biodisponibilité

relative de deux formulations différentes de tamoxifène: Tamoplex® et Nolvadex® 10 mg à l'état d'équilibre était similaire [92].

Finalement, l'administration du tamoxifène 20 mg une fois par jour est équivalente à l'administration de 10 mg deux fois par jour [93]. Étant donné qu'un schéma d'administration consistant en une seule prise par jour permet une meilleure adhérence au traitement, la prise de 20 mg en une seule prise par jour a été retenue.

3.7.2 Distribution

Dans une analyse de pharmacocinétique de population, le volume de distribution apparent (V/*F*) de tamoxifène a été estimé à 562 L [94]. Ainsi, le tamoxifène et ses métabolites sont extensivement distribués dans le corps et leurs concentrations ont été retrouvées dans divers tissus (foie, poumon, pancréas, ovaires, tissu mammaire, uterus) [37,85,95]. La fixation aux protéines plasmatiques du tamoxifène et ses métabolites (*N*-desmethyltamoxifène et *N*,*N*-didesmethyltamoxifène) est de 98%, principalement à l'albumine [96].

La P-glycoprotéine (P-gp, « *multidrug resistance 1* », MDR1, « *ATP-binding cassette B1* », ABCB1) est une pompe d'efflux appartenant à la superfamille des transporteurs de type ATP-binding cassette (ABC). La P-gp est responsable du transport membranaire de divers molécules y compris des xénobiotiques et des substances endogènes. Sa fonction dans les cellules du foie, du rein, de l'intestin grêle et dans la barrière hémato-encéphalique et placentaire consiste à limiter le transport membranaire des xénobiotiques et augmenter leur élimination. En revanche, l'expression de la P-gp dans les cellules tumorales peut limiter les concentrations intracellulaires de médicaments anti-cancéreux substrats de la P-gp et ainsi provoquer la résistance tumorale.

Dans les études *in vitro* et *in vivo* chez la souris *Abcb1a/1b*(–/–), le tamoxifène, *N*-desmethyl- et 4-hydroxytamoxifène n'ont pas été substrats de la P-gp [97–101]. Néanmoins, la pénétration cérébrale de *N*-desmethyl- et 4-hydroxytamoxifène a été modestement augmentée (environ 2 fois) en absence de la P-gp. En revanche, l'accumulation cérébrale de l'endoxifène a augmenté d'environ 20 fois en absence de la P-gp [101,102]. Ceci suggère que l'endoxifène est un substrat de la P-gp. De ce fait, l'accumulation d'endoxifène dans les cellules cancéreuses peut être limitée par la P-gp et ceci peut être un facteur

important dans la survenue de la résistance tumorale au tamoxifène [101,102]. L'impact de la protéine BCRP (« *breast cancer resistance protein* », ABCG2) sur la pharmacocinétique du tamoxifène ou ses métabolites n'a pas été démontré [101].

3.7.3 Métabolisation

Le tamoxifène est extensivement métabolisé au niveau de foie par les cytochromes de la famille P450 (CYP), notamment le CYP2D6, CYP3A4/5, CYP2B6, CYP2C19 et CYP2C9 [22,29]. Plus de 20 métabolites primaires et secondaires du tamoxifène ont été identifiées [23]. Les voies de métabolisation du tamoxifène sont représentées sur la Figure 4.

La voie majeure de la métabolisation du tamoxifène est la *N*-deméthylation catalysée par le CYP3A4/5 résultant en formation de *N*-desmethyltamoxifène. Le 4-hydroxytamoxifène est formé par le CYP2D6 avec une implication mineure d'autres enzymes (CYP3A4/5, CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19) [22,103,104]. Ces deux voies de métabolisation correspondent au 92% et 7%, respectivement, de la métabolisation primaire du tamoxifène [22]. D'autres métabolites primaires mineurs comprennent α-, 3- et 4'-hydroxytamoxifène et *N*-oxyde tamoxifène [22,105]. La formation de α- et 3-hydroxytamoxifène est catalysée par le CYP3A4 tandis que la formation de 4'-hydroxytamoxifène est catalysée par le CYP2B6 et CYP2D6. La réaction de *N*-oxydation de tamoxifène en *N*-oxyde tamoxifène est catalysée par flavine mono-oxygénase 1 (FMO1) et 3 (FMO3) [106]. Selon une étude, le *N*-oxyde tamoxifène peut être ensuite réduit en tamoxifène par le CYP2A6, CYP1A1 et CYP3A4.

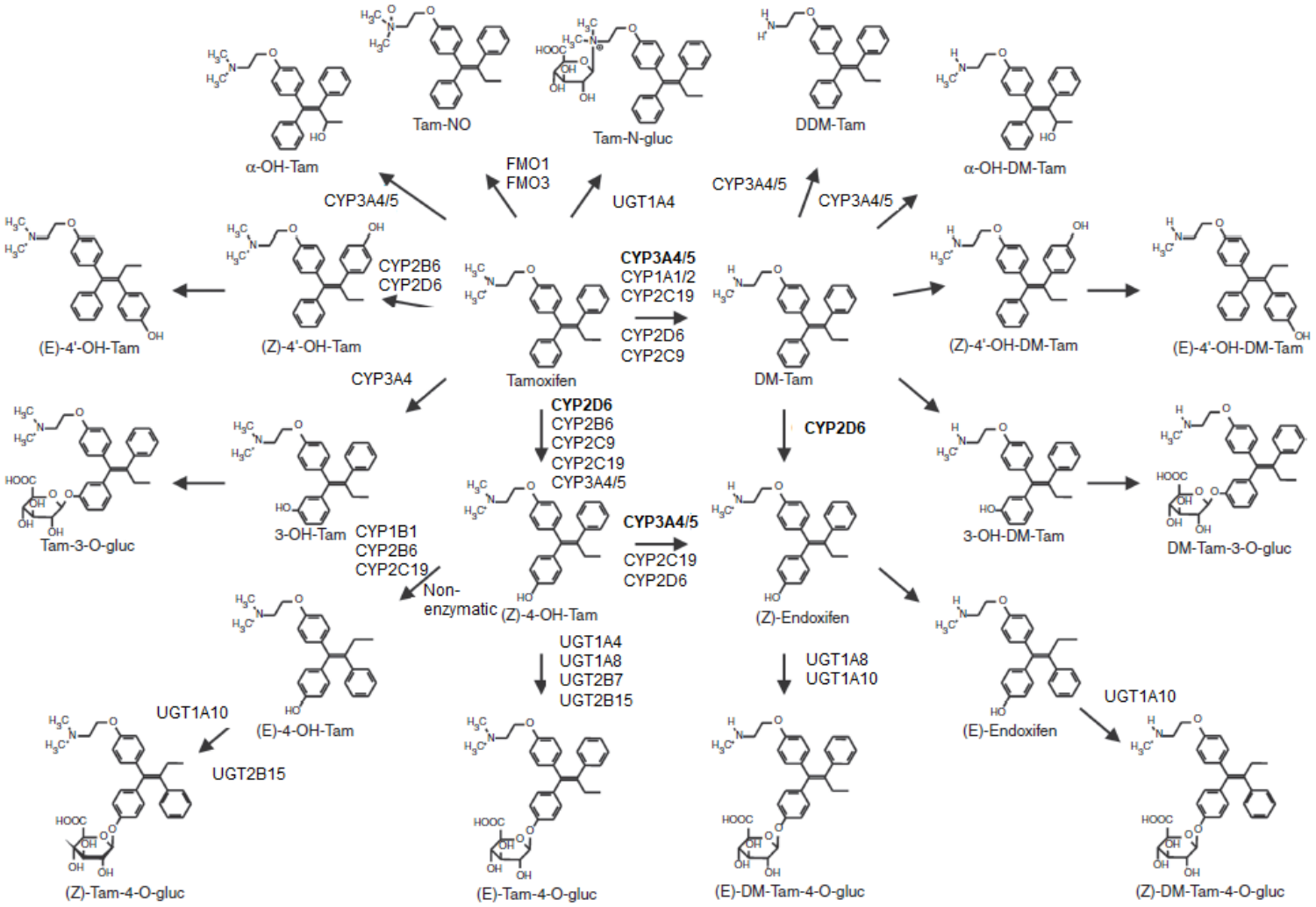


Figure 4 Schéma de la métabolisation du tamoxifène d'après Murdter *et al.* [23].

Le métabolisme secondaire du tamoxifène comprend notamment la conversion de *N*-desmethyltamoxifène en α-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifène, *N,N*-didesmethyltamoxifène et endoxifène. Ces voies de métabolisation sont majoritairement catalysées par le CYP3A4/5 sauf pour l'endoxifène, qui est entièrement formé par le CYP2D6. Le métabolisme secondaire du 4-hydroxytamoxifène comprend la formation d'endoxifène par le CYP3A4. De ce fait, 30% d'endoxifène serait formé à partir du 4-hydroxytamoxifène et 70% à partir de *N*-desmethyltamoxifène. Le norendoxifène peut être produit par deméthylation de l'endoxifène et par hydroxylation de *N*,*N*-didesmethyltamoxifène [107].

Les métabolites du tamoxifène subissent les réactions de phase II dans lesquelles ils sont conjugués par les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) à l'acide glucuronique et par les sulfotransferases (SULT) à l'acide sulfuronique [105]. Les composées conjugés sont généralement plus hydrophiles et peuvent être éliminés dans la bile ou dans les urines.

Le SULT1A1 catalyse la formation de sulfate de 4-hydroxytamoxifène, sulfate d'endoxifène et des métabolites sulfonés de *N*-desmethyltamoxifène [108]. Les réactions de glucuronidation sont catalysées par UGT1A4 (tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène), UGT1A8 et UGT2B7 (4-hydroxytamoxifène et endoxifène), UGT2B15 et UGT2B17 (4-hydroxytamoxifène) [108–110].

3.7.4 Elimination

Après administration d'une dose unique de 20 mg ^{14}C-tamoxifène (40 µCi/mg) à deux patientes avec un cancer du sein, 26% et 51% du matériel radiomarqué a été retrouvé dans les fèces tandis que 9% et 14% ont été retrouvés dans les urines principalement sous forme des conjugués [111]. L'excrétion biliaire est donc la principale route d'élimination du tamoxifène. La quantité de tamoxifène inchangé retrouvé dans les urines était négligeable montrant que son excrétion urinaire est très faible.

Le tamoxifène suit une cinétique biphasique avec un temps de demi-vie de distribution ($t_{1/2\alpha}$) de 7 à 14 heures et un temps de demi-vie terminale ($t_{1/2\beta}$) de 5 à 7 jours [84,111]. La circulation enterohépatique peut être à l'origine de temps de demi-vie d'élimination prolongé [85,111,112]. L'analyse de pharmacocinétique de population a estimé la CL/*F* du tamoxifène à 6.6 L/h [94].

Après l'arrêt du traitement, l'élimination des métabolites (*N*-desmethyltamoxifène, 4-hydroxytamoxifène, endoxifène, *N*,*N*-didesmethyltamoxifène) suit une cinétique d'ordre 1 et leurs temps de demi-vie se rapprochent de celui de la molécule mère [82]. Par ailleurs, le temps de demi-vie de l'endoxifène après administration directe par voie orale était de 264 h tandis que celui après administration du tamoxifène était de 1051 h ce qui confirme la cinétique formation-dépendante de l'endoxifène [113]. Les concentrations plasmatiques de *N*-desmethyl-, 4-hydroxytamoxifène et l'endoxifène ont été plus fortes à 4 mois après le début de traitement par rapport à 1 mois suggérant que l'état d'équilibre pour ces métabolites serait atteint après seulement 4 mois de traitement [89].

3.8 Facteurs influençant la pharmacocinétique du tamoxifène

3.8.1 Alimentation

La nourriture n'a pas d'impact sur C_{max} et AUC de la solution orale du tamoxifène. En conséquence, la prise du tamoxifène peut se faire avec ou sans le repas.

3.8.2 Ethnie

Deux études différentes ont montré que les concentrations plasmatiques d'endoxifène étaient similaires entre les populations caucasiennes, asiatiques, africaines et moyennes orientales après avoir corrigé pour le génotype CYP2D6 [88,114].

3.8.3 Facteurs démographiques

Des résultats discordants concernant l'effet de l'âge sur la pharmacocinétique du tamoxifène ont été rapportés. Dans une étude incluant 316 patientes, des concentrations plus fortes de tamoxifène et de ses métabolites ont été observées chez les patientes âgées (> 80 ans) par rapport aux patientes jeunes (< 40 ans) [115]. Lien *et al.* ont confirmé une augmentation des concentrations de tamoxifène, endoxifène et *N*-desmethyltamoxifène avec l'âge dans une population de 151 patientes [116]. En revanche, Marcath *et al.* n'ont observé aucune association entre les concentrations d'endoxifène et l'âge chez 302 patientes [117]. De plus, dans une étude récente réalisée chez 908 patientes, aucune différence significative des

concentrations d'endoxifène entre les patientes de moins de 50 ans et celles de plus de 50 ans n'a été observée [118].

L'impact du poids corporel sur la pharmacocinétique du tamoxifène a également été étudié. En particulier, des concentrations plus faibles de *N*-desmethyltamoxifène chez les patientes avec un IMC supérieur à 30 ont été rapportées dans les travaux de Saladores *et al.* [119]. Deux autres études ont confirmé ces résultats montrant que les concentrations d'endoxifène diminuaient avec l'augmentation du poids corporel [117,120].

3.8.4 Insuffisance hépatique

Le métabolisme hépatique est la voie majeure de l'élimination du tamoxifène. Pourtant, l'impact de l'insuffisance hépatique sur sa pharmacocinétique n'a pas été évalué dans les études cliniques. Deux cas cliniques ont décrit le traitement de patientes avec une insuffisance hépatique par tamoxifène. DeGregorio *et al.* ont noté une augmentation des concentrations du tamoxifène et de ses métabolites chez une patiente avec des métastases hépatiques [121]. Une seconde étude a mis en avant une aggravation de la maladie du foie préexistante après 1 an de traitement par tamoxifène et une augmentation du taux plasmatique de tamoxifène [122]. Ces résultats suggèrent que l'altération de la fonction hépatique peut impacter l'exposition au tamoxifène et ses métabolites.

3.8.5 Insuffisance rénale

L'impact de l'insuffisance rénale sur la pharmacocinétique du tamoxifène n'a pas été étudié dans les études cliniques. Néanmoins, au vu de l'élimination rénale négligeable du tamoxifène, un impact significatif sur sa pharmacocinétique n'est pas attendu. En effet, dans un cas clinique, les concentrations plasmatiques du tamoxifène n'ont pas été augmentées chez une patiente avec insuffisance rénale [123].

3.8.6 Polymorphismes génétiques

3.8.6.1 CYP2D6

Le CYP2D6 est l'enzyme majeure impliquée dans la métabolisation du tamoxifène. Il est impliqué parmi d'autres enzymes dans la conversion de tamoxifène en 4-hydroxytamoxifène et en *N*-

desmethyltamoxifène ainsi que dans la conversion de 4-hydroxytamoxifène en endoxifène. Enfin, il est la seule enzyme impliquée dans la conversion de *N*-desmethyltamoxifène en endoxifène [22]. Une forte variabilité interindividuelle de l'activité enzymatique de CYP2D6 est observée. En effet, plus de 100 variants génétiques du *CYP2D6* ont été décrits dans la littérature dont la fréquence varie en fonction de l'ethnie [124]. Ainsi, l'allèle sauvage **1*, associé à une enzyme fonctionnelle, est l'allèle le plus fréquent dans toutes les ethnies. Les variants génétiques **2* et **35* produisent une protéine fonctionnelle mais leur fréquence est moins importante. Les allèles **9*, **10*, **17*, **41* sont responsables de la protéine avec une activité réduite. Enfin, **3*, **4*, **5*, **6*, **7* et **8* sont les allèles produisant une protéine non-fonctionnelle. La duplication du gène avec les allèles fonctionnels entraîne une augmentation de l'expression et de l'activité enzymatique [125]. L'effet de la duplication du gène avec les allèles à l'activité réduite ou non-fonctionnels sur la protéine est plus complexe à interpréter. Le Tableau 3 présente les variants génétiques du gène *CYP2D6* les plus fréquents avec leur fréquence dans les populations caucasiennes, africaines et asiatiques. Le variant génétique responsable de la protéine non-fonctionnelle le plus fréquent dans la population caucasienne est l'allèle **4* avec une fréquence de 18%. Dans la population asiatique, l'allèle le plus fréquent associé à une diminution de l'activité de la protéine est l'allèle **10* avec une fréquence de 42% tandis que dans la population africaine et afro-américaine, l'allèle **17*, responsable de la protéine avec l'activité réduite, représente environ 19% de la fréquence allélique [126]. Par ailleurs, une prévalence plus importante des phénotypes UM est observée dans la population africaine ce qui est lié à une fréquence plus importante de la duplication du gène.

Tableau 3 Variants génétiques de CYP2D6 [126–128].

Allèle variant	rs ID	Substitution	Conséquence	Fonction de l'enzyme	Fréquence allélique (%)		
					Caucasiens	Africains	Asiatiques
**1*	-	-	-	Normale	52	39	0.34
**2*	rs16947	2850C>T, 4181G>C	Arg296Cys, Ser486Thr	Normale	27	20	0.12
**3*	rs4986774	2549delA	Décalage du cadre de lecture	Non-fonctionnelle	1.7	0.03	0
**4*	rs3892097	1846G>A	Défaut d'épissage	Non-fonctionnelle	18	3.3	0.4
**5*	-	-	Délétion du gène entier	Absente	2.8	6.0	5.8
**6*	rs5030655	1707delT	Décalage du cadre de lecture	Non-fonctionnelle	0.9	0	0.02
**7*	rs5030867	2936A>C	Faux sens: His324Pro	Non-fonctionnelle	0.1	0	0
**9*	rs5030656	c.931-933delAAG	Faux sens: Del Lys281	Diminuée	2.0	0	0
**10*	rs1065852	c.190C>T	Faux sens: Pro34Ser	Diminuée	2.8	6.7	42
**17*	rs28371706	1023C>T, 2850C>T	Faux sens: Thr107Ile, Arg296Cys	Diminuée	0.3	19	0.02
**41*	rs28371725	2988G>A	Intron 6	Diminuée	10.6	10.0	2.2
**1 xN*	-	Amplification du gène	N gènes actifs	Augmentée	0.8	1.4	0.3
**2 xN*	-	Amplification du gène	N gènes actifs	Augmentée	1.3	1.5	0.4
**4 xN*	-	Amplification du gène	N gènes non-fonctionnels	Non-fonctionnelle	0.3	1.5	0

Un classement de génotype *CYP2D6* en phénotype a été proposé afin de prendre en compte les différentes combinaisons des allèles variants et le nombre de copies de gène. Tout d'abord, les allèles sont classés en fonction de leur activité: ultra-rapide (UM) avec un score d'activité > 1 (dépend de nombre de copies de gène), normale (NM) = 1, intermédiaire (IM) = 0.5 et lent (PM) = 0 (Tableau 4).

Tableau 4 Classement des variants génétiques de CYP2D6 en fonction de leur activité [127].

Allèles	**Activité du CYP2D6**	**Score d'activité allélique**	**Type d'allèle**
**1xN, *2xN, *35xN*	Augmentée	> 1	UM
**1, *2, *35, *9xN*[a], **10xN*[a], **17xN*[a], **41xN*[a]	Normale	1	NM
**9, *10, *17, *29, *36, *41,*	Réduite	0.5	IM
**3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *15, *19, *20, *40, *4xN*	Sans activité	0	PM

[a] la multiplication d'un allèle à l'activité réduite entraîne une classification en activité normale [129]

Un patient a généralement deux allèles ce qui donne lieu aux différentes possibilités de combinaison alléliques résultant en diplotype: (UM/UM ou NM/UM, somme de score d'activité > 2), NM/NM (2), NM/IM (1.5), NM/PM (1), IM/IM (1), IM/PM (0.5) et PM/PM (0). Enfin, en fonction de la somme des scores d'activité, les diplotypes sont classés en phénotypes: UM (score d'activité > 2), NM (1.5 à 2), NM ou IM (1), IM (0.5) et PM (0). La classification des diplotypes en phénotype d'après les dernières recommandations de CPIC (« *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* ») [129] est présentée dans le Tableau 5.

Tableau 5 Classement de diplotype CYP2D6 en phénotype [129].

Diplotype	Fréquence des diplotypes [23]	Somme de score d'activité allèlique	Phénotype
PM/PM	5.9	0	PM
IM/PM	7.6	0.5	IM
IM/IM	3.0	1	IM ou NM [a]
NM/PM	27.5	1	
NM/IM	17.4	1.5	NM
NM/NM	38.1	2	
NMxN	< 1	> 2	UM

[a] il existe une incertitude concernant la classification de diplotypes IM/IM et NM/PM (somme de score d'activité allèlique = 1) en phénotype

Plusieurs études ont démontré que les concentrations de *N*-desmethyltamoxifène, endoxifène et 4-hydroxytamoxifène sont fortement influencées par le génotype *CYP2D6* [23,29,89,118,119,130–132]. En particulier, les concentrations d'endoxifène montrent un effet gène-dose avec des concentrations en moyenne 74% et 50% plus faibles chez les patientes avec le phénotype PM et IM, respectivement, par rapport aux patientes NM [23,133]. La distribution des concentrations d'endoxifène en fonction du phénotype CYP2D6 est représentée sur la Figure 5.

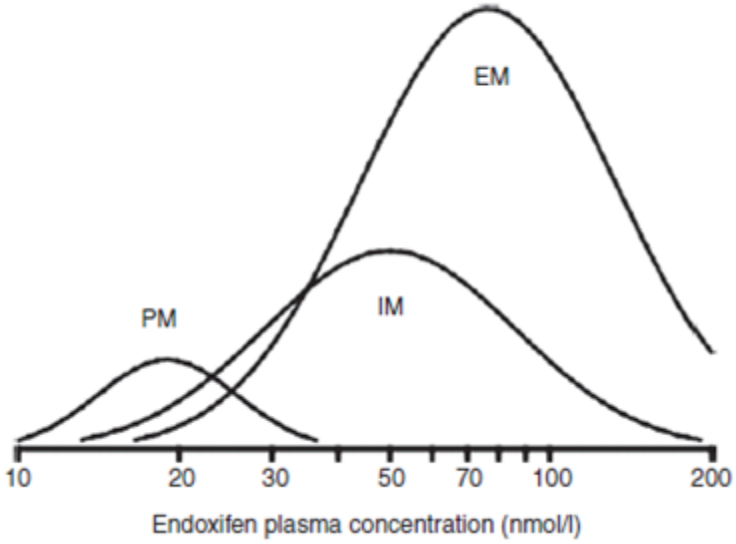


Figure 5 Distribution des concentrations plasmatiques de l'endoxifène en fonction du phénotype CYP2D6 en prenant en compte la prévalence de chaque phénotype (l'aire sous la distribution représente la proportion de la population avec le phénotype donné). D'après Lyon *et al.*[125].

Il est à noter que chez les patientes avec le phénotype PM qui n'ont pas d'enzyme CYP2D6 fonctionnelle, des concentrations d'endoxifène, bien que très faibles, sont observées [133]. De plus, le génotype *CYP2D6* explique environ 38-42% de la variabilité des concentrations d'endoxifène [23,118,132] ce qui confirme l'implication d'autres enzymes dans sa formation. Pour le 4-hydroxytamoxifène, seulement 9% de la variabilité de ses concentrations peut être expliquée par le génotype *CYP2D6* [23]. Les concentrations de tamoxifène s'avèrent ne pas être influencées par l'activité du CYP2D6.

Étant donné que le génotype *CYP2D6* explique seulement une partie de la variabilité des concentrations d'endoxifène, la majorité des analyses qui s'intéressent à l'évaluation de la corrélation entre le génotype *CYP2D6* et son activité *in vivo* chez les patientes traitées par tamoxifène se focalisent sur le ratio métabolique endoxifène/*N*-desmethyltamoxifène (alternativement *N*-desmethyl-tamoxifène/endoxifène). En effet, la conversion de *N*-desmethyltamoxifène en endoxifène est catalysée exclusivement par le CYP2D6 [22] ce qui fait de ce ratio un marqueur de l'activité de CYP2D6. Il a été démontré que le génotype CYP2D6 explique environ 57-69% de la variabilité de ce ratio métabolique [23,118,132].

3.8.6.2 CYP3A4/5

Le CYP3A4/5 est impliqué dans le métabolisme du tamoxifène à plusieurs niveaux, principalement dans la conversion du tamoxifène en *N*-desmethyltamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène en endoxifène [22]. Le CYP3A4/5 est le cytochrome de la famille P450 le plus abondant dans le foie humain et est responsable de la métabolisation d'environ 50 à 60% des médicaments disponibles sur le marché. Environ 50 variants génétiques du *CYP3A4/5* ont été décrits dans la littérature dont certains peuvent avoir une conséquence sur l'activité de la protéine [134,135]. Parmi les polymorphismes du *CYP3A4*, l'allèle **22,* présent dans la population caucasienne à la fréquence de 5 à 7% [136,137], est un single nucleotide polymorphisme (SNP) de promoteur associé à une réduction de l'expression de mRNA entraînant une diminution de l'activité enzymatique du CYP3A4 [136]. Il a été démontré que le ratio métabolique 1'-hydroxymidazolam/midazolam, un probe phénotypique pour l'activité de CYP3A4, a été diminué en moyenne de 21% chez les porteurs d'allèle **22* par rapport aux porteurs d'un génotype sauvage [138]. L'importance clinique de ce variant génétique a été démontrée dans le traitement par immunosuppresseurs, notamment le tacrolimus et la cyclosporine A [139]. En effet, la CL/*F* de tacrolimus a été diminuée d'environ 37% chez les patients hétérozygotes mutés par rapport aux patients avec un génotype sauvage, nécessitant une adaptation de dose [137].

Un impact significatif du génotype *CYP3A4*22* sur les concentrations de tamoxifène, endoxifène, *N*-desmethyltamoxifène et 4-hydroxytamoxifène a été observé dans plusieurs études [132,133,140,141]. En particulier, les concentrations de tamoxifène, endoxifène et 4-hydroxytamoxifène plus élevées ont été observées chez les porteuses d'allèle **22* par rapport aux patientes avec un génotype sauvage, quel que soit le phénotype CYP2D6 [133]. De plus, les patientes avec une activité altérée du CYP2D6 et porteuses de l'allèle **22* avaient des concentrations d'endoxifène comparables à celles des patientes avec une activité normale du CYP2D6 (phénotype NM) [133,140,142]. Il semble donc que l'altération de la formation d'endoxifène chez les patientes présentant une diminution d'activité du CYP2D6 pourrait être en partie compensée par la présence de l'allèle *CYP3A4*22*. Toutefois, le mécanisme de cette interaction n'est pas clair. Il a été proposé que le premier passage intestinal du tamoxifène est diminué chez les patientes *CYP3A4*22*-mutées ce qui augmente la biodisponibilité du tamoxifène. Néanmoins, bien que le

génotype *CYP3A4*22* soit significativement associé aux concentrations d'endoxifène, son inclusion dans le modèle de régression linéaire avec le génotype *CYP2D6* améliore très légèrement le pourcentage de variabilité interindividuelle expliquée (de 42.3% avec le génotype *CYP2D6* à 42.8% avec le génotype *CYP2D6* et *CYP3A4*22*) [132].

La fréquence allélique du variant *CYP3A4*1B* est de 2.4 – 3.7% dans la population caucasienne [143]. Son résultat sur l'expression de la protéine n'a pas encore été clairement établi mais il a été suggéré qu'il soit associé à une augmentation de l'activité de CYP3A4. Cependant, la présence de l'allèle **1B* n'a pas eu d'impact sur les concentrations de tamoxifène ou ses principaux métabolites dans l'étude de Fernandez-Santander *et al.* [144].

Concernant les polymorphismes génétiques du *CYP3A5*, les allèles **3*, **6* et **7* sont responsables de la protéine non-fonctionnelle [145]. La fréquence de l'allèle **3* dans la population caucasienne est de 88% à 97% tandis que les allèles **6* et **7* sont présents dans la population africaine et asiatique, avec des fréquences de 15 à 25% et 10%, respectivement [146]. Concernant le polymorphisme **3*, la présence d'au moins un allèle fonctionnel (génotypes **1/*1* et **1/*3*) entraîne un phénotype expresseur tandis que la présence de deux allèles mutés (génotype **3/*3*) induit un phénotype non-expresseur de CYP3A5 [134]. L'impact clinique de ce polymorphisme génétique a été démontré pour le tacrolimus. La présence d'un allèle fonctionnel **1* a été associée à une diminution des concentrations résiduelles de tacrolimus de 36% tandis que la présence de deux allèles fonctionnelles a été associée à une diminution de 59% [147].

Concernant le tamoxifène, dans l'étude de *Jin et al.* les concentrations d'endoxifène étaient plus fortes chez les patientes expresseurs de CYP3A5 par rapport aux patientes non-expresseurs mais cette différence n'était pas statistiquement significative [89]. Dans une autre étude, les concentrations de *N*-oxyde tamoxifène étaient plus fortes chez les patientes expressers (**1/*3*) par rapport aux patientes non-expressers de CYP3A5 et la même tendance a été observée pour le 4-hydroxytamoxifène, *N*-desmethyltamoxifène et *N*,*N*-didesmethyltamoxifène [148]. Schroth *et al.* ont rapporté une réduction moyenne de 12% de ratio métabolique *N*-desmethyltamoxifène/tamoxifène chez les patientes non-expresseurs de CYP3A5 par rapport aux patientes avec le génotype **1/*1* [118]. Enfin, une autre étude a rapporté une prédiction légèrement meilleure du ratio métabolique endoxifène/4-hydroxytamoxifène quand le génotype *CYP3A5*3* était pris en compte dans le modèle de régression linéaire avec le génotype

CYP2D6 [132]. En revanche, aucune association significative entre les génotypes *CYP3A5*3*, **6* et **7* et les concentrations de tamoxifène ou ses métabolites n'a été observée dans d'autres études [117,140,144,149,150].

3.8.6.3 CYP2C9

Le CYP2C9 contribue à la formation des métabolites primaires du tamoxifène: le *N*-desmethyl- et le 4-hydroxytamoxifène [22]. Environ 60 variants génétiques du gène *CYP2C9* sont aujourd'hui recensés dans la littérature. Les allèles **2* et **3* produisent une protéine à l'activité réduite et leur fréquence dans la population caucasienne est de 9% et 6% respectivement [151].

Deux études ont montré une diminution des concentrations de 4-hydroxytamoxifène et endoxifène chez les patientes avec un allèle **2* et/ou **3* par rapport aux patientes non-mutées [23,119]. De plus, le ratio métabolique 4-hydroxytamoxifène/tamoxifène était plus faible chez les patientes avec au moins un allèle à l'activité réduite, suggérant l'altération de formation de 4-hydroxytamoxifène chez ces patientes. En accord avec ces résultats, Schroth *et al.* ont rapporté une réduction moyenne de 26% de ratio 4-hydroxytamoxifène/tamoxifène chez les patientes homozygotes pour l'allèle **2* ou **3* par rapport aux patientes avec le génotype sauvage [118]. Marcath *et al.* ont observé des concentrations d'endoxifène plus faibles chez les patientes avec une diminution de l'activité de CYP2C9 due à la présence de deux allèles variants (le génotypage comprenait les allèles **2*, **3*, **5*, **6*, **8*, **11*, **12*) après avoir ajusté pour le diplotype CYP2D6 [117]. En revanche, trois autres études ont rapporté que les variants **2* et **3* n'avaient pas d'impact significatif sur l'exposition plasmatique au tamoxifène et ses métabolites ni sur les ratios métaboliques [89,107,140].

3.8.6.4 CYP2C19

Le CYP2C19 est une des enzymes catalysant la conversion du tamoxifène en 4-hydroxytamoxifène [22]. Les polymorphismes génétiques du *CYP2C19* peuvent entraîner la diminution (**2* et **3*) ou l'augmentation (**17*) de l'activité enzymatique [152,153]. La fréquence des allèles **2*, **3* et **17* est d'environ 15%, 0.04%, 18%, respectivement, dans la population caucasienne [153].

Aucune corrélation entre les génotypes **2* et **17* et les concentrations de *N*-desmethyltamoxifène, endoxifène, 4-hydroxytamoxifène et d'autres métabolites, ni les ratios métaboliques n'a été trouvée dans

deux études [23,149]. Une autre étude a rapporté une tendance à l'augmentation des concentrations d'endoxifène chez les patientes avec un phénotype ultrarapide de CYP2C19 (génotype **1*/**17* ou **17*/**17*) [117]. Gjerde *et al.* ont démontré que les concentrations de *N*,*N*-didesmethyltamoxifène, un métabolite de *N*-desmethyltamoxifène, étaient significativement plus fortes chez les patientes avec au moins un allèle **2* par rapport aux autres patientes tandis que les concentrations de *N*-oxyde tamoxifène montraient une variation significative en fonction du génotype *CYP2C19* [148]. En accord avec ces résultats, Lim *et al.* ont rapporté des concentrations plus faibles de norendoxifène, un métabolite de *N*,*N*-didesmethyltamoxifène et endoxifène, chez les porteuses d'allèle **2* [107]. Les ratios métaboliques norendoxifène/*N*,*N*-didesmethyltamoxifène et norendoxifène/endoxifène étaient plus faibles chez les porteuses d'allèle muté **2* suggérant que la formation de norendoxifène était diminuée chez ces patientes [107,119].

3.8.6.5 CYP2B6

Le CYP2B6 est impliqué dans la conversion du tamoxifène en 4- et 4'-hydroxytamoxifène [22,23]. Plus de 50 variants génétiques du CYP2B6 ont été décrits mais pour certains d'entre eux, le résultat sur l'activité de la protéine n'est pas encore connu. La fréquence de l'allèle **6*, responsable d'une enzyme avec activité réduite, est de 14 à 27% dans la population caucasienne [154]. Aucune corrélation entre l'allèle **6* et les concentrations du tamoxifène, endoxifène et d'autres métabolites ou le ratio métabolique tamoxifène/4-hydroxytamoxifène n'a été trouvée [23,117,140]. En revanche, Woo *et al.* ont observé des concentrations plus fortes de 4-hydroxytamoxifène chez les patientes asiatiques avec une diminution de l'activité de CYP2B6 due à la présence de l'allèle **6* [155].

3.8.6.6 SULT

La sulfotransférase 1A1 (SULT1A1) catalyse la formation des métabolites sulfonés du tamoxifène: le sulfate de 4-hydroxytamoxifène, le sulfate d'endoxifène et des métabolites sulfonés de *N*-desmethyltamoxifène [108]. Parmi les polymorphismes génétiques connus de *SULT1A1*, l'allèle **2* entraîne une diminution de l'activité enzymatique. Sa fréquence dans la population caucasienne est de 31% [156,157].

Plusieurs études ont rapporté l'absence d'association entre les concentrations plasmatiques du tamoxifène et de ses métabolites et le *SULT1A1*2* [89,117,144,148]. En revanche, dans une autre étude, le ratio métabolique *N*-desmethyltamoxifène/tamoxifène était plus faible chez les patientes porteuses d'allèle *SULT1A1*2* [158]. Concernant les SNPs rs6839 et rs1042157 dans la région 3'-non traduite (*3'-untranslated region*, UTR) du gène *SULT1A1* responsables de l'activité diminuée de SULT1A1 [159], les concentrations plus élevées de l'endoxifène et 4-hydroxytamoxifène ont été observées chez les patientes avec une activité diminuée, par rapport aux autres patientes, suggérant une diminution de la conjugaison [160]. Finalement, le nombre de copies du gène SULT1A1 n'a pas été corrélé aux concentrations du tamoxifène et ses métabolites [148,158]. Néanmoins, l'interprétation de ces résultats est difficile en l'absence de concentrations des métabolites sulfonés.

3.8.6.7 UGT

Les UGT1A4, UGT1A8, UGT2B7, UGT2B15 et UGT2B17 interviennent dans la glucuronidation du tamoxifène et de ses métabolites. Le Tableau 6 présente les polymorphismes génétiques fonctionnels d'*UGT1A4*, *UGT1A8*, *UGT2B7*, *UGT2B15* et *UGT2B17* les plus souvent rapportés dans la littérature avec leur fréquence dans la population caucasienne.

Tableau 6 Variants génétiques des UGTs intervenant dans la glucuronidation du tamoxifène.

Gène	Variant génétique	rs ID	Substitution	Conséquence	Fonction de l'enzyme	Fréquence allèlique (%)
UGT1A4	**2*	rs6755571	70C>A	Pro24Thr	Diminuée [161], Augmentée [162]	8.0 [161]
	**3*	rs58554624	142T>G	Leu48Val	Diminuée [110,161], Augmentée [110,163–165]	9.0 [161]
UGT1A8	**2*	rs1042597	518C>G	Ala173Gly	Normale [166]	14.5 [166]
	**3*	rs17863762	830G>A	Cys277Tyr	Fortement diminuée [166]	2.2 [166]
UGT2B7	**1c*	rs28365062	735A>G	Thr245Thr	Normale	12.0 – 17.0 [167]
	**2*	rs7439366	802C>T	His268Tyr	Diminuée [168], Similaire à l'allèle sauvage [169,170], Augmentée [171]	42.9 [172]
	-	rs7438135	-900G>A	-	Augmentée [173]	50.0 [174]
	-	rs7668258	-161TC>T	-	Diminuée [175]	53.2 [175]
	-	rs7662029	-327A>G	-	Augmentée [175]	14.6 [175]
	-	rs3924194	c.1003-1801C>G	-	Inconnue	15.0 [176]
UGT2B15	**2*	rs1902023	c.253G>T	Asp85Tyr	Diminuée [177], Augmentée [178]	47.0 [177]
	**4*	rs4148269	c.1568C>A	Lys523Thr	Similaire à l'allèle sauvage [179]	23.0 – 40.0 [177,179]
UGT2B17	**2*	-	Délétion du gène	-	Absente	19.0 – 30.0 [177,180]

Les polymorphismes génétiques *UGT1A4*3, UGT2B7*2*, *UGT2B15*2* et *UGT2B17del* n'ont pas eu d'impact sur les concentrations plasmatiques de l'endoxifène, 4-hydroxytamoxifène ou les ratios métaboliques de leur métabolites glucuronidés [23,117]. Cependant, une étude a rapporté que le ratio métabolique tamoxifène/tamoxifène-*N*-glucuronide était significativement diminué chez les patientes homozygotes pour l'allèle *UGT1A4*3* par rapport aux patientes avec le génotype sauvage. Cet effet suggère une augmentation de la glucuronidation liée à la présence du polymorphisme *UGT1A4*3* [23]. Contrairement à ces résultats, Romero-Lorca *et al.* ont noté des concentrations plus faibles de métabolites glucuronidés de 4-hydroxytamoxifène et l'endoxifène chez les patientes homozygotes pour l'allèle *UGT1A4*3* par rapport aux patientes homozygotes sauvages et hétérozygotes mutées [181]. La glucuronidation de 4-hydroxytamoxifène a également été diminuée chez des patientes homozygotes pour l'allèle *UGT2B7*2*. Une augmentation des concentrations des métabolites glucuronidés a été observée chez les patientes porteuses d'allèle *UGT2B15*4*. Enfin, une augmentation inattendue de glucuronidation de 4-hydroxytamoxifène a été notée chez les patientes avec le génotype *UGT2B17 del/del*.

3.8.6.8 Transporteurs d'efflux de la famille ABC

Les polymorphismes génétiques des gènes codant pour les transporteurs de la famille ABC (*ABCB1* codant pour la P-gp, *ABCC2* codant pour la MRP2, *ABCG2* codant pour la BCRP) pourraient avoir un impact d'une part sur les concentrations plasmatiques du tamoxifène et ses métabolites (l'excrétion biliaire et la biodisponibilité), d'autre part sur le transport membranaire de l'endoxifène à l'intérieur des cellules tumorales. Plusieurs polymorphismes génétiques d'*ABCB1*, *ABCC2* et *ABCG2* sont documentés dans la littérature dont certains sont responsables de la diminution de l'activité des pompes d'efflux et d'autres, de l'augmentation de leur activité ce qui pourrait conférer la résistance au traitement.

Le polymorphisme génétique du gène *ABCC2* (rs3740065), entraînant l'augmentation de l'expression et de l'activité d'ABCC2, n'a pas eu d'impact significatif sur les concentrations plasmatiques du tamoxifène et ses métabolites (*N*-desmethyltamoxifène, 4-hydroxytamoxifène, endoxifène) [131]. De même, Marcath *et al.* n'ont pas observé d'association significative entre les polymorphismes génétiques de l'*ABCB1* (3435C>T – diminution de l'activité) et *ABCG2* (421C>A – diminution de l'activité) et les

concentrations plasmatiques d'endoxifène [117]. Enfin, les polymorphismes génétiques *ABCB1* 3435C>T, *ABCG2* 34G>A (activité normale ou diminuée) et 421C>A n'ont pas été associés aux concentrations d'endoxifène [140].

3.8.6.9 Régulateurs de transcription

Les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (NR1I) tels que le pregnane X receptor (PXR, NR1I2) et le récepteur constitutif des androstanes (CAR, NR1I3) sont des régulateurs de transcription de plusieurs enzymes interférant dans la métabolisation des médicaments et des molécules endogènes. L'activation de ces récepteurs par des xénobiotiques et des substances endogènes est un des mécanismes majeurs des interactions médicamenteuses liées à l'induction de CYP3A4. Il a été démontré que le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène induisent le CYP3A4 par interaction avec le PXR *in vitro* [182–184]. Du fait de l'implication de CYP3A4 dans la métabolisation du tamoxifène, son induction pourrait impacter ses concentrations plasmatiques et celles de ses métabolites. De plus, l'ampleur de l'induction peut varier en fonction de différents génotypes de PXR. Trois polymorphismes fonctionnels du PXR ont été décrits dans la littérature: 7635G>A, 8055C>T et -25385C>T [185]. Néanmoins, aucune association entre ces polymorphismes génétiques (7635G>A et 8055C>T) et les concentrations de *N*-desmethyltamoxifène et endoxifène n'a été observée chez les patientes avec un cancer du sein au stade métastatique [186].

3.8.7 Interactions médicamenteuses

3.8.7.1 Inhibiteurs du CYP2D6

Stearns *et al.* ont démontré une diminution de 55% des concentrations d'endoxifène due à l'administration de la paroxétine, un inhibiteur puissant de CYP2D6 [29]. Jin *et al.* ont mis en évidence que cette réduction était moins prononcée chez les patientes avec une altération génétique de l'activité de CYP2D6 [89]. En effet, chez les patientes avec le génotype sauvage de *CYP2D6*, l'administration d'un inhibiteur puissant de CYP2D6 a entraîné une diminution des concentrations d'endoxifène de 58% par rapport aux patientes sans traitement concomitant. Chez les patientes hétérozygotes mutées pour un allèle non-fonctionnel, cette diminution était d'environ 40%. Ainsi, la prise concomitante de paroxétine

par les patientes avec une activité normale du CYP2D6 entraîne une diminution des concentrations d'endoxifène jusqu'au niveau observé chez les patientes avec le phénotype PM [130]. L'administration d'inhibiteurs faibles du CYP2D6 (sertraline, citalopram, celecoxib, diphenhydramine, chlorpheniramine) entraîne également une diminution des concentrations d'endoxifène mais dans une moindre mesure. Par ailleurs, les inhibiteurs de CYP2D6 ne semblent pas avoir un impact significatif sur les concentrations de tamoxifène et *N*-desmethyltamoxifène [130].

La diminution des concentrations d'endoxifène en raison de l'administration d'inhibiteurs puissants du CYP2D6 constitue un problème important dans la thérapie par tamoxifène puisque une grande majorité de ces médicaments sont les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI) et les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (SNRI). Ces médicaments peuvent être prescrits chez les patientes atteintes d'un cancer du sein pour traiter la dépression. L'utilisation d'inhibiteurs puissants de CYP2D6 (paroxétine, fluoxétine) n'est pas recommandée chez les femmes sous tamoxifène [129]. L'escitalopram, un faible inhibiteur de CYP2D6, a été proposé comme une alternative à la paroxétine et fluoxétine, pour le traitement des troubles dépressifs chez les patientes traitées par tamoxifène [187]. Binkhorst *et al.* ont montré que le changement de la paroxétine ou la fluoxétine contre l'escitalopram chez les patientes sous tamoxifène entraînait une augmentation de l'$AUC_{0\text{-}24}$, C_{trough} et C_{max} d'endoxifène de 3 fois par rapport aux concentrations observées sous paroxétine/fluoxétine [188]. De plus, $AUC_{0\text{-}24}$, C_{trough} et C_{max} de 4-hydroxytamoxifène ont aussi été augmentées de 34%, 30% et 42%, respectivement, tandis que les concentrations du tamoxifène et de *N*-desmethyltamoxifène sont restées inchangées. Ainsi, les concentrations d'endoxifène chez les patientes traitées par escitalopram étaient similaires à celles observées chez les patientes avec le même génotype CYP2D6 et sans traitement concomitant. Globalement, ces résultats suggèrent que le remplacement de la paroxétine et de la fluoxétine par des inhibiteurs faibles de CYP2D6 tels que l'escitalopram peut restaurer l'exposition plasmatique aux métabolites actifs du tamoxifène.

3.8.7.2 Inhibiteurs du CYP3A4

L'impact des inhibiteurs du CYP3A4 sur la pharmacocinétique du tamoxifène n'est pas encore bien connu. Jin *et al.* ont rapporté une augmentation moyenne de 56% des concentrations du tamoxifène

parmi les patientes traitées concomitamment par des inhibiteurs des canaux calciques inhibiteurs de CYP3A4/5. En revanche, aucun impact sur les concentrations de métabolites n'a été observé [89].

3.8.7.3 Inducteurs enzymatiques

La rifampicine, un antibiotique utilisé notamment dans le traitement de la tuberculose, est un inducteur des cytochromes (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6) et des transporteurs d'efflux (P-gp et MRP2) par son action sur l'activation de PXR [189]. Au vu de l'implication de CYP3A4 dans la formation de l'endoxifène, il serait attendu que l'administration concomitante d'un inducteur de CYP3A4 entraîne une augmentation de ses concentrations plasmatiques. Pourtant, Binkhorst *et al.* ont montré une diminution d'environ 81 – 86%, 62 – 74%, 59 – 83% et 28 – 85% de l'$AUC_{0\text{-}24}$ du tamoxifène, *N*-desmethyl-, 4-hydroxytamoxifène et endoxifène, respectivement, due à l'administration concomitante de la rifampicine dans une étude croisée incluant 4 patientes [190]. Cependant, l'analyse du ratio métabolique 4β-hydroxycholésterol/cholésterol (marqueur de l'activité de CYP3A4/5) a confirmé une induction de CYP3A4/5 par rifampicine. De plus, dans le cas clinique rapporté par Henderson *et al.* une diminution du taux d'endoxifène de 46 nmol/L à 16 nmol/L suivant l'administration de la rifampicine pendant 10 jours a été observée. La patiente a retrouvé ses concentrations d'endoxifène après l'arrêt de la rifampicine confirmant l'interaction médicamenteuse [191]. Enfin, il a été démontré qu'un autre inducteur enzymatique, la phénytoïne, avait entraîné une diminution importante des concentrations d'endoxifène chez une patiente traitée de manière chronique pour l'épilepsie. Deux mois après l'initiation du tamoxifène, la concentration plasmatique d'endoxifène chez cette patiente (phénotype CYP2D6 NM) était environ 7 fois plus faible que la concentration moyenne observée chez les patientes avec le même phénotype CYP2D6 alors que la concentration de tamoxifène était seulement légèrement diminuée [192]. Enfin, l'administration concomitante de tamoxifène avec l'aminogluthetimide, un inhibiteur de l'aromatase et un inducteur de CYP3A4, CYP2C9 et P-gp [193], a induit une diminution significative des concentrations de tamoxifène et de ses métabolites (*N*-desmethyl-, 4-hydroxytamoxifène, endoxifène) [194].

3.8.7.4 Inhibiteurs de l'aromatase

Bien que l'association thérapeutique du tamoxifène avec les inhibiteurs de l'aromatase ne soit pas recommandée à ce jour, elle a fait l'objet d'études cliniques et les interactions éventuelles ont été étudiées. Les résultats sont résumés ci-dessous.

Létrozole Dans une étude clinique évaluant l'efficacité de l'association thérapeutique du tamoxifène avec le létrozole, l'administration concomitante du létrozole a entraîné une variation moyenne (intervalle) de 2.6% (-59 à 99%), 4.7% (-51 à 94%) et 40% (-71 à 350%) de l'exposition plasmatique au tamoxifène, *N*-desmethyltamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène, respectivement. Toutefois, la grande variabilité interindividuelle de pourcentage de variation suggère que l'effet du létrozole sur la pharmacocinétique du tamoxifène et ses métabolites peut être observé chez certaines patientes [195]. Par ailleurs, le tamoxifène génère une réduction moyenne de 37.6% des concentrations plasmatiques du létrozole (le ratio de l'AUC du létrozole seule à l'AUC du létrozole pendant l'administration concomitante du tamoxifène était de 1.60, CI90% = 1.46 – 1.76), probablement due à l'induction enzymatique du CYP3A4 par le tamoxifène [196].

Anastrozole Les concentrations plasmatiques du tamoxifène et de *N*-desmethyltamoxifène n'ont pas été affectées par la prise concomitante de l'anastrozole (le ratio des moyennes géométriques de C_{trough} du tamoxifène et de *N*-desmethyltamoxifène chez les patientes traitées par tamoxifène + anastrozole *versus* patientes traitées par tamoxifène seul a été de 1.01 (CI90% = 0.91 – 1.11) et de 1.05 (CI90% = 0.94 – 1.16), respectivement [197,198]. En revanche, C_{trough} de l'anastrozole était réduite en moyenne de 27% (CI90% = 20% – 33%) en raison de l'administration concomitante du tamoxifène.

Exemestane L'administration concomitante de l'exemestane chez 32 patientes traitées par tamoxifène n'a pas eu d'impact significatif sur l'exposition au tamoxifène (ratio de moyenne géométrique de l'AUC_{0-24} tamoxifène + exemestane versus l'AUC_{0-24} tamoxifène seul = 1.0, CI90% = 0.96 – 1.06) ni sur celle de ses métabolites [94]. D'autre part, le tamoxifène n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique de l'exemestane [199].

3.8.7.5 Phytothérapie

Approximativement 20 à 30% de l'ensemble des patients atteints de cancer utilisent de la phytothérapie [200,201]. L'utilisation des compléments alimentaires à base de plantes dans le cadre d'un cancer du sein a notamment pour but de réduire la dépression liée à la maladie, les effets indésirables ou encore d'augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux. Néanmoins, certains compléments peuvent influencer la pharmacocinétique des médicaments anticancéreux et donc avoir une conséquence sur leur efficacité et toxicité.

La curcumine est une substance active de curcuma, une plante d'origine indienne utilisée comme épice. Récemment, une augmentation de l'utilisation de la curcumine chez les patients avec un cancer a été notée, en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, anticancéreuses et anti-infectieuses. La curcumine est un inhibiteur des enzymes de phase I et II (CYP3A4, CYP2D6, UGT) [202] et peut inhiber ou induire les transporteurs d'efflux tels que la P-gp [203]. Une interaction pharmacocinétique entre le tamoxifène et la curcumine a récemment été décrite [204]. L'administration concomitante de la curcumine a entraîné une diminution de $AUC_{0\text{-}24h}$ et C_{trough} de tamoxifène de 8% ($p = 0.02$) et 7% ($p = 0.25$), respectivement, par rapport à l'administration de tamoxifène seul. L'$AUC_{0\text{-}24h}$ et C_{trough} d'endoxifène ont diminué de 8% ($p = 0.07$) et 6% ($p = 0.43$), respectivement. Cette diminution a été plus prononcée lorsque la curcumine a été administrée avec la piperine, cette association étant couramment utilisée afin d'augmenter sa biodisponibilité. En effet, $AUC_{0\text{-}24h}$ et C_{trough} de tamoxifène ont diminué de 13% ($p < 0.01$) et 12% ($p = 0.02$), respectivement. L'$AUC_{0\text{-}24h}$ et C_{trough} de l'endoxifène ont tous les deux diminué de 12% ($p = 0.02$ et $p = 0.01$, respectivement). Il a été également noté que la diminution de l'exposition plasmatique a été plus prononcée chez les patientes CYP2D6 NM par rapport aux patientes IM. Bien que modeste, cette interaction statistiquement significative pourrait s'expliquer par une diminution de la biodisponibilité du tamoxifène due à l'induction de la P-gp par la curcumine mais ce mécanisme n'est pas certain.

Le millepertuis, doté de propriétés antidépressive et légèrement anxiolytique, est souvent utilisé par les patientes atteintes d'un cancer du sein pour réduire le stress et la dépression liés à la maladie [205]. Plusieurs interactions pharmacocinétiques avec le millepertuis ont été rapportées dans la littérature dont certaines

concernent les médicaments anticancéreux (irinotecan, docetaxel, imatinib) [206,207]. En effet, la substance active du millepertuis – la hyperforine, est un agoniste de PXR qui entraîne une induction du CYP3A4, CYP2C19 et de la P-gp [208,209]. Du fait de l'implication de CYP3A4 et CYP2C19 dans la métabolisation du tamoxifène, le risque des interactions médicamenteuses avec le millepertuis ne peut pas être exclu. Par ailleurs, il a été démontré que *ginkgo biloba* et l'extrait d'algue brune *Undaria pinnatifida,* utilisés également comme compléments alimentaires mais dont l'effet éventuel sur les cytochromes n'est pas connu, n'avaient pas d'impact sur la pharmacocinétique du tamoxifène [210,211].

3.8.8 Saison

Il a été démontré qu'en été les concentrations d'endoxifène et de 4-hydroxytamoxifène étaient environ 24% et 42% plus fortes qu'en hiver [140,142]. Néanmoins, Marcath *et al.* ont observé une corrélation inverse, avec des concentrations d'endoxifène plus élevées en hiver par rapport aux autres saisons [117], possiblement à cause de la situation géographique différente. Il est cependant possible que l'exposition au soleil et le taux de la vitamine D_3 ait un impact sur la métabolisation du tamoxifène. En effet, les taux de vitamine D_3 sont réduits en hiver alors qu'elle régule l'expression intestinale de CYP3A4 [212,213]. Néanmoins, au vu de l'étude d'Antunes *et al.* qui n'a pas trouvé de corrélation significative entre les taux de vitamine D_3 et l'activité enzymatique de CYP3A4, l'impact des saisons sur l'exposition plasmatique au tamoxifène et métabolites reste incertain [142].

3.9 Méthodes de dosage

Plusieurs méthodes de dosage du tamoxifène et de ses métabolites dans les matrices biologiques ont été développées et validées [23,214–216]. La majorité d'entre elles permettent la quantification simultanée des concentrations de tamoxifène et de ses trois métabolites majeurs: *N*-desmethyltamoxifène, 4-hydroxytamoxifène et endoxifène. Toutefois, il existe également les méthodes permettant la quantification simultanée des concentrations de tamoxifène et de 20 métabolites de phase I et II dans le plasma humain [23]. Par ailleurs, la méthode développée par van Nuland *et al.* permet la quantification simultanée de concentrations d'endoxifène et d'autres traitements hormonaux dans une optique de réaliser un suivi thérapeutique pharmacologique (« *therapeutic drug monitoring* », TDM) [216].

Dans ces méthodes, la matrice humaine la plus courante est le plasma [214,217], les autres matrices étant le sérum [215], la bile, les feces, les urines, la salive et le LCR [96,112]. Dans la plupart des méthodes rapportées, les prises d'essais (50 – 200 uL) sont traitées par précipitation des protéines [214,215,217,218]. La séparation des analytes s'effectue sur chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou ultra haute performance (UPLC) permettant de réduire le temps d'analyse tout en améliorant la résolution chromatographique et la sensibilité. La méthode de détection la plus fréquente est la spectrométrie de masse qui permet d'identifier et de quantifier les molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Le principe de la spectrométrie de masse réside dans la séparation en phase gazeuse des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La plupart des analyses rapportées pour la détéction de tamoxifène et ses métabolites par spectrométrie de masse utilise l'ionization par la téchnique de l'electrospray (ESI) ou APCI (« *atmospheric pressure chemical ionization* ») en mode positif. Pour la quantification, le mode SRM (« *selective reaction monitoring* ») ou MRM (« *multiple reaction monitoring* ») sont utilisés.

La gamme des concentrations quantifiables est généralement comprise entre 5 et 1000 ng/mL pour le tamoxifène, 5 – 1000 ng/mL pour le *N*-desmethyltamoxifène, 1 – 200 ng/mL pour l'endoxifène et Z'-endoxifène, 0.4 – 80 ng/mL pour le 4-hydroxytamoxifène et 0.2 – 40 ng/mL pour le 4'-hydroxytamoxifène [215]. La précision et biais des métodes analytiques rapportées sont inférieurs à 15% et à 20% pour le LLOQ.

Le tamoxifène est administré sous forme de mélange des isomères (Z) et (E) dont seulement les isomères (Z) sont pertinents d'un point de vue pharmacologique. Bien que les concentrations des métabolites (E) soient présentes à des concentrations inférieures à LLOQ dans le plasma des patientes, le tamoxifène et ses métabolites pouvent subir à l'isomération (Z)/(E) après l'exposition à la lumière UV. De plus, lors de la métabolisation de (Z)-tamoxifène, les métabolites (Z)' sont formés qui présentent une activité pharmacologique environ 10 fois moins importante que leurs métabolites respectifs (Z). Cependant, un grand nombre des méthodes publiées n'a pas séparé des isomères de tamoxifène et de ses métabolites et a en conséquence surestimé les concentrations plasmatiques d'endoxifène et 4-hydroxytamoxifène en moyenne d'un facteur 2 et 3, respectivement [219]. Afin de correctement effectuer les études évaluant la

relation PK/PD de tamoxifène, une séparation chromatographique des isomères (Z), (E) et (Z)' est indispensable.

3.10 Relation pharmacogénétique-pharmacodynamie

3.10.1 CYP2D6

3.10.1.1 Efficacité

Le CYP2D6 est la seule enzyme impliquée dans la conversion de *N*-desmethyltamoxifène en endoxifène et constitue ainsi l'enzyme principale dans l'activation pharmacologique du tamoxifène. De ce fait, plusieurs études ont été effectuées afin d'évaluer si l'altération de l'activité de CYP2D6 pourrait avoir un impact sur l'efficacité clinique du tamoxifène. Goetz *et al.* ont mis en évidence dans une cohorte de 256 patientes que les porteuses de génotype *CYP2D6 *4/*4* avaient un temps sans rechute et une survie sans maladie plus courts (p = 0.023 et p = 0.012 respectivement) que les patientes hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle sauvage mais cet effet n'a pas été observé sur la survie globale (p = 0.169) [220]. Dans cette étude, l'extraction d'ADN a été effectuée sur les spécimens tumoraux et buccaux mais pour une partie des patientes, les auteurs ont démontré une bonne concordance entre les génotypes obtenus à partir de ces deux types d'échantillons. L'étude de Schroth *et al.* a démontré que les porteuses non seulement des allèles non-fonctionnels (**4* et **5*) mais aussi des allèles à l'activité réduite (**10* et **41*) ont eu une moins bonne réponse au tamoxifène en terme de survie sans rechute, par rapport aux patientes non-porteuses de ces allèles [221]. L'extraction d'ADN a été effectuée sur le tissu mammaire normal provenant des biopsies ou tissus d'exérèse. Enfin, dans une étude rétrospective chez 1325 patientes, Schroth *et al.* ont démontré que la survie sans événement et la survie sans maladie ont été plus courtes chez les patientes avec une diminution de l'activité de CYP2D6 (phénotypes IM et PM) par rapport aux patientes avec le phénotype NM (HR = 1.33, CI95% = 1.06 – 1.68 et HR = 1.29, CI95% = 1.03 – 1.61, respectivement) [222]. A la base de ces résultats positifs observés également par d'autres équipes [223–226], une information concernant l'augmentation de risque de rechute chez les patientes avec le phénotype PM a été considérée pour la notice du tamoxifène par la FDA. Cependant, les analyses rétrospectives des deux grandes études cliniques ATAC et BIG 1-98 ont rapporté des résultats

extrêmement discordants ce qui n'a pas permis de conclure sur l'utilité de l'examen de génotypage de *CYP2D6* à l'initiation du traitement [227,228]. Notamment, l'analyse rapportée par Rae *et al.* portant sur les patientes traitées par tamoxifène pour un cancer du sein au stade précoce dans le cadre de l'étude ATAC a démontré absence d'association entre le phénotype CYP2D6 et la rechute (HR = 0.99, CI95% = 0.48 – 2.08, p = 0.99) [227]. L'analyse rétrospective des données de l'étude BIG 1-98 a démontré que les patientes avec le phénotype IM et PM présentaient une augmentation non statistiquement significative de risque de rechute par rapport aux patientes NM (HR = 0.86, CI95% = 0.60 – 1.24) [228]. Il est à noter que dans ces deux analyses, l'extraction d'ADN a été effectuée exclusivement à partir de spécimens tumoraux.

Plusieurs études ont été effectuées pour confirmer ou dénoncer ces résultats produisant encore des conclusions discordantes [131,229–233]. La méta-analyse rapportée par Province *et al.* a été réalisée sur 4973 patientes dont l'examen de génotypage a été effectué sur les spécimens divers (sang, spécimens tumoraux, tissu mammaire normal). Il a été démontré que le statut CYP2D6 est un facteur prédictif de la réponse chez les patientes ménopausées traitées par une dose de 20 mg/jour pendant 5 ans (HR pour maladie invasive = 1.25, CI95% = 1.06 – 1.47, p = 0.009). Cependant, dans toute la population étudiée, le phénotype CYP2D6 n'était pas significativement associé à la réponse clinique après avoir corrigé pour le statut ménopausal, la durée de thérapie et le temps de suivi (p = 0.25) [234]. Enfin, les études prospectives ayant pour but d'évaluer spécifiquement la relation entre le phénotype CYP2D6 (établi à la base d'un examen de génotypage sur l'ADN germinale) et l'efficacité du tamoxifène n'ont récemment rapporté aucune association dans le cancer du sein métastatique [235] et en situation adjuvante [236]. Notamment, dans l'étude hollandaise CYPTAM incluant 667 patientes traitées par tamoxifène en situation adjuvante, le temps jusqu'à progression n'a pas été associé au génotype *CYP2D6* (HR ajusté = 0.929, CI95% = 0.525 – 1.642, p = 0.779).

3.10.1.2 Toxicité

De la même manière que pour l'efficacité, l'altération de l'activité de CYP2D6 pourrait avoir un impact sur l'intensité ou la fréquence des effets indésirables induits par le tamoxifène. En effet, dans une étude évaluant l'impact de CYP2D6 sur la persistance au traitement, un nombre plus important de patientes

arrêtant prématurément le tamoxifène a été observé parmi les porteuses des allèles fonctionnels de CYP2D6 (p = 0.018) suggérant que les patientes présentant une diminution de l'activité de CYP2D6 pourrait avoir un risque de toxicité moins important [66]. Cette hypothèse a été étudiée dans plusieurs études qui ont produit des résultats contradictoires. Concernant les bouffées de chaleur, Goetz *et al.* ont rapporté que les bouffées de chaleur d'intensité modérée et sévère n'ont pas été observées chez les patientes porteuses de génotype *CYP2D6 *4/*4* par rapport aux patientes homozygotes et hétérozygotes pour l'allèle sauvage [220]. Une étude prospective a démontré que les patientes CYP2D6 IM avaient un plus grand risque d'avoir des bouffées de chaleur que les patientes NM et PM tandis que chez les patientes PM ce risque était moins important [237]. Le phénotype CYP2D6 était également associé à la survenue de bouffées de chaleur dans l'étude WHEL [238]. En revanche, au cours de l'étude BIG 1-98, les patientes avec les phénotypes PM et IM avaient un risque augmenté d'avoir des bouffées de chaleur par rapport aux patientes NM [228]. Enfin, d'autres études plus récentes n'ont observé aucune corrélation entre la survenue des bouffées de chaleur et le génotype/phénotype CYP2D6 [62,88,141,239–241].

3.10.2 CYP3A4/5

Le CYP3A4/5 interfère à plusieurs niveaux dans la métabolisation de tamoxifène et il a été démontré que le polymorphisme génétique *CYP3A4*22* (associé à la diminution de l'activité enzymatique) influence de manière significative les concentrations plasmatiques d'endoxifène et de 4-hydroxytamoxifène [133,140]. Néanmoins, à l'heure actuelle, la relation entre l'efficacité de tamoxifène et le génotype *CYP3A4*22* n'a pas été étudiée. Concernant les toxicités, dans l'étude de Baxter *et al.* les patientes porteuses de génotype *CYP3A4*22* avait moins de risque d'avoir des bouffées de chaleur que les patientes avec un génotype sauvage [141].

En ce qui concerne le génotype *CYP3A5*3*, Wegman *et al.* ont rapporté que les patientes homozygotes pour l'allèle **3* (non-expresseurs de CYP3A5) avaient une meilleure survie sans rechute (HR = 0.13, CI95% = 0.02 – 0.86, p = 0.03), cependant cette étude était basée sur l'ADN tumoral [242]. Inversement, trois autres études ont rapporté l'absence de relation entre le génotype *CYP3A5*3* et l'efficacité du tamoxifène [220,221,243].

3.10.3 CYP2C19

Les études évaluant la relation entre les polymorphismes génétiques de *CYP2C19* et la réponse au tamoxifène (efficacité, toxicité) ont rendu des résultats contradictoires. Schroth *et al.* ont rapporté que les patientes porteuses d'allèle **17*, responsable de l'augmentation de l'activité du CYP2C19, avaient une meilleure réponse au tamoxifène que les patientes porteuses des allèles **1* (allèle sauvage),**2* ou **3* responsables de la diminution de l'activité enzymatique (HR = 0.45, CI95% = 0.21 – 0.92, p = 0.03) [221]. Au contraire, une étude récente a observé une moins bonne réponse au tamoxifène chez les patientes porteuses d'au moins un allèle **17* et présentant l'altération de l'activité enzymatique du CYP2D6 [244]. Trois autres études ont démontré que les patientes hétérozygotes et homozygotes pour l'allèle **2* avaient une survie sans maladie plus longue que les patientes homozygotes pour l'allèle sauvage (HR = 0.73, CI95% = 0.58 – 0.91, p = 0.007) [245–247]. Finalement, d'autres rapports n'ont pas mis en évidence de relation significative entre les génotypes **2*, **3 et *17* et la réponse au tamoxifène ou la survenue des effets indésirables [248–251]. Par ailleurs, chez les patientes avec un cancer du sein hormonodépendant au stade précoce qui n'étaient pas traitées par tamoxifène, la présence d'au moins un allèle **2* était associé à un moins bon pronostique de maladie [247], néanmoins dans cette étude le génotype a été effectué sur l'ADN tumoral.

3.10.4 CYP2C9

Dans deux études, aucune corrélation entre l'efficacité du tamoxifène et les polymorphismes génétiques *CYP2C9*2* et **3* n'a été trouvée [221,250].

3.10.5 CYP2B6

Les génotypes du CYP2B6 (**4*, **5*, **6*, **22*) n'ont pas été associés à la réponse au tamoxifène [221,250].

3.10.6 SULT

Au vu de l'implication de SULT dans la métabolisation de 4-hydroxytamoxifène et endoxifène dans les réactions de phase II, les variations de l'activité de ces enzymes pourraient impacter la réponse au tamoxifène. Nowell *et al.* ont rapporté que les patientes présentant le génotype *SULT1A1*2/*2*,

entraînant une diminution de l'activité enzymatique, avaient un risque de mort trois fois plus important que les patientes avec le génotype **1/*1* et **1/*2* [252]. D'après ces résultats, les patientes avec une diminution de la sulfatation de métabolites actifs auraient un risque plus élevé de mort que les autres patientes ce qui semble le contraire de l'hypothèse posée. Néanmoins, les études consécutives n'ont pas reproduit ces résultats [242,251,253,254]. Récemment, Sanchez-Spitman *et al.* ont démontré que les patientes avec une diminution de l'activité du SULT1A1 due à la présence des polymorphismes génétiques rs6839 et rs1042157 dans la région 3′ non traduite (UTR) du gène *SULT1A1*, avaient une meilleure réponse au traitement en termes de survie sans récidive, mais le résultat était à la limite de significativité [160]. Ainsi, à ce jour, on ne peut pas conclure concernant l'impact des polymorphismes génétiques du *SULT1A1* sur la réponse au tamoxifène.

3.10.7 UGT

Concernant les polymorphismes génétiques des UGTs impliqués dans l'inactivation de l'endoxifène et 4-hydroxytamoxifène, aucune corrélation entre le génotype *UGT2B7*2* et la survenue des rechutes n'a été observée dans l'étude ATAC [227]. De même, dans une autre étude, aucune corrélation avec la réponse clinique n'a été observée pour le polymorphisme *UGT2B15**2 [242]. En revanche, Nowell *et al.* ont rapporté que les patientes avec le génotype *UGT2B15*2* présentaient une tendance vers une diminution de survie sans rechute. Cependant, aucune corrélation avec la survie globale n'a été observée [255].

3.10.8 Transporteurs d'efflux de la famille ABC

L'étude de Kiyotani *et al.* réalisée dans une population japonaise, a démontré une relation significative entre le SNP rs3740065 de l'*ABCC2*, entraînant l'augmentation de l'expression ou de l'activité d'ABCC2, et la survie sans rechute avec une augmentation de risque chez les patientes homozygotes et hétérozygotes mutées [131]. Une étude récente a démontré la prolongation de temps jusqu'à la progression chez les patientes pré-ménopausées avec une diminution de l'activité de ABCB1 due à la présence de deux allèles variants de SNP rs1045642 [233]. Le risque de survenue d'effets indésirables gynécologiques et vasomoteurs a également été augmenté chez les porteuses de deux allèles variants pour ce SNP. Dans une autre étude, les patientes homozygotes sauvages pour le même SNP du ABCB1 avaient un temps

jusqu'à rechute plus court que les patientes hétérozygotes et homozygotes mutées [256]. Ces résultats suggèrent que l'efficacité du tamoxifène peut être diminuée chez les patientes avec une augmentation de l'activité des pompes d'efflux due à la diminution des concentrations intracellulaires d'endoxifène.

3.11 Relation pharmacocinétique-pharmacodynamie

3.11.1 Efficacité

La relation significative entre la dose et l'efficacité du tamoxifène a été mise en lumière pour la première fois par l'EBCTCG dans une méta-analyse de plusieurs études cliniques. En effet, la réduction des rechutes était significativement plus importante dans les études évaluant des doses supérieures à 20 mg/jour par rapport à la dose 20 mg/jour [51].

La relation entre les concentrations plasmatiques d'endoxifène et la survenue de rechutes chez les patientes avec un cancer du sein en situation adjuvante a été décrite pour la première fois par l'équipe de Madlensky *et al.* L'analyse rétrospective des données de l'étude WHEL (Women's Healthy Eating and Living) de 1370 patientes ménopausées a permis d'identifier un seuil de concentration plasmatique d'endoxifène de 5.97 ng/mL (correspondant au 16 nmol/L) associé à une diminution du 26% de risque de récidive (HR = 0.74, CI95% = 0.55 – 1.00) [120]. Les concentrations plasmatiques d'autres métabolites n'ont pas été significativement associées à l'efficacité du tamoxifène. Saladores *et al.* ont confirmé ces résultats dans une cohorte de 306 patientes pré-ménopausées [119]. Chez les patientes avec des faibles concentrations d'endoxifène (< 14 nmol/L), une tendance pour une plus courte survie sans rechute à distance a été observée par rapport aux patientes avec des concentrations d'endoxifène supérieures à 35 nmol/L (HR = 1.94, CI95% = 1.04 – 4.14, p = 0.064). De même, aucune relation significative entre la réponse clinique et les concentrations d'autres métabolites n'a été observée. Helland *et al.* ont mis en évidence une relation significative entre l'efficacité du tamoxifène et les concentrations de 4-hydroxytamoxifène et l'endoxifène dans une cohorte de 86 patientes [257]. Les patientes présentant des concentrations de 4-hydroxytamoxifène inférieures ou égales à 3.26 nmol/L ou d'endoxifène inférieures ou égales à 9 nmol/L avaient une moins bonne réponse au traitement en termes de survie spécifique au cancer du sein (HR = 3.56, CI95% = 1.14 – 11.07, p = 0.02 et HR = 3.73, CI95% = 1.05 – 13.22, p =

0.029, respectivement). Enfin, de Vries Schultink *et al.* ont proposé un score d'activité antiestrogénique tenant compte des concentrations de tamoxifène, *N*-desmethyltamoxifène, 4-hydroxytamoxifène et endoxifène en se basant sur l'hypothèse que non seulement l'endoxifène mais aussi d'autres métabolites de tamoxifène possédant l'activité antiestrogénique contribuent à son effet antitumoral [258]. En ré-analysant les patientes de l'étude WHEL, une diminution du risque de récidive de 33% a été observée chez les patientes avec un score d'activité antiestrogénique supérieur ou égal à 1798 (HR = 0.67, CI95% = 0.47 – 0.96), mais le bénéfice d'utilisation de ce score reste comparable à celui de la concentration d'endoxifène.

Ces résultats prometteurs n'ont pas été confirmés dans deux grandes études prospectives. L'étude hollandaise CYPTAM a été réalisée dans une cohorte de 667 patientes en situation adjuvante [236]. Dans cette étude, aucune corrélation entre la survie sans rechute et les concentrations d'endoxifène analysées comme variable continue ou en divisant les patientes en fonction du seuil proposé par Madlensky *et al.* (16 nmol/L) n'a été observée (HR ajusté = 0.991, CI95% = 0.946 – 1.038, p = 0.691 et HR ajusté = 1.583, CI95% = 0.719 – 3.29, p = 0.267, respectivement). Enfin, les travaux de Neven *et al.* portant sur une cohorte de 247 patientes traitées par tamoxifène en situation néoadjuvante ou métastatique ont montré l'absence de l'association entre les concentrations d'endoxifène ou d'autres métabolites et le taux de réponse objective [235]. Ces résultats négatifs provenant d'études prospectives ont remis en question le bénéfice clinique de l'adaptation de dose du tamoxifène. Des études supplémentaires portant sur un nombre de patientes plus important et avec un suivi plus long sont donc nécessaires afin de conclure quant à l'existence d'une relation entre la pharmacocinétique et l'efficacité du tamoxifène. En effet, de Vries Schultink *et al.* [259] ont démontré par simulation que pour mettre en évidence une diminution du risque de rechute de 29% chez les patientes en situation adjuvante avec des concentrations d'endoxifène supérieures au seuil de 16 nmol/L, un suivi de 15 ans et l'inclusion de 1500 patientes seraient nécessaires. Il est à noter que l'étude CYPTAM ne disposait que d'une puissance d'environ 30% pour détecter une association statistiquement significative entre le seuil des concentrations d'endoxifène et la survie sans rechute (effet à démontrer HR = 0.71, nombre de patientes = 667, durée de suivi = 10 ans). En plus de ces résultats, Goetz *et al.* ont récemment montré que les éléments du design de l'étude CYPTAM tels que le pré-traitement par chimiothérapie chez 68% de la population, les

changements vers des inhibiteurs de l'aromatase au cours de l'étude, l'inclusion des patientes ayant initié le tamoxifène jusqu'à 12 mois auparavant, le censoring des données et la puissance discutée ci-dessus n'étaient pas suffisants pour répondre à la question posée [260].

3.11.2 Toxicité

De nombreuses études ont été effectuées afin d'évaluer la valeur prédictive des concentrations plasmatiques de tamoxifène et ses métabolites dans la survenue des toxicités. Gallicchio *et al.* ont rapporté une corrélation positive entre la survenue d'effets indésirables rapportés par les patientes et les concentrations de tamoxifène dans une population de 99 patientes [261]. Lorizio *et al.* ont mis en évidence une relation significative entre les concentrations d'endoxifène et la survenue d'effets indésirables tels que les bouffées de chaleur, les sécheresses vaginales, les problèmes de sommeil ou encore la prise de poids dans une population de 241 patientes [63]. De plus, une tendance pour les concentrations plus faibles de 4-hydroxytamoxifène chez les patientes sans effet indésirable a été observée. Enfin, Helland *et al.* ont récemment mis en évidence une relation significative entre les taux plasmatiques élevés de tamoxifène, 4'-hydroxytamoxifène et *N*-oxyde tamoxifène et la sécheresse vaginale chez 220 patientes [262]. En revanche, des résultats contradictoires ont également été rapportés. Baxter *et al.* ont observé une corrélation inverse entre les concentrations d'endoxifène et la survenue des bouffées de chaleur [141]. Ainsi, les patientes plus fortement exposées à l'endoxifène avaient moins de risque d'avoir les bouffées de chaleur. Jager *et al.* n'ont observé aucune corrélation entre la survenue des bouffées de chaleur ni leur sévérité chez 109 patientes [263]. Cependant, les données sur la survenue des bouffées de chaleur ont été recueillies rétrospectivement ce qui pouvait être à l'origine d'un biais de mémoire (« *recall bias* »). Enfin, une étude prospective sur une cohorte de 410 patientes a rapporté l'absence de corrélation entre la survenue et l'intensité des bouffées de chaleur et les concentrations de tamoxifène, 4-hydroxytamoxifène et endoxifène [241]. De même, la survenue des bouffées de chaleur n'a pas été associée aux concentrations d'endoxifène dans les travaux de Fox *et al.* [88].

3.12 Individualisation de traitement par tamoxifène

Malgré une bonne efficacité clinique du tamoxifène, approximativement 25% des patientes présentent une rechute dans les 15 ans suivant le premier diagnostic de cancer [51]. De ce fait, identifier les patientes à risque de mauvaise réponse au traitement ou à risque accru de toxicité permettrait d'adapter individuellement la posologie et assurerait une meilleure prise en charge thérapeutique. En effet, les patientes avec les phénotypes CYP2D6 PM et IM présentent des concentrations de métabolites actifs significativement plus faibles que les patientes NM et UM. Néanmoins, les résultats contradictoires concernant l'efficacité clinique chez les patientes avec les phénotypes CYP2D6 PM et IM n'ont pas permis d'établir de recommandations sur le choix de dose. L'hétérogénéité méthodologique peut être à l'origine de ces discordances. A titre d'exemple, on peut notamment citer des différences méthodologiques concernant la source d'ADN utilisée pour le génotypage (tissu tumoral, sang), la durée de traitement par tamoxifène (moins de 5 ans, 5 ans ou 10 ans), le design de l'étude (prospective ou rétrospective), le nombre de variants génétiques de CYP2D6 analysés, les critères de jugement (survie sans rechute, survie sans maladie, survie globale …) et enfin le traitement concomitant par inhibiteurs de CYP2D6 non rapporté au cours de l'étude. La critique majeure repose sur la détermination du génotype germinal effectuée sur les tissus tumoraux. En effet, il a été décrit que la perte de hétérozygotie du chromosome 22 où est localisé le gène du *CYP2D6* (22q13.1) est très fréquente dans le cancer du sein [264,265]. De ce fait, si la patiente est une hétérozygote pour l'allèle **4* et que dans la tumeur la perte d'un allèle est survenue, le génotypage effectué sur l'ADN tumoral chez cette patiente entraîne une mauvaise classification en phénotype CYP2D6 (l'attribution de génotype **1*/**1* ou **4*/**4* aux patientes qui sont en réalité porteuses d'un génotype **1*/**4*). L'analyse *a posteriori* des fréquences des génotypes rapportés dans l'étude Regan *et al.* [228] a démontré une déviation significative de l'équilibre de Hardy-Weinberg tandis que l'étude Rae *et al.* [227] ne présente pas d'information nécessaire pour pouvoir juger de la qualité des données génétiques [265,266]. En conséquence, les résultats négatifs rapportés par Regan *et al.* (étude BIG 1-98) et Rae *et al.* (étude ATAC) ont été remis en question.

Les études effectuées par la suite ont démontré que le phénotype/génotype CYP2D6 explique seulement 38 à 42% de la variabilité des concentrations plasmatiques d'endoxifène [132,133]. De ce fait, le TDM basé

directement sur les concentrations plasmatiques d'endoxifène à l'état d'équilibre semble être la meilleure méthode pour optimiser la dose de tamoxifène en pratique clinique. De plus, il a été montré que le seuil de concentration d'endoxifène de 5.97 ng/mL (16 nmol/L) proposé par Madlensky *et al.* [120] n'est pas atteint chez environ 95 – 100%, 50 – 55% et 13 – 19% des patientes présentant un phénotype CYP2D6 PM, IM et NM, respectivement [133,267]. Cependant, les résultats prometteurs de l'étude de Madlensky *et al.* n'ont pas été confirmés par d'autres études prospectives ce qui, à ce jour, ne permet pas de valider l'implémentation du TDM de l'endoxifène dans la pratique clinique.

3.12.1 Faisabilité de l'adaptation de dose

Les tentatives de mise en évidence d'une relation exposition-réponse thérapeutique n'ont pas permis de confirmer le seuil de concentration d'endoxifène qui pourrait être utilisé pour le TDM. Néanmoins, plusieurs études ont évalué la faisabilité de l'adaptation de dose basée sur la connaissance du phénotype/génotype CYP2D6 ou des concentrations plasmatiques de l'endoxifène.

L'adaptation de dose du tamoxifène dans les travaux d'Irvin *et al.* a été effectuée sur la base du phénotype CYP2D6. L'escalade de dose de 20 à 40 mg/jour chez les patientes CYP2D6 IM et PM a induit une augmentation significative des concentrations d'endoxifène par rapport à la baseline. Ainsi, les patientes IM ayant reçu une dose de 40 mg/jour ont atteint le même niveau de concentration que les patientes NM à la dose standard (20 mg/jour). L'augmentation de dose à 40 mg/jour chez les patientes PM n'a pas été suffisante pour atteindre les taux observés chez les NM [268]. L'extension de cette étude sur une cohorte de 500 patientes a confirmé ces résultats et a démontré l'absence de détérioration de la qualité de vie des patientes ayant suivi l'augmentation de dose [114]. Kiyotani *et al.* ont rapporté une étude d'escalade de dose basée sur le génotype CYP2D6 [86]. L'augmentation de dose à 30 et 40 mg/jour chez les patientes avec le génotype *CYP2D6*1/*10* ou **10/*10*, respectivement, a entraîné une augmentation des concentrations d'endoxifène et 4-hydroxytamoxifène aux niveaux observés chez les patientes avec le génotype **1/*1* et traitées par une dose standard (20 mg/jour), sans augmentation de toxicité.

Au vu de la grande variabilité des concentrations d'endoxifène dont seulement une partie peut être expliquée par l'activité de CYP2D6, le TDM semble une meilleure option pour l'adaptation de dose du

tamoxifène. Différents seuils de concentrations ont été utilisés dans les études évaluant la faisabilité du TDM d'endoxifène.

L'escalade de dose dans l'étude de Barginear *et al.* a été basée sur le seuil de concentration d'endoxifène de 40 nmol/L [269]. Ce seuil a été établi dans les études *in vitro* comme une concentration optimale pour l'inhibition de la prolifération cellulaire hormonodépendante dans le cancer du sein [30]. L'augmentation de dose de 20 à 30 mg/jour chez les patientes avec des concentrations d'endoxifène inférieures à 40 nmol/L a généré une augmentation moyenne de 49% et 75% des concentrations de l'endoxifène et 4-hydroxytamoxifène, respectivement, chez 90% de la population étudiée. L'apparition ou l'augmentation de l'intensité des effets indésirables a été notée chez 20% des patientes. Dans l'étude de Dezentje *et al.*, l'escalade de dose a été effectuée chez les patientes avec les phénotypes CYP2D6 PM et IM [270]. La dose adaptée a été calculée à partir de la concentration individuelle d'endoxifène mesurée à la baseline pour atteindre le même niveau de concentration que la moyenne observée chez les patientes avec le phénotype CYP2D6 NM à la dose standard (20 mg/jour). Ainsi, une dose moyenne de 46 mg/jour (intervalle 30 – 100) et de 90 mg/jour (60 – 120) a été administrée chez les CYP2D6 IM et PM, respectivement. Après l'ajustement de dose, les CYP2D6 IM ont atteint le même niveau de concentrations d'endoxifène que les CYP2D6 NM. En revanche, suivant l'escalade de dose, les concentrations d'endoxifène chez les CYP2D6 PM ont été significativement augmentées par rapport à la baseline mais n'ont pas atteint le niveau de CYP2D6 NM. Cependant, toutes les patientes ont atteint le seuil de 16 nmol/L. Enfin, aucune augmentation de toxicité n'a été observée due à l'escalade de dose pendant la durée de l'étude (2 mois). La faisabilité du TDM a également été démontrée dans une étude récente publiée par Fox *et al.* basée sur un seuil de concentration d'endoxifène de 30 nmol/L (niveau moyen dans un sous-groupe initial) [88]. Au cours de l'étude, un seuil de 15 nmol/L a également été sélectionné basée sur les résultats de Madlensky *et al.* et Saladores *et al*. Ainsi, l'augmentation de dose par pallier de 20 et 10 mg/jour a été effectuée pour les patientes dont la concentration d'endoxifène était inférieure à 15 nmol/L et à 30 nmol/L, respectivement, jusqu'à ce qu'une concentration supérieure ou égale à 30 nmol/L ait été atteinte (la dose maximale était de 60 mg/jour). Après l'escalade de dose, 96% et 69% des patientes ont atteint les concentrations cibles de 15 et 30 nmol/L respectivement.

En conclusion, ces études ont démontré la faisabilité de l'adaptation de dose basée soit sur le phénotype/génotype CYP2D6 soit sur les concentrations plasmatiques d'endoxifène. Cependant, à ce jour, la relation exposition-efficacité du tamoxifène n'a pas été clairement démontrée et d'autres études prospectives sont nécessaires pour pouvoir implémenter le TDM de l'endoxifène en pratique clinique courante.

4 Généralités sur le létrozole

4.1 Propriétés physico-chimiques

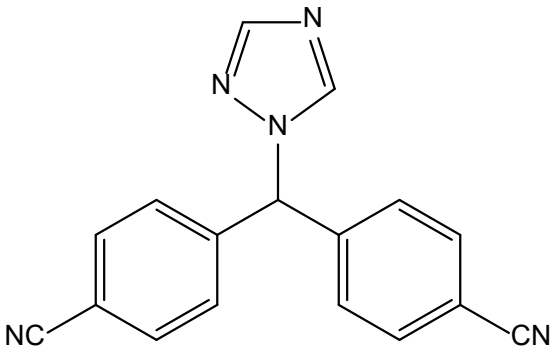


Figure 6 Structure chimique du létrozole.

Le létrozole ou 4,4'-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethylene)dibenzonitrile est un inhibiteur de l'aromatase non-stéroïdien (type II) appartenant à la troisième génération. Sa structure chimique est présentée sur la Figure 6. Le létrozole est une poudre cristalline de couleur blanche à jaunâtre, sans odeur, facilement soluble dans le dichlorométhane, légèrement soluble dans l'éthanol et pratiquement insoluble dans l'eau. Sa masse molaire est de 285.31 g/mol. Le létrozole est caractérisé par un log P de 2.5 et un pKa_1 (forme monoproton) calculé de 1.6. Selon la classification BCS, le létrozole est un composé de classe I avec une forte solubilité et une forte perméabilité. Il est commercialisé sous le nom Femara® par le laboratoire Novartis à une dose unique de 2.5 mg pour l'administration par voie orale.

4.2 Propriétés pharmacodynamiques

Le létrozole est un inhibiteur puissant et sélectif ciblant l'enzyme de l'aromatase dans les tissus périphériques et les cellules cancéreuses. *In vitro*, dans les cellules du cancer du sein ER+ transfectées avec le gène de l'aromatase (MCF-7Ca), le létrozole entraîne une forte inhibition de l'aromatase avec une IC_{50} de 0.07 nmol/L [271]. L'activité anti-tumorale du létrozole a été observée dans des études *in vivo* chez la souris ovariectomisée xénogreffée par la lignée cellulaire MCF-7Ca. Le létrozole entraîne une inhibition dose-dépendante de la croissance tumorale et induit une régression tumorale [272–274].

Différentes études chez des patientes ménopausées ont mis en évidence une forte suppression de l'aromatisation générale dans le corps par le létrozole dans l'intervalle de doses 0.1 – 5 mg/jour [275–277]. La suppression de l'activité de l'aromatase intratumorale a été démontrée par Geisler *et al.* où les taux de l'estradiol, l'estrone et l'estrone sulfate dans la tumeur des patientes ménopausées ont été diminués de 97.6%, 90.7% et 90.1% respectivement, après 4 mois de traitement par létrozole 2.5 mg/jour [278].
Le létrozole possède une activité inhibitrice sélective envers l'aromatase comme l'indique l'absence d'impact sur la stéroïdogenèse surrénalienne ainsi que sur les taux de 17α-hydroxy progestérone, thyréostimuline, hormone lutéinisante (LH), hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'androstènedione observé dans plusieurs études cliniques [279,280].

4.3 Efficacité clinique

A l'heure actuelle, le létrozole peut être prescrit dans les indications suivantes:

- Traitement adjuvant du cancer du sein ER+ et/ou PR+ à un stade précoce chez la femme ménopausée;
- Prolongation du traitement adjuvant du cancer du sein à un stade précoce chez la femme ménopausée ayant préalablement reçu un traitement adjuvant standard par tamoxifène pendant 5 ans;
- Traitement de première intention du cancer du sein ER+ et/ou PR+ à un stade avancé chez la femme ménopausée;
- Traitement du cancer du sein à un stade avancé chez la femme ménopausée (ménopause naturelle ou artificielle), après rechute ou progression de la maladie chez les femmes antérieurement traitées par antiestrogènes.

L'efficacité du létrozole dans ces différentes indications a été évaluée au cours d'études cliniques.

4.3.1 Cancer du sein au stade avancé

Plusieurs études de phase 1et 2 ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité du létrozole dans le traitement du cancer du sein au stade avancé. Ces études ont mis en évidence la diminution des taux d'estrogènes

circulant pour toutes les doses étudiées (0.1, 0.5 et 2.5 mg/jour) ainsi qu'une bonne efficacité avec des réponses complètes et partielles observées à chaque palier de doses. L'incidence des effets indésirables était similaire entre différents niveaux de doses [279–282].

L'étude de phase 3 randomisée en double aveugle a comparé l'efficacité de deux doses de létrozole (0.5 et 2.5 mg/jour) au mégestrol chez les patientes ménopausées [283]. Le létrozole 2.5 mg/jour était supérieur à la dose de 0.5 mg/jour et au mégestrol en termes de taux de réponse globale (24% versus 13% et 16% respectivement). De plus, le temps jusqu'à progression était significativement plus long dans le bras 2.5 mg/jour que 0.5 mg/jour ($p = 0.02$) mais similaire à celui du bras mégestrol ($p = 0.07$). En termes de survie globale, un effet dose a été observé en faveur d'une dose de 2.5 mg/jour du létrozole par rapport à la dose 0.5 mg/jour ($p = 0.03$).

Une étude de phase 3 randomisée en double-aveugle a comparé l'efficacité du létrozole au tamoxifène comme traitement de première ligne du cancer du sein au stade avancé chez les femmes ménopausées [47,284]. Le létrozole a réduit le risque de progression de 30% par rapport au tamoxifène (HR = 0.70, CI95% = 0.60 – 0.82, $p < 0.0001$). De plus, le temps médian jusqu'à la progression a été prolongé de 57%, passant de 6.0 mois avec le tamoxifène à 9.4 mois avec le létrozole.

Plus récemment, une étude de phase 3 randomisée en double aveugle (PALOMA-2) a comparé l'efficacité de l'association thérapeutique létrozole plus palbociclib (inhibiteur CDK 4-6) versus létrozole plus placebo chez les patientes ménopausées avec un cancer du sein au stade avancé ER+/ERBB2- qui n'ont pas reçu de traitement systémique antérieur [285]. Après un suivi médian de 3.2 ans, la survie sans progression médiane était de 2.3 ans dans le bras létrozole plus palbociclib versus 1.2 ans dans le bras létrozole plus placebo (HR = 0.56, $p < 0.0001$). Le palbociclib en association avec un inhibiteur de l'aromatase est désormais indiqué dans le traitement du cancer du sein avancé ER+/ERBB2- chez les patientes ménopausées.

4.3.2 Cancer du sein en situation adjuvante

L'étude Breast International Group (BIG) 1-98 est une étude de phase 3, randomisée en double aveugle comparant 4 groupes:

1) 5 ans de létrozole

2) 5 ans de tamoxifène

3) un traitement séquentiel de 2 ans de létrozole suivi de 3 ans de tamoxifène

4) un traitement séquentiel de 2 ans de tamoxifène suivi de 3 ans de létrozole

chez les femmes ménopausées avec un cancer du sein hormonodépendant en situation adjuvante [286]. La première analyse effectuée après un suivi médian de 25.8 mois a révélé que la survie sans maladie (définie comme le temps jusqu'à une rechute locorégionale, rechute à distance ou apparition d'un cancer controlatéral ou un autre cancer et mort non précédée par un événement lié au cancer) a été significativement plus longue dans le groupe du létrozole que dans le groupe du tamoxifène (HR = 0.81, CI95% = 0.70 – 0.93, p = 0.003). Les taux de survie estimés à 5 ans étaient de 84.0% et 81.4% dans le groupe du létrozole et tamoxifène, respectivement. Une mise à jour des résultats de cette étude après un suivi médian de 4.25 ans a confirmé le bénéfice du létrozole en termes de survie sans rechute par rapport au tamoxifène (HR = 0.82, CI95% = 0.71 – 0.95, p = 0.007) [59]. Une dernière actualisation a mis en évidence une tendance pour l'amélioration de la survie globale en faveur du létrozole avec une survie à 5 ans de 91.8 % sous létrozole contre 90.9 % sous tamoxifène (HR = 0.87, CI95% = 0.75 – 1.02, p = 0.08) [287]. Enfin, cette étude a démontré que l'hormonothérapie séquentielle n'apporte pas de bénéfice par rapport au létrozole seul mais n'est pas non plus moins efficace (létrozole versus tamoxifène suivi de létrozole: HR = 1.05, CI99% = 0.84 – 1.32; létrozole versus létrozole suivi de tamoxifène: HR = 0.96, CI99% = 0.76 – 1.21).

L'étude MA.17 (randomisée en double aveugle) a comparé l'efficacité de la prolongation de l'hormonothérapie adjuvante par 5 ans de létrozole versus placebo chez les femmes ménopausées ayant complété la thérapie adjuvante d'environ 5 ans par le tamoxifène [288,289]. L'analyse intermédiaire effectuée après un suivi médian de 2.4 ans a mis en évidence une diminution de 43% du risque de rechute locorégionale, rechute à distance, apparition de métastases ou d'un cancer controlatéral dans le bras létrozole par rapport au placebo (HR = 0.57, CI95% = 0.43 – 0.75, p = 0.00008). Le bénéfice absolu attendu à 4 ans de thérapie était de 4.6%. Cependant, la survie globale était similaire entre les deux bras (HR = 0.82, CI95% = 0.57 – 1.19, p = 0.3) sauf dans le sous-groupe de patientes dont la tumeur s'accompagnait d'un envahissement ganglionnaire chez lesquelles la survie globale était améliorée par rapport au placebo (HR = 0.61, CI95% = 0.38 – 0.98, p = 0.04). Au vu de ces résultats, l'étude a été

levée d'aveugle et environ 60% des patientes sous placebo ont choisi de changer le traitement pour le létrozole. Une mise à jour de cette étude après un suivi médian de 5.3 ans a confirmé les résultats précédents avec une meilleure survie sans maladie dans le bras létrozole versus placebo dans une analyse de l'intention à traiter (HR = 0.68, CI95% = 0.56 – 0.83, p < 0.001) et une survie globale similaire entre les deux bras (HR = 0.99, CI95% = 0.797 – 1.24, p = 0.83) [290].

L'étude MA.17R randomisée en double aveugle contrôlée contre placebo a évalué l'efficacité de 5 ans supplémentaires de létrozole versus placebo chez les patientes ayant déjà suivi 5 ans de létrozole précédés par 5 ans de tamoxifène [291]. Après un suivi médian de 6.3 ans, l'extension de la thérapie par le létrozole jusqu'à 10 ans a été associée à une prolongation du taux de survie sans maladie de 91% dans le bras placebo à 95% dans le bras létrozole (HR = 0.66, CI95% = 0.48 – 0.91, p = 0.01). Cependant, le taux de survie globale à 5 ans était similaire entre les deux bras (HR = 0.97, 95CI = 0.73 – 1.28, p = 0.83) et une augmentation de l'incidence des effets indésirables a été observée.

Enfin, une étude de phase 3 randomisée en double aveugle contrôlée contre placebo (NSABP B-42) a évalué l'efficacité de 5 ans de létrozole chez les patientes ayant suivi une thérapie de 5 ans par un inhibiteur de l'aromatase ou le tamoxifène [292]. Après un suivi médian de 6.9 ans, 5 ans supplémentaires de létrozole n'ont pas significativement amélioré la survie sans maladie par rapport au placebo (HR = 0.85, CI95% = 0.73 – 0.999, p = 0.048).

A ce jour, le létrozole est indiqué dans le traitement du cancer du sein chez les patientes ménopausées. Néanmoins, des études cliniques réalisées chez la femme pré-ménopausée avec suppression de la fonction ovarienne ont aussi été rapportées. L'étude HOBOE (Hormonal Bone Effects) est un essai de phase 3 comparant l'efficacité du létrozole seul, au létrozole plus acide zolédronique, et au tamoxifène seul, chez les patientes pré-ménopausées avec un cancer du sein au stade précoce avec suppression de la fonction ovarienne obtenue par l'administration de la triptoréline (analogue de l'hormone de libération des gonadotrophines, GnRH) [293]. Après un suivi médian de 64 mois, le taux de survie sans maladie était de 85.4%, 93.2% et 93.3% dans le groupe tamoxifène seul, létrozole seul et létrozole plus acide zolédronique, respectivement. En revanche, les effets indésirables de grade 3 à 4 ont été rapportés chez 4.2%, 6.9% et 9.1% des patientes dans le bras tamoxifène, létrozole et létrozole plus acide zolédronique, respectivement. En conclusion, la thérapie par létrozole plus acide zolédronique améliore

significativement la survie sans maladie chez les patientes pré-menopausées avec suppression de la fonction ovarienne par rapport au traitement par tamoxifène mais est associée à un risque plus important de toxicités.

4.3.3 Cancer du sein en situation néoadjuvante

Un essai randomisé en double aveugle a comparé le létrozole au tamoxifène chez les femmes ménopausées diagnostiquées d'un cancer du sein inéligibles à une chirurgie conservant le sein [294]. Après 4 mois de traitement, une réponse a été observée chez 60% des patientes du bras létrozole et 41% du bras tamoxifène ($p = 0.004$). De plus, 48% versus 36% ($p = 0.036$) des patientes dans le bras létrozole versus tamoxifène ont suivi une chirurgie conservant le sein avec succès. Enfin, chez les patientes présentant des tumeurs ER+, ERBB1+ et /ou ERBB2+ (15.2% de la population étudiée), plus de réponses ont été observées sous létrozole que sous tamoxifène (taux de réponse: 88% versus 21%, respectivement, $p < 0.0004$).

4.4 Effets indésirables

4.4.1 Profil de toxicité

Au cours de l'étude BIG 1-98, le létrozole a démontré un profil de toxicité relativement favorable [286]. Les effets indésirables (spécifiés dans le protocole) les plus fréquents étaient: l'hypercholestérolémie (44%), les bouffées de chaleur (33%), l'arthralgie (20%), les sueurs nocturnes (14%), la myalgie (6%), les fractures (6%), les hémorragies vaginales (3%), les accidents cardiaques (4%) et les accidents thromboemboliques (1%). Parmi ces effets indésirables, la majorité concerne des grades 1 et 2 tandis que les toxicités de grade 3-4 les plus fréquentes sont les accidents cardiaques (2%), les fractures (2%) et l'arthralgie (2%). Des effets indésirables graves ou fatals sont survenus chez 1.7% des patientes et comprennent les accidents vasculaires cérébraux, les accidents thromboemboliques et les accidents cardiaques. Davantage de patientes ont rapporté au moins un effet indésirable dans le bras létrozole que dans le bras tamoxifène, mais le nombre de patientes avec des toxicités graves ou fatales était similaire dans les deux bras (1.7%). Cependant, il a été noté une majoration du risque de fractures (5.7% versus 4%) et d'hypercholestérolémie (44% versus 19%) dans le bras létrozole. Néanmoins, la majorité était

de grade 1. Bien que le nombre d'accidents cardiovasculaires ait été similaire entre les deux bras, le létrozole a entraîné plus d'accidents cardiaques de grade ≥ 3 que le tamoxifène (2.1% versus 1.1%). L'arrêt de traitement est survenu chez 2.6% des patientes et était dû à l'arthralgie de grade 3 et 4.

Au cours de l'étude MA.17, une fréquence plus importante de bouffées de chaleur (47%) et de troubles musculo-squelettiques a été observée (45%) tandis que la fréquence d'autres effets indésirables était similaire [288]. En plus des toxicités rapportées dans l'étude BIG 1-98, il a également été rapporté la présence de fatigue (30%), œdèmes (17%), maux de tête (18%), vertiges (12%), constipation (10%), arthrite (6%) et ostéoporose (6%). Un arrêt du traitement dû aux effets indésirables a été noté chez 4.5% des patientes. Néanmoins, un nombre similaire de patientes a été arrêté dans le bras placebo (3.6%, p = 0.11).

Les données de pratique clinique courante montrent que l'apparition des effets indésirables est beaucoup plus importante dans la vraie vie que celle observée au cours des études cliniques [295,296]. En particulier, deux études observationnelles ont rapporté que les douleurs articulaires survenaient chez environ 50% des patientes dont plus de 60% étaient de l'intensité modérée ou sévère [297–299]. Une autre étude a rapporté que 71% des patientes présentaient au moins un effet indésirable lié à la thérapie adjuvante par létrozole [296]. L'arrêt de traitement dû à la survenue des effets indésirables, notamment de l'arthralgie et myalgie, survient chez environ 20-30% de patientes [296,299,300]. Malgré la toxicité importante du létrozole, une étude comparant la préférence des patientes pour le létrozole ou l'anastrozole, a démontré que 68% des patientes préféraient continuer la thérapie sous létrozole versus 32% sous anastrozole, notamment grâce à la meilleure qualité de vie, moins d'effets indésirables tels que la nausée, les bouffées de chaleur et les troubles abdominaux [301]. Il est à noter que les patientes traitées par hormonothérapie adjuvante ont généralement un faible risque de rechute. De ce fait, le choix de traitement (tamoxifène, inhibiteur de l'aromatase, traitement séquentiel) dépendra en grande partie du profil de toxicité de la molécule envisagée d'où la nécessité de maîtriser au mieux les risques associés à chaque traitement.

4.4.2 Accidents cardiovasculaires

Les estrogènes exercent une fonction protectrice sur les os, le système immunitaire, le système central nerveux et le système cardiovasculaire [302]. La diminution des taux d'estrogènes liée à l'administration

des inhibiteurs de l'aromatase pourrait réduire l'effet bénéfique des estrogènes sur la régulation du profil lipidique et, par conséquent, augmenter le risque d'accidents cardiovasculaires. En effet, une analyse destinée à étudier la prévalence des effets indésirables cardiovasculaires dans la cohorte de l'étude BIG 1-98 a rapporté que davantage d'accidents cardiovasculaires de grade 3 à 5 ont été observés sous létrozole que sous tamoxifène (2.4% versus 1.4%, p = 0.001) mais la fréquence des accidents cardiovasculaires de tous grades était similaire dans les deux bras (4.8% versus 4.7%) [70]. Cependant, au cours de l'étude MA.17 après un suivi médian de 2.5 ans, l'incidence des accidents cardiovasculaires était similaire entre létrozole et placebo (5.8% versus 5.6%, respectivement) [288]. Par ailleurs, des résultats contradictoires concernant l'impact du létrozole sur l'évolution du taux de cholestérol total, HDL et LDL, du taux des triglycérides et apolipoprotéine A ont été rapportés dans les études basées sur de petites cohortes de patientes [303–306]. Or, dans une étude prospective auxiliaire de l'essai clinique MA.17 (MA.17L), le létrozole a entraîné de faibles variations des taux d'HDL, LDL et triglycérides qui étaient sans importance clinique [307]. Compte tenu de l'activité cardioprotectrice du tamoxifène, il semble que l'incidence élevée des effets indésirables cardiovasculaires observée au cours de l'étude BIG 1-98 chez les patientes traitées par le létrozole par rapport aux patientes sous tamoxifène serait plutôt liée à l'effet protecteur du tamoxifène qu'à la toxicité cardiovasculaire du létrozole.

L'impact du létrozole et d'autres inhibiteurs de l'aromatase sur le risque cardiovasculaire est un sujet qui fait débat. Il est à noter que les patientes ménopausées avec un cancer du sein ont déjà un risque accru d'accidents cardiovasculaires, risque que le traitement par les inhibiteurs de l'aromatase pourrait encore augmenter. De plus, du fait des critères d'inclusion très sélectifs dans les études cliniques de phase 3, la prévalence des effets indésirables cardiovasculaires chez les patientes traitées par létrozole en pratique clinique courante (comorbidités, obésité, hypertension …) peut être beaucoup plus importante que celle observée au cours des essais cliniques. Actuellement, il n'y a pas d'indication formelle à la réalisation de bilan lipidique régulier chez les patientes traitées par les inhibiteurs de l'aromatase, sauf cas particulier [20].

4.4.3 Ostéoporose et fractures

Dans l'étude BIG 1-98, après 5 ans de suivi, la prévalence de l'ostéoporose du rachis lombaire et du col fémoral était plus importante dans le bras tamoxifène suivi par létrozole (14.5% et 7.1% pour rachis lombaire et col fémoral, respectivement) que dans le bras létrozole seul (4.3% et 5.1%), létrozole suivi de tamoxifène (4.2% et 1.4%) et tamoxifène seul (4% et 0%) [308]. De plus, l'incidence des fractures des os était plus importante dans le bras létrozole seul et dans le bras tamoxifène suivi par létrozole (9.8% et 9.4%, respectivement) que dans le bras tamoxifène seul et le bras létrozole suivi par tamoxifène (7.3% et 7.5%, respectivement). Cet effet défavorable sur les os qui est commun à tous les inhibiteurs de l'aromatase, a été à l'origine de plusieurs études évaluant les marqueurs de l'ostéoporose chez les patientes traitées par le létrozole [305,309]. Perez *et al.* ont étudié les marqueurs de la résorption osseuse et de la densité minérale osseuse chez les patientes incluses dans l'étude MA.17B [309]. Après 24 mois de suivi, une diminution de la densité minérale osseuse au niveau du col fémoral et au niveau du rachis lombaire a été observée chez les patientes traitées par létrozole par rapport aux patientes sous placebo (-3.6% versus -0.71%, p = 0.044 pour le col fémoral et 5.35% versus -0.70%, p = 0.008 pour le rachis lombaire). De plus, le nombre de patientes développant une ostéoporose au niveau du rachis lombaire a été plus important dans le bras létrozole que dans le bras placebo (4.1% versus 0%, p = 0.064).

En raison de l'altération de la densité osseuse par létrozole, il est actuellement conseillé d'effectuer une densitométrie osseuse à l'initiation du traitement et de la renouveler en fonction du T score initial dans le but d'évaluer les éventuelles altérations et de proposer un traitement à base de biphosphonates. En effet, il a été démontré que l'utilisation concomitante d'acide zolédronique chez les patientes sous létrozole entraîne une augmentation significative de la densité minérale osseuse comparé aux patientes sans ce traitement [310,311]. En cas d'ostéopénie, une densitométrie osseuse doit être renouvelée après 1 à 2 ans.

4.5 Propriétés pharmacocinétiques

4.5.1 Absorption

Après administration par voie orale, le létrozole est rapidement absorbé dans le tube digestif avec un T_{max} médian de 1 h [312]. La biodisponibilité absolue moyenne du létrozole après une administration orale de dose 2.5 mg est de 99.9%. Les concentrations plasmatiques de létrozole augmentent proportionnellement à la dose administrée après une administration de dose unique dans l'intervalle 0.1 – 10 mg. La pharmacocinétique est non-linéaire après l'administration de doses supérieures à 30 mg, probablement en raison de la saturation du métabolisme [313]. Après administration de doses répétées, l'AUC_{τ} augmente de manière proportionnelle à la dose administrée pour des doses allant jusqu'à 1.0 mg/jour. En revanche, après l'administration répétée de 2.5 et 5 mg/jour, l'AUC_{τ} augmente plus que la dose. De plus, l'AUC_{τ} à l'état d'équilibre est en moyenne 28% plus grande que l'$AUC_{0\text{-}inf}$ après une dose unique [314] suggérant une temps-dépendance de la cinétique du létrozole probablement liée à la saturation ou l'auto-inhibition de sa métabolisation via le CYP2A6 [315]. En effet, chez les patientes atteintes de cancer du sein, le $t_{1/2}$ du létrozole après la première administration d'une dose de 2.5 mg est de 82 h et augmente jusqu'à 118 h après administration réitérée [314]. En conséquence, l'état d'équilibre est atteint après environ 4 à 6 semaines de traitement par la dose recommandée de 2.5 mg/jour. La concentration moyenne du létrozole à l'état d'équilibre ($C_{moy,ss}$) pour la dose de 2.5 mg/jour est de 88.4 ng/mL [316].

4.5.2 Distribution

Le létrozole est rapidement et extensivement distribué dans les tissus. Son volume de distribution à l'état d'équilibre est de 183 L [314]. La fixation aux protéines plasmatiques est d'environ 60%, principalement à l'albumine (environ 55%) [317]. Les résultats des études *in vitro* chez la souris suggèrent que le létrozole peut être faiblement transporté par la P-gp mais pas par la BCRP [318] ce qui pourrait expliquer son passage par la barrière hémato-encéphalique chez le rat [319] et son efficacité contre les tumeurs cérébrales observée dans les études précliniques [320].

4.5.3 Métabolisme

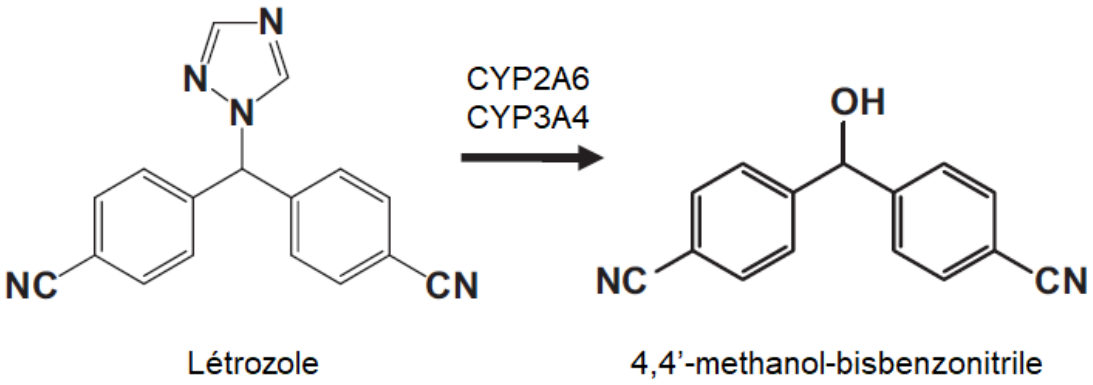


Figure 7 Schéma de métabolisation du létrozole [321].

Le létrozole est métabolisé dans le foie par le CYP2A6 et CYP3A4 en 4,4'-methanol-bisbenzonitrile, son métabolite principal dépourvu d'activité pharmacologique [316,321] (Figure 7). Un métabolite ketone a également été mentionné par le laboratoire fabricant mais d'autres études n'ont pas mis en évidence la présence de ce métabolite dans le plasma humain [316]. Il a été démontré *in vitro* que le létrozole est métabolisé principalement par le CYP2A6 lorsqu'il est présent à des concentrations faibles dans le foie tandis que, à des concentrations plus élevées, son métabolisme est catalysé par le CYP3A4 [321]. D'après les études *in vitro*, le létrozole est un inhibiteur puissant de CYP2A6 [315] De ce fait, la temps-dépendance de la pharmacocinétique du létrozole pourrait être expliquée par l'inhibition de son propre métabolisme par le CYP2A6.

4.5.4 Elimination

Après l'administration de létrozole radiomarqué, environ 88% de la radioactivité a été récupérée dans les urines et 4% dans les fèces sous forme de métabolite glucuronidé [322]. Seulement 6% de la dose administrée a été retrouvé dans les urines sous forme inchangée suggérant que l'élimination rénale du létrozole est négligeable [312]. En conclusion, le métabolisme hépatique par le CYP2A6 et le CYP3A4 et l'excrétion dans les fèces et les urines du métabolite sous forme conjuguée constitue la voie majeure de l'élimination du létrozole [312]. Après l'administration d'une dose intraveineuse chez les volontaires saines, la CL totale était de 2.21 L/h dont la composante rénale et métabolique était de 0.08 L/h et 2.1

L/h respectivement. La clairance métabolique du létrozole est plus faible que le débit sanguin hépatique (90 L/h) suggérant que la faible clairance du létrozole est due à sa faible clairance intrinsèque [312]. Après administration d'une dose de 2.5 mg par voie orale chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, les concentrations plasmatiques décroissent de manière mono exponentielle avec un $t_{1/2}$ de 82 h après une dose unique et de 118 h à l'état d'équilibre [314] probablement dû à la saturation ou l'inhibition de son propre métabolisme par le CYP2A6, évoquée ci-dessus. Des valeurs plus élevées de l'$AUC_{0\text{-}inf}$ et $t_{1/2}$ après une dose unique ont été observées chez les patientes atteintes d'un cancer du sein par rapport aux volontaires saines indiquant une élimination plus longue chez les patientes.

4.6 Facteurs influençant la pharmacocinétique du létrozole

4.6.1 Alimentation

La prise du létrozole avec le repas diminue le C_{max} (129 ± 20.3 nmol/L versus 98.7 ± 18.6 nmol/L à jeun et avec le repas, respectivement) et augmente le T_{max} de 1 h à 2 h indiquant une diminution de la vitesse d'absorption. En revanche, aucun effet n'a été observé sur l'étendue de l'absorption (ratio de l'$AUC_{0\text{-}inf}$ avec et sans repas = 0.98, CI95% = 0.92 – 1.05) [323]. Finalement, aucune différence de $t_{1/2}$ n'a été observée quand le létrozole a été administré avec ou sans la prise alimentaire. En conclusion, le létrozole peut être administré indépendamment du repas.

4.6.2 Ethnie

L'analyse de pharmacocinétique de population effectuée dans une population japonaise (femmes ménopausées, volontaires saines) a démontré que CL/*F* était environ 70% plus faible et le $t_{1/2}$ était environ 1.6 fois plus long que les valeurs décrites auparavant chez les femmes ménopausées issues de population caucasienne [324]. Ceci suggère une exposition plasmatique plus élevée chez les Asiatiques. Toutefois, la population étudiée était peu nombreuse (n = 24) et la variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques était importante. Ces différences de pharmacocinétique pourraient être expliquées en partie par la présence des polymorphismes génétiques du *CYP2A6* dont la fréquence varie en fonction de l'ethnie.

4.6.3 Facteurs démographiques

Les concentrations du létrozole augmentent avec l'âge et diminuent avec l'IMC [316,325]. En particulier, l'IMC explique 12% de la variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques du létrozole tandis que 4% de cette variabilité peut être expliquée par l'âge. L'augmentation du volume de distribution du létrozole avec l'augmentation de l'IMC serait à l'origine de la diminution des concentrations plasmatiques observées.

4.6.4 Insuffisance hépatique

Chez les volontaires avec une insuffisance hépatique modérée, une augmentation de l'AUC de 37% par rapport aux volontaires sains a été observée [326]. L'insuffisance hépatique sévère implique une multiplication par 2 de l'AUC et une réduction de 47% de la clairance systémique par rapport aux sujets sains. Chez ces patientes, il est recommandé d'administrer une dose de 2.5 mg tous les deux jours.

4.6.5 Insuffisance rénale

Compte tenu du fait que l'élimination rénale du létrozole est négligeable, un impact significatif de la fonction rénale sur la pharmacocinétique du létrozole n'est pas attendu. Dans une étude menée chez les volontaires sains avec différents degrés d'altération de la fonction rénale (étendue de la clairance de créatinine: 9 – 116 mL/min), aucune différence de profils pharmacocinétiques après administration d'une dose unique de 2.5 mg du létrozole n'a été observée [326]. Ainsi, l'adaptation de dose n'est pas nécessaire chez les patientes avec insuffisance rénale avec la clairance de la créatinine ≥ 10 mL/min.

4.6.6 Polymorphismes génétiques

4.6.6.1 CYP2A6

Étant donné que le CYP2A6 est l'enzyme majeure impliquée dans la métabolisation du létrozole, la variabilité de l'activité de cette enzyme pourrait avoir une conséquence sur son exposition plasmatique. Le CYP2A6 est exprimé principalement dans le foie où il représente 1 à 10% du contenu total en CYP [327]. Une grande variabilité interindividuelle de l'activité du CYP2A6 est observée. Ceci est attribué

principalement aux variations génétiques du gène codant pour le CYP2A6 puisque plus de 40 polymorphismes génétiques ont été décrits dans la littérature dont la fréquence varie en fonction de l'ethnie [328]. Les polymorphismes génétiques du CYP2A6 les plus souvent rencontrés dans la population caucasienne sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 Variants génétiques du *CYP2A6* et leur fréquence dans la population caucasienne. D'après Tanner *et al.* [328].

Allèle variant	rs ID	Substitution	Conséquence	Impact fonctionnel	Fréquence allélique (%)		
					Caucasiens	Africains	Asiatiques
**1B*	-	-	Conversion du gène 58 bp avec *CYP2A7*	Augmentation de stabilité de mRNA et de l'activité enzymatique	28 – 35	11 – 18	26 – 57
**1X2A* et *B*	-	-	Duplication du gène	Augmentation de l'expression mRNA et de l'activité enzymatique	0 – 1.7	0	0 – 0.4
**2*	rs1801272	1799T>A	Leu160His	Diminution importante de l'activité enzymatique	1.1 – 5.3	0 – 1.1	0
**4*	-	-	Délétion du gène entier	Pas d'expression de mRNA	0.1 – 4.2	0.5 – 2.7	4.9 – 24
**5*	rs5031017	6582G>T	Gly479Val	Diminution de l'activité enzymatique	0 – 0.3	0	0 – 1.2
**7*	rs5031016	6558T>C	Ile471Thr	Diminution de l'activité enzymatique	0 – 0.3	0	2.2 – 13
**9*	rs28399433	− 48T>G	SNP du promoteur, interruption de box TATA (A>C)	Diminution de l'expression de mRNA et de la protéine	5.2 – 8.0	5.7 – 9.6	16 – 22
**12*	esv2663194	Exons 1-2 du gène *CYP2A7*, exons 3-9 du gène *CYP2A6*	Substitution de 10 acides aminés	Diminution de l'activité enzymatique	0 – 0.3	0 – 0.4	0 – 0.8
**18*	rs1809810	5668A>T	Tyr392Phe	Diminution de l'activité enzymatique	1.1 – 2.1	0	0 – 0.5
**21*	rs6413474	6573A>G	Lys476Arg	Diminution de l'activité enzymatique	0 – 2.3	0 – 0.6	0 – 3.4

Dans la population caucasienne, le variant génétique produisant une protéine non-fonctionnelle les plus fréquent est l'allèle **2* avec une fréquence de 1.1 – 5.3% tandis que l'allèle **4* est associé à la délétion du gène entier entraînant ainsi l'absence de la protéine avec une fréquence de 0.1 – 4.2%. L'allèle **9* entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la protéine et sa fréquence dans la population caucasienne est de 5.2 – 8.0%. Il a été démontré que les patients avec un génotype **1/*9* présentent une diminution d'environ 30% de l'activité enzymatique du CYP2A6 [329,330]. De plus, les duplications du gène *CYP2A6* sont à l'origine de l'augmentation de l'activité enzymatique. Compte tenu de la complexité de l'analyse du génotype du CYP2A6, une classification en phénotype a été proposée [331]. Ainsi, les porteurs d'un ou deux allèles sans activité enzymatique (p. ex. **1/*2* et **2/*2*) ou de deux allèles à l'activité réduite (p. ex. **9/*9*) ou d'un allèle sans activité et un allèle à l'activité réduite (p. ex. **2/*9*) sont classés en *slow metaboliser* (SM). Les porteurs d'un allèle à l'activité réduite (p. ex. **1/*9*) sont classés en *intermediate metaboliser* (IM) tandis que les individus qui n'ont pas d'allèles mutés (**1/*1*) sont classés en *normal metaboliser* (NM). Enfin, la présence de plus de deux copies de gène sans allèle muté entraîne un classement en *ultrarapid metaboliser* (UM). La fréquence des phénotypes SM, IM et NM dans la population américaine majoritairement caucasienne est de 8%, 15% et 77%, respectivement [316].

L'impact du génotype du *CYP2A6* sur la métabolisation du létrozole a été démontré dans une étude *in vitro* où l'oxydation du létrozole était significativement réduite dans les échantillons de microsomes de foie humain (« *human liver microsomes* », HLM) provenant d'individus porteurs de génotypes **1/*4*, **4/*4*, **4/*9* et **1/*7* par rapport aux porteurs d'un génotype sauvage **1/*1* [321]. Deux études cliniques ont montré que des concentrations plus élevées de létrozole ont été observées chez les patientes avec une diminution de l'activité enzymatique du CYP2A6 due à la présence des polymorphismes génétiques [316,325]. D'après ces études, environ 17-23% de la variabilité interindividuelle des concentrations du létrozole pourrait s'expliquer par le phénotype CYP2A6. Enfin, une étude de pharmacocinétique de population menée chez 24 volontaires sains issus de la population Japonaise a démontré que la CL/*F* du létrozole était 16% et 55% plus faible chez les hétérozygotes mutées et les homozygotes mutées, respectivement, pour les allèles **4*, **7* et **9*, par rapport aux homozygotes sauvages [324]. Contrairement à ces résultats, une autre étude japonaise n'a pas observé de relation significative entre la présence

d'allèle *CYP2A6*4* et la CL/*F* du létrozole. Néanmoins l'analyse comportait uniquement le génotypage de l'allèle **4* ce qui pourrait influencer les résultats [332].

4.6.6.2 CYP3A4/5

Les études *in vitro* ont démontré que le CYP3A4 intervenait dans le métabolisme du létrozole mais son implication serait plus prononcée à des concentrations élevées de létrozole [321]. Néanmoins, l'impact de l'allèle **22* sur la pharmacocinétique du létrozole n'a pas été étudié.

Concernant les polymorphismes génétiques du *CYP3A5*, aucune corrélation n'a été observée entre les allèles *CYP3A5*3*, *6 et **7* et les concentrations plasmatiques du létrozole [316]. De même, le génotype *CYP3A5*3* n'a pas été associé à la CL/*F* dans une étude japonaise [332].

4.6.7 Interactions médicamenteuses

Le létrozole est métabolisé par le CYP2A6 et le CYP3A4. De ce fait, l'administration concomitante d'inhibiteurs de ces enzymes pourrait diminuer l'élimination du létrozole et en conséquence, augmenter ses concentrations plasmatiques. De même, les inducteurs de CYP3A4 pourraient diminuer les concentrations plasmatiques du létrozole par l'induction de son métabolisme. *In vitro*, le métabolisme du létrozole a été diminué par le kétoconazole, inhibiteur fort de CYP3A et faible inhibiteur de CYP2A6, et la pilocarpine, un inhibiteur de CYP2A6, avec des valeurs de l'IC_{50} de 0.28 µmol/L et 8.2 µmol/L, respectivement [316]. Dans une étude évaluant l'interaction pharmacocinétique entre le létrozole et la cimetidine (inhibiteur de CYP2C et CYP3A), une diminution faible mais statistiquement significative de l'$AUC_{0\text{-}inf}$ de létrozole a été observée contrairement à l'effet attendu [313]. Dowsett *et al.* ont décrit une diminution de 38% des concentrations de létrozole liée à l'administration concomitante de tamoxifène [196]. Concernant les interactions médicamenteuses entre des inhibiteurs ou inducteurs de CYP2A6 et le létrozole, aucune donnée n'est disponible dans la littérature.

Les études *in vitro* ont démontré que le létrozole est un inhibiteur compétitif et puissant de CYP2A6 et un inhibiteur faible de CYP2C19 tandis que le métabolite a montré une inhibition modérée de CYP2C19 et CYP2B6 [315]. Au cours d'un essai clinique évaluant l'interaction médicamenteuse entre le létrozole et la warfarine (substrat de CYP2C9 avec une fenêtre thérapeutique étroite), aucun impact cliniquement

significatif sur les paramètres pharmacocinétiques ou pharmacodynamiques de la warfarine n'a été observé [326]. Enfin, le létrozole n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique du tamoxifène [195].

4.7 Méthodes de dosage

De nombreuses méthodes ont été développées et validées pour le dosage du létrozole dans les matrices biologiques [216,333–339]. La majorité d'entre elles permet la détéction et la quantification du létrozole simultanément avec d'autres molécules en raison de leur application au TDM des thérapies anticancéreuses [216,335] ou à l'étude des interactions médicamenteuses [336]. Par ailleurs, les méthodes permettant la quantification simultanée de létrozole et de ses métabolites carbinole et glucuronide de carbinole ont également été développées [334,339]. La matrice biologique humaine la plus couramment utilisée est le plasma et les urines. Les prises d'essai (50 – 150 µL) sont traitées par précipitation des protéines ou extraction en phase solide. Dans les méthodes les plus récentes, la séparation des analytes est effectuée en UPLC. La détéction se fait majoritairement en spéctrométrie de masse après ionisation par ESI ou turbo ion spray (TIS) en mode positif. La quantification est effectuée en mode SRM ou MRM. La gamme des concentrations plasmatiques quantifiables est habituellement comprise entre 1 – 200 ng/mL pour le létrozole, entre 0.2 – 15 nmol/L pour le métabolite carbinol et entre 2 – 150 nmol/L pour le glucuronide de carbinol [216,337,339].

4.8 Biomarqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique

Compte tenu de la grande variabilité de la pharmacocinétique du létrozole, due en partie aux polymorphismes génétiques du *CYP2A6*, les différences d'exposition plasmatique pourraient être à l'origine d'un risque accru d'effets indésirables chez certaines patientes et d'une manque d'efficacité chez d'autres. Ceci est d'autant plus important que la survenue des effets indésirables est à l'origine des arrêts de traitements chez environ 30% des patientes [340]. La possibilité d'identifier les patientes qui auraient un risque accru de toxicité ou de mauvaise réponse thérapeutique permettrait de proposer une dose personnalisée adaptée à chaque patiente.

Etant donné que le mécanisme d'action du létrozole consiste en la diminution des taux d'estrogènes, la quantification des estrogènes circulants pourrait être un marqueur de l'efficacité. Pourtant, il n'existe

aucune donnée montrant que chez les patientes qui ne présentent pas de suppression complète de l'activité de l'aromatase (taux détectables d'estrogènes), l'efficacité du traitement serait inférieure à celle observée chez d'autres patientes. De plus, aucune corrélation n'a été détectée entre les taux d'estrogènes et la survenue d'effets indésirables [300]. Par ailleurs, les concentrations maximales à l'équilibre ($C_{ss,max}$) du létrozole n'ont pas été associées aux concentrations d'estrogènes après 3 mois de traitement ou à la variation des concentrations des estrogènes par rapport à la baseline [341].

4.9 Relation pharmacocinétique-pharmacodynamie

Au cours de l'essai de phase 3 chez les patientes avec un cancer du sein avancé, une meilleure efficacité a été observée à la dose de 2.5 mg/jour qu'à la dose 0.5 mg/jour suggérant une relation entre l'exposition plasmatique et la réponse [283]. En effet, les auteurs ont observé une tendance pour une augmentation de temps jusqu'à la progression tumorale chez les patientes ayant une concentration résiduelle à l'état d'équilibre supérieure à 85.6 ng/mL [313,342]. Dans la même étude, les concentrations élevées de létrozole n'ont pas été associées à un risque accru de survenue d'effets indésirables. Dans une cohorte de 126 patientes l'arthralgie n'a pas été corrélée aux concentrations plasmatiques du létrozole [325]. Kadakia *et al.* ont rapporté les résultats similaires concernant d'autres effets indésirables [300].

Compte tenu de ces éléments, la relation entre l'exposition plasmatique et la réponse au traitement (efficacité, toxicité) nécessite d'être plus profondément étudiée afin de savoir si le suivi des concentrations plasmatiques du létrozole pourrait améliorer la prise en charge thérapeutique.

5 Pharmacocinétique de population

5.1 Approche en deux étapes

L'analyse classique des données pharmacocinétiques provenant de plusieurs individus est appelée « l'approche en deux étapes ». La première étape consiste à déterminer les paramètres pharmacocinétiques pour chaque individu. Ceci est effectué par analyse modèle indépendante (non-compartimentale) qui consiste à calculer l'aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps par la méthode de trapèzes. De ce fait, cette méthode nécessite un grand nombre de prélèvements par individu. Dans un deuxième temps, la moyenne des paramètres pharmacocinétiques ainsi que leurs écarts types sont calculés permettant ainsi d'étudier la distribution des paramètres dans la population. La variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques est souvent surestimée du fait de l'absence de prise en compte de l'erreur sur l'estimation des paramètres individuels. Néanmoins, l'approche en deux étapes reste une méthode largement utilisée entre autres dans les études de bioéquivalence.

5.2 Modèles non-linéaires à effets mixtes

Le concept de la pharmacocinétique de population a été introduit par Sheiner *et al.* en 1972 [343]. Cette approche consiste en l'analyse simultanée des données provenant de l'ensemble des individus. L'avantage de cette approche par rapport à l'approche en deux étapes est la possibilité d'analyser les données riches ou éparses. Ainsi, il est possible d'étudier la pharmacocinétique d'un médicament dans les populations où le nombre des prélèvements est limité par les raisons éthiques ou médicales.

L'analyse de population utilise la modélisation non-linéaire à effets mixtes. Le logiciel de référence utilisant cette approche est NONMEM (NON-linear Mixed Effects Models). Les modèles non-linéaires à effets mixtes contiennent deux types de variables (d'où l'acronyme « *mixed effects* »):

- les effets fixes (« *fixed effets* ») désignant les paramètres qui ne varient pas entre les individus,
- les effets aléatoires (« *random effects* ») désignant les sources de variabilité aléatoire des paramètres dont on n'a pas de connaissance *a priori*.

Les effets aléatoires peuvent être catégorisés en ceux qui sont à l'origine de la variabilité interindividuelle (différence entre la valeur individuelle et la moyenne d'un paramètre dans la population) et de la variabilité résiduelle (la différence entre les observations et les prédictions du modèle). Le terme « non-linéaire » décrit la relation non-linéaire entre la variable dépendante (par ex. la concentration) et les paramètres du modèle ou les variables indépendantes. Les modèles non-linéaires à effets mixtes sont composés de deux éléments: modèle de structure (qui peut contenir les covariables) et modèle statistique. Lors de l'analyse de population, dans un premier temps, les paramètres moyens et leur distribution sont estimés. Dans un deuxième temps, ils sont utilisés pour prédire les paramètres individuels.

5.3 Modèle de structure

Le modèle de structure comprend des variables indépendantes connues (dose, temps) et les paramètres à estimer. Il décrit le processus biologique gouvernant les données observées par des équations mathématiques. En l'occurrence, dans une analyse pharmacocinétique, le modèle de structure est un modèle compartimental. En pharmacocinétique, les systèmes sont le plus souvent linéaires – les débits d'entrée ou de sortie d'un compartiment sont proportionnels à la quantité du médicament (cinétique d'ordre un). Un compartiment est un volume dans lequel toutes les molécules de médicament se comportent de la même manière, c'est-à-dire avec la même probabilité d'entrer ou de sortir selon la même vitesse de transfert. Chaque compartiment est décrit par une équation différentielle associant les entrées et les sorties.

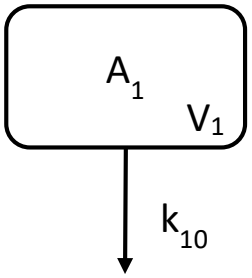


Figure 8 Exemple d'un modèle structural à un compartiment avec administration par voie iv.

Pour un médicament administré par un bolus iv (Figure 8), la variation d'A_1 (quantité de médicament dans le compartiment 1) en fonction du temps est décrite par l'équation différentielle:

$$dA_1/dt = - k_{10} \cdot A_1$$

où k_{10} est la constante d'élimination d'ordre 1.

La résolution de cette équation est obtenue par application de la transformation de Laplace. En rapportant la quantité A_1 au volume V_1, l'équation pour décrire la concentration du médicament dans l'organisme à l'instant t est:

$$C(t) = \frac{Dose}{V_1} \times e^{-\frac{CL}{V_1} \times t}$$

Où CL est la clairance et V_1 est le volume de distribution.

5.4 Modèle statistique

5.4.1 Variabilité interindividuelle

La variabilité interindividuelle traduit l'écart η entre la valeur réelle d'un paramètre pharmacocinétique d'un individu (θ_i) et la valeur typique (« *typical value* », TV) de ce paramètre dans la population θ_{TV}:

$$\theta_i = \theta_{TV} + \eta_i$$

où θ_{TV} est la valeur typique (moyenne) du paramètre (par ex. CL, V) dans la population et θ_i est la valeur du paramètre pour un individu i. La distribution de η suit une loi normale de moyenne nulle et de variance ω^2. ω représente donc l'écart type du paramètre pharmacocinétique, le coefficient de variation (CV) peut être calculé de la manière suivante : CV (%) = $\sqrt{\omega^2} \cdot 100\%$.

En pharmacocinétique, la variabilité interindividuelle des paramètres est supposée suivre une distribution log-normale permettant d'obtenir les valeurs positives. L'équation précédente devient:

$$\theta_i = \theta_{TV} + e^{\eta_i}$$

Dans ce cas, ω^2 est la variance du paramètre en échelle log et ω est son écart-type en échelle log. L'équation suivante est utilisée pour calculer le CV à l'échelle originale du paramètre:

$$\text{CV (\%)} = \sqrt{\exp(\omega^2) - 1} \cdot 100\%$$

Toutefois, pour des faibles valeurs de ω^2, l'approximation de CV (%) peut être effectuée avec la première équation [344].

5.4.2 Variabilité inter-occasion

Les paramètres pharmacocinétiques d'un individu peuvent changer au cours du temps, par ex. en relation avec le changement de la fonction rénale/hépatique, évolution de poids etc. Néanmoins, les sources de cette variabilité peuvent être variées et ce phénomène est décrit par la variabilité intra-individuelle (inter-occasion). Elle peut être considérée dans une analyse de population si les données à plusieurs occasions sont disponibles pour un individu. La variabilité inter-occasion est décrite par:

$$\theta_i = \theta_{TV} \cdot e^{\eta i + \eta 1i \cdot OCC1 + \eta 2i \cdot OCC2}$$

où η_{1i} et η_{2i} est l'écart de la moyenne de population pour un individu i pour l'occasion 1 (OCC1) et l'occasion 2 (OCC2) respectivement. OCC_1 est égale à 1 si la concentration provient de l'occasion 1, sinon elle est égale 0. Les η_1 et η_2 suivent une loi normale de moyenne 0 et variance $\omega_{OCC1,2}^2$ (souvent un seul terme de variance est estimé pour la variabilité inter-occasion).

5.4.3 Variabilité résiduelle

La variabilité résiduelle est l'écart ε entre la concentration observée (C_{obs}) et celle prédite (C_{pred}) par le modèle pour la $j^{ème}$ observation du $i^{ème}$ individu:

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} + \varepsilon_{ij}$$

La variabilité résiduelle est supposée suivre une loi normale centrée et de variance Σ^2 : $\varepsilon \sim N(0,\Sigma^2)$ pour un vecteur P de paramètres. L'erreur résiduelle s'explique par les erreurs analytiques dans la méthode de dosage, les erreurs de renseignement de dose ou de temps de prélèvement sanguin et enfin par l'inadéquation du modèle de structure.

Différents modèles d'erreurs permettent de décrire la variabilité résiduelle:

- Modèle d'erreur additive – suppose une variance constante de l'erreur (homoscédasticité) où ε_a correspond généralement à une valeur aux alentours de LLOQ de la méthode analytique:

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} + \varepsilon_{a,ij}$$

- Modèle d'erreur proportionnelle – suppose que le coefficient de variation de l'erreur soit constant tandis que la variance de l'erreur est non-constante (hétéroscédasticité). ε_p correspond à une valeur proportionnelle à la concentration mesurée:

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} \cdot (1 + \varepsilon_{p,ij})$$

- Modèle d'erreur combiné – la combinaison de modèle d'erreur additive et proportionnelle :

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} \cdot (1 + \varepsilon_{p,ij}) + \varepsilon_{a,ij}$$

Chaque modèle d'erreur correspond à une variable dépendante, dans le cas où les données sont de types différents (par ex. concentration de molécule mère et de métabolite), il est nécessaire d'estimer une erreur résiduelle pour chaque type de variable dépendante.

5.5 Modèle de covariables

Un des objectifs majeurs dans l'analyse pharmacocinétique de population est l'identification des associations significatives entre les paramètres pharmacocinétiques et les caractéristiques propres des individus, appelées covariables. Les covariables peuvent être des caractéristiques démographiques (âge, sexe, poids), biologiques (clairance de créatinine, enzymes hépatiques), génétiques (polymorphismes), environnementales (tabagisme), physiopathologiques (insuffisance rénale ou hépatique) ou encore la co-administration d'un inhibiteur ou inducteur enzymatique. L'inclusion des covariables permet d'expliquer une partie de la variabilité interindividuelle des paramètres pharmacocinétiques. D'un point de vue clinique, les patients à risque de sur- ou sous-exposition au médicament peuvent être identifiés grâce à l'analyse de covariables.

Dans un premier temps, les covariables pertinentes sont sélectionnées à partir des graphiques des valeurs individuelles d'η d'un paramètre pharmacocinétique en fonction de la covariable d'intérêt. Si une association ou une tendance est observée, la covariable peut être testée dans le modèle pharmacocinétique.

Différents types d'équations sont utilisés pour inclure les covariables dans le modèle. Pour les covariables continues (âge, poids), la relation entre un paramètre (par ex. CL) peut être décrite par une fonction linéaire:

$$CL = \theta_1 + \theta_2 \cdot \text{âge}$$

où θ_1 représente CL quand l'âge est égal à 0 et θ_2 représente le changement de CL par unité d'âge.

Souvent la valeur de CL est centrée sur la valeur moyenne (ou médiane) de la covariable afin de faciliter l'interprétation:

$$CL = \theta_1 \cdot (1 + \theta_2 \cdot (\text{âge}_i - \text{âge}_{moyen}))$$

où θ_1 est la valeur typique de CL pour un patient avec l'âge moyen dans la population et θ_2 représente l'effet de la variation de l'âge sur la CL par rapport à la moyenne.

Les covariables continues peuvent être également modélisées par une fonction allométrique:

$$CL = \theta_1 \cdot \left(\frac{\hat{a}ge_i}{\hat{a}ge_{moyen}}\right)^{\theta_2}$$

où θ_1 est la valeur de CL pour un individu avec l'âge moyen et θ_2 représente le facteur de l'influence de l'âge sur CL.

Généralement, ces deux fonctions (linéaire et allométrique) sont testées dans le modèle et celle qui décrit le mieux les données est sélectionnée.

Les covariables catégorielles (sexe, polymorphisme génétique) peuvent être inclues dans le modèle en estimant un coefficient associé à chaque catégorie par rapport à la catégorie de référence. Ainsi, l'équation pour décrire l'effet du sexe (SEX = 0 pour homme, SEX = 1 pour femme) sur CL s'écrit de la manière suivante:

$$CL = \theta_1 \cdot \theta_2^{SEX}$$

Où θ_1 est la valeur typique de CL pour les hommes (catégorie de référence) et θ_2 représente le coefficient par lequel la valeur de CL est modifiée chez les femmes par rapport aux hommes.

Alternativement, un paramètre peut être estimé pour chaque catégorie:

$$CL_{hommes} = \theta_1$$

$$CL_{femmes} = \theta_2$$

L'approche la plus souvent utilisée pour tester les covariables dans un modèle pharmacocinétique consiste en l'inclusion une par une des covariables jugées pertinentes sur un paramètre pharmacocinétique (analyse univariée, « *forward selection* ») et évaluation de leur significativité (habituellement un seuil de $p = 0.05$ avec 1 degré de liberté, test de χ^2, est utilisé). Ensuite, toutes les covariables significatives lors de la première étape sont inclues simultanément dans l'analyse multivariée. Ainsi, un modèle contenant toutes les covariables est construit (« *full covariate model* ») et la délétion d'une covariable à la fois est effectuée (« *backward deletion* »). Toutes les covariables identifiées dans l'analyse multivariée avec des critères de significativité plus rigoureux (habituellement $p = 0.01$) sont inclues dans le modèle final. Toutefois, la significativité statistique n'est pas le seul critère pour qu'une covariable soit inclue dans le modèle final. Généralement, ces trois critères doivent être remplis:

1. La covariable est statistiquement significative.
2. La covariable diminue la variabilité interindividuelle du paramètre pharmacocinétique à laquelle elle est associée.
3. La covariable est cliniquement pertinente.

5.6 Modèles de mixture

Dans certaines situations (par ex. quand le médicament est métabolisé par une enzyme dont l'activité varie dans la population en raison de la présence des polymorphismes génétiques, mais le génotype/phénotype pour cette enzyme n'a pas été étudié dans l'étude), l'estimation de paramètre pharmacocinétique (dans cette situation – CL) pour chacune de sous-populations peut être effectuée à l'aide de modèles de mixture (« *mixture models* »). La première étape pour inclure le modèle de mixture dans l'analyse pharmacocinétique est l'évaluation graphique de l'histogramme des valeurs individuelles d'un paramètre pharmacocinétique. La Figure 9 représente un histogramme de la distribution de la CL. Deux sous-populations peuvent être identifiées. La première suit une distribution normale de moyenne 50 et d'écart type 10. La deuxième sous-population suit une distribution normale de moyenne 100 et d'écart type 20. La proportion des sujets dans la première sous-population est de 75%.

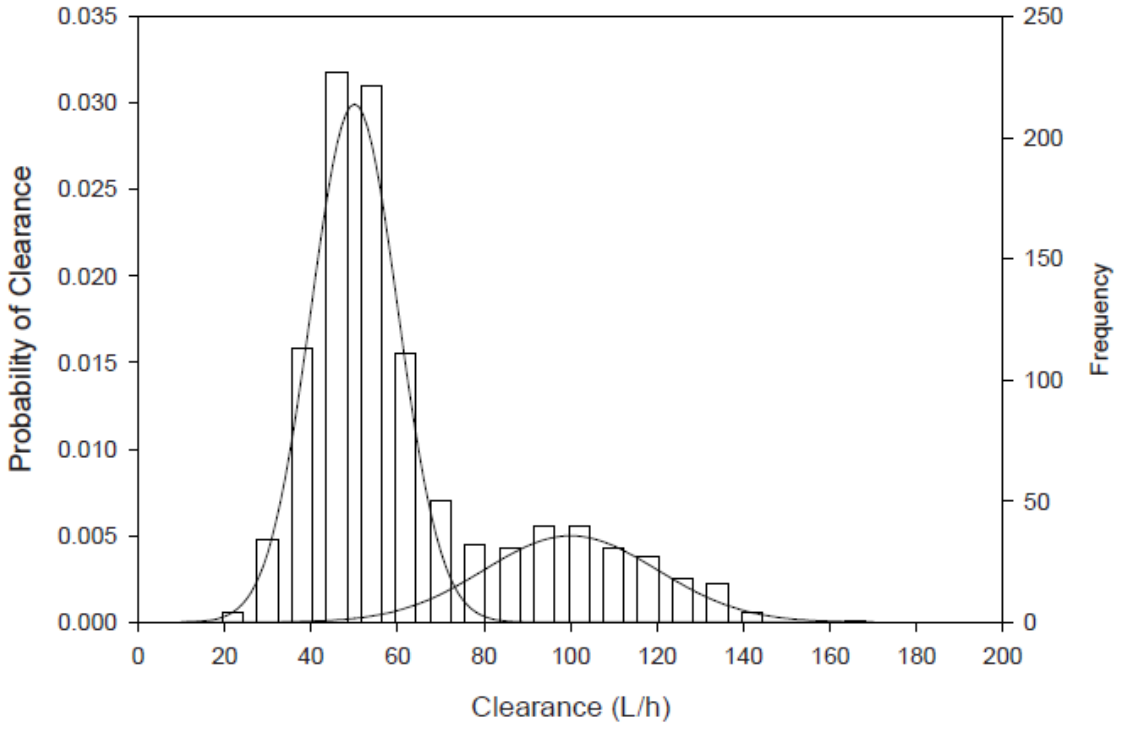


Figure 9 Histogramme présentant une distribution bimodale de la clairance. D'après Bonate [345].

Une distribution bi- ou multimodale d'un paramètre pharmacocinétique est un indicateur fort pour essayer d'inclure le modèle de mixture dans l'analyse. Toutefois, une connaissance *a priori* (comme évoqué ci-dessous concernant l'élimination par des enzymes polymorphiques) peut aussi guider le choix de modèle de mixture.

Un modèle de mixture avec deux sous-populations sur la CL peut être défini de manière suivante:

$$CL_i = \theta_1 \cdot \exp(\eta_{1i}) \qquad \text{si patient i est dans la sous-population 1}$$

$$CL_i = \theta_2 \cdot \exp(\eta_{2i}) \qquad \text{si patient i est dans la sous-population 2}$$

où θ_1 et θ_2 est la CL moyenne de sous-population 1 et 2, respectivement, et η_{1i} et η_{2i} est l'écart entre la CL moyenne de la sous-population 1 et 2, respectivement, et la CL de l'individu i. Il est également possible d'estimer la même valeur de la variabilité interindividuelle pour les deux sous-populations. La proportion mixte des deux sous-populations est estimée par le paramètre θ_3 qui est contraint entre 0 et 1. Toutefois, l'utilisation des modèles de mixture n'est pas limitée à l'identification de deux sous-populations.

5.7 Expression générale du modèle

Soit une population de N individus i, avec pour chacun J concentrations. Ainsi, C_{ij} est la $j^{ème}$ concentrations de l'individu i. La concentration est la variable dépendante du modèle (« *dependent variable »*, DV). Le modèle cherche à décrire les variations de C_{ij} par celles de x_{ij}. L'expression s'écrit de la façon suivante:

$$C_{ij} = f(\theta, x_{ij}, z_i, \eta_i, \varepsilon_{ij})$$

Où:

θ – le vecteur des p paramètres ou effets fixes du modèle : $\theta = (\theta_1 \ldots \theta_p)$,

x_{ij} – ensemble de deux variables indépendantes ou explicatives: la dose administrée (D_{ij}) et le temps correspondant à la $j^{ème}$ concentration (t_{ij})

z_i – le vecteur des covariables (poids, âge, créatinine) pour l'individu i,

η_i – les effets aléatoires correspondant à la variabilité interindividuelle. Les vecteurs η_i suivent une distribution normale d'espérance nulle et de matrice variance-covariance Ω constante.

ε_{ij} – effet aléatoire correspondant à l'erreur résiduelle. C'est la différence entre la concentration j observée et prédite de l'individu i. L'erreur résiduelle suit une distribution normale d'espérance nulle et de matrice de variance-covariance Σ constante.

5.8 Méthodes d'estimation

Une fois le modèle défini, une estimation des paramètres de population θ, Ω et Σ et des valeurs individuelles η_i est effectuée par une méthode sélectionnée. L'estimation consiste à trouver les valeurs des paramètres telles que les concentrations prédites par le modèle sont les plus proches des valeurs observées. La méthode du maximum de vraisemblance (« *maximum likelihood »*), largement utilisée en statistique, ne peut pas être utilisée dans le cas de la modélisation non-linéaire à effet mixtes en raison de la complexité du modèle général. De ce fait, des méthodes d'estimation faisant une approximation

du maximum de vraisemblance sont utilisées. Dans le logiciel NONMEM qui est spécifiquement dédié à l'analyse de données pharmacocinétiques, les méthodes les plus souvent utilisées sont:

- L'estimation d'ordre un (« *first order estimation »,* FO) – l'estimation des paramètres est effectuée pour un individu moyen et les paramètres individuels sont obtenus dans un second temps en utilisant option POSTHOC,
- L'estimation conditionnelle d'ordre un (« *first order conditional estimation »,* FOCE) – permet d'obtenir simultanément les paramètres de population et les paramètres individuels,
- L'estimation conditionnelle d'ordre un avec option d'interaction entre les effets aléatoires η_i et ε_i (« *first order conditional estimation with intercation »,* FOCE-I).

Le critère qui informe sur l'adéquation du modèle avec les observations est la valeur de la fonction objective. Lors de l'étape d'estimation, les valeurs des paramètres sont recherchés de façon itérative jusqu'à la minimisation de la valeur de la fonction objective (maximisation de la vraisemblance) décrite par l'équation suivante:

Fonction objective = -2 Log (probabilité des données)

La fonction objective (OFV) suit une distribution du χ^2. La différence de l'OFV entre deux modèles est la valeur de la statistique de test et permet de discriminer entre des modèles emboîtés.

5.9 Estimation bayésienne des paramètres individuels

Lors de l'analyse des données dans NONMEM, les paramètres individuels (« *Empirical Bayes Estimates* », EBEs) sont obtenus par « *maximum a posteriori bayesian estimation* » dont le principe repose sur la méthode bayésienne. L'estimation bayésienne consiste à utiliser une information connue *a priori* avec des informations provenant de nouvelles données observées afin d'obtenir une estimation *a posteriori* de maximum de vraisemblance (« *maximum likelihood estimate* »). Dans les analyses pharmacocinétiques, l'information connue *a priori* est la distribution des paramètres dans une population donnée obtenue par la modélisation pharmacocinétique, que l'on combine avec les concentrations observées chez un individu pour lequel les paramètres individuels sont à estimer. Pour un individu donné, la fonction objective à minimiser s'écrit de la manière suivante [344]:

$$OFV = \sum_{i=1}^{n} \frac{(C_{obs,i} - C_{pred,i})^2}{\sigma^2} + \sum_{j=1}^{m} \frac{(P_{j,pred} - P_{j,pop})^2}{\omega_{j,pop}{}^2}$$

Où n est le nombre de concentrations observées, m est le nombre des paramètres, $P_{j,pop}$ est l'estimation moyenne du paramètre j dans la population et $P_{j,pred}$ est l'estimation individuelle du paramètre j, C_{obs} et C_{pred} sont respectivement les concentrations observées et prédites d'un individu donné, $\omega_{j,pop}$ représente l'écart type du paramètre j et σ représente l'écart type des concentrations observées (erreur résiduelle). La fonction objective est minimisée par un algorithme implémenté dans NONMEM, les valeurs des paramètres individuels sont recherchées jusqu'à ce que le minimum de la fonction objective soit trouvé.

Lorsqu'on effectue une analyse de population sur des données éparses, les paramètres individuels ont tendance à être rétrécis vers la moyenne de population. Dans ce cas, on parle de phénomène de shrinkage – régression à la moyenne. La régression des paramètres individuels vers la moyenne s'accompagne de la régression des prédictions individuelles vers les observations et l'ajustement du modèle devient « parfait ». Les graphiques diagnostiques deviennent artificiellement bons et sont de ce fait moins fiables. Il est donc important de quantifier et rapporter le shrinkage lors de l'analyse pharmacocinétique.

Le premier type de shrinkage informe sur la prédiction des EBEs (η-shrinkage) qui peut être calculé d'après l'équation suivante [346]:

$$\eta_{shrinkage} = 1 - \frac{SD(\eta)}{\omega}$$

Où η sont les valeurs individuelles d'η et ω est l'écart type de la variabilité interindividuelle du paramètre considéré. La valeur de η-shrinkage est acceptable si elle est inférieure à 20-30% [346]. Si le shrinkage est supérieur à cette valeur, les paramètres pharmacocinétiques sont biaisés et une représentation graphique des η individuels en fonction des covariables peut masquer une vraie corrélation ou, au contraire, indiquer une relation qui n'existe pas.

Le deuxième type de shrinkage informe sur l'existence du phénomène d'ajustement parfait – la régression de l'erreur vers 0, décrite par ε-shrinkage est calculée par l'équation suivante:

$$\varepsilon_{shrinkage} = 1 - SD(IWRES)$$

$$\text{où } IWRES = \frac{DV - IPRED}{\sigma}$$

Quand la valeur de l'ε-shrinkage est supérieure à 20-30%, les graphiques diagnostiques deviennent moins fiables et le pouvoir de détecter l'inadéquation du modèle est diminué.

5.10 Evaluation d'un modèle

5.10.1 Graphiques diagnostiques

Les diagnostics graphiques permettent d'évaluer visuellement la qualité de l'ajustement des données par le modèle. Les graphiques les plus fréquemment utilisés sont:

- Prédiction individuelles (IPRED) ou de population (PRED) versus observations (DV) – permettent d'évaluer la qualité du modèle de structure et de détecter les biais éventuels.
- Ajustement individuel – les DV sont superposées avec les IPRED et PRED pour évaluer l'ajustement individuel du patient et le situer par rapport à un patient typique.
- Résidus (pondérés ou non) en fonction des PRED ou temps – permettent de détecter les biais éventuels.
- Histogramme des effets aléatoires η_i – permet de vérifier l'hypothèse de distribution normale des paramètres pharmacocinétiques.

5.10.2 Précision de l'estimation

Les erreurs standard d'estimation (« *standard error* », SE) sont calculées lors de l'étape de covariance dans NONMEM. Elles informent sur la précision de l'estimation et peuvent être exprimées comme intervalles de confiance à 95% ou relative standard error (RSE) obtenu par l'équation suivante:

$$\text{RSE (\%)} = \frac{\theta}{SE} \cdot 100\%$$

Où θ est l'estimation moyenne du paramètre pharmacocinétique (valeur typique).

Il n'existe pas de seuils établis pour la précision de l'estimation dans l'analyse de population. Toutefois, dans ce type d'analyse, les paramètres fixes et les erreurs résiduelles sont généralement mieux estimés que la variabilité interindividuelle. De ce fait, des valeurs de RSE inférieures à 30% pour la variabilité résiduelle et des paramètres fixes inférieurs à 50% pour la variabilité interindividuelle sont généralement acceptables. La mauvaise précision des paramètres peut suggérer la sur-paramétrisation du modèle. D'autres méthodes peuvent être utilisées pour générer les intervalles de confiance des paramètres tels que la méthode de ré-échantillonnage (« *bootstrap* ») non-paramétrique. Le bootstrap consiste à générer des nouvelles bases de données dans lesquelles les sujets de la base de données originale sont tirés au sort avec remise (un sujet peut être tiré au sort plusieurs fois). Les nouvelles bases de données sont ensuite évaluées avec le modèle final. La moyenne ainsi que la distribution des paramètres obtenues à partir des nouvelles bases de données sont comparées avec celles obtenues avec la base de données originale.

5.10.3 Visual Predictive Check

L'évaluation de la performance prédictive d'un modèle de population par un « *Visual Predictive Check* » (VPC) est devenue l'outil standard dans la validation. En effet, le VPC permet de vérifier la cohérence entre les données prédites par le modèle et celles qui ont été utilisées pour le construire. Il est également possible d'effectuer une validation externe d'un modèle pharmacocinétique consistant à le comparer avec les données de la même population provenant d'une autre étude.

Afin de construire un VPC, les estimations du modèle pharmacocinétique final sont utilisées pour simuler les concentrations. Souvent le même dataset ayant servi à la construction du modèle est simulé *n* fois (habituellement n = 1000). Ensuite, les simulations et les données observées sont comparées graphiquement. Les 5ème, 50ème et 95ème percentile des concentrations observées sont calculés et superposés sur les intervalles de confiance à 95% de 5ème, 50ème et 95ème percentiles des données simulées. Le modèle est validé si les percentiles des données observées sont compris dans les intervalles de confiance des percentiles correspondants des données simulées (Figure 10). Une stratification en fonction des covariables pertinentes (catégories d'âge ou de poids, covariables catégorielles) ou en fonction de la dose permet d'apprécier la performance du modèle dans les sous-groupes.

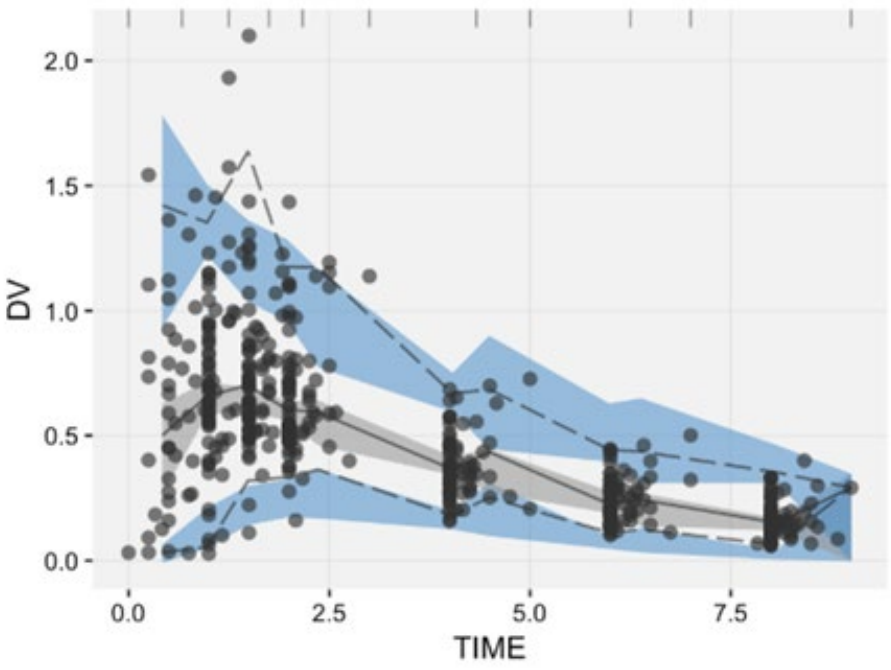


Figure 10 Visual Predictive Check d'un modèle pharmacocinétique de population pour un médicament administré par voie orale.

5.11 Application à l'analyse pharmacocinétique d'une molécule parent et de ses métabolites

Dans les cas où le médicament administré forme un métabolite qui présente une activité pharmacologique, la description de la formation du métabolite peut être indispensable pour une meilleure compréhension des propriétés pharmacologiques du médicament surtout si une analyse PK/PD est envisagée. L'analyse simultanée des données de la molécule parent et de son métabolite (voire de ses métabolites) par approche de population permet d'estimer les paramètres pharmacocinétiques déterminant la formation et l'élimination du métabolite en tenant compte des données de la molécule parent ce qui ne serait pas possible dans l'analyse par approches standards. Un exemple de modèle de structure incluant les données de médicament parent et son métabolite est présenté sur la Figure 11. Dans ce modèle, le médicament est absorbé du compartiment de dépôt vers le compartiment central V_2 avec un processus d'ordre un décrit par la constante de vitesse k_a. La distribution du médicament dans le compartiment périphérique V_3 est décrite par les constantes de vitesse k_{23} et k_{32}. Le médicament peut

être soit éliminé du compartiment central avec la constante d'élimination k_{20} soit converti en métabolite V_{met} selon la constante k_{24}. Le métabolite est éliminé selon la constante d'élimination k_{40}.

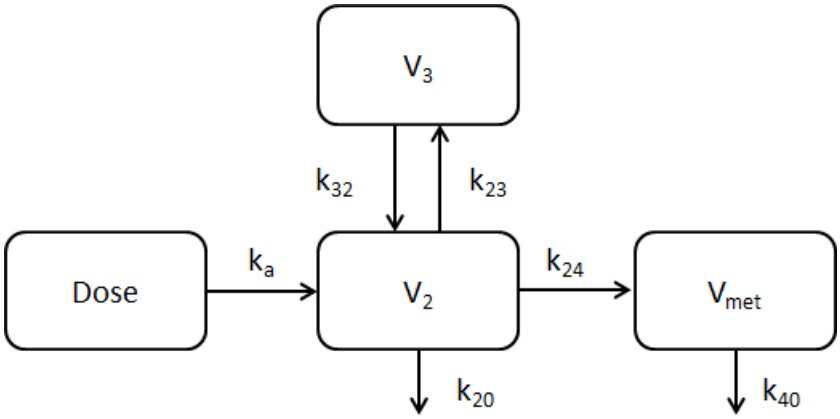


Figure 11 Schéma de modèle de structure décrivant les données de parent et son métabolite.

Ce modèle de structure peut être décrit par le système d'équations différentielles habituelles suivant:

$$dA_1/dt = -k_a \cdot A_1$$

$$dA_2/dt = k_a \cdot A_1 + k_{32} \cdot A_3 - (k_{20} + k_{23} + k_{24}) \cdot A_2$$

$$dA_3/dt = k_{23} \cdot A_2 - k_{32} \cdot A_3$$

$$dA_4/dt = k_{24} \cdot A_2 - k_{40} \cdot A_4$$

Où A_2 et A_3 sont les quantités de médicament dans le compartiment central et périphérique, respectivement, et A_4 est la quantité de métabolite.

Les concentrations correspondantes sont déduites de A_2 et A_4:

$$C_2 = A_2/V_2$$

$$C_4 = A_4/V_{met}$$

$$V_{met} = V_2$$

Où V_2 et V_{met} sont les volumes de distribution du parent et du métabolite, respectivement. Le V_{met} n'est pas identifiable en l'absence de données d'administration de parent et de métabolite par voie intraveineuse. De ce fait, le V_{met} ne peut pas être estimé et est habituellement fixé à la valeur du volume

de distribution de la molécule parent (V_2). La conversion en métabolites est décrite par des constantes de vitesse d'ordre un (processus linéaires).

Dans la littérature, plusieurs modèles pour l'analyse simultanée des données pharmacocinétiques d'une molécule parent avec un voire plusieurs métabolites ont été proposés. Yu *et al.* ont rapporté un modèle semi-mécanistique pour décrire la pharmacocinétique de sunitinib et son métabolite actif *N*-desethylsunitinib (SU12662) chez les patients atteints d'un cancer [347] (Figure 12).

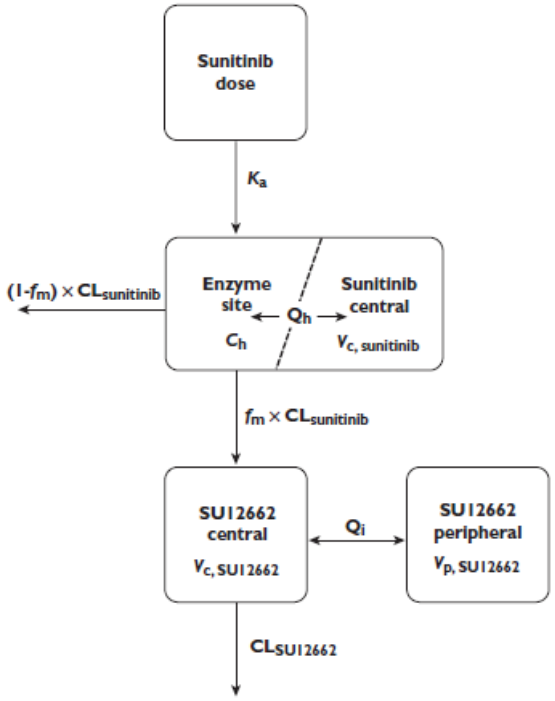


Figure 12 Schéma de modèle de structure décrivant les concentrations plasmatiques de sunitinib est son métabolite *N*-desethylsunitinib (SU12662) proposé par Yu *et al.* [347].

Dans ce modèle, la concentration de sunitinib dans le compartiment hypothétique C_h (représentant le site enzymatique) est à l'équilibre avec la concentration dans le compartiment central $V_{c,sunitinib}$. Le sunitinib est absorbé du compartiment de dépôt de dose selon une constante k_a dans le site enzymatique où il peut être soit métabolisé en *N*-desetylsunitinib soit rester inchangé et diffuser dans le compartiment central. L'élimination de sunitinib est décrite par $CL_{sunitinib}$ (clairance totale) et l'estimation de la fraction de métabolisation en *N*-desetylsunitinib, f_m, permet d'obtenir la CL métabolique de sunitinib. Le *N*-

desethylsunitinib est distribué dans le compartiment périphérique, $V_{p,SU12662}$, selon une clairance intercompartimentale, Q_i, et est éliminé à partir du compartiment central $V_{c,SU12662}$ selon $CL_{SU12662}$.
Un modèle décrivant séparément les clairances/constantes pour chaque voie métabolique est nécessaire si l'analyse a pour objectif l'identification des covariables significatives sur une voie métabolique en particulier. Bertrand *et al.* ont rapporté le développement d'un modèle parent-métabolite complexe (Figure 13) [348].

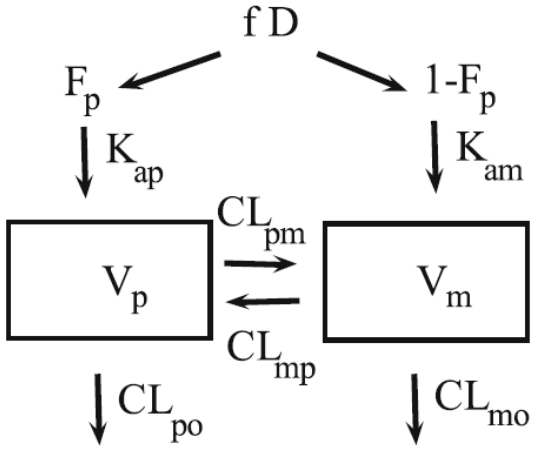


Figure 13 Schéma de modèle de structure décrivant les concentrations plasmatiques d'un médicament antipsychotique et son métabolite actif proposé par Bertrand *et al.* [348].

Dans ce modèle, le médicament est soit absorbé à partir du tube digestif dans le compartiment central V_p avec une constante de vitesse K_{ap}, soit il subit un premier passage hépatique décrit par la constante K_{am}. La fraction de dose, F_p, absorbée directement dans le compartiment central est estimée. Le médicament parent peut être soit éliminé du compartiment central selon la clairance CL_{po}, soit converti en métabolite V_m selon la CL_{pm}. Le métabolite peut être soit éliminé avec la CL_{mo} ou être reconverti en parent selon CL_{mp}. Pour des raisons d'identifiabilité, on fait l'hypothèse que $V_m = V_p$. *f* est la fraction de dose (D) disponible après absorption; elle est fixée à 1 car elle n'est pas non plus identifiable.

Travaux personnels

1 Objectifs

Ces travaux de thèse ont porté sur les analyses des données pharmacocinétiques et pharmacogénétiques provenant de l'étude PHACS – un essai clinique, prospectif réalisé dans 25 établissements de soins en cancérologie en région Sud-Ouest. Cette étude a permis d'inclure prospectivement 2000 patientes (entre juin 2010 et octobre 2014) débutant un traitement adjuvant par hormonothérapie (tamoxifène, létrozole, anastrozole ou exemestane). Les patientes ont été suivies tous les 6 mois pendant 3 ans. Les données pharmacocinétiques, pharmacogénétiques et cliniques (survenue des effets indésirables, rechutes précoces, traitement concomitants, adhérence) ont été recueillies. L'objectif principal de l'étude PHACS repose sur l'évaluation de la relation entre la pharmacocinétique, la pharmacogénétique et les effets indésirables des traitements adjuvants du cancer du sein hormonodépendant durant les 3 premières années de thérapie.

Dans le cadre de cette thèse, les analyses portant sur le tamoxifène et le létrozole ont été réalisées. Leur objectif était d'identifier et de quantifier l'impact des polymorphismes génétiques, traitements concomitants et facteurs démographiques sur la pharmacocinétique du tamoxifène et de ses métabolites et du létrozole chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant. Pour cela, une première analyse sur les données à la visite de suivi à 6 mois a été effectuée pour le tamoxifène. Les résultats de cette analyse préliminaire ont servi à guider le choix des polymorphismes génétiques à inclure dans le modèle de population. Ce modèle a été développé sur les données pharmacocinétiques longitudinales et a permis une analyse simultanée des données du tamoxifène et ses six métabolites. Quant au létrozole, la totalité des données pharmacocinétiques a été analysée par approche de population. Le modèle pharmacocinétique a également été utilisée pour identifier les patientes non-adhérentes au traitement en fonction de leurs profiles pharmacocinétiques à l'équilibre. Enfin, une analyse PK/PD incluant les effets indésirables rapportés à la visite à 6 mois a été réalisée pour le létrozole.

2 Etude de la relation pharmacocinétique-pharmacogénétique du tamoxifène

2.1 Introduction

Plus de 20 métabolites du tamoxifène ont été identifiés chez l'homme [23]. Au cours de l'étude PHACS, les concentrations plasmatiques de tamoxifène et de six métabolites majeurs ont été recueillies: *N*-desmethyltamoxifène, 4-hydroxytamoxifène, 4'-hydroxytamoxifène, endoxifène, Z'-endoxifène et *N*-oxyde tamoxifène. La Figure 14 présente le schéma de métabolisation du tamoxifène incluant les métabolites dosés dans le plasma des patientes de l'étude PHACS.

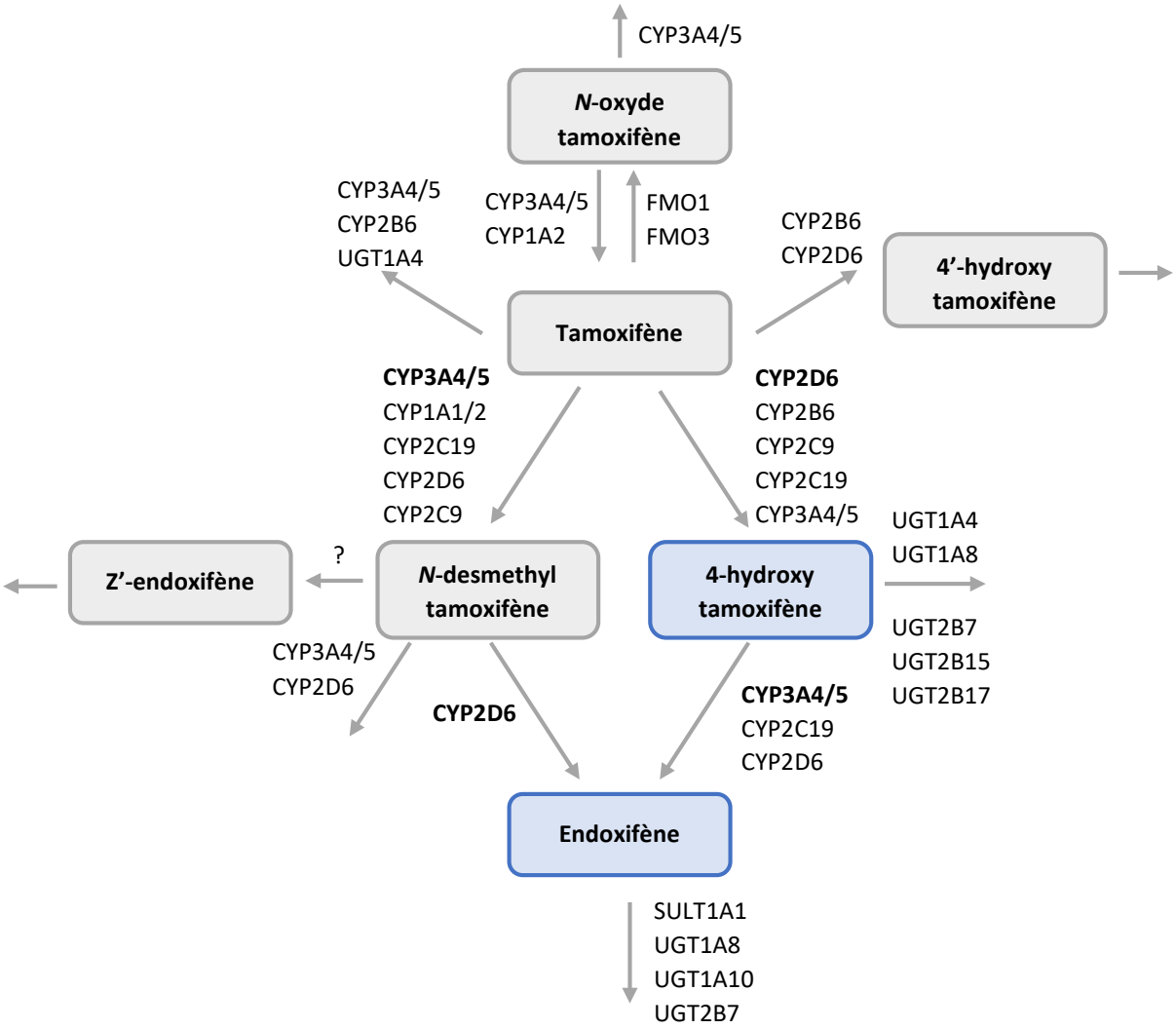


Figure 14 Schéma de métabolisation du tamoxifène et des métabolites analysés dans l'étude PHACS. Les molécules encadrées en bleu correspondent aux métabolites actifs.

Dans le cadre de ces travaux, nous avons effectué une analyse des données préliminaires de l'étude PHACS (première visite de suivi à 6 mois) dont le but était de rechercher les corrélations entre les concentrations plasmatiques de tamoxifène et de ses métabolites et les 63 polymorphismes génétiques dans les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les voies de métabolisation de tamoxifène. Des analyses plus détaillées ont consisté en évaluation de l'impact des différents génotypes de *CYP2D6* sur les concentrations d'endoxifène et le ratio métabolique *N*-desmethyltamoxifène/endoxifène (un marqueur de l'activité de CYP2D6) afin d'améliorer la classification existante des génotypes en phénotypes [129]. Enfin, les autres variables pouvant influencer les concentrations d'endoxifène tels que le traitement concomitant par des inhibiteurs de CYP2D6 et CYP3A4 ont été évalués dans cette analyse.

La deuxième partie des travaux sur le tamoxifène a été réalisée sur la totalité des données pharmacocinétiques de l'étude PHACS. L'analyse simultanée des concentrations de tamoxifène et de six métabolites a été effectuée par approche de population (modèles non-linéaires à effets mixtes). Le modèle pharmacocinétique a permis de décrire les voies de métabolisation du tamoxifène et de quantifier leur variabilité interindividuelle. Ensuite, l'impact des polymorphismes génétiques (sélectionnés à partir des résultats des analyses préliminaires), des traitements concomitants et des facteurs démographiques sur les paramètres pharmacocinétiques a été étudié. L'identification et la quantification de l'impact des covariables sur les paramètres pharmacocinétiques a permis de simuler les concentrations d'endoxifène en fonction de ces différentes covariables et de déterminer les facteurs de risque de sous-exposition à l'endoxifène. Le modèle final a été utilisé pour effectuer des simulations d'adaptation de dose chez les patientes à risque de sous-exposition à l'endoxifène basée sur le seuil thérapeutique proposé par Madlensky *et al.* [120] et le score d'activité antiestrogénique proposé par de Vries Schultink *et al.* [258].

2.2 Evaluation de l'impact des polymorphismes génétiques sur les concentrations plasmatiques de tamoxifène et ses métabolites

2.2.1 Article scientifique n°1

Ces travaux ont été réalisés sur les données préliminaires de l'étude PHACS (première visite de suivi) et ont été publiés dans le journal *Clinical Pharmacology & Therapeutics*.

Puszkiel et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* **106**, cpt.1404 (2019).

Factors Affecting Tamoxifen Metabolism in Patients With Breast Cancer: Preliminary Results of the French PHACS Study

Alicja Puszkiel[1], Cécile Arellano[1], Christelle Vachoux[1], Alexandre Evrard[2,3], Valérie Le Morvan[4], Jean-Christophe Boyer[2], Jacques Robert[4], Caroline Delmas[1,5], Florence Dalenc[1,5], Marc Debled[4], Laurence Venat-Bouvet[6], William Jacot[3,7], Etienne Suc[8], Isabelle Sillet-Bach[9], Thomas Filleron[5], Henri Roché[5], Etienne Chatelut[1,5], Melanie White-Koning[1,†] and Fabienne Thomas[1,5,*,†]

In addition to the effect of cytochrome P450 (*CYP*) *2D6* genetic polymorphisms, the metabolism of tamoxifen may be impacted by other factors with possible consequences on therapeutic outcome (efficacy and toxicity). This analysis focused on the pharmacokinetic (PK)-pharmacogenetic evaluation of tamoxifen in 730 patients with adjuvant breast cancer included in a prospective multicenter study. Plasma concentrations of tamoxifen and six major metabolites, the genotype for 63 single-nucleotide polymorphisms, and comedications were obtained 6 months after treatment initiation. Plasma concentrations of endoxifen were significantly associated with *CYP2D6* diplotype ($P < 0.0001$), *CYP3A4*22* genotype ($P = 0.0003$), and concomitant intake of potent CYP2D6 inhibitors ($P < 0.001$). Comparison of endoxifen levels showed that the CYP2D6 phenotype classification could be improved by grouping intermediate metabolizer (IM)/IM and IM/poor metabolizer diplotype into IM phenotype for future use in tamoxifen therapy optimization. Finally, the multivariable regression analysis showed that formation of tamoxifen metabolites was independently impacted by *CYP2D6* diplotype and *CYP3A4*22*, *CYP2C19*2*, and *CYP2B6*6* genetic polymorphisms.

Study Highlights

WHAT IS THE CURRENT KNOWLEDGE ON THE TOPIC?

☑ The clinical utility of pretherapeutic cytochrome P450 (*CYP*) *2D6* genotyping or therapeutic drug monitoring of ENDO, the major active metabolite of tamoxifen (TAM), remains uncertain.

WHAT QUESTION DID THIS STUDY ADDRESS?

☑ What is the impact of genetic polymorphisms and comedications on plasma concentrations of endoxifen (ENDO) and could the current *CYP2D6* genotype to phenotype classification system be improved for TAM therapy?

WHAT DOES THIS STUDY ADD TO OUR KNOWLEDGE?

☑ Based on data from 730 patients with adjuvant breast cancer, ENDO concentrations were strongly correlated with *CYP2D6* diplotype, *CYP3A4*22* genotype, and concomitant intake of potent CYP2D6 inhibitors. CYP2D6 phenotype classification could be improved by grouping intermediate metabolizer (IM)/IM and IM/poor metabolizer diplotypes into IM phenotype for future use in TAM therapy optimization.

HOW MIGHT THIS CHANGE CLINICAL PHARMACOLOGY OR TRANSLATIONAL SCIENCE?

☑ The results of this study provide information on factors affecting TAM metabolism, which might be helpful for further evaluations of its relationship with clinical outcome (efficacy and toxicity).

High interindividual variability in pharmacokinetics (PK) of tamoxifen (TAM) has been attributed to genetic polymorphisms of cytochrome P450 (CYP) 2D6 encoding for the most important enzyme involved in TAM bioactivation to endoxifen (ENDO), its

[1]Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm U1037, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; [2]Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Nîmes-Carémeau, Nîmes, France; [3]IRCM, Inserm, Université de Montpellier, ICM, Montpellier, France; [4]Institut Bergonié, Bordeaux, France; [5]Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse – Oncopole, Toulouse, France; [6]CHU Dupuytren, Limoges, France; [7]Institut du Cancer de Montpellier, Montpellier, France; [8]Clinique Saint Jean du Languedoc, Toulouse, France; [9]CH, Brive, France. *Correspondence: Fabienne Thomas (thomas.fabienne@iuct-oncopole.fr)

[†]These authors shared senior authorship of this study.

Received November 15, 2018; accepted February 8, 2019. doi:10.1002/cpt.1404

major active metabolite. However, individualization of TAM therapy based on *CYP2D6* genotype could not meet consensus due to conflicting results about the association between *CYP2D6* genetic polymorphisms and recurrence in patients with breast cancer.[1–3] The achievement of response to TAM therapy may be related to a combination of *CYP2D6* genotype and other factors influencing TAM metabolism, such as genetic polymorphisms (notably *CYP3A4/5*, *CYP2C9*, and *CYP2C19*) and comedications with CYP inhibitors.[4–8] Indeed, it has been shown that plasma concentrations of ENDO exhibit 20–40-fold variation among patients treated with TAM 20 mg/day[9] and only 39–58% of this interindividual variability can be explained by *CYP2D6* diplotype.[8,10] *CYP3A4*22*, *CYP2C19*2*, *CYP2C9*2*, and **3* genetic polymorphisms have also been shown to impact plasma concentrations of ENDO, 4-hydroxy tamoxifen (4-OHTAM) and other TAM metabolites.[4,6,7,9,11]

Some studies have reported a positive association between plasma ENDO concentrations and TAM efficacy and proposed a therapeutic threshold of 16 nmol/L for ENDO.[7,12] However, these results have not been reproduced in later studies[13,14] questioning the utility of therapeutic drug monitoring of ENDO concentrations in optimization of TAM therapy. More prospective studies are needed to confirm or denounce these findings.

Because over 100 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *CYP2D6* gene have been reported, a validated genotype to phenotype translation system is required to correctly investigate the impact of *CYP2D6* genotype on the metabolism of TAM and other drugs primary metabolized by CYP2D6. Previous Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines[15,16] recommended classification of patients into CYP2D6 phenotypes based on the sum of activity scores of the two alleles.[17] However, these classifications have been proposed based on dextromethorphan[17] or codeine[15,16] data and recent studies have shown that they are not adequate to predict ENDO levels.[8,18] In consequence, recent CPIC guidelines[19] discussed the need for re-evaluation of the existing CYP2D6 phenotype classification to guide TAM therapy.

Finally, comedication with CYP2D6 inhibitors may decrease plasma ENDO levels in TAM-treated patients.[20] However, data regarding the impact of CYP3A4 inhibitors on TAM metabolism are limited. Therefore, evaluation of the impact of CYP2D6 and CYP3A4 inhibitors based on data from an observational clinical trial could provide additional information helpful for better management of TAM-treated patients.

In light of the above considerations, the aims of this study were to evaluate the impact of genetic polymorphisms and comedications on ENDO concentrations and to compare ENDO levels and metabolic ratio N-desmethyl tamoxifen/endoxifen ($MR_{NDT/ENDO}$ as a marker of CYP2D6 activity) between *CYP2D6* genotypes and diplotypes in order to improve the existing genotype to phenotype classification system for TAM therapy. The third objective was to evaluate the PK/pharmacogenetic (PG) relationship of TAM and its major metabolites based on metabolic ratios. Data come from a large prospective multicenter 3-year follow-up study aiming to investigate the relationship among PK, PG, and toxicity of TAM and aromatase inhibitors in adjuvant setting (PHACS, ClinicalTrials.gov registration number NCT01127295).

RESULTS

Patients and data

Eight hundred seventy-nine patients starting treatment with TAM at 20 mg/day were included in the PHACS study; 864 patients performed the first follow-up visit, and PK samples were available for 789 patients. Of those, 59 patients were excluded from the statistical analysis of the first follow-up visit due to TAM or ENDO plasma concentrations below the limit of quantification suggesting noncompliance ($n = 12$), missing genotype data or missing/uncertain *CYP2D6* copy number ($n = 47$). Finally, 730 patients were included in the analysis, and the distributions of their baseline characteristics (**Table 1**) were not statistically different from those of the 134 excluded patients. The first follow-up visit was performed after a median time of 6.2 months after treatment initiation (interquartile range: 6.0–6.6). Because concomitant treatment with CYP2D6 and CYP3A4 inhibitors or inducers may significantly impact formation of TAM metabolites, patients taking concomitant CYP2D6 inhibitors (weak/moderate CYP2D6 inhibitors: celecoxib, citalopram, duloxetine, escitalopram, and sertraline; potent CYP2D6 inhibitors: fusidic acid, amiodarone, clomipramine, flecainide, fluoxetine, paroxetine, and propafenone); moderate or potent CYP3A4 inhibitors (amiodarone, ciprofloxacin, clarithromycin, diltiazem, fluconazole, fusidic acid, and verapamil); or CYP3A4 inducers (dexamethasone and phenobarbital) at the time of PK sampling were excluded from the PK/PG analysis ($n = 53$) unless otherwise stated. The 63 SNPs analyzed in the study (**Supplementary Material S1**) were in Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE).

Plasma concentrations of TAM and metabolites

Steady-state plasma concentrations of TAM, N-desmethyl tamoxifen (NDT), tamoxifen N-oxide (NOX), 4-OHTAM, Z-4′-hydroxy tamoxifen (4′-OHTAM), Z-ENDO, and Z′-endoxifen (Z′-ENDO), as well as metabolic ratios (MRs) and antiestrogenic activity score (AAS) are presented in **Table S2**. Plasma concentrations of NDT, 4-OHTAM, ENDO, and Z′-ENDO, as well as $MR_{TAM/4\text{-}OHTAM}$, $MR_{TAM/NDT}$, $MR_{NDT/ENDO}$, $MR_{4\text{-}OHTAM/ENDO}$, and AAS varied significantly among CYP2D6 diplotypes. ENDO levels, $MR_{NDT/ENDO}$, and $MR_{4\text{-}OHTAM/ENDO}$ showed the most significant gene-dose effect. ENDO concentrations increased with increasing CYP2D6 activity, whereas an inverse correlation was observed with $MR_{NDT/ENDO}$. High interindividual variability in ENDO concentrations was observed within CYP2D6 diplotypes (coefficient of variation: 42–105%), which supports the hypothesis that factors other than CYP2D6 contribute to these interindividual differences. Because CYP2D6 is the only enzyme involved in the formation of ENDO from NDT, further analyses focused on both $MR_{NDT/ENDO}$ (as a marker of CYP2D6 activity) and plasma ENDO concentrations (as a reflection of exposure to active metabolite).

Comparison of $MR_{NDT/ENDO}$ between CYP2D6 genotypes and diplotypes

$MR_{NDT/ENDO}$ was compared among *CYP2D6* genotypes classified into the same diplotype. Significant differences in

Table 1 Patients' baseline characteristics (n = 730)

Characteristic	Median [range] or number (%)
Age at inclusion	47 [25–74]
Lymph node status	
pN0	453 (62.2)
pN+	275 (37.8)
Missing	2
Hormonal receptor status	
ER–/PR+	6 (0.8)
ER+/PR–	78 (10.7)
ER+/PR+	643 (88.4)
Missing	3
Hormonal status	
Nonmenopausal	601 (84.5)
Menopausal	108 (15.2)
Menopausal under hormone replacement therapy	2 (0.3)
Missing	19
Neo-adjuvant chemotherapy	
Yes	63 (8.7)
No	665 (91.3)
Missing	2
Adjuvant chemotherapy	
Yes	415 (57.0)
No	313 (43.0)
Missing	2
Radiotherapy	
Yes	698 (95.6)
No	32 (4.4)
Trastuzumab treatment	
Yes	79 (10.9)
No	649 (89.1)
Missing	2

ER, estrogen receptor; pN0, no regional lymph node metastasis; pN+, regional lymph node metastasis; PR, progesterone receptor.

$MR_{NDT/ENDO}$ among **9/*4*, **10/*4*, and **41/*4* genotypes were identified ($P = 0.003$), whereas they all belong to intermediate metabolizer (IM)/poor metabolizer (PM) diplotype (**Figure 1a**). $MR_{NDT/ENDO}$ was significantly higher in **41/*4* patients than in **9/*4* patients ($P = 0.0009$); however, there was no significant difference between **9/*4* and **10/*4* patients and between **10/*4* and **41/*4* patients ($P = 0.2$ and $P = 0.08$, respectively). $MR_{NDT/ENDO}$ was similar between **41/*4* and PM/PM patients ($P = 0.3$) but not between **10/*4* and PM/PM patients ($P = 0.01$). No statistically significant differences in $MR_{NDT/ENDO}$ between genotypes of the remaining diplotypes were detected.

Comparisons of $MR_{NDT/ENDO}$ between *CYP2D6* diplotypes are presented in **Figure 1b**. Ultrarapid metabolizer (UM) had similar $MR_{NDT/ENDO}$ to UM/PM and normal metabolizer (NM)/NM patients ($P = 0.7$ and $P = 0.2$, respectively). $MR_{NDT/ENDO}$ was significantly lower in NM/IM than in NM/PM patients ($P = 0.02$) suggesting higher CYP2D6 activity of NM/IM diplotype (**Figure 1b**). NM/PM patients had significantly lower $MR_{NDT/ENDO}$ than IM/IM patients ($P = 0.0002$), despite the same sum of allele activity score (AS). Finally, $MR_{NDT/ENDO}$ was significantly lower in IM/IM patients than in IM/PM patients ($P = 0.02$).

Comparison of ENDO concentrations between CYP2D6 genotypes and diplotypes

Significant differences in ENDO levels among **9/*4*, **10/*4*, and **41/*4* genotypes were identified ($P = 0.006$), whereas they all belong to IM/PM diplotypes (**Figure 2a**). ENDO concentrations in **9/*4* patients (28.1 ± 13.5 nmol/L) were significantly higher than in **10/*4* (13.1 ± 7.1 nmol/L) and **41/*4* patients (15.0 ± 19.0 nmol/L; $P = 0.02$ and $P = 0.0017$, respectively) whereas **10/*4* and **41/*4* genotypes had similar ENDO levels ($P = 0.72$). Plasma ENDO levels were then compared among **10/*4*, **41/*4*, and PM/PM patients. Plasma ENDO levels were similar between **10/*4* and PM/PM and between **41/*4* and PM/PM patients ($P = 0.2$ and $P = 0.3$, respectively). No statistically significant differences in ENDO levels between genotypes of the remaining diplotypes were detected.

Next, plasma ENDO levels were compared across *CYP2D6* diplotypes. Similarly to $MR_{NDT/ENDO}$, plasma ENDO levels were not statistically different between UM and UM/PM ($P = 0.6$) or NM/NM patients ($P = 0.3$). Concerning NM/NM, NM/IM, NM/PM, and IM/IM diplotypes that are collapsed into NM phenotype according to the previous CPIC classification,[15] NM/NM patients had significantly higher plasma ENDO concentrations than NM/IM ($P < 0.0001$), NM/PM ($P < 0.0001$), and IM/IM patients ($P < 0.0001$; **Figure 2b**). Plasma ENDO levels were not significantly different between NM/IM and NM/PM patients ($P = 0.09$). NM/PM patients had significantly higher plasma ENDO levels than IM/IM patients ($P = 0.002$), despite the same sum of allele AS. Finally, plasma ENDO levels in IM/IM and IM/PM patients were similar ($P = 0.4$).

Impact of genetic polymorphisms and comedications on ENDO concentrations

In the univariate analysis of all 63 SNPs with ENDO concentrations, only SNPs related to the *CYP2D6* gene: rs1135840, rs3892097 (**4*), and rs1065852 (**10*), and to the *CYP3A4*: rs35599367 (**22*) were found significant after correction for multiple testing. In order to account for the *CYP2D6* copy number variation (CNV) and the presence of different gene variants, we combined all the information regarding patients' *CYP2D6* genotype into diplotype for the multivariable regression analysis. In this analysis, plasma ENDO concentrations were independently associated with *CYP2D6* diplotype and *CYP3A4*22* genotype ($P < 0.0001$ and $P = 0.0001$, respectively). NM/PM and IM/IM patients carrying *CYP3A4*22* allele had significantly higher plasma ENDO levels than patients with the same *CYP2D6* diplotype and absence of *CYP3A4*22* allele (**Figure 3**).

Table 2 summarizes plasma ENDO levels according to CYP2D6 phenotype (in which IM/IM and IM/PM diplotypes

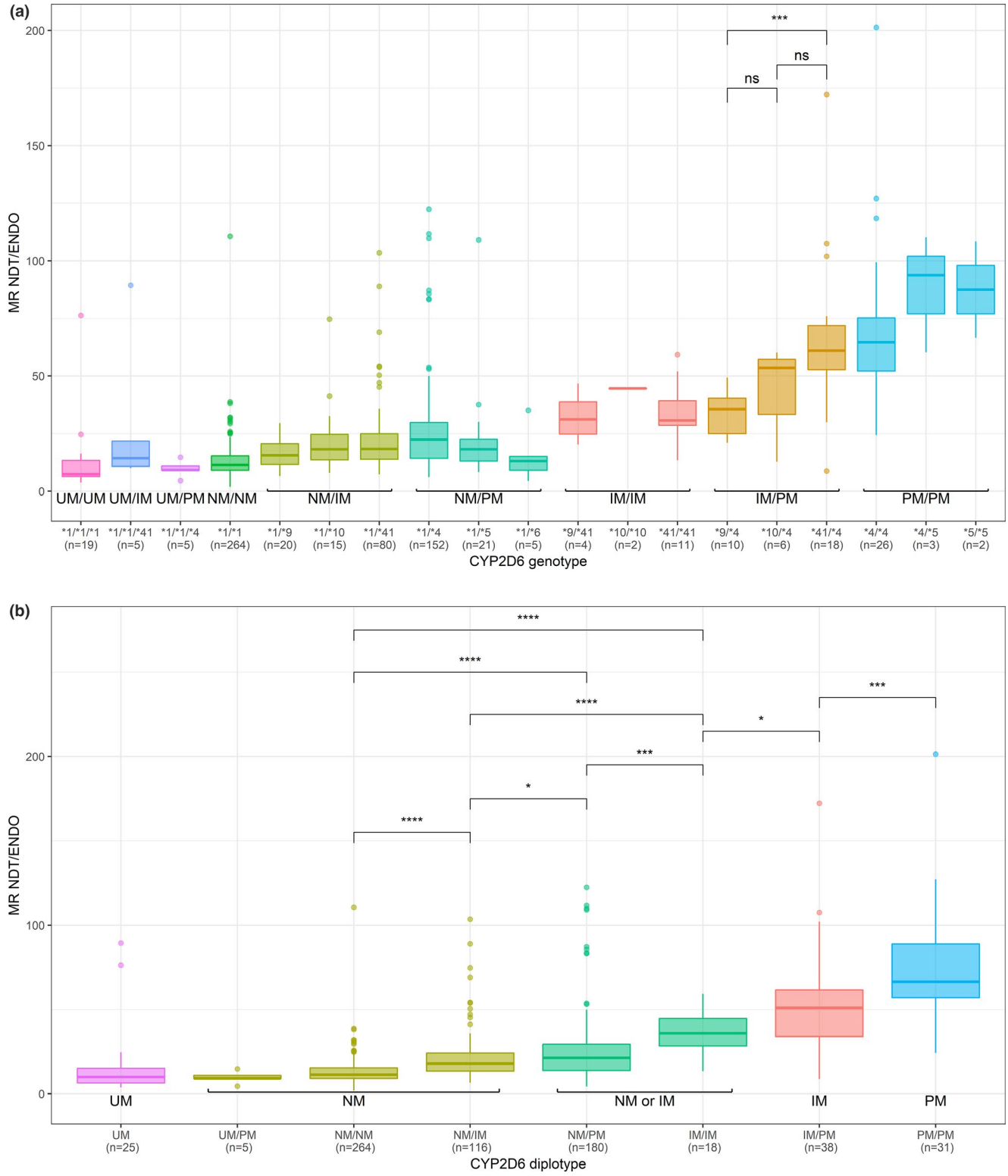


Figure 1 (**a**) Metabolic ratio N-desmethyl tamoxifen/endoxifen ($MR_{NDT/ENDO}$) according to cytochrome P450 (*CYP*) *2D6* genotype. Patients taking concomitant CYP2D6 inhibitors, moderate or potent CYP3A4 inhibitors, or CYP3A4 inducers (n = 53), and genotypes represented by only one patient (>**1x4*, **1/*4/*4*, **1/*17*, **1/*7*, **10/*41*, **10/*5*, **17/*4*, **41/*5*, and **41/*7*; n = 9) were excluded. (**b**) $MR_{NDT/ENDO}$ according to *CYP2D6* diplotype. The second *x*-axis represents the classification into CYP2D6 phenotype according to recent Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines[19] where ultrarapid metabolizer (UM)/UM and UM/intermediate metabolizer (IM) diplotypes were regrouped into UM. Patients taking concomitant CYP2D6 inhibitors, CYP3A4 moderate or potent inhibitors, or CYP3A4 inducers were excluded (n = 53). Not significant (ns) $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ****$P < 0.0001$. NM, normal metabolizer; PM, poor metabolizer. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

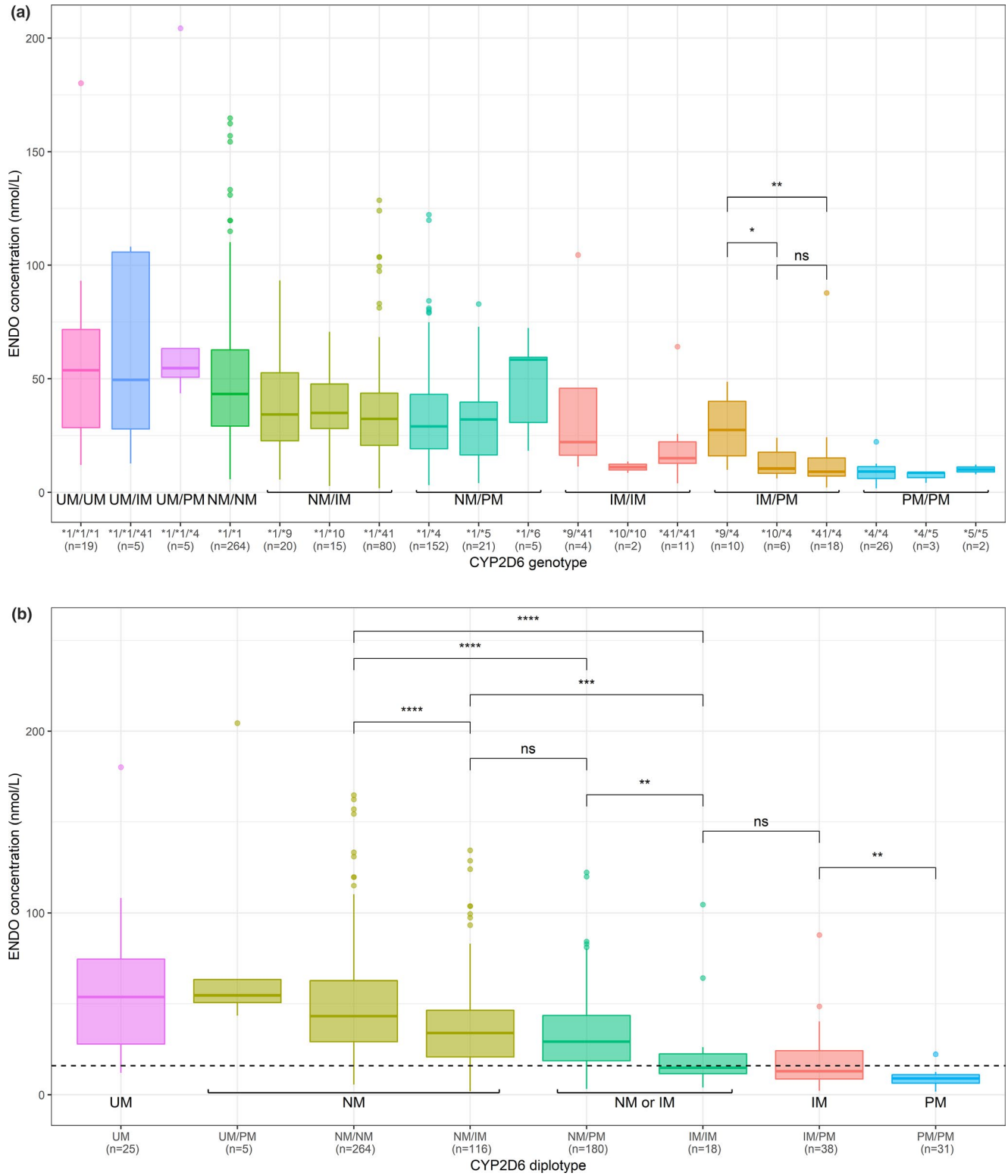


Figure 2 (**a**) Plasma endoxifen (ENDO) concentration according to cytochrome P450 (*CYP*) *2D6* genotype. Patients taking concomitant CYP2D6 inhibitors, moderate or potent CYP3A4 inhibitors, or CYP3A4 inducers (n = 53), and genotypes represented by only one patient (**1/*17*, **1/*7*, **10/*41*, **4/*17*, **7/*41*, **5/*10*, **5/*41*, **1/*4/*4*, and >**1x4*; n = 9) were excluded. (**b**) Plasma ENDO concentration according to *CYP2D6* diplotype. The second *x*-axis represents the classification into CYP2D6 phenotype according to recent Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines[19] where ultrarapid metabolizer (UM)/UM and UM/intermediate metabolizer (IM) diplotypes were regrouped into UM. The dashed line represents the threshold for plasma ENDO concentration (16 nmol/L) associated with lower breast cancer recurrence proposed by Madlensky *et al.*[12] Patients taking concomitant CYP2D6 inhibitors, CYP3A4 moderate or potent inhibitors, or CYP3A4 inducers were excluded (n = 53). Not significant (ns) $P > 0.05$, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ****$P < 0.0001$. NM, normal metabolizer; PM, poor metabolizer. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

were classified into IM phenotype) and concomitant intake of CYP2D6 and CYP3A4 inhibitors. Both weak/moderate and potent CYP2D6 inhibitors significantly decreased plasma ENDO levels in NM patients, whereas no significant difference was observed in IM patients probably due to the small number of patients. The number of UM and PM patients taking concomitant CYP2D6 inhibitors was too low to perform statistical analysis. Intake of weak or moderate CYP2D6 inhibitor decreased ENDO concentrations by 35% in NM patients ($P = 0.005$), in particular, escitalopram, a weak CYP2D6 inhibitor often prescribed to patients with breast cancer treated with TAM to avoid the use of paroxetine, decreased ENDO levels by 38% in NM patients ($n = 14$) compared with NM patients not taking comedications (from 42.3 to 25.9 nmol/L, respectively). Potent CYP2D6 inhibitors decreased plasma ENDO concentrations by 54% in NM patients ($P = 0.0006$) to the level observed in IM patients not taking a CYP2D6 inhibitor (no significant difference between ENDO levels under potent inhibitors and IM patients not taking a CYP2D6 inhibitor, $P = 0.5$). In the final multivariable regression analysis, intake of potent CYP2D6 inhibitors remained significantly associated with plasma ENDO concentrations when accounting for CYP2D6 diplotype and *CYP3A4*22* genotype (**Table 3**). *CYP2D6* diplotype alone explained 16.8% of the variation in ENDO levels, further inclusion of *CYP3A4*22* genotype and of concomitant CYP2D6 inhibitors increased the explained variability to 17.6% and 19.4% (final model), respectively.

Weak or moderate/potent CYP3A4 inhibitors did not have a significant impact on plasma ENDO levels in the univariate analysis ($P = 0.8$ and $P = 0.2$, respectively). However, when patients were classified according to CYP2D6 phenotype (**Table 2**), NM patients treated with a moderate or potent CYP3A4 inhibitor had significantly lower plasma ENDO levels than NM patients without concomitant treatment ($P = 0.048$; **Table 2**), whereas weak CYP3A4 inhibitors did not have an impact on ENDO concentrations ($P = 0.3$). Due to an insufficient number of patients with other CYP2D6 phenotypes taking CYP3A4 inhibitors, their impact on plasma ENDO could not be evaluated. The impact of CYP3A4 inducers on plasma ENDO levels could not be evaluated because only two patients were concomitantly treated with a CYP3A4 inducer.

Impact of genetic polymorphisms on MRs

CYP2D6 diplotype was the only factor significantly associated with $MR_{NDT/ENDO}$ ($P < 0.0001$; **Table 4**). The multivariable analyses

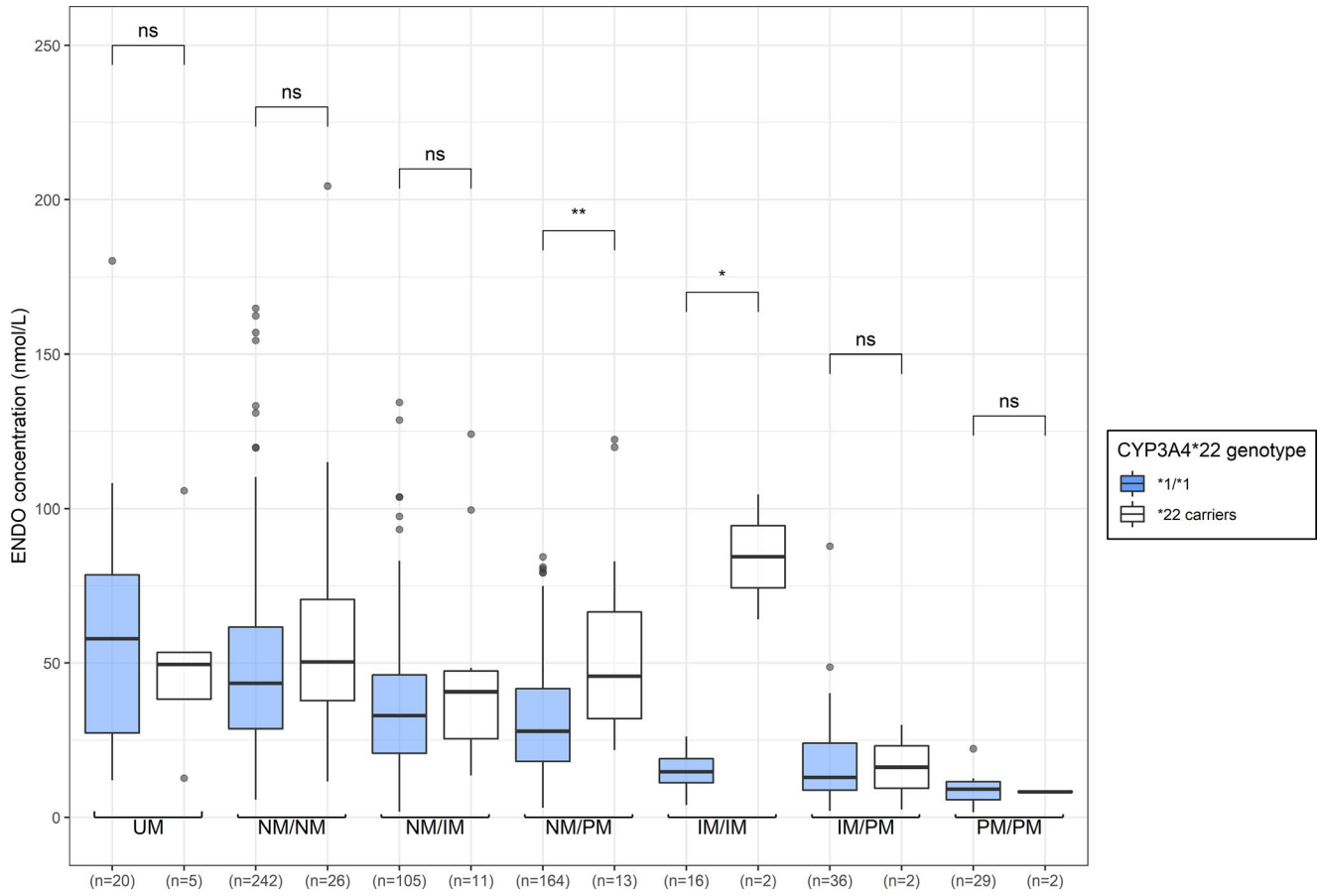


Figure 3 Plasma endoxifen (ENDO) concentration according to cytochrome P450 (*CYP*) *2D6* diplotype and *CYP3A4*22* genotype. Patients with missing *CYP3A4*22* genotype ($n = 4$) or concomitantly treated with CYP2D6 inhibitors, moderate or potent CYP3A4 inhibitors, or CYP3A4 inducers were excluded ($n = 53$). Not significant (ns) $P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$. NM, normal metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Table 2 Plasma ENDO concentrations according to CYP2D6 phenotype and concomitant intake of CYP2D6 inhibitors

	CYP2D6 phenotype									
	UM		NM[a]			IM[b]			PM	
	ENDO (nmol/L)	*n*	ENDO (nmol/L)	*n*	*P* value[c]	ENDO (nmol/L)	*n*	*P* value[c]	ENDO (nmol/L)	*n*
CYP2D6 inhibitor (*n* = 721)										
No CYP2D6 inhibitor	59.07 ± 39.17	25	42.28 ± 27.15	565	–	19.87 ± 19.11	56	–	8.87 ± 3.80	31
Weak or moderate[d]	71.97	1	27.25 ± 15.25	23	0.005	16.78 ± 10.07	5	0.9	10.10	1
Potent[e]	20.90	1	19.31 ± 11.77	11	0.0006	5.98 ± 4.81	2	0.1	NA	0
CYP3A4 inhibitor[e] (*n* = 682)										
No CYP3A4 inhibitor	NA	0	42.21 ± 27.13	557	–	20.07 ± 19.22	55	–	8.77 ± 3.83	30
Weak[f]	NA	0	49.11 ± 28.46	8	0.3	8.60	1	NA	11.76	1
Moderate or potent[g]	NA	0	23.11 ± 10.37	5	0.048	NA	0	NA	NA	0

Patients concomitantly treated with moderate or strong CYP3A4 inhibitors or CYP3A4 inducers were excluded (*n* = 9) for CYP2D6 inhibitor effect analysis, and patients concomitantly treated with CYP2D6 inhibitors (*n* = 46) or CYP3A4 inducers (*n* = 2) were excluded for CYP3A4 inhibitory effect analysis. Data are presented as mean ± SD.

CYP, cytochrome P450; ENDO, endoxifen; IM, intermediate metabolizer; NA, not applicable; NM, normal metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer.

[a]UM/PM, NM/NM, NM/IM, and NM/PM diplotypes. [b]IM/IM and IM/PM diplotypes. [c]Wilcoxon unpaired test for comparison between patients concomitantly treated with the respective inhibitor and without concomitant inhibitor. [d]Weak/moderate CYP2D6 inhibitors: escitalopram (*n* = 22), citalopram (*n* = 3), duloxetine (*n* = 3), celecoxib (*n* = 1), and sertraline (*n* = 1). [e]Potent CYP2D6 inhibitors: paroxetine (*n* = 7), flecainide (*n* = 3), amiodarone (*n* = 1), clomipramine (*n* = 2), fluoxetine (*n* = 1), fusidic acid (*n* = 1), and propafenon (*n* = 1). [f]Weak CYP3A4 inhibitors: esomeprazole (*n* = 13). [g]Moderate or potent CYP3A4 inhibitors: amiodarone (*n* = 1), ciprofloxacin (*n* = 1), clarithromycin (*n* = 1), diltiazem (*n* = 1), fluconazole (*n* = 1), fusidic acid (*n* = 1), and verapamil (*n* = 1).

Table 3 Multivariable regression analysis for plasma ENDO concentrations

	Coefficient[a]	95% CI	*P* value (*t*-test of coefficient)	*P* value (likelihood ratio test of global significance of variable)
Reference category: NM/NM diplotype, *CYP3A4*1/*1* genotype, and no concomitant CYP2D6 inhibitors	47.99	44.99; 50.99	< 0.001	
CYP2D6 diplotype				< 0.0001
UM (*n* = 27)	8.62	–1.29; 18.53	0.088	
NM/NM (*n* = 291)				
NM/IM (*n* = 123)	–10.43	–15.72; –5.14	< 0.001	
NM/PM (*n* = 187)	–15.26	–19.88; –10.65	< 0.001	
IM/IM (*n* = 19)	–25.90	–37.53; –14.28	< 0.001	
IM/PM (*n* = 44)	–29.11	–37.11; –21.10	< 0.001	
PM/PM (*n* = 33)	–38.60	–47.63; –29.58	< 0.001	
*CYP3A4*22* genotype				0.0003
**1/*1* (*n* = 659)				
**1/*22* or **22/*22* (*n* = 65)	11.90	5.48; 18.32	< 0.001	
CYP2D6 inhibitors				0.0001
No concomitant inhibitors (*n* = 678)				
Weak or moderate (*n* = 22)	–9.75	–20.47; 0.98	0.075	
Potent (*n* = 24)	–20.67	–30.90; –10.43	< 0.001	

Patients treated with CYP3A4 inducers (*n* = 2) and with missing *CYP3A4*22* genotype (*n* = 4) were excluded from the analysis.

CI, confidence interval; CYP, cytochrome P450; ENDO, endoxifen; IM, intermediate metabolizer; NM, normal metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer.

[a]As all the variables listed are indicator variables, the interpretation of each coefficient is as follows: a positive (or negative) value of the coefficient (*a*) indicates that the response variable (ENDO) is increased by *a* (respectively decreased by *a*) compared to the reference category. For example, for a given CYP3A4 genotype and use of CYP2D6 inhibitors, the mean ENDO value of NM/IM patients is 10.43 nmol/L lower than that of NM/NM patients.

showed that $MR_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ was significantly and independently associated with *CYP2D6* diplotype ($P < 0.0001$), *CYP3A4*22* ($P < 0.0001$), and *CYP2C19*2* ($P = 0.0001$) genotype (**Table S3**). $MR_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ was decreased in *CYP3A4*1/*1* and **1/*22* patients compared with **22/*22* patients suggesting that in patients with the same *CYP2D6* diplotype, higher TAM and lower

Table 4 Results of the linear regression analysis of CYP2D6 diplotype on $MR_{NDT/ENDO}$

	Coefficient[a]	95% CI	*P* value (*t*-test of coefficient)
$MR_{NDT/ENDO}$ (*n* = 677)			
CYP2D6 diplotype			
UM (*n* = 25)	3.49	−3.44; 10.42	0.323
NM/NM (reference) (*n* = 269)	12.89	10.87; 14.91	< 0.001
NM/IM (*n* = 116)	8.59	4.90; 12.27	< 0.001
NM/PM (*n* = 180)	12.44	9.25; 15.63	< 0.001
IM/IM (*n* = 18)	22.48	14.40; 30.55	< 0.001
IM/PM (*n* = 38)	38.44	32.70; 44.18	< 0.001
PM/PM (*n* = 31)	62.16	55.87; 68.45	< 0.001

Patients concomitantly treated with CYP2D6 inhibitors, moderate or potent CYP3A4 inhibitors, or CYP3A4 inducers were excluded (*n* = 53).
CI, confidence interval; CYP, cytochrome P450; IM, intermediate metabolizer; $MR_{NDT/ENDO}$, N-desmethyl tamoxifen to endoxifen metabolic ratio; NM, normal metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizer.
[a]As all the variables listed are indicator variables, the interpretation of each coefficient is as follows: a positive (or negative) value of the coefficient (*a*) indicates that the response variable ($MR_{NDT/ENDO}$) is increased by *a* (respectively decreased by *a*) compared to the reference category. For example, the mean $MR_{NDT/ENDO}$ value of NM/IM patients is 8.59 higher than that of NM/NM patients.

4-OHTAM concentrations are observed in the presence of two *CYP3A4*22* alleles, possibly because of a decreased conversion of TAM to 4-OHTAM. Increased $MR_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ was also observed in *CYP2C19*2* carriers.

$MR_{TAM/NDT}$ and $MR_{4\text{-}OHTAM/ENDO}$ were associated with *CYP2D6* diplotype ($P < 0.0001$) and phenotype ($P < 0.0001$), respectively (**Table S3**). *CYP3A5*3* was significantly associated with $MR_{TAM/NDT}$ and $MR_{4\text{-}OHTAM/ENDO}$ when coded as **1/*1* vs. **1/*3* or **3/*3* ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively). However, this SNP was no longer significant ($P = 0.7$ and $P = 0.3$, respectively) when coded as CYP3A5 expressor (**1/*1* and **1/*3*) vs. nonexpressor (**3/*3*) genotypes as suggested by Sanchez Spitman *et al.*[10] Because of the small number of patients with *CYP3A5*1/*1* genotype ($n = 5$) and the difficulty in interpreting the clinical meaning of the first classification compared to the expressor vs. nonexpressor classification, this SNP was not included in the multivariable analyses. *CYP3A4*1B* genotype (coded as **1/*1* and **1/*1B* vs. **1B/*1B*) was also found to be significantly associated with $MR_{TAM/NDT}$ in the univariate analysis ($P < 0.001$). However, the functional significance of this SNP has not been demonstrated, and there is a linkage disequilibrium with the wild-type allele (A) of rs776746 (SNP encoding the nonfunctional *CYP3A5*3* allele).[21] It may be speculated that *CYP3A5*3*, rather than *CYP3A4*1B* genotype, has contributed to significant associations with $MR_{TAM/NDT}$, especially because when *CYP3A5*3* (coded as **1/*1* vs. **1/*3* or **3/*3*) and *CYP3A4*1B* (coded as **1/*1* and **1/*1B* vs. **1B/*1B*) were entered in the multivariable analysis together with *CYP2D6* diplotype, the second one was no longer significant ($P = 0.11$). The presence of two *CYP2B6*6* (rs3745274) alleles was associated with increased $MR_{TAM/NOX}$ ($P < 0.001$; **Table S3**). Finally, no statistically significant SNPs were found on $MR_{TAM/4'OHTAM}$ and $MR_{NDT/Z'ENDO}$.

DISCUSSION

This work is, to our knowledge, the largest prospective study simultaneously evaluating factors that might influence the concentrations of TAM and six of its metabolites, including genetic polymorphisms in all the major enzymes involved in its metabolism. *CYP2D6* diplotype and *CYP3A4*22* genotype as well as concomitant intake of potent CYP2D6 inhibitors were significant predictors of ENDO concentrations. In addition, the comparison of plasma ENDO concentrations and $MR_{NDT/ENDO}$ among *CYP2D6* diplotypes showed that IM/IM patients had lower ENDO levels than NM/PM patients despite the same AS for both diplotypes. These results support the need to improve the *CYP2D6* genotype to phenotype classification system for TAM therapy.

Recent CPIC recommendations for TAM therapy discussed uncertainties in the translation of *CYP2D6* genotype into diplotypes and phenotypes.[19] We performed a comparison of plasma ENDO levels and $MR_{NDT/ENDO}$ between *CYP2D6* genotypes classified into the same diplotype. We showed that the presence of **10* and **41* alleles among IM/PM diplotype did not result in the same plasma ENDO levels as in **9* allele carriers, whereas all of these alleles are considered to be associated with reduced enzyme activity (AS = 0.5). This is consistent with previous studies showing that the activities of **10* and **41* alleles were lower than that of **9* allele.[18] Moreover, in our analysis, plasma ENDO levels were similar for **10/*4* or **41/*4* and PM/PM patients, confirming lower CYP2D6 activity of **10* and **41* alleles compared to **9* allele. Further studies including more patients with these genotypes are needed to evaluate if patients carrying **10/*4* and **41/*4* genotypes should be assigned into PM/PM instead of IM/PM diplotype (as suggested by our results) for prediction of ENDO concentration.

Furthermore, we found that NM/NM (AS = 2) and UM patients (AS > 2; UM/UM and UM/IM diplotypes) had similar ENDO levels and $MR_{NDT/ENDO}$. This is consistent with Hicks *et al.*,[16] who suggested that patients with AS = 2.5 or 3 should be attributed NM phenotype. Regarding patients with CYP2D6 AS = 1 (NM/PM and IM/IM), plasma ENDO levels were significantly lower in IM/IM patients than in NM/NM, NM/IM, and NM/PM patients but similar to IM/PM patients. Similar results were observed by Hertz *et al.*,[18] which altogether indicates that classification of IM/IM patients into NM phenotype as proposed by previous CPIC recommendations[15] needs to be re-evaluated. Based on ENDO levels in our study, IM/IM could be classified together with IM/PM (AS = 0.5) patients into the IM phenotype. Moreover, NM/PM had similar ENDO levels to NM/IM but lower than NM/NM patients, which might suggest classification of these diplotypes separately from NM/NM.

In our analysis, higher plasma ENDO levels were observed in *CYP3A4*22* carriers, a genotype associated with reduced mRNA expression and enzyme activity.[22] In particular, NM/

PM and IM/IM patients carrying *CYP3A4*22* allele had significantly higher ENDO levels than patients with the same CYP2D6 diplotype and *CYP3A4*22* noncarriers. Although unexpected, this result is consistent with previous studies showing that the presence of *CYP3A4*22* allele is associated with higher ENDO concentrations, particularly in patients with low CYP2D6 activity.[4,6,10]

One of the possible hypotheses for the increased concentrations of ENDO in *CYP3A4*22* carriers could be its impaired metabolism through CYP3A4. Although there is not much evidence in the literature that ENDO could be metabolized by CYP3A4, it has been suggested that norendoxifen, another metabolite of TAM, could be formed via N-demethylation of ENDO, which is a phase I reaction involving CYP isoenzymes.[23,24] In addition, a recent *in vitro* study showed that an estrogen-like metabolite of TAM (bisphenol tamoxifen) can be formed from ENDO in presence of CYP3A4.[25] More studies are needed to investigate the relative implication of CYP3A4 in ENDO metabolism compared with other enzymes.

In our study, NM patients cotreated with potent CYP2D6 inhibitors had 54% lower ENDO concentrations than NM patients without comedication with CYP2D6 inhibitors and, therefore, reached similar concentrations to IM patients, consistently with previous reports.[20,26] Concerning CYP3A4 inhibitors, lower ENDO levels in NM patients treated with moderate or strong CYP3A4 inhibitors were observed, but the low number of patients may have limited statistical significance. The final multivariable analysis, including *CYP2D6* diplotype, *CYP3A4*22* genotype, and CYP2D6 inhibitors explained 19.4% of the variability in ENDO levels. *CYP2D6* diplotype had the most substantial effect on ENDO as it explained 16.8% of the variability. This result is lower than that recently reported by Sanchez-Spitman *et al.*[10] ($R^2 = 0.42$), but their analysis was performed on ln-transformed concentration data, which partly explains our different result. However, our value is consistent with Hertz *et al.*[18] who reported that only 11% of the variability in ENDO levels was explained by *CYP2D6* phenotype.

Although the consideration of these factors will help to predict ENDO concentration, there is still uncertainty concerning the correlation of ENDO or other metabolites with clinical outcomes. Two retrospective analyses in patients with adjuvant breast cancer[7,12] have shown that ENDO concentration > 16 nmol/L and AAS > 1,798[27] are associated with a better therapeutic outcome. However a recent prospective study did not observe any significant association between clinical benefit of TAM and plasma ENDO exposure in 247 patients with neo-adjuvant and metastatic breast cancer,[13] corroborated by another recent study in 667 patients.[14] On the contrary, Helland *et al.*[28] reported a correlation between ENDO and 4-OHTAM concentrations and long-term survival in 99 retrospectively analyzed patients with adjuvant breast cancer. Therefore, the clinical utility of therapeutic drug monitoring of ENDO concentrations remains uncertain. This issue requires further elucidation based on data from prospective studies. Meanwhile, if we consider the 16 nmol/L threshold for ENDO,[7,12] our study shows that 97% of PM, 59% of IM, and 12% of NM + UM patients were below this value.

Finally, the analysis of genetic polymorphisms on MRs showed that *CYP3A4*22*, *CYP2C19*2*, and *CYP2B6*6* contribute to the variability in the metabolism of TAM. However, the results on MRs should be interpreted with caution as they are dependent not only on enzymes involved in a given metabolic pathway but also on the elimination of the metabolite.

The compliance to treatment is an important factor affecting clinical efficacy of TAM.[29] In this study, we excluded clearly noncompliant patients based on their plasma TAM or ENDO concentrations below the limit of quantification so that this should not be a confounding factor. Nevertheless, future analyses will further investigate the combined impact of genetic and nongenetic factors, such as age, body weight, and compliance, on TAM metabolism.

In conclusion, based on a large dataset of 730 patients with adjuvant breast cancer treated with TAM 20 mg/day, we provide results supporting re-evaluation of the existing *CYP2D6* genotype to phenotype classification system for TAM therapy. Moreover, this study refines the previous findings about the impact of genetic polymorphisms on TAM metabolism. Although personalization of TAM therapy based on *CYP2D6* genotype or ENDO concentrations is not currently recommended due to inconsistent results concerning their relationship with TAM efficacy or toxicity, the results of this study are of importance for future evaluations of factors impacting TAM outcome and to standardize the genotype to phenotype translation systems for TAM and other drugs with similar metabolic pathways.

METHODS

Patients and data collection

Eligible patients started treatment with TAM at 20 mg/day and were followed up every 6 months over 3 years. Inclusion criteria were histologically proven primary breast cancer, no metastatic disease at diagnosis, and estrogen receptor–positive and/or progesterone receptor–positive tumor assessed by locally performed immunohistochemistry. Each visit consisted in a clinical examination looking for side effects and a PK sampling; the comedications at each follow-up visit were recorded. The present report focuses on the evaluation of PK, PG, and comedication at first follow-up visit. All patients provided written informed consent in compliance with the ethical principles of the revised Declaration of Helsinki and with European regulations.

Plasma concentrations of TAM and its metabolites

Blood samples (10 mL) were collected in Vacutainer Lithium Heparin tubes from each patient during first the follow-up visit when steady-state concentrations of TAM and its metabolites were achieved. Patients were instructed not to take a TAM dose on the day of the PK sampling to assure trough plasma levels. Samples were immediately centrifuged at 1,400 *g* at ambient temperature, and plasma was stored at −20°C until analysis. Plasma concentrations of TAM, its two active metabolites 4-OHTAM and ENDO, as well as NDT, NOX, 4′-OHTAM, and Z′-ENDO were measured by a validated ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, as described previously.[30] MRs were calculated for TAM/4-OHTAM, TAM/NDT, NDT/ENDO, 4-OHTAM/ENDO, NDT/Z′-ENDO, TAM/NOX, and TAM/4′-OHTAM. AAS was calculated according to a recently proposed algorithm based on *in vitro* proliferation assays on Michigan Cancer Foundation-7 breast adenocarcinoma cells expressing estrogen receptors:

$$\begin{aligned} AAS = {} & 1 \times [C]_{TAM} + 0.38 \times [C]_{NDT} \\ & + 21.8 \times [C]_{4\text{–}OHTAM} + 74.4 \times [C]_{ENDO} \end{aligned}$$

where [C] is the plasma concentration of the respective compound.[27]

Genotyping

Blood samples for PG analysis were collected in Vacutainer EDTA tubes for each patient at inclusion. Description of the methods used for DNA extraction, genotyping of 63 selected SNPs, and CNV determination is provided in **Supplementary Material S1**.

CYP2D6 phenotype and AS

Patients were genotyped for the presence of decreased (**9*, **10*, **17*, and **41*) and nonfunctional (**4*, **6*, and **7*) alleles and gene copy number (**5* or duplication). The absence of one of these alleles led to **1* allele assignment. A phenotype and a score were assigned to each *CYP2D6* allele according to its activity: extensive NM (AS = 1) for wild-type (**1*), IM (AS = 0.5) for decreased activity, and PM (AS = 0) for nonfunctional alleles.[17] Based on the combination of alleles and the number of *CYP2D6* copies, patients were assigned a diplotype and an AS, which is the sum of the scores assigned to each allele: PM/PM (AS = 0), IM/PM (AS = 0.5), IM/IM (AS = 1), NM/PM (AS = 1), NM/IM (AS = 1.5), NM/NM and NM/NM/PM (UM/PM; AS = 2), and NMxn (xn represents the number of *CYP2D6* gene copies; UM/UM) and NM/NM/IM (UM/IM), which were collapsed into UM (AS > 2). Finally, patients were classified into CYP2D6 phenotypes: PM (AS = 0), IM (AS = 0.5), NM or IM (AS = 1), NM (AS = 1.5–2), and UM (AS > 2)[19]; the corresponding frequencies in our study were: 4.7%, 6.0%, 28.6%, 57.0%, and 3.7%, respectively.

Statistical analysis

HWE was assessed for all 63 SNPs using the Benjamini–Hochberg correction for multiple testing. For *CYP2D6*, *CYP2A6*, and *UGT2B17* SNPs, the analysis was performed in patients with two copies of the corresponding gene, as the HWE is a widely used model to describe the distribution of genotypes without CNV in a population. The associations of plasma ENDO levels and MRs with SNPs were examined using the qtlsnp Stata command and adjusted for multiple testing (Benjamini–Hochberg correction). After identification of SNPs significantly associated with ENDO concentrations or the different MRs, univariate and multivariable linear regression analyses with the respective SNPs were carried out in order to determine which SNPs were independently associated with ENDO levels and MRs (in these analyses, *CYP2D6* SNPs were replaced by *CYP2D6* diplotypes combining all the genetic polymorphisms and number of gene copies). The global significance of each variable was tested using likelihood ratio tests on the nested models. Kruskal–Wallis or Wilcoxon tests were used for comparisons of plasma concentrations or MRs between *CYP2D6* diplotypes and genotypes or patients with and without comedications. Data are presented as mean ± SD. All tests were two-sided, and a P value < 0.05 was considered statistically significant unless otherwise stated. Statistical analyses were performed in R version 3.4.2 coupled with RStudio and in Stata version 13.0 (StataCorp, College Station, TX).

SUPPORTING INFORMATION

Supplementary information accompanies this paper on the *Clinical Pharmacology & Therapeutics* website (www.cpt-journal.com).

Supplementary Material S1. Methods for genotyping and CNV analysis.
Table S1. List of single-nucleotide polymorphisms (n = 63) analyzed in the PHACS study with the corresponding gene.
Table S2. Mean ± SD plasma concentrations of TAM, major TAM metabolites, and MRs in patients with breast cancer from PHACS study at 6 months after treatment start according to *CYP2D6* diplotype. Patients concomitantly treated with CYP2D6 inhibitors, moderate or potent CYP3A4 inhibitors or CYP3A4 inducers were excluded (n = 53).
Table S3. Results of the linear regression analyses of genetic polymorphisms on the MRs. Patients concomitantly treated with CYP2D6 inhibitors, moderate or potent CYP3A4 inhibitors, or CYP3A4 inducers were excluded (n = 53). Patients without variant allele for the investigated single-nucleotide polymorphism were considered **1/*1* genotype.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the following clinical investigators for the inclusion and follow-up of patients in other participating centers: Drs. Nadine Dohollou, Chantal Bernard-Marty, Hortense Laharie-Mineur, Raymond Despax, Catherine Ferrer, Nadia Levasseur, Rodolphe Paulon, Philippe Houyau, Virginie Fichet, Jérôme Dauba, Guillermo Reyes Ortega, Nathalie Trufflandier, Stephen Ellis, Adela Carmen Cauchois, and Karine Salignon.

FUNDING

The PHACS study was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC 2009 #09-18-005). Alicja Puszkiel received a grant from French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared no competing interests for this work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.P., M.W.-K., and F.T. wrote the manuscript. H.R., A.E., J.R., M.D., W.J., T.F., E.C., M.W.-K., and F.T. designed the research. A.P., C.A., C.V., A.E., V.L.M., J.C.B., J.R., C.D., F.D., M.D., L.V.-B., W.J., E.S., I.S.B., H.R., M.W.-K., and F.T. performed the research. A.P., C.A., A.E., J.C.B., J.R., T.F., M.W.-K., and F.T. analyzed the data.

© 2019 The Authors *Clinical Pharmacology & Therapeutics* © 2019 American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics

1. Schroth, W. *et al.* Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* **302**, 1429–1436 (2009).
2. Rae, J.M. *et al.* CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 452–460 (2012).
3. Regan, M.M. *et al.* CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 441–451 (2012).
4. Antunes, M.V. *et al. CYP3A4*22* is related to increased plasma levels of 4-hydroxytamoxifen and partially compensates for reduced CYP2D6 activation of tamoxifen. *Pharmacogenomics* **16**, 601–617 (2015).
5. Antunes, M.V. *et al.* Influence of CYP2D6 and CYP3A4 phenotypes, drug interactions, and vitamin D status on tamoxifen biotransformation. *Ther. Drug Monit.* **37**, 733–744 (2015).
6. Teft, W.A. *et al.* CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 95–105 (2013).
7. Saladores, P. *et al.* Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J.* **15**, 84–94 (2014).
8. Schroth, W. *et al.* Improved prediction of endoxifen metabolism by CYP2D6 genotype in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Front. Pharmacol.* **8**, 582 (2017).
9. Mürdter, T.E. *et al.* Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 708–717 (2011).
10. Sanchez Spitman, A. B. *et al.* Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A combined genotypes on tamoxifen metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **73**, 1589–1598 (2017).
11. Lim, J.S.L. *et al.* Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **71**, 737–750 (2011).

12. Madlensky, L. *et al.* Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 718–725 (2011).
13. Neven, P. *et al.* Tamoxifen metabolism and efficacy in breast cancer: a prospective multicenter trial. *Clin. Cancer Res.* **24**, 2312–2318 (2018).
14. Sanchez-Spitman, A. *et al.* Tamoxifen pharmacogenetics and metabolism: results from the prospective CYPTAM study. *J. Clin. Oncol.* **37**, 636–646 (2019).
15. Crews, K.R. *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 376–382 (2014).
16. Hicks, J. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for *CYP2D6* and *CYP2C19* genotypes and dosing of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin. Pharmacol. Ther.* **98**, 127–134 (2015).
17. Gaedigk, A. *et al.* The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 234–242 (2008).
18. Hertz, D.L. *et al.* In vivo assessment of the metabolic activity of CYP2D6 diplotypes and alleles. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **80**, 1122–1130 (2015).
19. Goetz, M.P. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 and tamoxifen therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 770–777 (2018).
20. Borges, S. *et al.* Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**, 61–74 (2006).
21. Zeigler-Johnson, C. *et al.* CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Res.* **64**, 8461–8467 (2004).
22. de Jonge, H., Elens, L., de Loor, H., van Schaik, R.H. & Kuypers, D.R.J. The CYP3A4*22 C>T single nucleotide polymorphism is associated with reduced midazolam and tacrolimus clearance in stable renal allograft recipients. *Pharmacogenomics J.* **15**, 144–152 (2015).
23. Lu, W.J. *et al.* The tamoxifen metabolite norendoxifen is a potent and selective inhibitor of aromatase (CYP19) and a potential lead compound for novel therapeutic agents. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 99–109 (2012).
24. Lv, W., Liu, J., Lu, D., Flockhart, D.A. & Cushman, M. Synthesis of mixed (*E*, *Z*)-, (*E*)-, and (*Z*)-norendoxifen with dual aromatase inhibitory and estrogen receptor modulatory activities. *J. Med. Chem.* **56**, 4611–4618 (2013).
25. Johänning, J. *et al.* The formation of estrogen-like tamoxifen metabolites and their influence on enzyme activity and gene expression of ADME genes. *Arch. Toxicol.* **92**, 1099–1112 (2018).
26. Binkhorst, L. *et al.* Augmentation of endoxifen exposure in tamoxifen-treated women following SSRI switch. *Clin. Pharmacokinet.* **55**, 249–255 (2016).
27. de Vries Schultink, A.H.M. *et al.* An antiestrogenic activity score for tamoxifen and its metabolites is associated with breast cancer outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* **161**, 567–574 (2017).
28. Helland, T. *et al.* Serum concentrations of active tamoxifen metabolites predict long-term survival in adjuvantly treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **19**, 125 (2017).
29. McCowan, C. *et al.* Cohort study examining tamoxifen adherence and its relationship to mortality in women with breast cancer. *Br. J. Cancer* **99**, 1763–1768 (2008).
30. Arellano, C., Allal, B., Goubaa, A., Roché, H. & Chatelut, E. An UPLC–MS/MS method for separation and accurate quantification of tamoxifen and its metabolites isomers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **100**, 254–261 (2014).

Supplementary Material S1a Methods for genotyping and CNV analysis.

The selection of genes and SNPs was based on the search of literature of tamoxifen metabolism and on pharmacogenetics database (such as PharmGKB). Apart from the genes encoding for metabolising enzymes, SNPs of the NR1I2 and NR1I3 genes were also included in the analysis as they might influence the expression of CYP450 and drug transporters.

Genotyping was performed by IntegraGen SA, Evry, France.

- **SNP analysis**

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping of 63 selected SNPs (Supplementary Table 1) was performed on the Biomark (Fluidigm) in a microfluidic multiplex 96.96 dynamic array chip. 1 chip was used to analyze 90 samples for 96 SNP.

Briefly, a 14-cycle preamplification reaction was performed for each sample in 5 µl by pooling 96 Taqman Assays, 1.25 µl gDNA, and 2.5 µl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN, Cat. no. 206143). For each individual assay, 4µl of an Assay Mix containing Taqman Assays and 1X Assay Loading Reagent was loaded into one of the Assay Inlets on the chip.

The following solution (5 µl) was loaded in sample inlets: 2.1 µl Preamplified sample previously diluted to 1:5 in low TE Buffer, 2.5 µl 2X Taqman Genotyping Master Mix (ThermoFisher, Cat. no. 4371357), 0.25 µl 20X GT Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN 85000741), 0.05µl Ampli Taq Gold DNA polymerase (ThermoFisher, Cat. no. 4311818).

The Biomark's specific cycling program was used to amplify fragments:

Hot start: 95°C 10 min

PCR cycle: 50 cycles

95°C 15 sec

60°C 60 sec

The genotypes were obtained by clustering, using Fluidigm SNP Genotyping Analysis version 4.1.3 according to Fluidigm's recommendations.

- **CNV analysis**

CNV genotyping was performed on the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in a 384wells plate. For each specific assay, the following solution (3µl) was prepared and added in sample dilution aliquot (2µl, 5ng/µl): 2.5 µl 2X Taqman Genotyping Master Mix (ThermoFisher, Cat. No. 4371357), 0.3µl 20X Taqman Copy Number Reference Assay (Thermofisher, Cat. No. 4403328), 0.1µl 60X Taqman Copy Number Specific Assay (Thermofisher, Cat. No. 4400293). Each measure was realized in 3 replicates.

The 7900HT's specific cycling program was used to amplify fragments:

Hot start: 95°C 10 min.

PCR cycles: 40 cycles

95°C 15 sec

60°C 60 sec

ABI 7900HT SDS (Sequence Detection Systems) software and CopyCaller software were used for CNV analysis, according to Applied Biosystems recommendations.

- **Allele quantification for ambiguous genotypes**

For patients with heterozygous genotype for CYP2D6 *4, *41 or *9 allele and CYP2D6 CNV > 2 copies, a droplet digital PCR (ddPCR) technique was developed to quantify the number of copy of each allele. The method used a QX200™ Droplet Digital™ PCR System and QuantaSoft software from Biorad and is an adaptation of the CYP2D6 Allele-specific Copy Number Analysis kit used with QuantStudio™ 3D developed by Applied Biosystem. The first step is a DNA digestion in a 96-well plate with 20 µL of gDNA 5 ng/µL (100 ng), 5 µL of CutSmart™ Buffer 10X, 1 unit of Spel-HF™ (enzyme that cuts the CYP2D6 gene within intron 7 to separate duplicated gene copies) and water to bring the final volume to 50 µL. The 96-well plate was incubated at 37°C for 60 minutes then heated at 80°C for 20 minutes to inactivate enzyme. The PCR emulsion was then prepared with 2.2 µL of digested DNA (2 ng/ µL) and 19.8 µL of mixture containing 11 µL 2X ddPCR SuperMix (Biorad), 1.1 µL of the corresponding TaqMan Assay 20X (C_27102431_D0 for *4, C_34816116_20 for *41 and C_32407229_60 for *9) and 7.7 µL of water. Droplets were generated by combining 20 µL of sample reactions with 70 µL of Droplet Generation oil into a QX200 droplet generator. The whole volume (40–45 µL) of emulsion was

transferred to a 96-well PCR plate covered by aluminium film on the top and the PCR reaction was realized with the C1000 Touch thermal as follows: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 35 seconds and hybridation/extension at 55°C for 1 minute, 10 minutes at 98°C and then 12°C until droplet reading and data analysis. PCR endpoints in droplets were read by QX200 droplet Reader and alleles were quantified with QuantaSoft software.

Supplementary Material S1b List of single nucleotide polymorphisms (n = 63) analysed in the PHACS study with the corresponding gene.

Gene (allele)	rs number
CYP1A1	rs2470893
CYP1A1	rs2472297
CYP1A2 (*1C)	rs2069514
CYP1A2 (*1D)	rs35694136
CYP1A2 (*1F)	rs762551
CYP1B1	rs10012
CYP1B1	rs1056836
CYP1B1	rs1056837
CYP1B1	rs1800440
CYP2A6 (*2)	rs1801272
CYP2A6 (*9)	rs28399433
CYP2B6 (*6)	rs2279343
CYP2B6 (*6)	rs3745274
CYP2C19 (*17)	rs12248560
CYP2C19 (*2)	rs4244285
CYP2D6 (shared by *2,*4, *10, *17 and *41 alleles)	rs1135840
CYP2D6 (*2)	rs16947
CYP2D6 (*10)	rs1065852
CYP2D6 (*17)	rs28371706
CYP2D6 (*4)	rs3892097
CYP2D6 (*41)	rs28371725
CYP2D6 (*6)	rs5030655
CYP2D6 (*7)	rs5030867
CYP2D6 (*9)	rs5030656
CYP3A4 (*1B)	rs2740574
CYP3A4 (*22)	rs35599367

CYP3A5 (*3)	rs776746
NR1I2	rs10934498
NR1I2	rs1464603
NR1I2	rs1523130
NR1I2	rs2276706
NR1I2	rs2276707
NR1I2	rs2461823
NR1I2	rs2472671
NR1I2	rs2472677
NR1I2	rs3732360
NR1I2	rs3814057
NR1I2	rs6785049
NR1I2	rs7643645
NR1I2	rs3814055
NR1I3	rs2307418
NR1I3	rs2307424
NR1I3	rs2502815
NR1I3	rs3003596
NR1I3	rs4073054
SULT1A1	rs35728980
UGT1A10	rs8330
UGT1A4 (*2)	rs6755571
UGT1A4 (*3)	rs2011425
UGT1A4	rs3732218
UGT1A4	rs3732219
UGT1A8 (*2)	rs1042597
UGT1A8 (*3)	rs17863762
UGT1A8, UGT1A10	rs10187694
UGT2B15 (*2)	rs1902023
UGT2B15 (*4)	rs4148269
UGT2B17	rs28374627

UGT2B17	rs7678636
UGT2B7	rs28365063
UGT2B7	rs7668258
UGT2B7	rs7662029
UGT2B7	rs3924194
UGT2B7	rs7438135

Table S2 Mean ± SD plasma concentrations of TAM, major TAM metabolites and MRs in breast cancer patients from PHACS study at 6 months after treatment start according to CYP2D6 diplotype. Patients concomitantly treated with CYP2D6 inhibitors, moderate or potent CYP3A4 inhibitors or CYP3A4 inducers were excluded (n = 53).

	***CYP2D6* diplotype**							**p-value***
	UM (n = 25)	**NM/NM (n = 269)**	**NM/IM (n = 116)**	**NM/PM (n = 180)**	**IM/IM (n = 18)**	**IM/PM (n = 38)**	**PM/PM (n = 31)**	
TAM (nmol/L)	344.18 ± 169.96	319.76 ± 133.59	336.74 ± 162.83	302.56 ± 127.45	332.28 ± 219.62	300.27 ± 149.11	258.60 ± 109.59	0.0823
NDT (nmol/L)	627.60 ± 370.38	541.17 ± 249.36	638.60 ± 287.95	639.38 ± 299.84	645.23 ± 421.10	681.27 ± 358.85	603.21 ± 225.85	**0.0020**
NOX (nmol/L)	64.58 ± 49.09	72.44 ± 65.40	71.99 ± 62.67	65.62 ± 91.49	52.21 ± 40.08	57.67 ± 44.28	62.88 ± 40.34	0.5523
4-OHTAM (nmol/L)	8.39 ± 4.39	9.43 ± 8.19	6.98 ± 4.54	6.59 ± 6.03	5.39 ± 5.06	6.21 ± 7.84	5.42 ± 5.43	**<0.0001**
4'-OHTAM (nmol/L)	10.58 ± 6.18	9.67 ± 4.58	10.13 ± 5.21	10.01 ± 5.29	10.19 ± 7.89	9.42 ± 5.03	8.86 ± 3.95	0.8982
ENDO (nmol/L)	59.07 ± 39.17	49.80 ± 29.00	38.68 ± 26.29	33.37 ± 21.13	22.97 ± 24.13	18.39 ± 16.38	8.87 ± 3.80	**<0.0001**
Z'-ENDO (nmol/L)	19.17 ± 11.16	19.90 ± 10.85	22.08 ± 11.35	24.02 ± 11.37	26.51 ± 19.54	24.54 ± 11.70	25.14 ± 9.29	**<0.0001**
$MR_{TAM/4\text{-}OHTAM}$	44.80 ± 19.48	47.81 ± 28.53	59.11 ± 30.12	60.39 ± 36.05	71.61 ± 28.52	73.60 ± 41.13	67.35 ± 36.50	**<0.0001**
$MR_{TAM/NDT}$	0.62 ± 0.22	0.64 ± 0.24	0.57 ± 0.26	0.51 ± 0.17	0.53 ± 0.16	0.47 ± 0.13	0.46 ± 0.18	**<0.0001**
$MR_{NDT/ENDO}$	16.38 ± 20.78	12.89 ± 8.27	21.48 ± 15.30	25.33 ± 19.05	35.37 ± 12.46	51.33 ± 30.14	75.05 ± 33.78	**<0.0001**
$MR_{4\text{-}OHTAM/ENDO}$	0.17 ± 0.09	0.24 ± 0.26	0.26 ± 0.30	0.28 ± 0.44	0.36 ± 0.54	0.50 ± 0.73	0.82 ± 0.87	**<0.0001**

$MR_{NDT/Z'-ENDO}$	35.63 ± 16.31	30.18 ± 12.35	34.96 ± 32.64	29.72 ± 14.47	27.17 ± 9.75	29.23 ± 10.84	26.10 ± 11.16	0.0680
$MR_{TAM/NOX}$	6.92 ± 3.86	6.28 ± 3.52	6.93 ± 5.44	6.46 ± 3.57	7.87 ± 3.62	6.53 ± 3.78	5.54 ± 3.59	0.2474
$MR_{TAM/4'-OHTAM}$	37.61 ± 16.06	35.70 ± 12.48	36.59 ± 14.62	33.69 ± 13.46	36.36 ± 13.70	38.46 ± 31.93	32.21 ± 14.36	0.1498
AAS	5,160.2 ± 3135.4	4,435.5 ± 2340.1	3,609.1 ± 2150.2	3,171.7 ± 1749.5	2,404.0 ± 2206.3	2,063.0 ± 1399.5	1,265.7 ± 410.8	**<0.0001**

4-OHTAM, 4-hydroxy tamoxifen; 4'-OHTAM, 4'-hydroxy tamoxifen; AAS, antiestrogenic activity score proposed by de Vries *et al.* [1]; ENDO, endoxifen; IM, intermediate metaboliser; MR, metabolic ratio; NDT, N-desmethyl tamoxifen; NM, normal metaboliser; NOX, tamoxifen N-oxide; PM, poor metaboliser; TAM, tamoxifen; UM, ultrarapid metaboliser; Z'-ENDO, Z'-endoxifen.

*Kruskal-Wallis test

1. de Vries Schultink AHM, Alexi X, van Werkhoven E, et al. An Antiestrogenic Activity Score for tamoxifen and its metabolites is associated with breast cancer outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;161(3):567-574. doi:10.1007/s10549-016-4083-6.

Table S3 Results of the linear regression analyses of genetic polymorphisms on the MR. Patients concomitantly treated with CYP2D6 inhibitors, moderate or potent CYP3A4 inhibitors or CYP3A4 inducers were excluded (n = 53). Patients without variant allele for the investigated single nucleotide polymorphism were considered **1/*1* genotype.

	Coefficient[a]	**95% CI**	**p-value (t-test of coefficient)**	**p-value (likelihood ratio test of global significance of variable)**
$MR_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ (n = 661)				
NM/NM diplotype, *CYP3A4*1/*1* or **1/*22* and *CYP2C19*1/*1* genotype (reference)	44.07	39.99; 48.16	<0.001	
CYP2D6 diplotype				<0.0001
UM (n = 25)	-4.96	-17.76; 7.82	0.446	
NM/NM (n = 266)				
NM/IM (n = 116)	12.98	6.19; 19.77	<0.001	
NM/PM (n = 173)	12.59	6.65; 18.53	<0.001	
IM/IM (n = 17)	24.35	9.14; 39.55	0.002	
IM/PM (n = 35)	24.57	13.62; 35.53	<0.001	
PM/PM (n = 29)	20.28	8.40; 32.16	0.001	
*CYP3A4*22* genotype (rs35599367)				<0.0001
**1/*1* or **1/*22* (n = 658)				
**22/*22* (n = 3)	88.13	52.75; 123.51	<0.001	
*CYP2C19*2* genotype (rs4244285)				0.0001
**1/*1* (n = 474)				
**1/*2* or **2/*2* (n = 187)	10.84	5.54; 16.14	<0.001	
$MR_{TAM/NDT}$ (n = 675)				
NM/NM diplotype and *CYP3A4*1/*1* or **1/*1B* genotype (reference)	0.643	0.617; 0.668	<0.001	

CYP2D6 diplotype				
UM (n = 25)	-0.038	-0.126; 0.050	0.400	
NM/NM (n = 267)				
NM/IM (n = 116)	-0.078	-0.125; -0.031	0.001	<0.0001
NM/PM (n = 180)	-0.129	-0.169; -0.088	<0.001	
IM/IM (n = 18)	-0.112	-0.214; -0.009	0.032	
IM/PM (n = 38)	-0.175	-0.248; -0.102	<0.001	
PM/PM (n = 31)	-0.185	-0.265; -0.105	<0.001	
*CYP3A4*1B* genotype (rs2740574)				<0.0001
**1/*1 or *1/*1B* (n = 671)				
**1B/*1B* (n = 4)	0.495	0.282; 0.707	<0.001	
$MR_{4\text{-OHTAM/ENDO}}$ (n = 666)				
CYP2D6 phenotype				
UM (n = 25)	-0.082	-0.244; 0.079	0.317	Univariate analysis
NM (reference) (n = 560)	0.257	0.224; 0.290	<0.001	
IM (n = 52)	0.199	0.085; 0.314	0.001	
PM (n = 29)	0.559	0.408; 0.709	<0.001	
$MR_{TAM/NOX}$ (n = 649)				
*CYP2B6*6* genotype (rs3745274)				Univariate analysis
**1/*1* or **1/*6* (reference) (n = 604)	6.33	6.01; 6.64	<0.001	
**6/*6* (n = 45)	2.23	-3.42; -1.04	<0.001	

4-OHTAM, 4-hydroxy tamoxifen; CI, confidence interval; ENDO, Z-endoxifen; IM, intermediate metaboliser; MR, metabolic ratio; NDT, N-desmethyl tamoxifen; NM, normal metaboliser; NOX, tamoxifen N-oxide; PM, poor metaboliser; TAM, tamoxifen; UM, ultrarapid metaboliser.

[a] As all the variables listed are indicator variables, the interpretation of each coefficient is as follows: a positive (or negative) value of the coefficient (*a*) indicates that the response variable (e.g. $MR_{TAM/4\text{-OHTAM}}$) is increased by *a* (respectively decreased by *a*) compared to the reference category. For example, for a given *CYP3A4*22* and

*CYP2C19*2* genotype, the mean $MR_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ value of NM/IM patients is 12.98 higher than that of NM/NM patients.

2.3 Analyse des données longitudinales du tamoxifène et métabolites par approche de pharmacocinétique de population

2.3.1 Article scientifique n°2

Ces travaux ont été réalisés sur la totalité des données pharmacocinétiques de l'étude PHACS et feront prochainement l'objet d'une publication.

A joint population pharmacokinetic model of tamoxifen and six metabolites in breast cancer patients: quantification of the impact of genetic polymorphisms and co-medications

Alicja Puszkiel[1], Cécile Arellano[1], Christelle Vachoux[1], Alexandre Evrard[2,3], Valérie Le Morvan[4], Jean-Christophe Boyer[2], Jacques Robert[4], Caroline Delmas[1,5], Florence Dalenc[1,5], Marc Debled[4], Laurence Venat-Bouvet[6], William Jacot[3,7], Etienne Suc[8], Isabelle Sillet Bach[9], Thomas Filleron[5], Henri Roché[5], Etienne Chatelut[1,5], Fabienne Thomas[1,5,*], Melanie White-Koning[1,*]

1 Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm U1037, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

2 Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Nîmes-Carémeau, Nîmes, France

3 IRCM, Inserm, Université de Montpellier, ICM, Montpellier, France

4 Institut Bergonié, Bordeaux, France

5 Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse – Oncopole, Toulouse, France

6 CHU Dupuytren, Limoges, France

7 Institut du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

8 Clinique Saint Jean du Languedoc, Toulouse, France

9 CH, Brive, France

CORRESPONDING AUTHOR

Mélanie White-Koning, PhD

Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm U1037, Université Paul Sabatier - Toulouse III

2 Avenue Hubert Curien,

31100 Toulouse, France

melanie.white-koning@univ-tlse3.fr

Tel: +33 5 31 15 55 74

KEYWORDS

Tamoxifen, Endoxifen, Metabolite, Pharmacokinetics, Non-Linear Mixed-Effects Models, CYP2D6,

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

The PHACS study was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC 2009 #09-18-005). Alicja Puszkiel received a grant from French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

ABSTRACT

Background and Objective: Tamoxifen (TAM), used in the adjuvant treatment of hormone-dependent breast cancer, undergoes an extensive metabolism into more active endoxifen (ENDO) and 4-hydroxytamoxifen (4-OHTAM) and several other metabolites. The variable activity of metabolising enzymes (mainly CYP2D6) can impact formation of TAM metabolites and possibly the therapeutic outcome. The aim of this study was to quantify the impact of genetic polymorphisms and co-medications on the pharmacokinetics (PK) of TAM in adjuvant breast cancer patients using a joint PK model.

Methods: Concentration-time data for TAM and six metabolites (N-desmethyltamoxifen [NDT], 4-OHTAM, 4'-hydroxytamoxifen [4'-OHTAM], ENDO, Z'-endoxifen [Z'-ENDO] and tamoxifen N-oxide [NOX-TAM]) come from a prospective, multicenter, 3-year follow-up study of adjuvant TAM (20 mg/day) in breast cancer patients. Plasma samples were drawn at trough every 6 months over a 3-year period and co-medications at time of sampling were recorded. Genotyping for 63 single nucleotide polymorphisms in CYP enzymes was performed at study inclusion. Concentration-time data were analysed using non-linear mixed-effects modelling in NONMEM 7.4.1.

Results: PK data for TAM and six metabolites from 917 patients (n = 27076 concentrations) were analysed simultaneously with a seven-compartment model. CYP2D6 phenotype (poor [PM], intermediate [IM], normal [NM] and ultra-rapid [UM]), *CYP3A4*22* and *CYP2B6*6* genotypes, concomitant CYP2D6 inhibitors, age and body weight had a significant impact on TAM metabolism. The formation of ENDO from NDT was decreased in PM and IM patients by 81% and 65%, respectively, and increased by 47% in UM patients, compared to NM. Dose-adjustment simulations support a dose increase from 20 mg/day (standard dose) to 40 and 80 mg/day in IM and PM, respectively, to reach previously proposed ENDO target concentration of 16 nmol/L.

Conclusion: The developed model can be used to establish recommendations for monitoring of plasma ENDO concentrations and to individually adjust doses. Nevertheless, the relationship between plasma ENDO exposure and treatment efficacy/toxicity still needs to be confirmed in prospective trials.

1 Introduction

Tamoxifen (TAM), a selective estrogen receptor (ER) modulator, has been the cornerstone of ER-positive breast cancer treatment for over 40 years. TAM undergoes a complex metabolism with over 20 identified metabolites [1,2] of which (Z)-endoxifen (ENDO) and (Z)-4-hydroxy tamoxifen (4-OHTAM) have approximately 30 to 100 fold-higher activity towards inhibition of ER-dependent cell proliferation than the parent compound [3,4]. The metabolism of TAM is mediated by cytochrome P450 (CYP) family isoenzymes, mainly CYP2D6 but also CYP3A4/5, CYP2C19, CYP2C9 and others [1,2]. CYP4A4/5 is the main enzyme involved in the formation of TAM major metabolite N-desmethyltamoxifen (NDT) and CYP2D6 is the only enzyme responsible for its further conversion to ENDO. The formation of 4-OHTAM from TAM is mediated mainly by CYP2D6 with implication of other isoenzymes (CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4). The conversion of 4-OHTAM to ENDO is mediated mainly by CYP3A4/5. Genetic polymorphisms, co-medications and other factors affecting CYP isoenzymes activity impact plasma concentrations of active metabolites with possible significance on the therapeutic outcome. Extensive research has been carried out to understand the reasons of high inter-individual variability (IIV) of TAM efficacy and toxicity, particularly in terms of *CYP2D6* genetic polymorphisms. However, since conflicting results about the relationship between *CYP2D6* genotype and TAM efficacy have been reported [5–7], recent studies have focused on the evaluation of the association between plasma ENDO concentrations and therapeutic outcome and have produced, again, contradictory results [8–11]. Therefore, no personalization of TAM therapy based on monitoring of plasma ENDO concentrations or *CYP2D6* genotype is currently recommended and there is a strong need for prospective studies evaluating the clinical utility of pharmacokinetic (PK)-guided dosing of TAM and the impact of different factors on TAM metabolism which may provide an explanation for these inconsistent results.

Most of the analyses aiming to investigate the impact of *CYP2D6* and other genetic polymorphisms on ENDO levels used standard approaches. To date, two population PK models describing disposition of both TAM and ENDO have been reported. In the first model (18), TAM was directly converted to ENDO without accounting for the intermediate metabolites which does not allow for an accurate quantification of the impact of genetic polymorphisms on TAM metabolism. In addition, in that study, the activity of

CYP2D6 and CYP3A4 was evaluated by concomitant administration of dextromethorphan, a dual phenotypic probe for CYP2D6 and CYP3A. In the second PK model [12], CYP2D6 genotyping was only performed for **3*, **4*, **5* and **6* variant alleles which do not cover all the most frequent allelic variants in Caucasians especially regarding the reduced activity alleles. Although the authors performed a phenotypic assessment of CYP2D6 activity, the effect of CYP2D6 phenotype based on extensive genotyping should be assessed. Finally, neither of these models included data for all the major metabolites of TAM (one and three metabolites in the first and second model, respectively) and both of them were based on a small number of patients (n = 40 and n = 97, respectively), which does not allow for the accurate quantification of the impact of rare genotypes. Therefore, a development of a joint population PK model for TAM and all its major metabolites based on data from a large, longitudinal, prospective study with exhaustive data on genotyping and other relevant factors influencing TAM PK could quantify their respective impact on ENDO exposure and help to perform future evaluations aiming to personalise TAM therapy.

In light of the above considerations, the aims of this study were to 1) develop a population PK model describing steady-state concentrations of TAM and its six major metabolites in breast cancer patients treated with TAM 20 mg/day in an adjuvant setting and 2) quantify the impact of genetic polymorphisms, co-medications and demographic characteristics on the PK of TAM and its metabolites. The final PK model was subsequently used to evaluate the alternative dosing regimens necessary to reach a target exposure to ENDO in patients with impaired CYP2D6 activity.

2 Material and methods

2.1 Study population

Data come from a large, prospective, multicenter, 3-year follow-up study aiming to investigate the relationship between PK, pharmacogenetics (PG) and toxicity of TAM and aromatase inhibitors in adjuvant breast cancer patients (PHACS; ClinicalTrials.gov NCT01127295). The inclusion criteria were: histologically proven primary breast cancer, no metastatic disease at diagnosis, ER–positive and/or progesterone receptor (PR)–positive tumour assessed by locally performed

immunohistochemistry. Eligible patients started treatment with TAM at 20 mg/day and were followed-up every 6 months over 3 years. All patients provided written informed consent in adherence with the ethical principles of the revised Declaration of Helsinki and with French regulations.

2.2 Data collection

Blood samples for PK analysis were collected in 5 mL lithium heparinized Vacutainer tubes at inclusion (pre-treatment) and 24-hours post-dose every 6 months during 3-year follow-up. In addition, data on co-medication at time of PK sampling as well as on adherence during 10 days preceding the visit were reported by the clinician. Samples were centrifuged at 1400 x *g* at ambient temperature, plasma was transferred to propylene tubes and stored at -20°C until analysis. Plasma concentrations of TAM, NDT, tamoxifen N-oxide (NOX-TAM), (Z)-4-hydroxytamoxifen (4-OHTAM), (Z)-4'-hydroxytamoxifen (4'-OHTAM), (Z)-endoxifen (ENDO) and (Z')-endoxifen (Z'-ENDO) were quantified by a validated UPLC-MS/MS method [13]. The lower limit of quantification (LLOQ) was 5 ng/mL for TAM, NDT and NOX-TAM and 0.5 ng/mL for 4-OHTAM, 4'-OHTAM, ENDO and Z'-ENDO. Plasma concentrations were converted to nmol/L using the molecular weight of each compound. Blood samples for genotyping were collected in 7 mL EDTA Vacutainer tubes at study inclusion for all the participants. The analysis of 63 selected single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes of interest was described elsewhere [14]. Based on the presence of respective *CYP2D6* alleles (**4*, **6*, **7*, **9*, **10*, **17*, **41*) and the number of gene copies (**5* or duplication), patients were assigned a poor (PM), intermediate (IM), normal (NM) or ultrarapid (UM) metaboliser CYP2D6 phenotype [15,16] (Supplementary Material S1).

2.3 Population Pharmacokinetic Analysis

2.3.1 Model development

The development of a joint parent-metabolite model was performed in a stepwise manner. First, a one compartment model with first order absorption and elimination was used to fit concentration-time data of the parent compound (TAM). The estimates of the absorption rate constant (k_a) and of the apparent

volume of distribution (V_{TAM}) obtained from this model were subsequently used to fix the corresponding parameters in the models including metabolites. NDT, 4-OHTAM and ENDO were included sequentially in the TAM model and addition of an elimination rate constant (k_e) for each intermediate metabolite (NDT and 4-OHTAM) was tested (to account for the metabolism into other metabolites for which PK data were not available). For 4'-OHTAM and NOX-TAM which are directly formed from TAM, intermediate models were built including one compartment for TAM and one for the metabolite. The estimates of the conversion rate constants from these intermediate models ($k_{TAM/4'\text{-}OHTAM}$ and $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$) were used as initial estimates in the full metabolite model and the elimination rate constants of 4'-OHTAM and NOX-TAM ($k_{e,TAM/4'\text{-}OHTAM}$ and $k_{e,TAM/NOX\text{-}TAM}$, respectively) were fixed to the estimates from the intermediate models. To account for the problem of identifiability of PK parameters when modelling parent and metabolite data, the apparent volumes of distribution of the metabolites were fixed to the value of V_{TAM}. The formation and elimination of metabolites were described by first-order conversion (k) or elimination (k_e) rate constants, respectively.

The IIV was included on PK parameters according to the exponential model i.e. assuming a log-normal distribution. The inclusion of inter-occasion variability (IOV) on PK parameters was tested. The residual variability was estimated separately for each compound according to a proportional error model.

2.3.2 Covariate screening

The screening of the potential covariates was performed by plotting the individual PK parameters from the base model versus the continuous covariates or using box-plots for categorical covariates. The selection of relevant SNPs to be included in the covariate analysis was based on the previous PK-pharmacogenetic (PG) analysis of the data from the PHACS study [14].

The continuous covariates (body weight [BW], age) were included in the model according to the allometric function:

$$\theta_i = \theta_\mu \cdot (cov_i/cov_{median})^{\theta cov} \cdot \exp(\eta_i)$$

Where θ_i is the estimate of the parameter for the *i*th subject, θ_μ is the parameter population mean estimate, cov_i is the value of the covariate for the *i*th subject, cov_{median} is the population median of the

covariate, θ_{cov} is the estimated effect of the covariate on the parameter and η_i is the deviation from the mean for the *i*th subject with zero mean and variance ω^2.

For categorical covariates (CYP2D6 phenotype, *CYP3A4*22*, *CYP3A5*3*, *CYP2C19*2*, **17*, *CYP2B6*6* genotypes, CYP2D6 inhibitors) a separate covariate effect was estimated. For example, for *CYP3A4*22* genotype, the coefficient for **22* carriers (**1/*22* or **22/*22* genotype) relative to **22* non-carriers (**1/*1*, reference) was estimated according to the following equation:

$$\theta_i = \theta_\mu \cdot \theta^{CYP3A4*22_carrier} \cdot \exp(\eta_i)$$

Where θ_μ is the parameter population mean for *CYP3A4*22* non-carriers and θ is the estimate of the effect of *CYP3A4*22* genotype on the parameter. *CYP3A4*22_carrier* is equal to 1 if the patient is a *CYP3A4*22* carrier, and 0 otherwise.

A different type of coding was considered for inclusion of CYP2D6 phenotype on NDT to ENDO conversion rate constant ($k_{NDT/ENDO}$). A separate $k_{NDT/ENDO}$ was estimated for each phenotype (UM, NM, IM and PM). The effect of CYP2D6 inhibitors was tested on $k_{NDT/ENDO}$ of UM, NM, IM and PM patients separately to account for the difference of the effect of CYP2D6 inhibitors according to CYP2D6 phenotype. For example, the effect of a potent CYP2D6 inhibitor on $k_{NDT/ENDO}$ in NM patients was estimated according to the following equation:

$$k_{NDT/ENDO,NMi} = k_{NDT/ENDO,NM} \cdot \theta^{CYP2D6_potent_inhibitor} \cdot \exp(\eta_{kNDT/ENDOi})$$

where $k_{NDT/ENDO,NMi}$ is the estimate of $k_{NDT/ENDO}$ for the *i*th subject with NM phenotype, $k_{NDT/ENDO,NM}$ is the mean estimate of $k_{NDT/ENDO}$ in NM patients, θ is the effect of potent CYP2D6 inhibitor on $k_{NDT/ENDO,NM}$ and *CYP2D6_potent_inhibitor* is equal to 1 if the patient took a potent CYP2D6 inhibitor, and 0 otherwise.

For missing continuous covariates (i.e. BW), the missing value was imputed using the last observation (i.e. from the preceding visit) for a given patient and if no data were available, the missing covariate was imputed with the median value in the studied population.

For the genetic covariates (*CYP3A4*22, CYP3A5*3*, *CYP2C19*2* and **17, CYP2B6*6*), the missing data were imputed with the most frequent genotype since the number of patients with missing genotype

was low (~1.5% for *CYP3A4*22*, *CYP3A5*3*, *CYP2C19*2*, **17* and 2.9% for *CYP2B6*6*), whereas missing CYP2D6 phenotype data were handled by estimating a separate parameter for the missing category because of a higher number of missing values (5.8%) [17].

Stepwise covariate modelling was performed using the base model. Each covariate was included separately on a PK parameter according to its clinical plausibility and previous graphical examination. A covariate was considered significant if its inclusion resulted in a drop in objective function value (OFV) of at least 3.84 points ($p < 0.05$, 1 degree of freedom [df], χ^2 test). Next, all the significant covariates were included in the model and a stepwise backward deletion was performed. If the removal of the covariate from the model resulted in an increase of at least 6.63 points in the OFV ($p<0.01$, 1 df, χ^2 test), it was considered significantly associated with the PK parameter.

2.3.3 Model selection and evaluation

Statistical discrimination between nested models was based on the log-likelihood ratio test using the OFV. A drop of at least 3.84 points in OFV ($p < 0.05$, 1 df, χ^2 test) between nested models was considered statistically significant. Apart from the OFV, the selection of the model was based on goodness-of-fit plots, precision (relative standard error, RSE %), stability and plausibility of the estimates. Goodness-of-fit plots included observed versus individual (IPRED) or population predicted (PRED) concentrations, conditional weighted residuals (CWRES) versus time or PRED as well as a visual predictive check (VPC) with 1000 replicates of the original dataset.

2.4 Model-based simulations

To compare the predictions of the developed model with the previously reported plasma concentrations in breast cancer patients, simulations (n = 100) were performed using the original dataset to keep the original frequency of the genotypes. The mean (standard deviation [SD]) of the simulated steady-state trough concentrations ($C_{ss,trough}$) were compared with those reported in the literature.

Next, model-based simulations were performed to evaluate the impact of CYP2D6 phenotype and all the significant covariates in the final model on plasma ENDO exposure. Plasma ENDO $C_{ss,trough}$ were simulated according to CYP2D6 phenotype and categorical covariates (n = 1000 for each combination

of CYP2D6 phenotype + categorical covariate) using the estimates of the final model. The previously reported ENDO $C_{ss,trough}$ of 16 nmol/L, associated with a 26% reduction of breast cancer recurrence in an adjuvant setting [8], was used as the therapeutic target. Alternatively, de Vries Schultink *et al.* suggested an antiestrogenic activity score (AAS) which takes into account plasma concentrations of TAM, NDT, 4-OHTAM and ENDO and their respective antiestrogenic activity [18]. The AAS was calculated in the following manner:

$$AAS = C_{ss,trough,TAM} + 0.38 \cdot C_{ss,trough,NDT} + 21.8 \cdot C_{ss,trough,4\text{-}OHTAM} + 74.4 \cdot C_{ss,trough,ENDO}$$

The AAS threshold of 1798 was associated with a 33% lower risk of breast cancer recurrence in a retrospective analysis [18].

The impact of BW and age on plasma concentrations of TAM, NDT and ENDO was evaluated through simulations. For this purpose, $C_{ss,trough}$ were simulated for a patient (CYP2D6 NM phenotype) with 1) median BW and age, 2) median BW and 5th percentile age and 3) median BW and 95th percentile age. Simulations were also performed for a patient with median age and 5th and 95th percentile BW in the studied population (n = 1000 for each).

Finally, dose-adjustment simulations were performed in patients at increased risk of subtherapeutic ENDO $C_{ss,trough}$. The alternative doses of 40 and 60 mg/day were selected for simulations in CYP2D6 IM patients whereas doses of 40, 60 and 80 mg/day were selected for simulations in CYP2D6 PM patients (n = 1000 for each dose).

2.5 Software

PK modelling and simulations were performed in NONMEM version 7.4.1 (ICON Development Solutions, Ellicott City, MD, USA) coupled with Piraña [19] and PsN toolkit [20]. The concentration-time data were analysed using first order conditional estimation method with interaction option (FOCE-I). R software (version 3.5.1) coupled with RStudio (version 1.1.456) was used for data processing and diagnostic plots.

3 Results

3.1 Patients' characteristics and data

The genetic and demographic characteristics of 917 patients included in the analysis are summarized in Table 1. All the patients were women with a median age of 48 years and median BW of 64 kg. At each time point, if the TAM and all six metabolite concentrations were below LLOQ, the samples were excluded, hence leaving a total of 3868 time points (27076 plasma concentrations) in the analysis. Of those, 402 concentrations (1.5%) were below LLOQ and were included in the analysis with a value set to LLOQ/2. The median sampling time was 24.1 hours (range 0 – 393) after dose. Plots of concentrations versus time after dose for each compound all visits confounded are presented in Supplementary Figure S2.

3.2 Population Pharmacokinetic Analysis

3.2.1 Model development

The concentration-time data of TAM and six metabolites were described simultaneously by a joint seven-compartment model (Figure 1). The disposition of each compound was modelled using one-compartment which was dictated by the sparse study design. IIV was included on TAM to NDT ($k_{TAM/NDT}$), TAM to 4-OHTAM ($k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$), NDT to ENDO ($k_{NDT/ENDO}$), TAM to 4'-OHTAM ($k_{TAM/4'\text{-}OHTAM}$) and TAM to NOX-TAM ($k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$) conversion rate constants and on NDT elimination rate constant ($k_{e,NDT}$). IIV could not be estimated on the remaining PK parameters (NDT to Z'ENDO [$k_{NDT/Z'ENDO}$] and 4-OHTAM to ENDO [$k_{4\text{-}OHTAM/ENDO}$] conversion rate constants and ENDO elimination rate constant [$k_{e,ENDO}$]) and was therefore fixed to 0. The associated η-shrinkage was small (< 14%) except for $k_{TAM/4'\text{-}OHTAM}$ for which η-shrinkage was 29%. The inclusion of IOV (defined as various combinations of two or three occasions, e.g. 6, 12, 18 months versus 24, 30 and 36 months visits) was tested on $k_{TAM/NDT}$, $k_{NDT/ENDO}$, $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$ and $k_{e,NDT}$. However, it resulted in significantly increased η-shrinkage (> 20%) and thus inaccurate individual predictions, therefore IOV was not retained in the model. The residual error was coded separately for each compound according to a proportional model

and was associated with small ε-shrinkage (< 8%). The results of the final PK model with respective RSE (%) and η- and ε-shrinkage values are presented in Table 2.

3.2.2 Covariate analysis

Table 1 includes the covariates tested in the model with their respective median (range) values for continuous and number (%) for the categorical covariates. Covariate relationships were investigated for $k_{TAM/NDT}$, $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$, $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$, $k_{NDT/ENDO}$ and $k_{e,ENDO}$; the plots of the individual PK parameters versus covariates are presented in Figures S3-S10. The results of the univariate covariate inclusion in the base model are presented in Table S11.

Estimation of a separate $k_{NDT/ENDO}$ for each CYP2D6 phenotype resulted in a significant decrease in OFV ($p<0.00001$). The mean $k_{NDT/ENDO}$ was 81% and 65% lower in PM and IM patients, respectively, and 47% higher in UM patients, compared to NM patients. Of note, in patients with missing CYP2D6 phenotype, the mean $k_{NDT/ENDO}$ was 28% higher than in NM patients. The concomitant treatment by weak/moderate and potent CYP2D6 inhibitors decreased $k_{NDT/ENDO}$ in both NM and UM patients by 29% (RSE = 6.0%) and 47% (RSE = 6.4%), respectively. CYP2D6 inhibitors (irrespectively of the potency) had no significant impact on $k_{NDT/ENDO}$ in PM nor in IM patients ($p = 0.65$ and $p = 0.58$, respectively).

A common coefficient for CYP2D6 PM and IM phenotypes was included on $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$. Both of these phenotypes were associated with a 28% (RSE = 6.1%) decrease in $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ compared to NM and UM phenotype, whereas missing phenotype was associated with a 35% (RSE = 6.5%) increase in this parameter. CYP2D6 inhibitors had no statistically significant impact on $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ ($p = 0.07$).

In patients carrying a *CYP3A4*22* genotype, the mean $k_{TAM/NDT}$ was decreased by 21% (RSE = 5.8%) compared to non-carriers of this genotype. In addition, the mean $k_{e,NDT}$ was decreased by 19% (RSE = 8.3%) in *CYP3A4*22* carriers, compared to non-carriers. Patients carrying a *CYP2B6*6/*6* genotype showed a 25% (RSE = 7.0%) decrease in $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$ compared to *CYP2B6*1/*6* and **1/*1* patients.

Age was significantly associated with $k_{TAM/NDT}$, $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ and $k_{NDT/ENDO}$ and a respective decrease of 7%, 12% and 12% in these parameters was estimated in a 65-year old patient, compared to a patient with median age (48 years) and the same CYP2D6 phenotype. A significant association was also found

between BW and $k_{e,NDT}$. In particular, a 9% increase in $k_{e,NDT}$ with an increase in BW from 64 kg (median) to 94 kg was estimated.

In the final model, 35% of the IIV on $k_{NDT/ENDO}$ was explained by both CYP2D6 phenotype and CYP2D6 inhibitors (decrease from 73.8% to 47.7%). In particular, CYP2D6 phenotype and CYP2D6 inhibitors explained 32% and 3%, respectively, of the IIV in $k_{NDT/ENDO}$. The IIV of other parameters were less significantly decreased (a decrease of 4%, 5% and 1% in the IIV on $k_{TAM/NDT}$, $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ and $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$, respectively, compared to the base model) whereas $k_{e,NDT}$ showed a slight increase in IIV compared with the base model (from 44.8% to 46.4%).

3.2.3 Model validation

The goodness-of-fit plots of the final model are presented in Figures S12-S18. CWRES versus time and PRED showed that the model describe correctly the data although an overestimation of NOX-TAM concentrations at later time points was observed (Figure S18). The validation of the final model was based on a VPC with 1000 replicates of the original dataset (Figure 2). Overall, the VPC indicates that the predictive performance of the model is accurate for all the compounds although NOX-TAM is less accurately predicted due to a decrease of its concentrations with time which could not be accounted for in the model with the tested methods. The VPC for NDT, 4-OHTAM and ENDO stratified on CYP2D6 phenotype is presented in Figure S19.

3.3 Simulations

Table 3 presents the simulated $C_{ss,trough}$ for TAM, NDT, 4-OHTAM, 4'-OHTAM, ENDO, Z'-ENDO and NOX-TAM and the respective concentrations reported previously in clinical studies in breast cancer patients. Overall, the simulated concentrations were in agreement with those reported in the literature [2,21].

The impact of CYP2D6 phenotype, *CYP3A4*22* and *CYP2B6*6/*6* genotypes and CYP2D6 inhibitors on plasma ENDO $C_{ss,trough}$ was investigated through simulations. ENDO $C_{ss,trough}$ were simulated for each CYP2D6 phenotype and wild-type genotype for *CYP3A4*22* and *CYP2B6*6* and no concomitant CYP2D6 inhibitors (n = 1000 for each CYP2D6 phenotype). Then, for each CYP2D6 phenotype,

simulations according to the presence of either a *CYP3A4*22* or *CYP2B6*6/*6* genotype or concomitant use of a weak/moderate or potent CYP2D6 inhibitor were performed (n = 1000 for each combination). The model-predicted ENDO $C_{ss,trough}$ according to CYP2D6 phenotype, *CYP3A4*22*, *CYP2B6*6* genotypes and concomitant use of weak/moderate or potent CYP2D6 inhibitors are presented on Figure 3. In patients with wild-type *CYP3A4*22* and *CYP2B6*6* and no concomitant inhibitors, the median ENDO $C_{ss,trough}$ were 75% and 60% lower in PM and IM patients, respectively, and 25% higher in UM patients compared to NM.

In *CYP3A4*22* carriers, the median ENDO $C_{ss,trough}$ were 11-17% higher than in patients with a respective CYP2D6 phenotype and no *CYP3A4*22* genotype.

The PM and NM patients carrying *CYP2B6*6/*6* genotype had 5% lower ENDO $C_{ss,trough}$ than respective phenotypes without *CYP2B*6/*6* genotype whereas UM patients carrying *CYP2B6*6/*6* showed a slight increase in ENDO $C_{ss,trough}$ (+5%). No effect of *CYP2B6*6/*6* genotype was observed in IM patients.

Use of weak/moderate and potent CYP2D6 inhibitors decreased median ENDO $C_{ss,trough}$ in NM patients by 25% (from 35.8 to 26.9 nmol/L) and 41% (to 21.2 nmol/L), respectively, whereas in UM patients the median ENDO $C_{ss,trough}$ were decreased by 21% (from 44.9 to 35.4 nmol/L) and 36% (to 28.9 nmol/L), respectively.

Simulated $C_{ss,trough}$ of TAM, NDT and ENDO according to BW and age for a patient with CYP2D6 NM phenotype are presented on Figure S20. Increase in age from 48 to 65 years resulted in a slight increase in TAM and NDT concentrations (+11% and +4%, respectively) whereas ENDO $C_{ss,trough}$ were decreased (-15%) compared to patients with median age in the population. Increase in BW from 64 to 94 kg resulted in slight decrease in TAM, NDT and ENDO $C_{ss,trough}$ (-1%, -7%, -8%, respectively) compared to patients with median BW.

At a standard dose of 20 mg/day, 11%, 40%, 93% and 98% of CYP2D6 PM, IM, NM and UM patients, respectively, reached the target $C_{ss,trough}$ of 16 nmol/L. In addition, carriers of *CYP3A4*22* genotype were more likely to achieve target ENDO $C_{ss,trough}$. Indeed, 19% of PM and 52% of IM patients carrying *CYP3A4*22* genotype were above the target. In NM and UM patients this number increased slightly to

96% and 99%, respectively. When AAS was considered, 19%, 43%, 94% and 98% of PM, IM, NM and UM patients reached the target threshold of 1798 at the standard dose.

The dose-adjustment simulations were performed for PM and IM patients (*CYP3A4*22* and *CYP2B6*6* non-carriers) and the results are presented in Figure 4. A dose increase from 20 to 40 and 60 mg/day in IM patients increased the number of patients reaching the ENDO target from 40% to 88% and 97%, respectively. Concerning CYP2D6 PM patients, a dose increase from 20 to 40, 60 and 80 mg/day increased the number of patients reaching the ENDO target from 11% to 54%, 78% and 95%, respectively. The evaluation of AAS following dose adjustment is presented in Figure S21. A higher number of PM and IM patients reached the previously proposed target threshold of 1798 following a dose adjustment compared to when ENDO $C_{ss,trough}$ is considered. Indeed, a dose of 60 mg/day and 40 mg/day in PM and IM patients, respectively, resulted in 99% and 97% patients reaching the AAS target, suggesting that in PM patients, a further dose increase to 80 mg/day might not be necessary.

4 Discussion

In our study, the sparse steady-state PK data for TAM and six metabolites in 917 adjuvant breast cancer patients were adequately described by a joint seven-compartment model. To the best of our knowledge, this is the first PK model to simultaneously incorporate the data for TAM and its six major metabolites, allowing for a more accurate quantification of the impact of genetic covariates on the respective metabolic pathways. The model enabled us to quantify the impact of CYP2D6 phenotype, *CYP3A4*22* and *CYP2B6*6* genotypes, of the use of CYP2D6 weak/moderate and of potent inhibitors as well as that of age and BW on TAM metabolism and was subsequently used to perform dose-adjustment simulations.

Based on the mean estimates of V_{TAM}, $k_{TAM/NDT}$, $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$, $k_{TAM/4'\text{-}OHTAM}$ and $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$ in our model, the mean CL/*F* of TAM was 7.1 L/h. This is consistent with the previously reported value of 6.6 L/h obtained in a population PK model in postmenopausal patients with early breast cancer [22]. The developed model showed good predictive performance based on VPC and the mean model-predicted concentrations were in accordance with the values previously reported in breast cancer patients [2,21].

Overall, the concentration-time data for TAM and its metabolites were correctly described by the PK model. However, NOX-TAM plasma concentrations showed a high intra-individual variability and a decrease over time which could not be satisfactorily captured by the tested methods. Since NOX-TAM is not an active TAM metabolite, this was not considered as deleterious for the validity of our analysis.

In the covariate analysis, CYP2D6 phenotype was significantly associated with NDT to ENDO and TAM to 4-OHTAM conversion. In particular, the mean $k_{NDT/ENDO}$ was decreased by 81% and 65% in PM and IM patients, respectively, and increased by 47% in UM patients, compared to NM patients.

The estimated effect of CYP2D6 phenotype on $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ was similar in PM and IM patients, therefore a common parameter was estimated indicating a 28% lower $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ in those patients compared to NM and UM. Several CYP isoenzymes are involved in TAM to 4-OHTAM conversion which might be the reason why the estimated decrease in $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ is less pronounced than that on $k_{NDT/ENDO}$. Indeed, CYP2D6 is the only enzyme involved in the NDT to ENDO conversion and it explained 32% of the IIV in $k_{NDT/ENDO}$ which is in the midrange of the various values found in previous studies (between 19% and 57%) evaluating the impact of CYP2D6 on the NDT/ENDO metabolic ratio [23,24].

The missing CYP2D6 phenotype was associated with a 28% and 35% increase in $k_{NDT/ENDO}$ and $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$, respectively. An explanation for this finding might be the decreasing confidence of the CNV Taqman assay with increasing number of gene copies. Thus, most of the patients with missing CYP2D6 phenotype might be those with more than two *CYP2D6* gene copies, resulting in increased CYP2D6 activity.

The $k_{NDT/ENDO}$ was significantly lower in NM and UM patients using weak/moderate and potent CYP2D6 inhibitors (29% and 47% decrease for weak/moderate and potent inhibitors, respectively). No significant impact of CYP2D6 inhibitors on $k_{NDT/ENDO}$ in IM and PM patients was observed, consistently with the decreased/absent CYP2D6 activity in those patients.

In our study, the presence of *CYP3A4*22* genotype, associated with a decreased mRNA expression and decreased enzyme activity [25], was a significant covariate on $k_{TAM/NDT}$ and $k_{e,NDT}$. Indeed, patients carrying *CYP3A4*22* allele had 21% and 19% lower $k_{TAM/NDT}$ and $k_{e,NDT}$, respectively. *CYP3A4*22* was previously associated with a decreased TAM/NDT metabolic ratio [24]. In addition, the previous *in vitro*

studies showed that CYP3A is involved in the metabolism of NDT into α-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and N-didesmethyltamoxifen (not available in our study) [1], which is consistent with the impact of *CYP3A4*22* genotype on $k_{e,NDT}$ found in our analysis.

*CYP2B6*6* genotype is associated with a decreased enzyme activity [26]. In our analysis, patients carrying *CYP2B6*6/*6* genotype showed a mean decrease of 25% in $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$ compared to patients carrying *CYP2B6*1/*6* or *CYP2B6*1/*1*. CYP2B6 is involved in the metabolism of TAM into 4-OHTAM and 4'-OHTAM [1,2] whereas the metabolism of TAM into NOX-TAM is mainly mediated by human flavin-containing monooxygenases 1 (FMO1) and 3 (FMO3) [27]. Therefore, our result might reflect the impact of *CYP2B6*6* on the elimination of TAM.

In the covariate analysis, age was significantly associated with $k_{TAM/NDT}$, $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ and $k_{NDT/ENDO}$. According to simulations, an increase in age from 48 to 65 years resulted in a slight increase in TAM and NDT concentrations (+11% and +4%, respectively) whereas ENDO $C_{ss,trough}$ were decreased (-15%) compared to patients with median age in the population. One explanation for this finding could be decreased enzymatic activity in older patients leading to accumulation of TAM and NDT and lower formation of ENDO. However, contradictory results about the impact of age on TAM PK have been reported with either no significant association found [28,29] or increased levels of TAM, NDT and ENDO observed in older patients [29]. Further studies are needed to elucidate this issue, however in any case, the observed changes in concentrations are small.

A significant increase in $k_{e,NDT}$ with increasing BW was found. Simulated $C_{ss,trough}$ for NDT and ENDO were decreased by -7% and -8%, respectively, in a patient with BW of 94 kg compared to patients with median BW (64 kg). Our findings are in accordance with previous reports on decreased NDT and ENDO concentrations in patients with high BW or BMI [8,9,29].

The model-based simulations showed that the median ENDO $C_{ss,trough}$ were 75% and 60% lower in PM and IM patients, respectively, and 25% higher in UM patients compared to NM (in patients with wild-type *CYP3A4*22* and *CYP2B6*6* and no concomitant inhibitors). Interestingly, *CYP3A4*22* carriers had higher median ENDO $C_{ss,trough}$ than patients with a respective CYP2D6 phenotype and no *CYP3A4*22* genotype. Therefore, the number of patients reaching the previously proposed ENDO $C_{ss,trough}$ target of

16 nmol/L was higher among *CYP3A4*22* carriers than non-carriers within the same CYP2D6 phenotype group. Indeed, among patients with CYP2D6 PM phenotype, 11% of *CYP3A4*22* non-carriers and 19% of *CYP3A4*22* carriers reached the ENDO $C_{ss,trough}$ target. In patients with CYP2D6 IM phenotype this number was 40% and 52% for *CYP3A4*22* non-carriers and carriers, respectively. The impact of the presence of *CYP3A4*22* allele on reaching ENDO target was less significant in CYP2D6 NM and UM patients. These findings are consistent with previous reports showing that patients with the same CYP2D6 phenotype and *CYP3A4*22* carriers are more likely to have higher ENDO concentrations than patients with the same CYP2D6 phenotype and *CYP3A4*22* non-carriers [21,30]. The reasons for the increased concentrations of ENDO in patients carrying *CYP3A4*22* allele have not been fully elucidated but a possible hypothesis could be an increase in TAM bioavailability in *CYP3A4*22* carriers due to decreased intestinal first-pass metabolism and therefore higher concentrations of TAM available for conversion into metabolites. Nevertheless, further research is needed to confirm this hypothesis [21].

According to the model-based simulations, *CYP2B6*6* genotype has a marginal impact on ENDO levels which does not seem clinically relevant, consistently with the absence of direct impact of *CYP2B6*6* on ENDO formation.

Evaluation of alternative dosing regimens through simulations showed that a dose increase from 20 to 40 and 60 mg/day in IM patients increased the number of patients reaching the ENDO target from 40% to 88% and 97%, respectively. Concerning CYP2D6 PM patients, a dose increase from 20 to 40, 60 and 80 mg/day increased the number of patients reaching the ENDO target from 11% to 54%, 78% and 95%, respectively. On the basis of these results, a dose of 40 mg/day and 80 mg/day could be proposed in IM and PM patients, respectively. This is consistent with the dose escalation studies which showed that administration of a mean dose of 46 mg/day and 90 mg/day to IM and PM patients, respectively, increased the ENDO concentrations above 16 nmol/L in all the patients [31,32]. However, if we consider AAS, a higher number of patients reached the efficacy threshold of 1798 following the dose adjustment compared to when ENDO $C_{ss,trough}$ was taken into account. Indeed, a dose increase from 20 to 40 and 60 mg/day in IM patients increased the number of patients reaching the AAS target from 43% to 97% and

100%, respectively. A dose increase from 20 to 40, 60 and 80 mg/day in PM patients increased those numbers from 19% to 86%, 99%, and 100%, respectively. In addition, a dose increase to 80 mg/day in PM patients led to higher AAS than that observed in NM patients at a standard dose. Therefore, on the basis of AAS, a dose increase to 60 mg/day in PM patients could be sufficient. However, since the clinical utility of AAS has only been described in one retrospective analysis [18], future research should focus on the evaluation of AAS as a possible marker for TAM efficacy based on the hypothesis that not only ENDO but also other TAM metabolites contribute to its antitumoral activity.

Overall, our model could be used for therapeutic drug monitoring of ENDO concentrations and dose-adjustment simulations. However, the clinical utility of CYP2D6 genotype- and PK-guided dosing of TAM remains uncertain. Indeed, the therapeutic threshold of 16 nmol/L, reported by Madlensky *et al.* which was associated with a 26% decrease in breast cancer recurrence in adjuvant setting [8] was not confirmed in a recent prospective study [11]. Further studies are needed in order to conclude on the relationship between exposure to ENDO and therapeutic outcome.

Finally, in the PHACS study, the adherence to treatment was self-reported by patients and according to these data, samples corresponding to occasions with less than 80% doses taken in the last ten days preceding PK sampling, constituted only 0.8% of the total dataset. Therefore the self-reported adherence was not included in the PK model. However, a recent study showed that at least 50% of patients with undetectable or low TAM concentrations did not admit to non-adherence [33]. Therefore, the non-adherence could be one of the factors contributing to the residual variability in our model. Future analyses should be performed to take into account the non-adherence while evaluating exposure-response relationship for TAM.

5 Conclusion

The present study is the first to explore the PK of TAM and six of its metabolites using a population approach based on data from a large, prospective, longitudinal study. It provides important information on the contribution of genetic polymorphisms, co-medications and demographic characteristics to TAM metabolism and their impact on plasma ENDO levels, possibly the most important clinical endpoint.

The results of the current study will help in future analyses aiming to optimise TAM therapy. Indeed, evaluation of the relationship between TAM PK and adverse events based on data from the PHACS study is planned in the near future. Finally, the developed PK model could be used to individually adapt the dose based on CYP2D6 phenotype and ENDO plasma exposure if the clinical utility of PK-guided dosing for TAM is demonstrated.

REFERENCES

1. Desta, Z., Ward, B. A., Soukhova, N. V & Flockhart, D. A. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 1062–1075 (2004).

2. Mürdter, T. E. *et al.* Activity Levels of Tamoxifen Metabolites at the Estrogen Receptor and the Impact of Genetic Polymorphisms of Phase I and II Enzymes on Their Concentration Levels in Plasma. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 708–717 (2011).

3. Jordan, V. C. Metabolites of tamoxifen in animals and man: identification, pharmacology, and significance. *Breast Cancer Res. Treat.* **2**, 123–38 (1982).

4. Lim, Y. C., Desta, Z., Flockhart, D. A. & Skaar, T. C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 471–478 (2005).

5. Goetz, M. P. *et al.* The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* **101**, 113–121 (2007).

6. Rae, J. M. *et al.* CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 452–460 (2012).

7. Regan, M. M. *et al.* CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 441–451 (2012).

8. Madlensky, L. *et al.* Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 718–725 (2011).

9. Saladores, P. *et al.* Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J.* **15**, (2014).

10. Helland, T. *et al.* Serum concentrations of active tamoxifen metabolites predict long-term survival in adjuvantly treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **19**, 125 (2017).

11. Sanchez-Spitman, A. *et al.* Tamoxifen Pharmacogenetics and Metabolism: Results From the Prospective CYPTAM Study. *J. Clin. Oncol.* JCO1800307 (2019).doi:10.1200/JCO.18.00307

12. Dahmane, E. *et al.* Population Pharmacokinetics of Tamoxifen and three of its metabolites in Breast Cancer patients. **89**, 3402 (2014).

13. Arellano, C., Allal, B., Goubaa, A., Roché, H. & Chatelut, E. An UPLC–MS/MS method for

separation and accurate quantification of tamoxifen and its metabolites isomers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **100**, 254–261 (2014).

14. Puszkiel, A. *et al.* Factors affecting tamoxifen metabolism in breast cancer patients; preliminary results of the French PHACS study (NCT01127295). *Clin. Pharmacol. Ther.* (2019).doi:10.1002/cpt.1404

15. Gaedigk, A. *et al.* The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 234–242 (2008).

16. Goetz, M. P. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 770–777 (2018).

17. Keizer, R. J., Zandvliet, A. S., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M. & Huitema, A. D. R. Performance of Methods for Handling Missing Categorical Covariate Data in Population Pharmacokinetic Analyses. *AAPS J.* **14**, 601–611 (2012).

18. Vries Schultink, A. H. M. de *et al.* An Antiestrogenic Activity Score for tamoxifen and its metabolites is associated with breast cancer outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* **161**, 567–574 (2017).

19. Keizer, R. J., Benten, M. van, Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M. & Huitema, A. D. R. Piraña and PCluster: A modeling environment and cluster infrastructure for NONMEM. *Comput. Methods Programs Biomed.* **101**, 72–79 (2011).

20. Lindbom, L., Pihlgren, P. & Jonsson, N. PsN-Toolkit—A collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput. Methods Programs Biomed.* **79**, 241–257 (2005).

21. Teft, W. A. *et al.* CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 95–105 (2013).

22. Hutson, P. R., Love, R. R., Havighurst, T. C., Rogers, E. & Cleary, J. F. Effect of exemestane on tamoxifen pharmacokinetics in postmenopausal women treated for breast cancer. *Clin. Cancer Res. An Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 8722–8727 (2005).

23. Hertz, D. L. *et al.* In vivo assessment of the metabolic activity of CYP2D6 diplotypes and alleles. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **80**, 1122–1130 (2015).

24. Sanchez Spitman, A. B. *et al.* Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A combined genotypes on tamoxifen metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **73**, 1589–1598 (2017).

25. Wang, D., Guo, Y., Wrighton, S. A., Cooke, G. E. & Sadee, W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* **11**, 274–286 (2011).

26. Zanger, U. M. & Klein, K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front. Genet.* **4**, 24 (2013).

27. Parte, P., Kupfer, D. & Pape, C. W. Oxidation of tamoxifen by human flavin-containing monooxygenase (FMO) 1 and FMO3 to tamoxifen-N-oxide and its novel reduction back to tamoxifen by human cytochromes P450 and hemoglobin. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1446–52 (2005).

28. Schroth, W. *et al.* Improved Prediction of Endoxifen Metabolism by CYP2D6 Genotype in Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen. *Front. Pharmacol.* **8**, 582 (2017).

29. Marcath, L. A. *et al.* Comprehensive assessment of cytochromes P450 and transporter genetics with endoxifen concentration during tamoxifen treatment. *Pharmacogenet. Genomics* **27**, 402–409 (2017).

30. Antunes, M. V. *et al.* CYP3A4*22 is related to increased plasma levels of 4-hydroxytamoxifen and partially compensates for reduced CYP2D6 activation of tamoxifen. *Pharmacogenomics* **16**, 601–617 (2015).

31. Irvin, W. J. *et al.* Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3232–9 (2011).

32. Dezentjé, V. O. *et al.* CYP2D6 genotype- and endoxifen-guided tamoxifen dose escalation increases endoxifen serum concentrations without increasing side effects. *Breast Cancer Res. Treat.* **153**, 583–590 (2015).

33. Pistilli, B. *et al.* 185O_PRSerum assessment of non-adherence to adjuvant endocrine therapy (ET) among premenopausal patients in the prospective multicenter CANTO cohort. *Ann. Oncol.* **29**, (2018).

Table 1 Patients' characteristics (n = 917).

Characteristic	Median [range], number (%)
Age at inclusion (years)	48 [25 – 77]
Body weight at inclusion (kg)	64 [40 – 131]
CYP2D6 phenotype	
UM	34 (3.9)
NM	716 (82.9)
IM	76 (8.8)
PM	38 (4.4)
Missing	53
*CYP3A4*22* genotype	
Wild-type (**1/*1*)	822 (90.9)
Heterozygous mutant (**1/*22*)	79 (8.8)
Homozygous mutant (**22/*22*)	3 (0.3)
Missing	13
*CYP3A4*1B* genotype	
Wild-type (**1/*1*)	847 (93.3)
Heterozygous mutant (**1/*1B*)	57 (6.3)
Homozygous mutant (**1B/*1B*)	4 (0.4)
Missing	9
*CYP3A5*3* genotype	
Wild-type (**1/*1*)	6 (0.7)
Heterozygous mutant (**1/*3*)	123 (13.6)
Homozygous mutant (**3/*3*)	775 (85.7)
Missing	13
*CYP2C19*2* genotype	
Wild-type (**1/*1*)	643 (71.0)

Heterozygous mutant (**1/*2*)	245 (27.0)
Homozygous mutant (**2/*2*)	18 (2.0)
Missing	11
*CYP2C19*17* genotype	
Wild-type (**1/*1*)	563 (62.3)
Heterozygous mutant (**1/*17*)	303 (33.6)
Homozygous mutant (**17/*17*)	37 (4.1)
Missing	14
*CYP2B6*6* genotype	
Wild-type (**1/*1*)	489 (54.9)
Heterozygous mutant (**1/*6*)	345 (38.8)
Homozygous mutant (**6/*6*)	56 (6.3)
Missing	27
Co-medications, number of occasions (%)	
CYP2D6 inhibitors	
Weak/moderate[a]	169 (4.4)
Potent[b]	79 (2.0)
CYP3A4 inhibitors	
Weak[c]	49 (1.3)
Moderate/potent[c]	48 (1.2)

[a] weak/moderate CYP2D6 inhibitors: celecoxib, citalopram, diphenhydramine, duloxetine, escitalopram, sertraline;
[b] potent CYP2D6 inhibitors: amiodarone, clomipramine, flecainide, fluoxetine, fusidic acid, imatinib, paroxetine, propafenon, terbinafine;
[c] weak CYP3A4 inhibitors: esomeprazole; fluoxetine;
[d] moderate/potent CYP3A4 inhibitors: amiodarone, ciprofloxacin, clarithromycin, diltiazem, fluconazole, imatinib, ketoconazole, miconazole, verapamil

Table 2 Estimates of the final pharmacokinetic model.

Parameter	Mean estimate (RSE %) [shrinkage %]
k_a (h^{-1})	*0.9 (fixed)*
V_{TAM} (L)	*966 (fixed)*
$k_{TAM/NDT}$ (h^{-1})	7.28 x 10^{-3} (2.2)
*CYP3A4*22 carriers*[a]	0.79 (5.8)
Age	-0.25 (24)
$k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ (h^{-1})	6.13 x 10^{-5} (20)
CYP2D6 IM or PM phenotype[b]	0.72 (6.1)
CYP2D6 missing phenotype	1.35 (6.5)
Age	-0.43 (28)
$k_{TAM/4'\text{-}OHTAM}$ (h^{-1})	6.05 x 10^{-8} (1.6)
$k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$ (h^{-1})	2.47 x 10^{-7} (2.3)
*CYP2B6*6/*6* genotype[c]	0.75 (7.0)
$k_{NDT/ENDO}$ in CYP2D6 UM (h^{-1})	10.3 x 10^{-4} (10)
$k_{NDT/ENDO}$ in CYP2D6 NM (h^{-1})	7.04 x 10^{-4} (6.9)
$k_{NDT/ENDO}$ in CYP2D6 IM (h^{-1})	2.47 x 10^{-4} (8.9)
$k_{NDT/ENDO}$ in CYP2D6 PM (h^{-1})	1.31 x 10^{-4} (12)
$k_{NDT/ENDO}$ in missing CYP2D6 (h^{-1})	9.02 x 10^{-4} (13)
Weak/moderate CYP2D6 inhibitor in NM and UM patients	0.71 (6.0)
Potent CYP2D6 inhibitor in NM and UM patients	0.53 (6.4)
Age	-0.42 (25)
$k_{NDT/Z'\text{-}ENDO}$ (h^{-1})	4.09 x 10^{-7} (1.0)
$k_{4\text{-}OHTAM/ENDO}$ (h^{-1})	3.34 x 10^{-3} (19)
$k_{e,NDT}$ (h^{-1})	3.48 x 10^{-3} (4.5)
*CYP3A4*22* carriers[a]	0.81 (8.3)
Body weight	0.23 (24)
$k_{e,ENDO}$ (h^{-1})	11.9 x 10^{-3} (6.1)

$k_{e,4'\text{-OHTAM}}$ (h^{-1})	*2.01 x 10^{-6} (fixed)*
$k_{e,NOX\text{-}TAM}$ (h^{-1})	*1.77 x 10^{-6} (fixed)*
$k_{e,Z'ENDO}$ (h^{-1})	*1.08 x 10^{-5} (fixed)*
IIV $k_{TAM/NDT}$ (CV %)	30.8% (2.8) [6.5]
IIV $k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$ (CV %)	51.5% (3.1) [8.2]
IIV $k_{TAM/4'\text{-}OHTAM}$ (CV %)	19.7% (4.8) [29]
IIV $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$ (CV %)	44.8% (3.2) [14]
IIV $k_{NDT/ENDO}$ in CYP2D6 NM (CV %)	47.7% (3.2) [12]
IIV $k_{e,NDT}$ (CV %)	46.3% (2.9) [4.6]
TAM residual error (CV %)	30.9 (1.6) [6.3]
NDT residual error (CV %)	34.6 (2.1) [4.8]
4-OHTAM residual error (CV %)	38.2 (1.8) [8.4]
ENDO residual error (CV %)	41.4 (1.9) [7.3]
Z'-ENDO residual error (CV %)	40.5 (1.6) [3.5]
4'-OHTAM residual error (CV %)	34.9 (1.8) [6.6]
NOX-TAM residual error (CV %)	59.5 (2.0) [5.9]

CV, coefficient of variation; IIV, Inter-individual variability; IM, CYP2D6 intermediate metaboliser; 4'-OHTAM, 4'-hydroxytamoxifen; 4-OHTAM, 4-hydroxytamoxifen; ENDO, endoxifen; k, conversion rate constant; k_a, absorption rate constant; k_e, elimination rate constant; NDT, N-desmethyltamoxifen; NOX-TAM, N-oxide tamoxifen; TAM, tamoxifen; V_{TAM}, apparent volume of distribution of TAM; Z'-ENDO, Z'-endoxifen; NM, CYP2D6 normal metaboliser; PM, CYP2D6 poor metaboliser; RSE, Relative standard error; UM, CYP2D6 ultrarapid metaboliser;

[a] reference: *CYP3A4*22* non-carriers;

[b] reference: CYP2D6 NM and UM;

[c] reference: *CYP2B6*1/*6* and *CYP2B6*1/*1*;

Table 3 Comparison of model-predicted concentrations with the previously reported concentrations of TAM and its metabolites in breast cancer patients treated with recommended dose 20 mg/day [2,21].

Compound	Mean (SD) plasma concentration (nmol/L)	
	Model-predicted	**Reported in the literature[a]**
TAM	313.6 (108.8)	265.1 (133.4)
NDT	587.7 (233.8)	635.8 (264.6)
4-OHTAM	6.87 (4.36)	5.81 (2.17)
4'-OHTAM	10.3 (3.91)	9.12 (3.53)
ENDO	35.9 (19.7)	31.8 (16.2)
Z'-ENDO	22.3 (8.83)	21.3 (8.0)
NOX-TAM	50.5 (29.0)	31.2 (16.1)

TAM, tamoxifen; NDT, N-desmethyltamoxifen; 4-OHTAM, 4-hydroxytamoxifen; 4'-OHTAM, 4'-hydroxytamoxifen; ENDO, endoxifen; Z'-ENDO, Z'-endoxifen; NOX-TAM, tamoxifen N-oxide, SD, standard deviation

[a]Murdter *et al.*, Teft *et al.* [2,21]

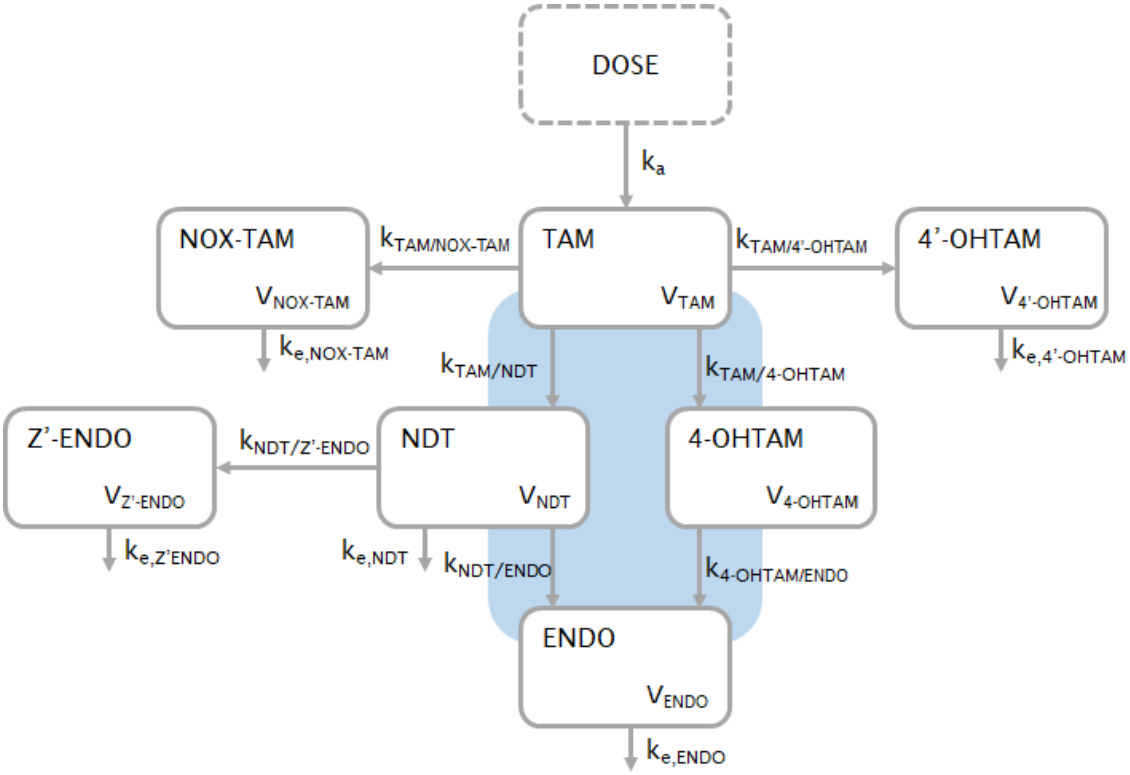


Figure 1 Schematic representation of the structural model for TAM and its six major metabolites. *The shaded blue area* represents the major metabolic pathways leading to active metabolite ENDO. 4'-OHTAM, 4'-hydroxy tamoxifen; 4-OHTAM, 4-hydroxy tamoxifen; ENDO, endoxifen; k, conversion rate constant; k_a, absorption rate constant; k_e, elimination rate constant; NDT, N-desmethyl tamoxifen; NOX-TAM, N-oxide tamoxifen; TAM, tamoxifen; V, volume of distribution; Z'-ENDO, Z'-endoxifen.

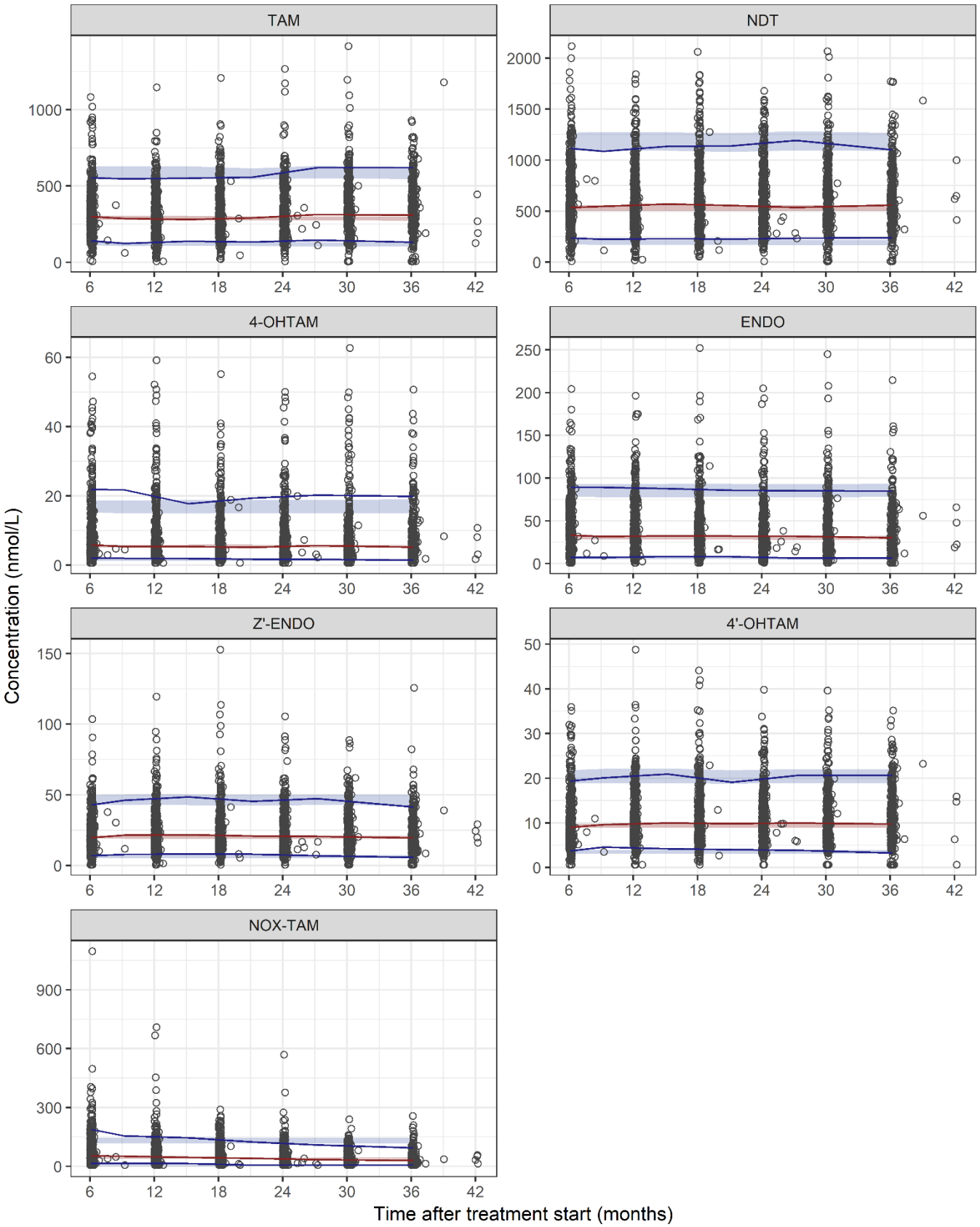


Figure 2 Visual predictive check for TAM, NDT, 4-OHTAM, ENDO, Z'-ENDO, 4'-OHTAM and NOX-TAM based on 1000 replicates of the original dataset using the final model. *The blue shaded areas* represent the 95% confidence intervals around the 5th and 95th percentile of the simulated concentrations, *the red shaded areas* represent the 95% confidence intervals around the median of the simulated concentrations, *the blue lines* represent the 5th and 95th percentile of the observed concentrations, *the red lines* represent the median of the observed concentrations and *the circles* represent the observed concentrations.

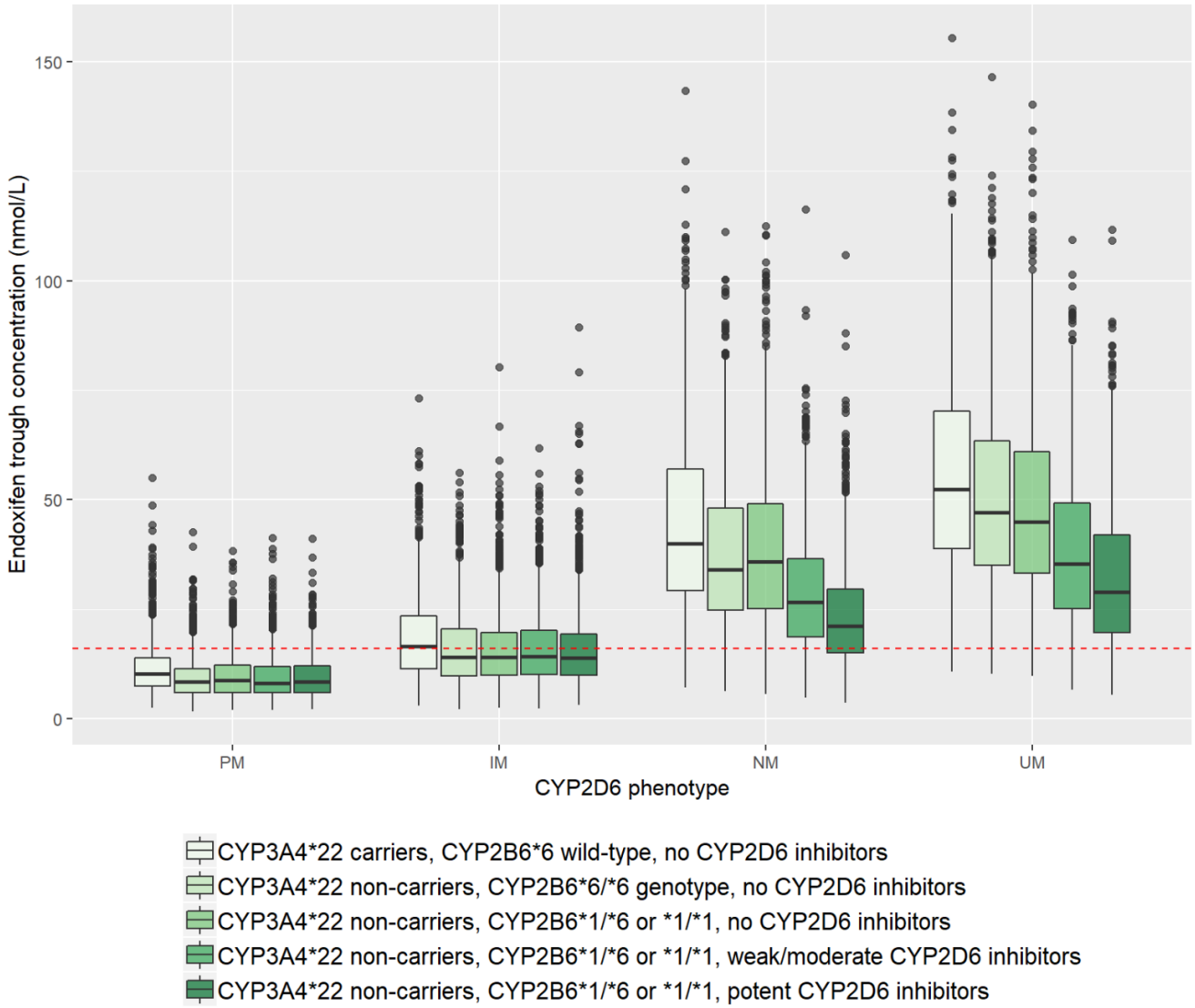
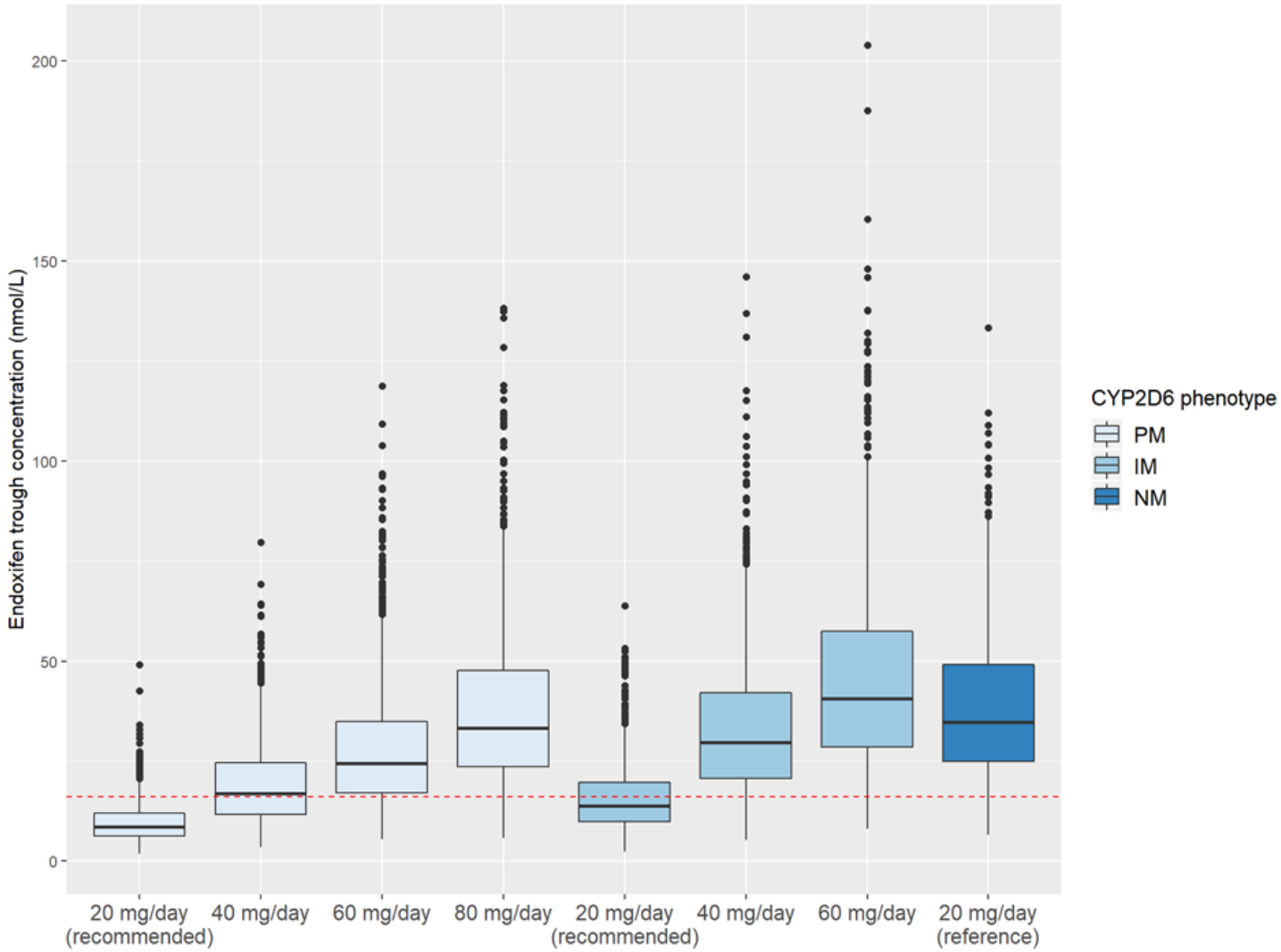


Figure 3 Simulated ENDO concentrations according to CYP2D6 phenotype, *CYP3A4*22* and *CYP2B6*6* genotypes and CYP2D6 inhibitors. For each combination, n = 1000 ENDO concentrations were simulated. *The red dashed line* represents the previously proposed plasma endoxifen therapeutic threshold of 16 nmol/L [8].



Above	11%	54%	78%	95%	40%	88%	97%	93%
Below	89%	46%	22%	5%	60%	12%	3%	7%

Figure 4 Dose-adjustment simulations of alternative dosing regimens for patients with CYP2D6 PM and IM phenotype according to endoxifen steady-state trough concentration. *The red dashed line* represents the previously proposed plasma endoxifen therapeutic threshold of 16 nmol/L [8].

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material S1 Assignment of CYP2D6 phenotype.

Patients were genotyped for the presence of decreased (**9, *10, *17, *41*) and non-functional (**4, *6, *7*) alleles and gene copy number (**5* or duplication). The absence of one of these alleles led to **1* allele assignment. A phenotype and a score were assigned to each *CYP2D6* allele according to its activity: normal (extensive) metaboliser (NM, allele score = 1) for wild-type (**1*), intermediate metaboliser (IM, allele score = 0.5) for decreased activity (**9, *10, *17, *41*) and poor metaboliser (PM, allele score = 0) for non-functional alleles (**4, *6, *7*). Based on the combination of alleles and the number of *CYP2D6* copies, patients were assigned a diplotype and an activity score (AS) which is the sum of the scores assigned to each allele: PM/PM (AS = 0), IM/PM (AS = 0.5), IM/IM (AS = 1), NM/PM (AS = 1), NM/IM (AS = 1.5), NM/NM and NM/NM/PM (UM/PM) (AS = 2), NMxn (UM/UM) and NM/NM/IM (UM/IM) which were collapsed into UM (AS > 2). Finally, patients were classified into CYP2D6 phenotypes: PM (AS = 0), IM (AS = 0.5 and AS = 1 [IM/IM]), NM (AS = 1 [NM/PM] and AS = 1.5 to 2) and UM (AS > 2) [15,16].

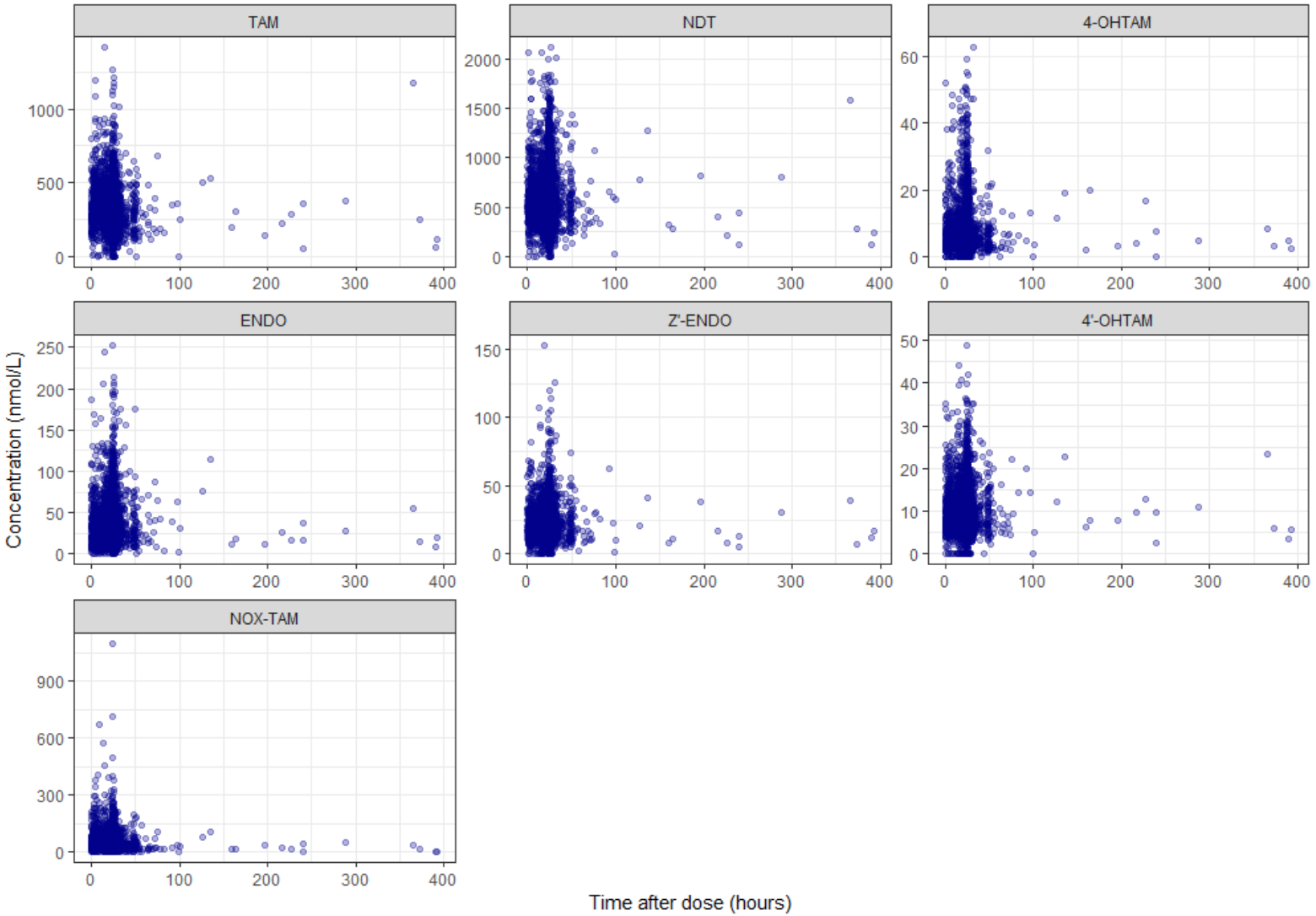


Figure S2 Concentrations of tamoxifen (TAM), N-desmethyltamoxifen (NDT), 4-hydroxytamoxifen (4-OHTAM), endoxifen (ENDO), Z'-endoxifen (Z'-ENDO), 4'-hydroxytamoxifen (4'-OHTAM) and N-oxide tamoxifen (NOX-TAM) versus time after dose.

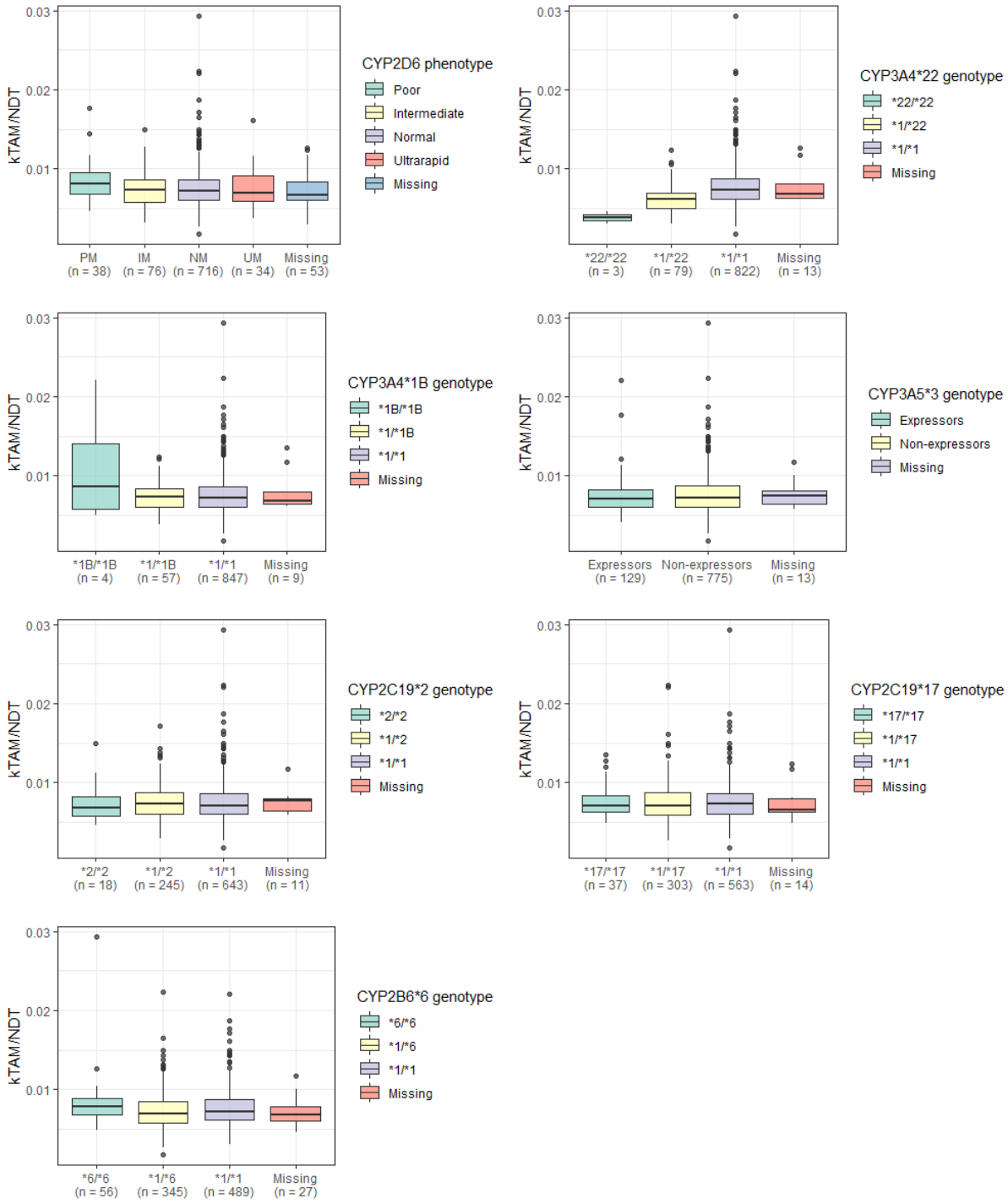


Figure S3 Individual estimates of tamoxifen to N-desmethyltamoxifen conversion rate constant ($k_{TAM/NDT}$) versus categorical covariates.

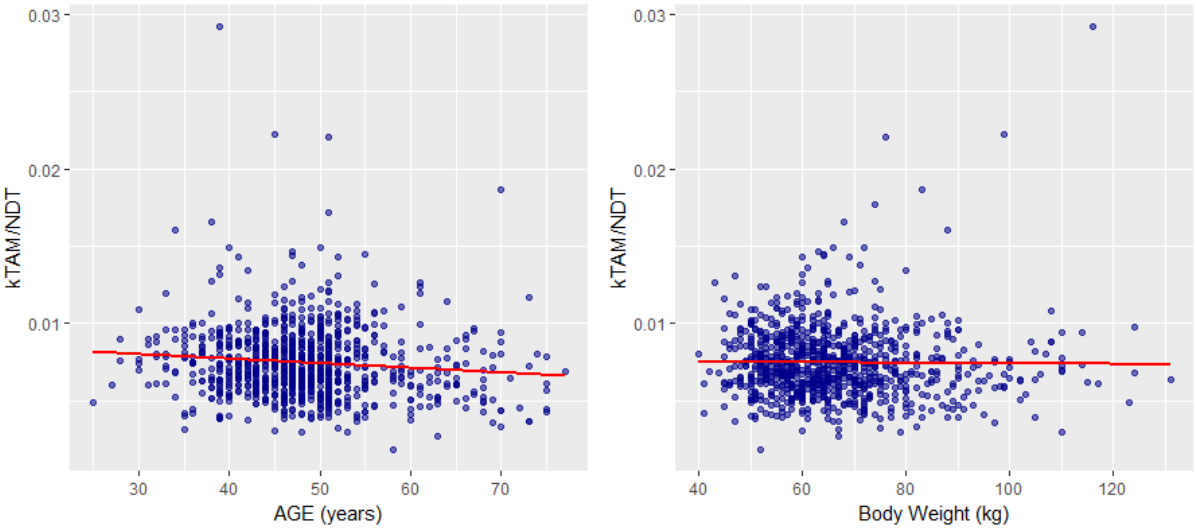


Figure S4 Individual estimates of tamoxifen to N-desmethyltamoxifen conversion rate constant ($k_{TAM/NDT}$) versus continuous covariates.

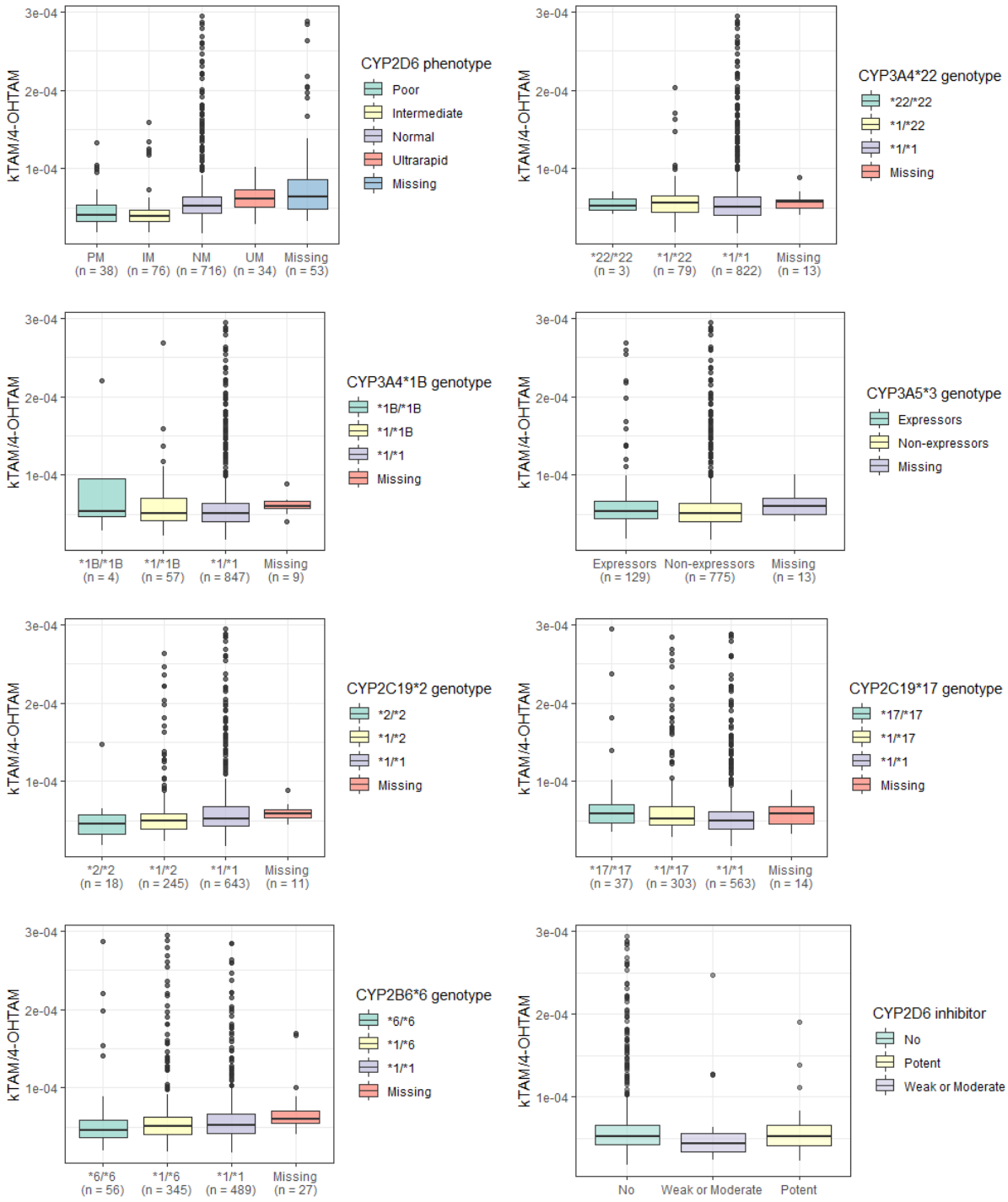


Figure S5 Individual estimates of tamoxifen to 4-hydroxytamoxifen conversion rate constant ($k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$) versus categorical covariates.

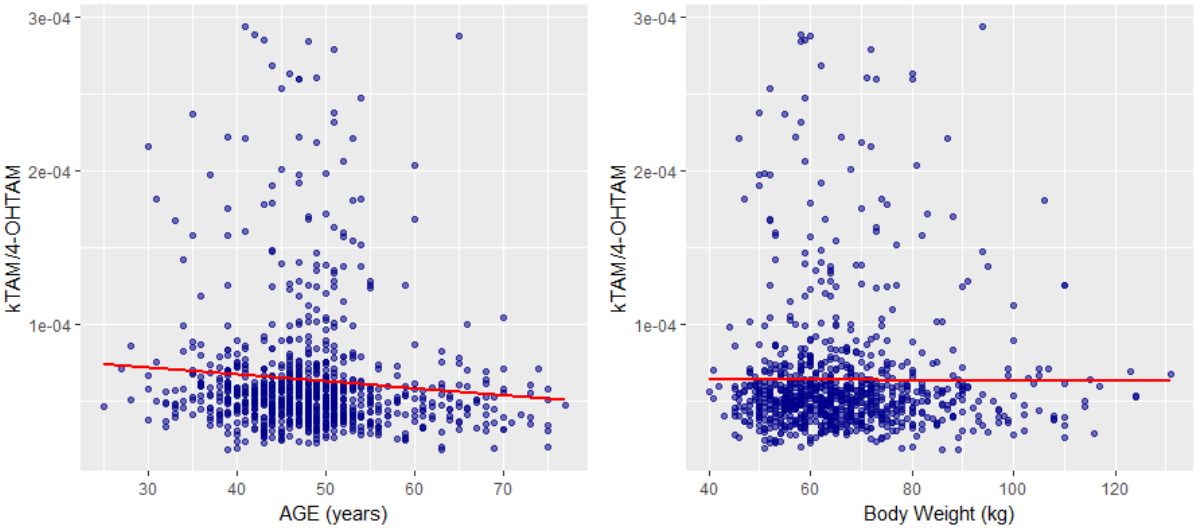


Figure S6 Individual estimates of tamoxifen to 4-hydroxytamoxifen conversion rate constant ($k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$) versus continuous covariates.

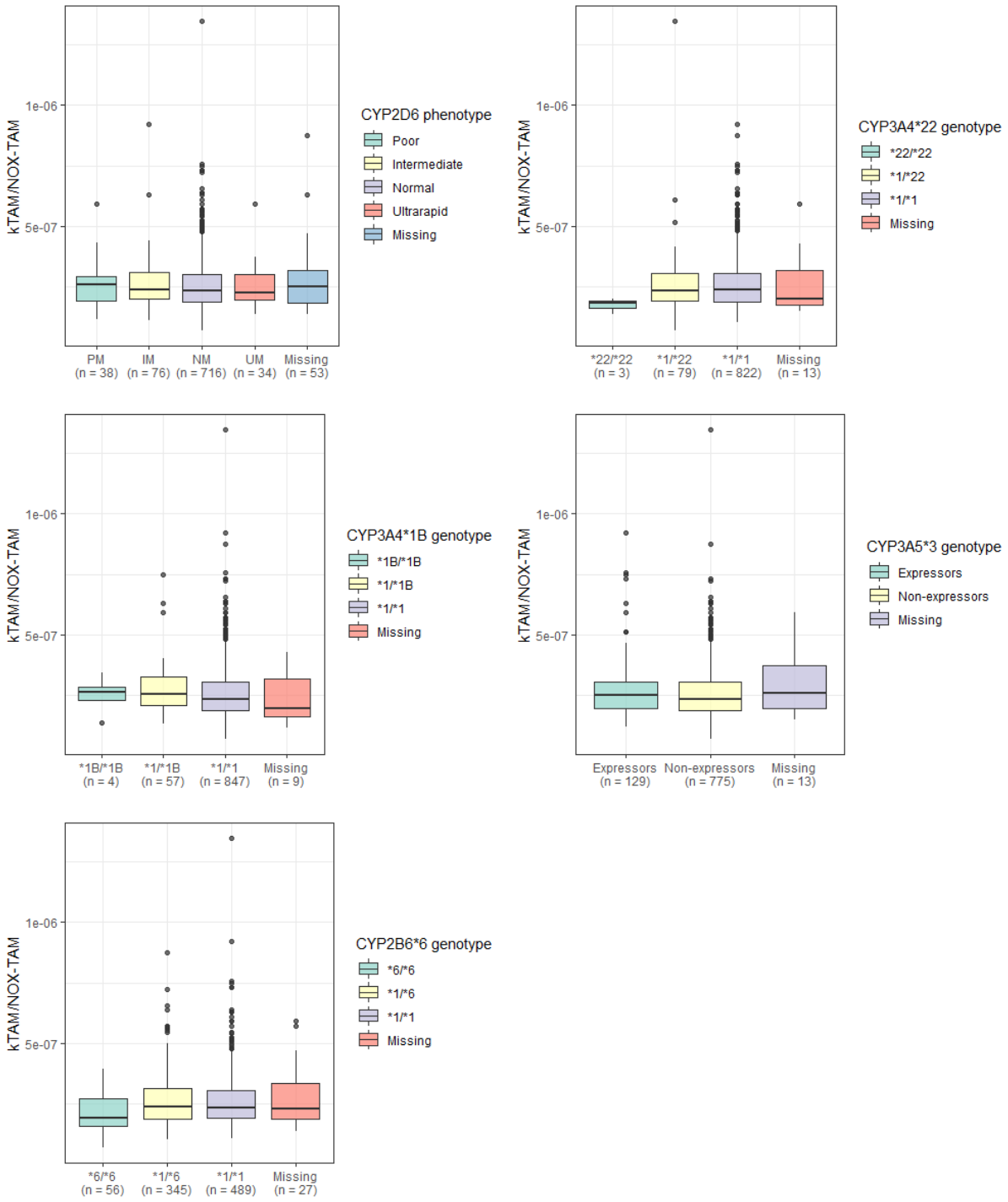


Figure S7 Individual estimates of tamoxifen to N-oxide tamoxifen conversion rate constant ($k_{TAM/NOX-TAM}$) versus categorical covariates.

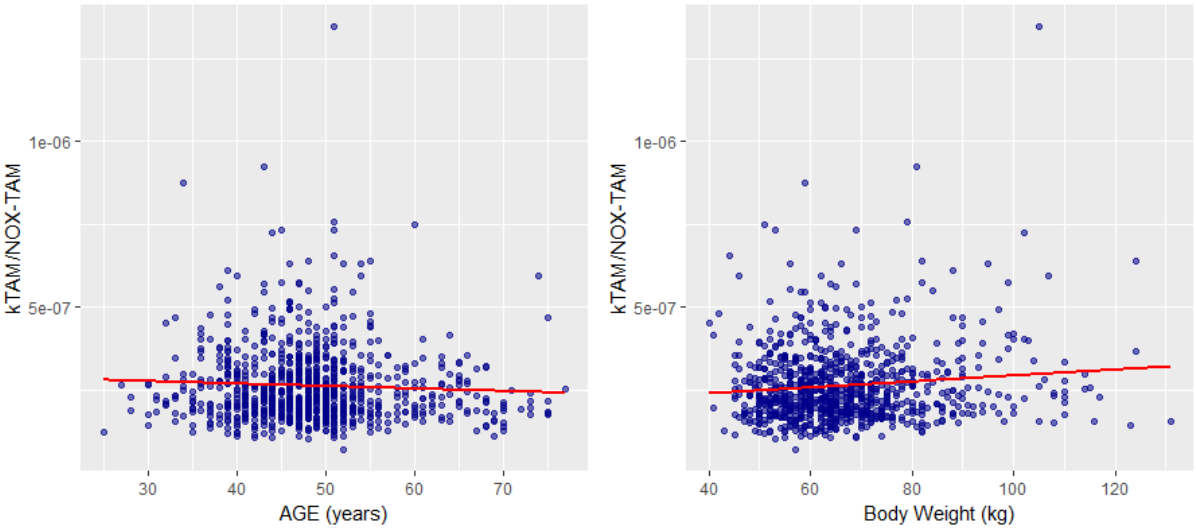


Figure S8 Individual estimates of tamoxifen to N-oxide tamoxifen conversion rate constant ($k_{TAM/NOX-TAM}$) versus continuous covariates.

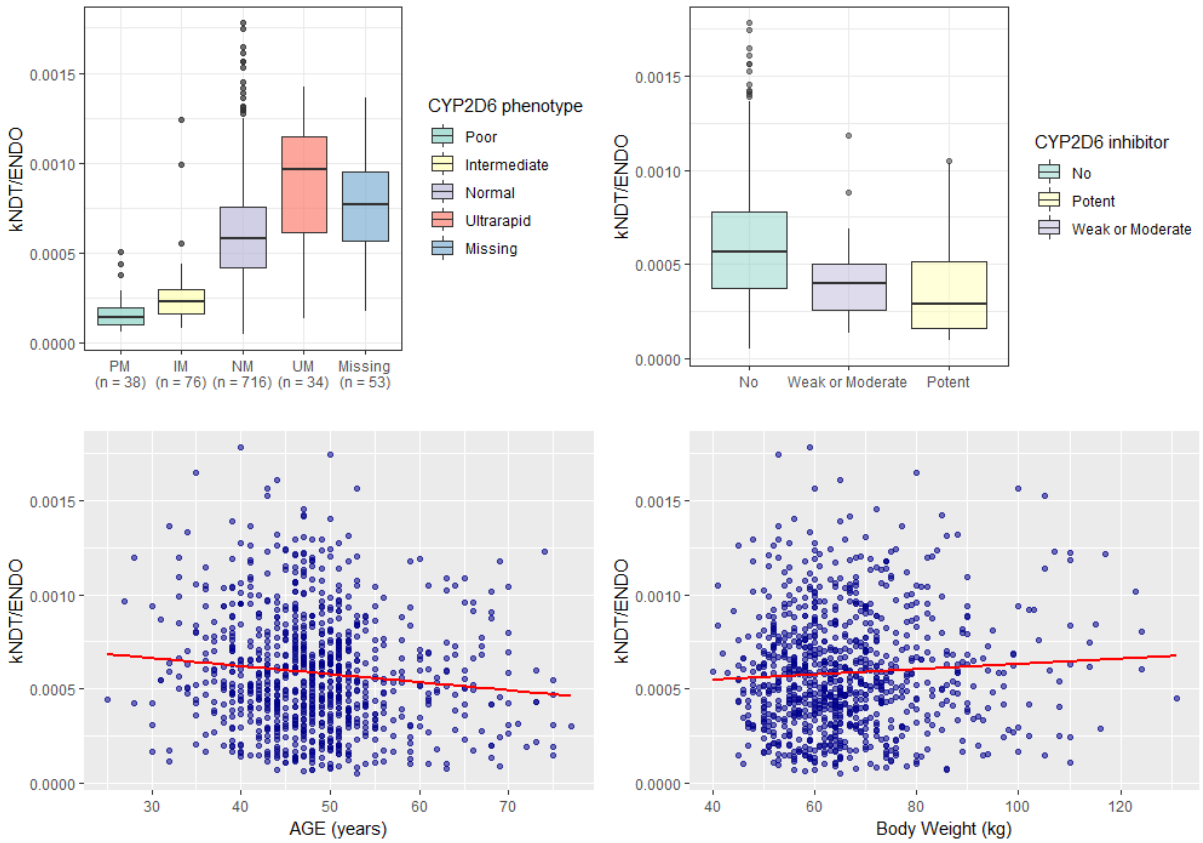


Figure S9 Individual estimates of N-desmethyltamoxifen to endoxifen conversion rate constant ($k_{NDT/ENDO}$) versus categorical and continuous covariates.

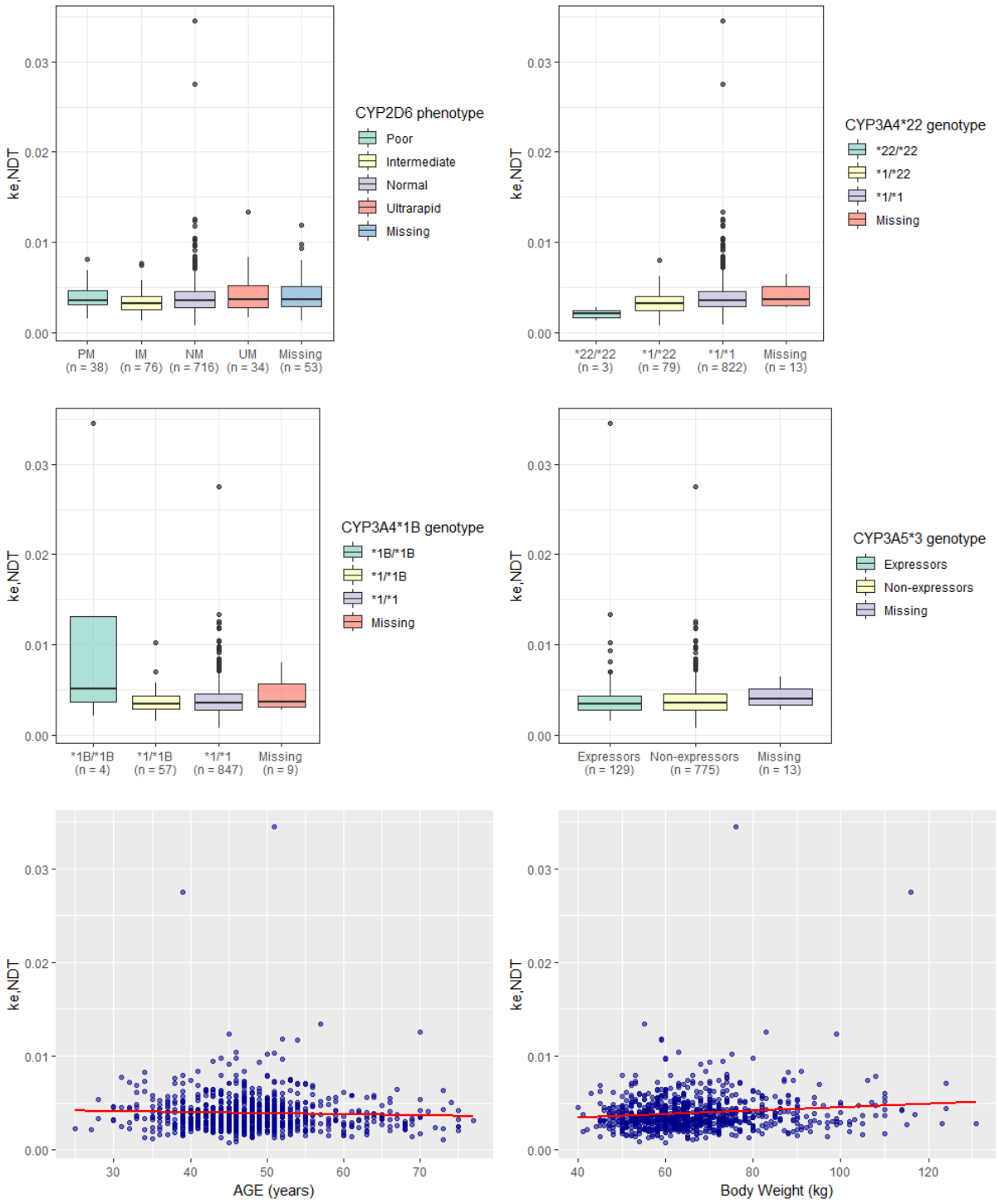


Figure S10 Individual estimates of N-desmethyltamoxifen elimination rate constant ($k_{e,NDT}$) versus categorical and continuous covariates.

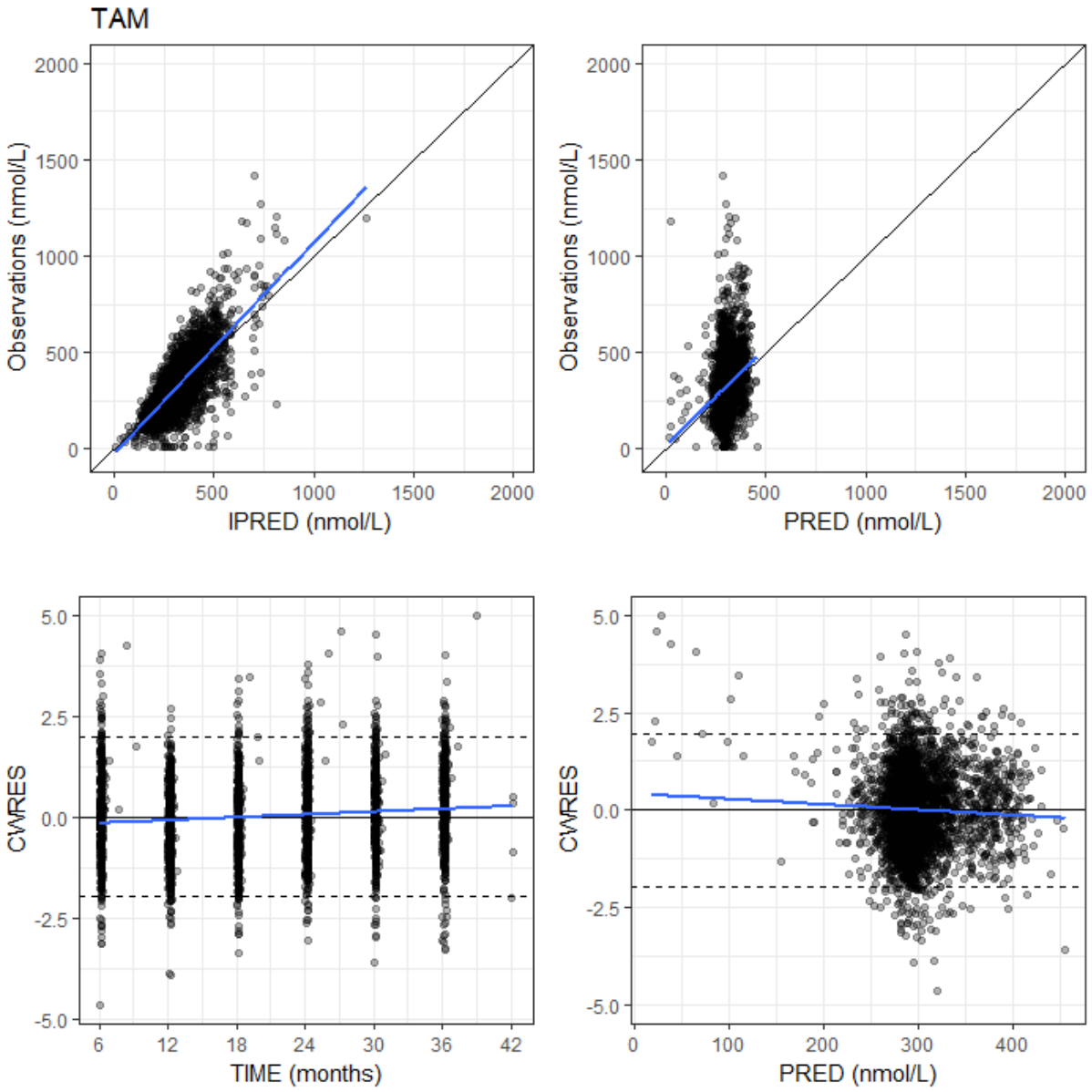
Table S11 Results of the univariate covariate analysis using the base model.

Parameter	Mean estimate (RSE %)	IIV of the corresponding parameter (CV %)	ΔOFV	p-value[a]	Include in the full covariate model
$k_{TAM/NDT}$	-	32.0	-	-	-
*CYP3A4*22* genotype (**22* carriers versus non-carriers)	$\theta_{CYP3A4*22_carrier}$ = 0.78 (4)	31.1	-42.1	< 0.00001	Yes
*CYP3A5*3* genotype (expressors versus non-expressors)	$\theta_{CYP3A5_expressor}$ = 0.99 (4)	32.0	-0.04	0.84	No
Age	θ_{Age} = -0.25 (25)	31.7	-14.3	0.00015	Yes
Body weight	$\theta_{Body\ weight}$ = -0.13 (29)	31.9	-7.2	0.0073	Yes
$k_{TAM/4\text{-}OHTAM}$	-	54.1	-	-	-
CYP2D6 phenotype (IM+PM and missing versus NM and UM)	θ_{CYP2D6_IM+PM} = 0.72 (7) $\theta_{CYP2D6_missing}$ = 1.36 (6)	51.8	-58.2	< 0.00001 [b]	Yes
CYP2D6 phenotype (IM+PM, UM and missing versus NM)	θ_{CYP2D6_IM+PM} = 0.72 (7) θ_{CYP2D6_UM} = 1.1 (15) $\theta_{CYP2D6_missing}$ = 1.37 (6)	51.8	-59.3	< 0.00001[c]	No
*CYP2C19*2* genotype (**2* carriers versus non-carriers)	$\theta_{CYP2C19*2_carrier}$ = 0.88 (4)	53.8	-9.6	0.002	Yes
*CYP2C19*17* genotype (**17* carriers versus non-carriers)	$\theta_{CYP2C19*17_carrier}$ = 1.13 (4)	53.8	-10.4	0.0012	Yes
CYP2D6 inhibitor	$\theta_{CYP2D6_inhibitor}$ = 0.94 (3)	54.1	-3.3	0.07	No
Age	θ_{Age} = -0.40 (29)	53.8	-13	0.0003	Yes
Body weight	$\theta_{Body\ weight}$ = -0.001 (8485)	54.1	0	1	No
$k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$	-	45.3	-	-	-
*CYP2B6*6* genotype (**6/*6 versus *1/*1* or **1/*6*)	$\theta_{CYP2B6*6/*6}$ = 0.74 (7)	44.7	-18.3	0.00002	Yes
*CYP3A4*22* genotype (**22* carriers versus non-carriers)	$\theta_{CYP3A4*22_carrier}$ = 0.98 (6)	45.3	-0.16	0.69	No

Age	θ_{Age} = -0.17 (61)	45.3	-2.5	0.11	No
Body weight	$\theta_{Body\ weight}$ = 0.10 (68)	45.2	-1.6	0.20	No
$k_{NDT/ENDO}$	-	73.8	-	-	-
CYP2D6 phenotype (UM, NM, IM, PM and missing)	$k_{NDT/ENDO,\ CYP2D6_PM}$ = 1.15 x 10^{-4} (13) $k_{NDT/ENDO,\ CYP2D6_IM}$ = 2.19 x 10^{-4} (10) $k_{NDT/ENDO,\ CYP2D6_NM}$ = 6.04 x 10^{-4} (9) $k_{NDT/ENDO,\ CYP2D6_UM}$ = 9.0 x 10^{-4} (11) $k_{NDT/ENDO,\ CYP2D6_missing}$ = 8.1 x 10^{-4} (12)	50.2	-448	< 0.00001[d]	Yes
+ CYP2D6 inhibitor on UM	$\theta_{CYP2D6_inhibitor_UM}$ = 0.43 (17)	50.2	-8.4[e]	0.004	No
+ CYP2D6 inhibitor on NM	$\theta_{CYP2D6_inhibitor_NM}$ = 0.67 (5)	48.3	-63.5[e]	< 0.00001	No
+ Weak/moderate or potent CYP2D6 inhibitor on NM	$\theta_{weak/moderate_CYP2D6_inhibitor,\ NM}$ = 0.71 (6) $\theta_{potent_CYP2D6_inhibitor,\ NM}$ = 0.55 (7)	48	-68.5[e]	< 0.00001[b]	No
+ Weak/moderate or potent CYP2D6 inhibitor on NM and UM	$\theta_{weak/moderate_CYP2D6_inhibitor,NM,UM}$=0.71(6) $\theta_{potent_CYP2D6_inhibitor,\ NM,UM}$ = 0.52 (6)	48	-78.0[e]	< 0.00001[b]	Yes
+ CYP2D6 inhibitor on IM	$\theta_{CYP2D6_inhibitor,\ IM}$ = 0.93 (16)	50.1	-0.3[e]	0.58	No
+ CYP2D6 inhibitor on PM	$\theta_{CYP2D6_inhibitor,\ PM}$ = 1.12 (34)	50.2	-0.2[e]	0.65	No
Age	θ_{Age} = -0.49 (29)	73.3	-11.9	0.0005	Yes
Body weight	$\theta_{Body\ weight}$ = 0.12 (88)	73.7	-1.2	0.27	No
$k_{e,NDT}$	-	44.8	-	-	-
*CYP3A4*22* genotype (**22* carriers versus non-carriers)	$\theta_{CYP3A4*22_carrier}$ = 0.82 (5)	44.5	-13.7	0.0002	Yes
*CYP3A5*3* genotype (expressors versus non-expressors)	$\theta_{CYP3A5_expressor}$ = 0.99 (4)	44.8	-0.06	0.81	No
CYP2D6 phenotype (IM + PM and missing versus NM and UM)	θ_{CYP2D6_IM+PM} = 0.92 (5) $\theta_{CYP2D6_missing}$ = 1.1 (6)	43.7	-5.6	0.052[b]	No
Age	θ_{Age} = -0.16 (58)	44.5	-2.9	0.09	No
Body weight	$\theta_{Body\ weight}$ = 0.22 (24)	44.4	-11.0	0.0009	Yes

CV, coefficient of variation; IIV, Inter-individual variability; IM, intermediate metaboliser; $k_{e,NDT}$, N-desmethyltamoxifen elimination rate constant; $k_{NDT/ENDO}$, N-desmethyltamoxifen to endoxifen conversion rate constant; $k_{TAM/4\text{-}OHTAM,}$ tamoxifen to 4-hydroxytamoxifen conversion rate constant; $k_{TAM/NDT}$, tamoxifen to N-desmethyltamoxifen conversion rate constant; $k_{TAM/NOX\text{-}TAM}$, tamoxifen to N-oxide tamoxifen conversion rate constant; NM, normal metaboliser; OFV, objective function value; PM, poor metaboliser; RSE, Relative standard error; UM, ultrarapid metaboliser;

[a] χ^2 test for comparison between base model (without covariate) and the model including covariate (univariate), 1 degree of freedom (unless otherwise stated), α = 5%, [b] 2 degrees of freedom, [c] 3 degrees of freedom, [d] 4 degrees of freedom, [e] ΔOFV was calculated with the model including CYP2D6 phenotype as the reference.



Figures S12-S18 Diagnostic plots of the final pharmacokinetic model for tamoxifen (TAM), N-desmethyltamoxifen (NDT), 4-hydroxytamoxifen (4-OHTAM), endoxifen (ENDO), Z'-endoxifen (Z'-ENDO), 4'-hydroxytamoxifen (4'-OHTAM) and N-oxide tamoxifen (NOX-TAM). *CWRES* conditional weighted residuals, *IPRED* individual predictions, *PRED* population predictions.

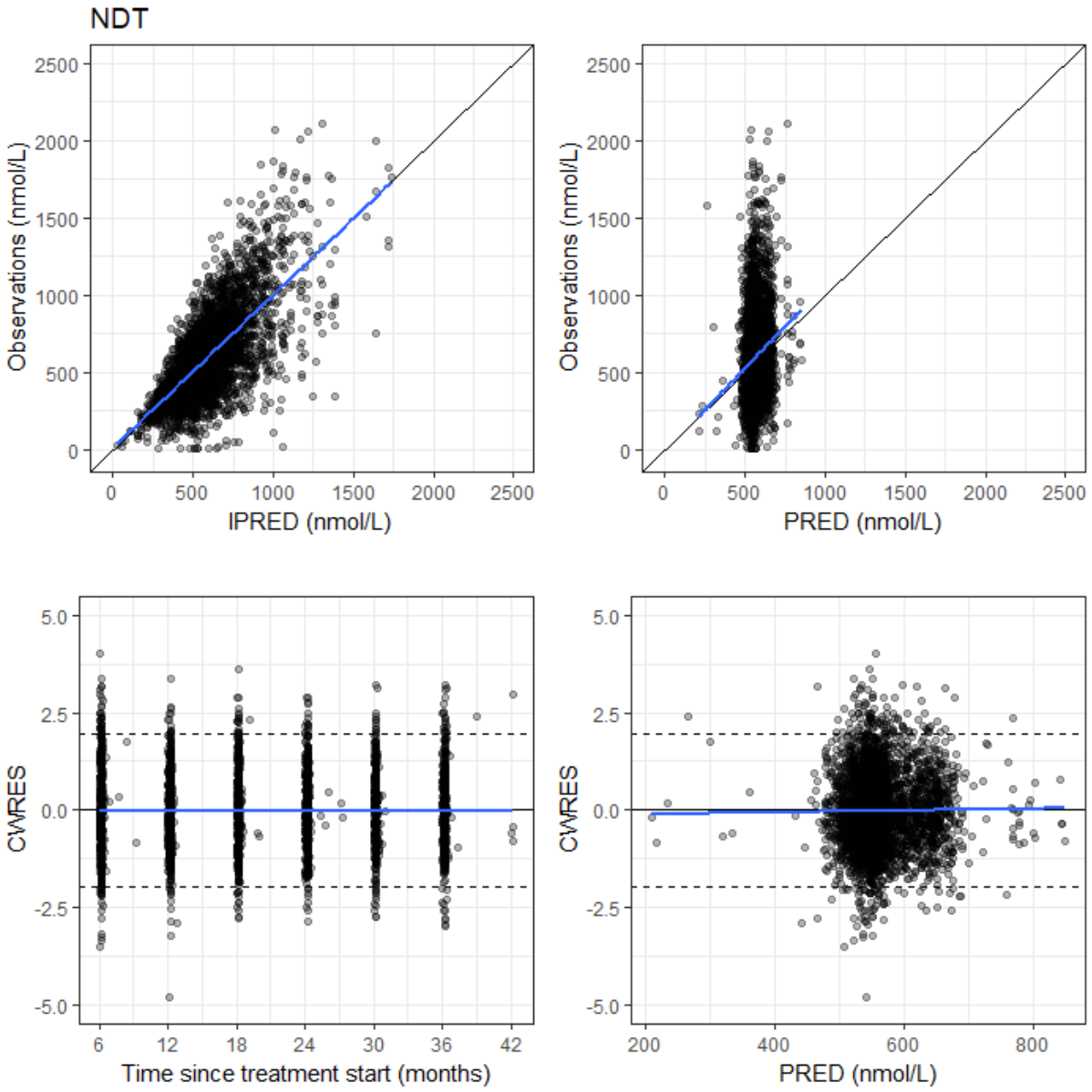

NDT
Observations (nmol/L)
IPRED (nmol/L)
PRED (nmol/L)
CWRES
Time since treatment start (months)

Figure S13

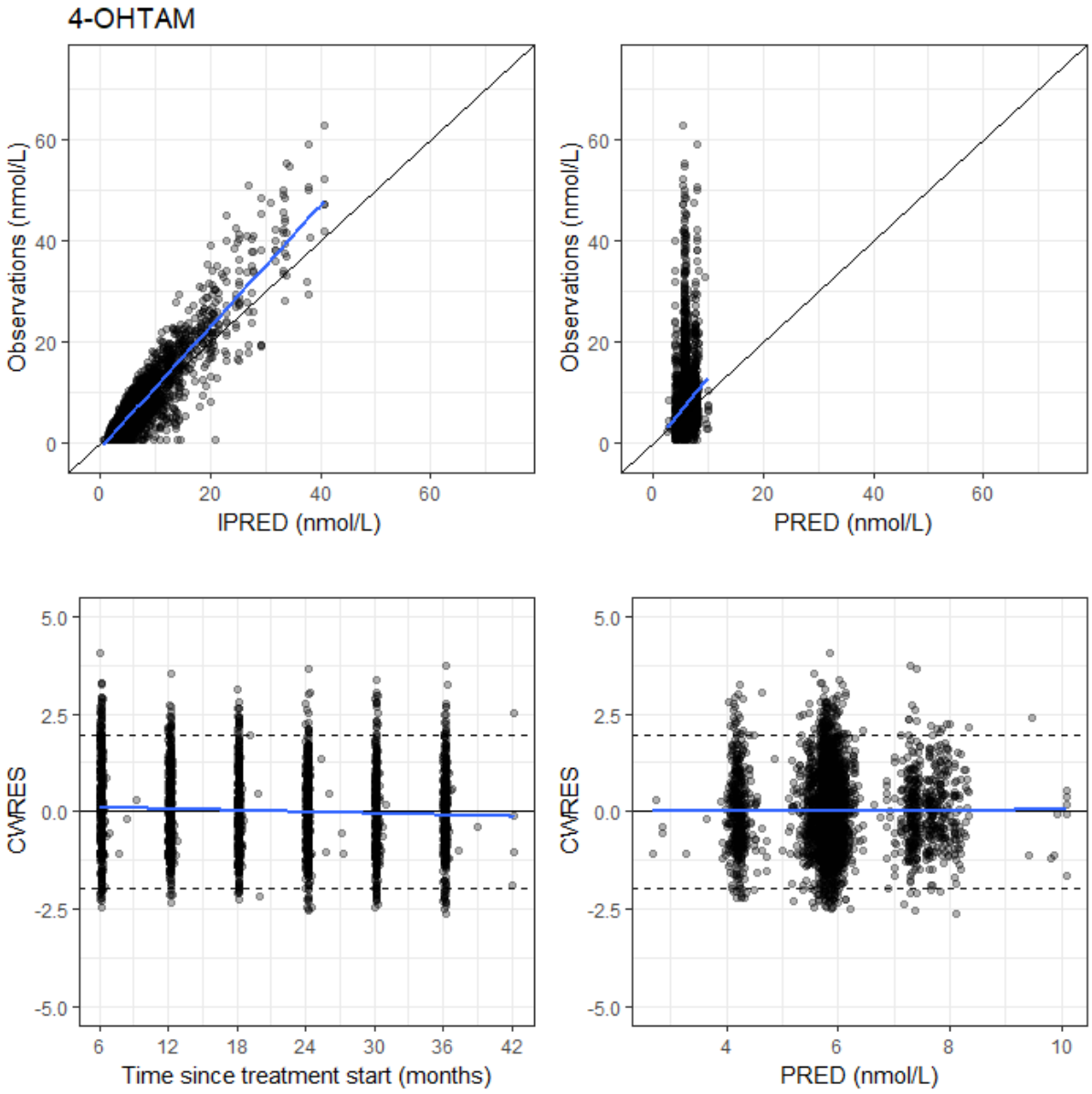

4-OHTAM
Observations (nmol/L)
IPRED (nmol/L)
PRED (nmol/L)
CWRES
Time since treatment start (months)

Figure S14

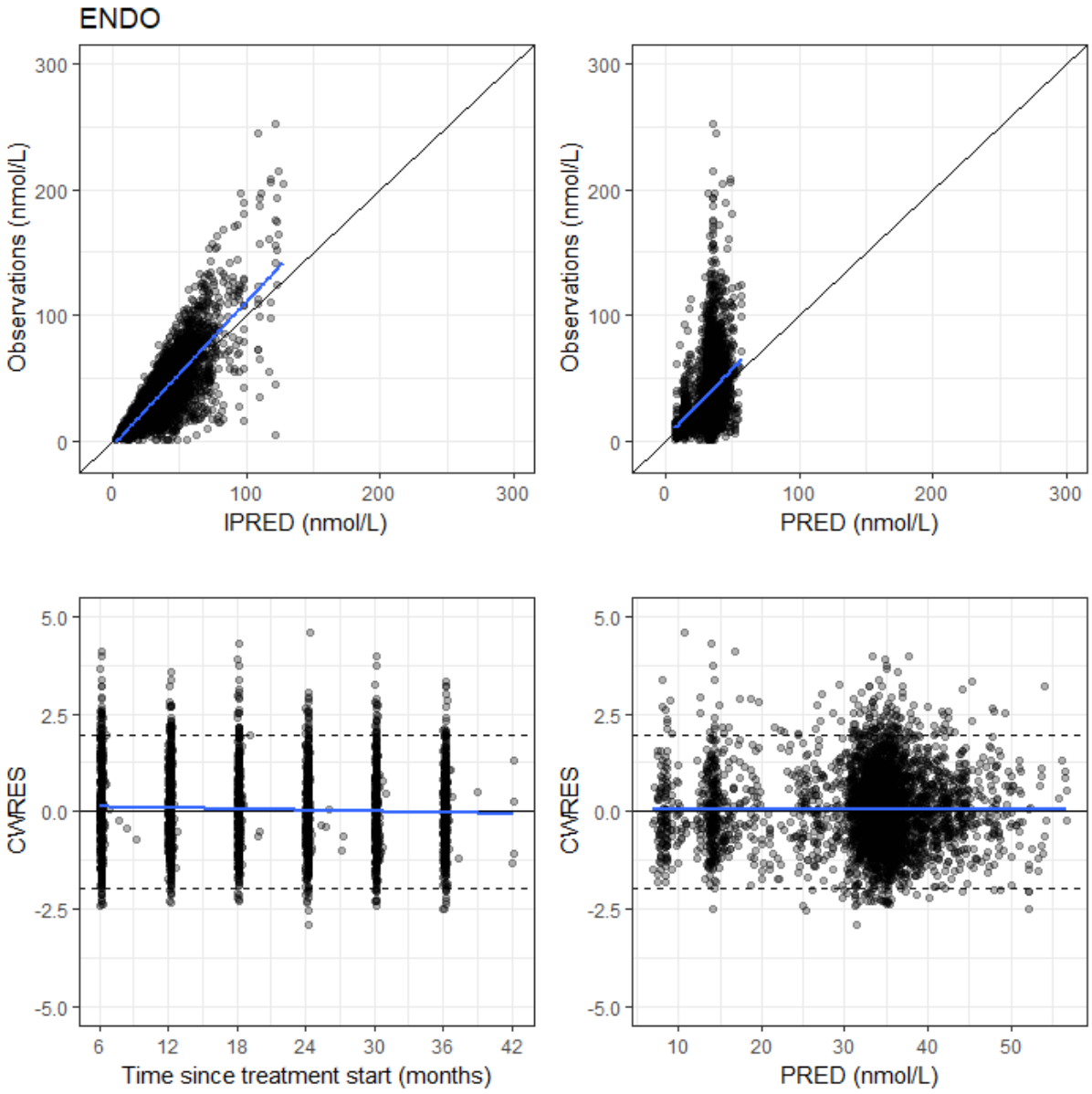

ENDO
Observations (nmol/L)
IPRED (nmol/L)
PRED (nmol/L)
CWRES
Time since treatment start (months)

Figure S15

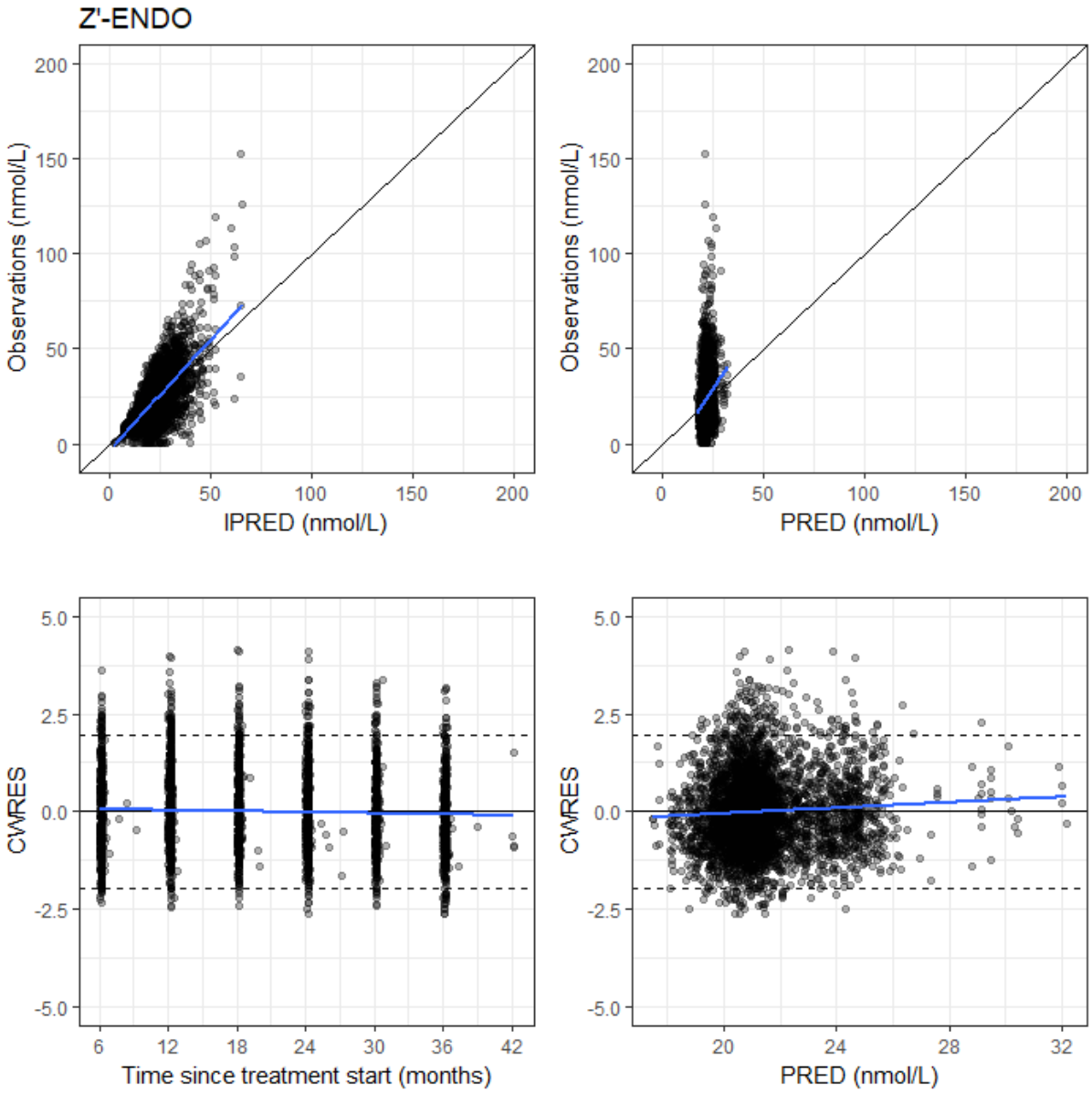

Z'-ENDO
Observations (nmol/L)
IPRED (nmol/L)
PRED (nmol/L)
CWRES
Time since treatment start (months)

Figure S16

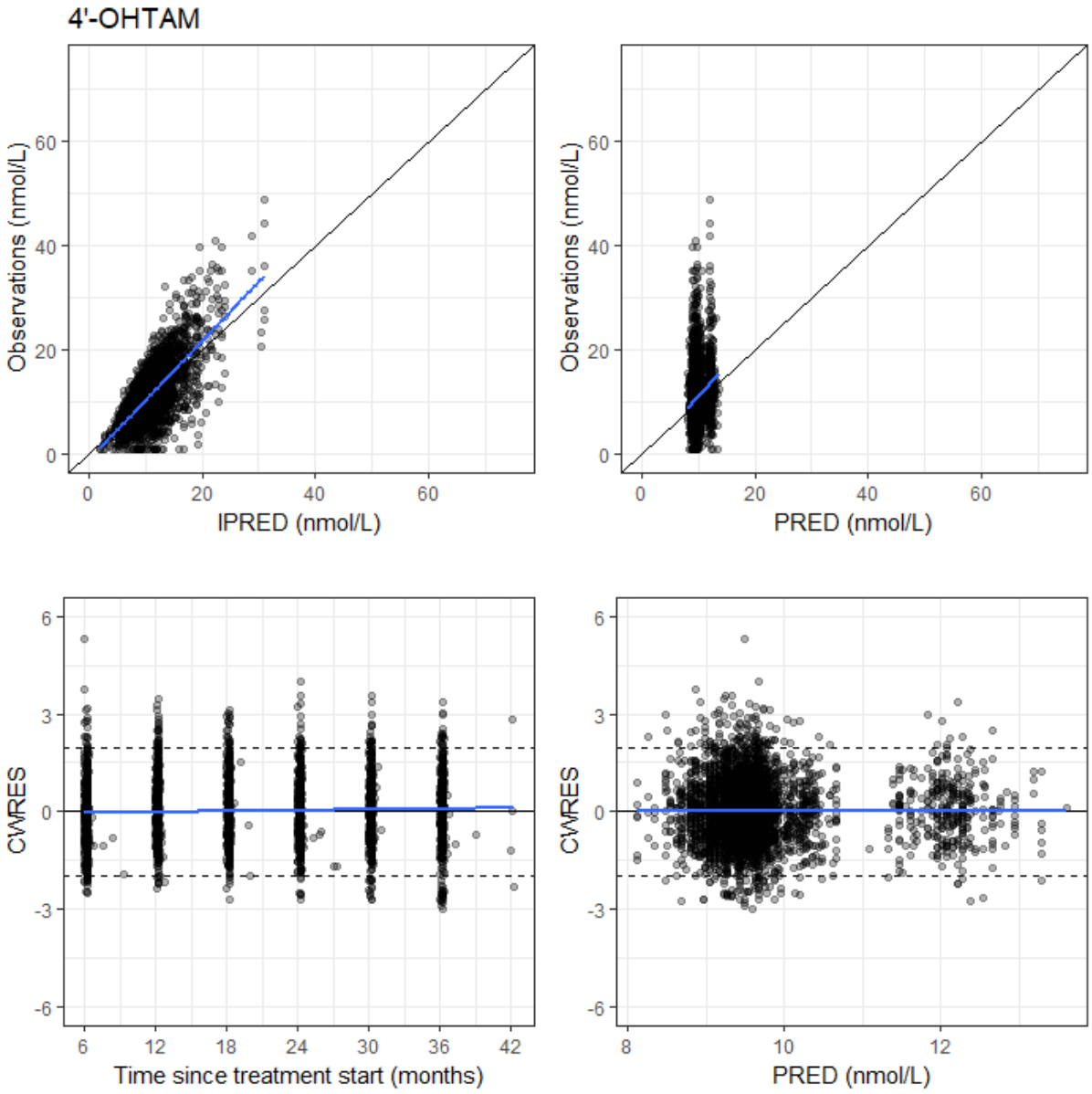

4'-OHTAM
Observations (nmol/L)
IPRED (nmol/L)
PRED (nmol/L)
CWRES
Time since treatment start (months)

Figure S17

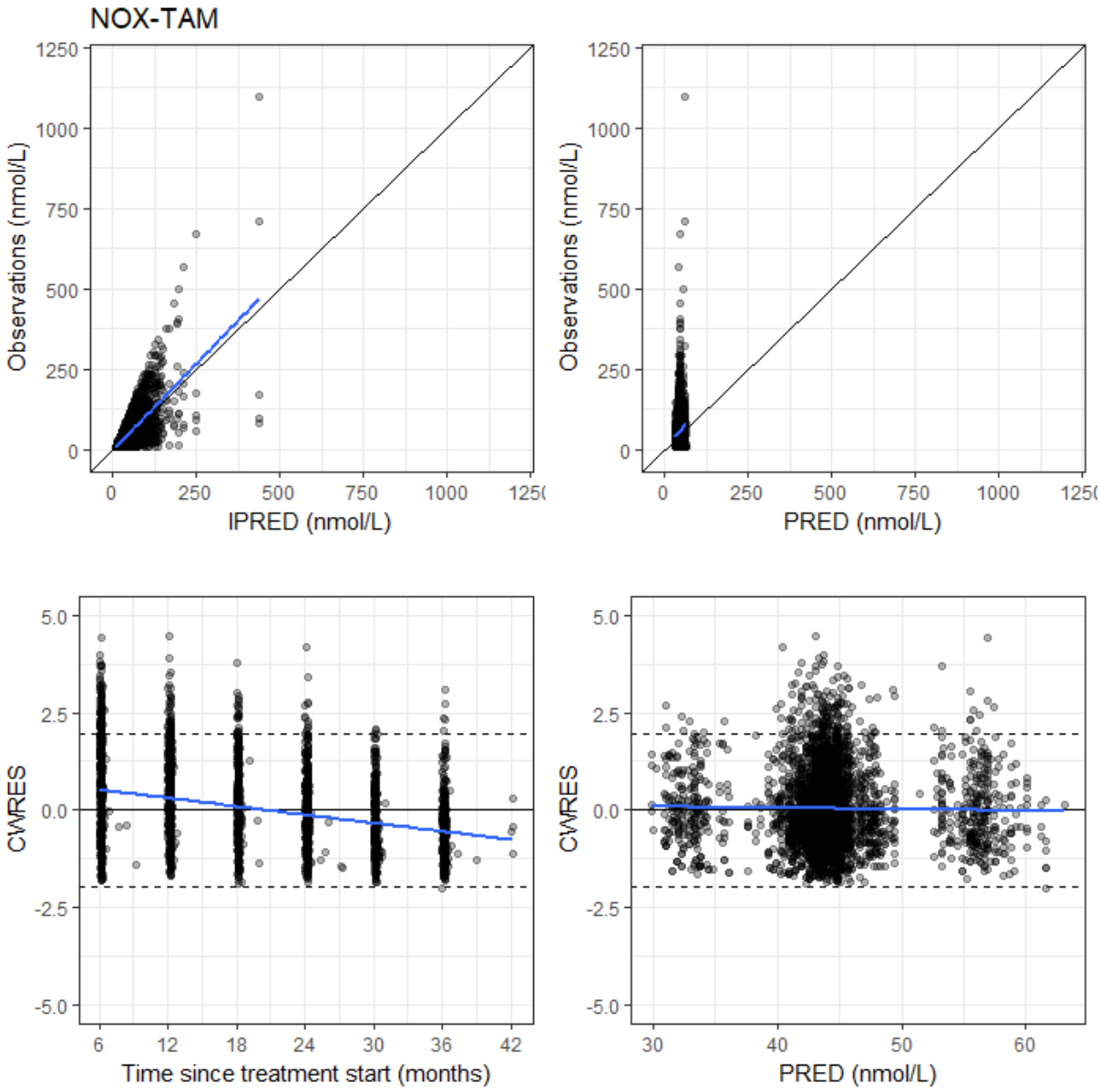

NOX-TAM
Observations (nmol/L)
IPRED (nmol/L)
PRED (nmol/L)
CWRES
Time since treatment start (months)

Figure S18

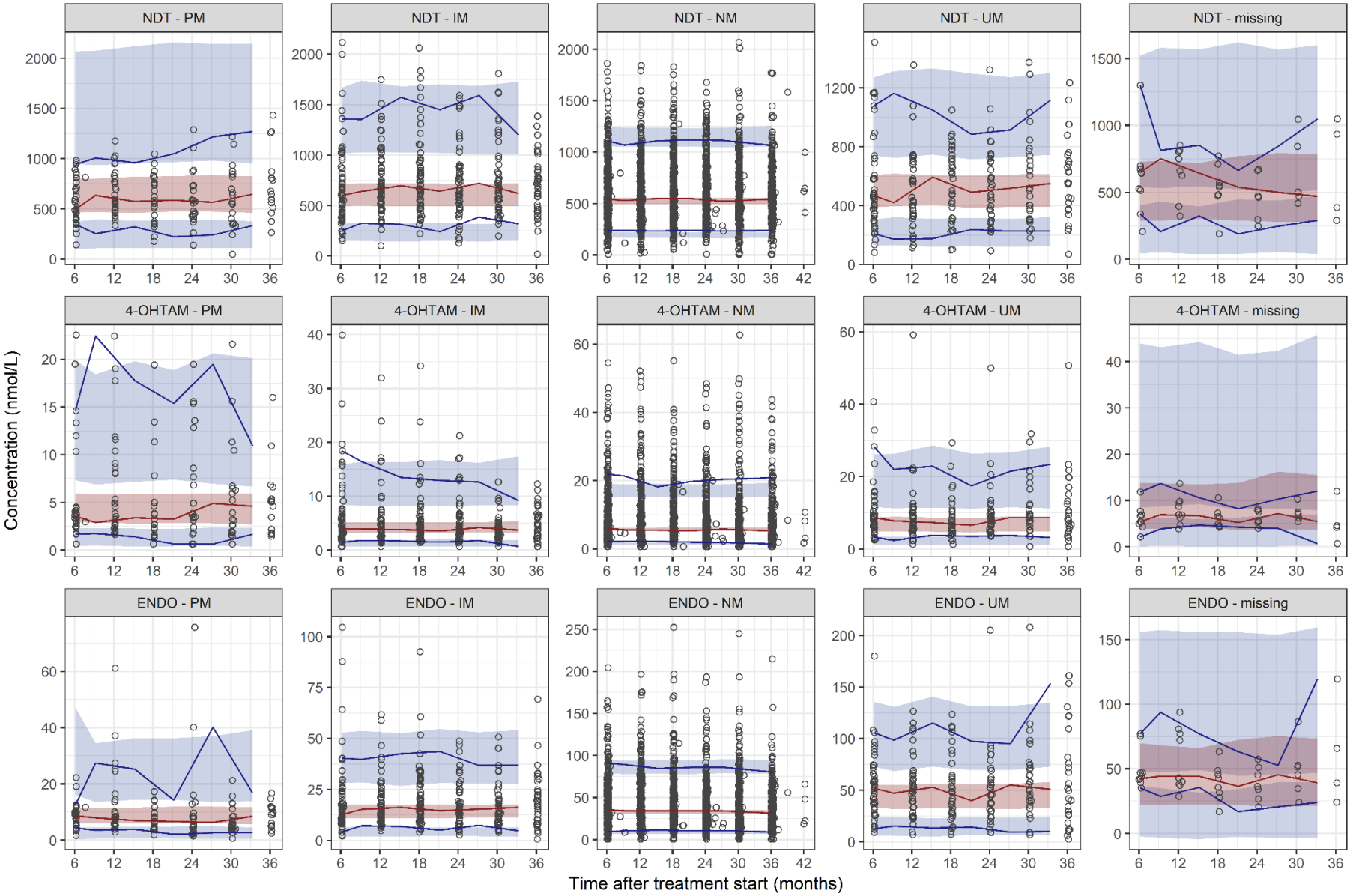


Figure S19 Visual Predictive Check based on 1000 simulations of the original dataset for N-desmethyltamoxifen (NDT), 4-hydroxytamoxifen (4-OHTAM) and endoxifen (ENDO) stratified on CYP2D6 phenotype. IM, intermediate metaboliser; NM, normal metaboliser; PM, poor metaboliser; UM, ultra-rapid metaboliser. *The blue shaded areas* represent the 95% confidence intervals around the 5th and 95th percentile of the simulated concentrations, *the red shaded areas* represent the 95% confidence intervals around the median of the simulated concentrations, *the blue lines* represent the 5th and 95th percentile of the observed concentrations, *the red lines* represent the median of the observed concentrations and *the circles* represent the observed concentrations.

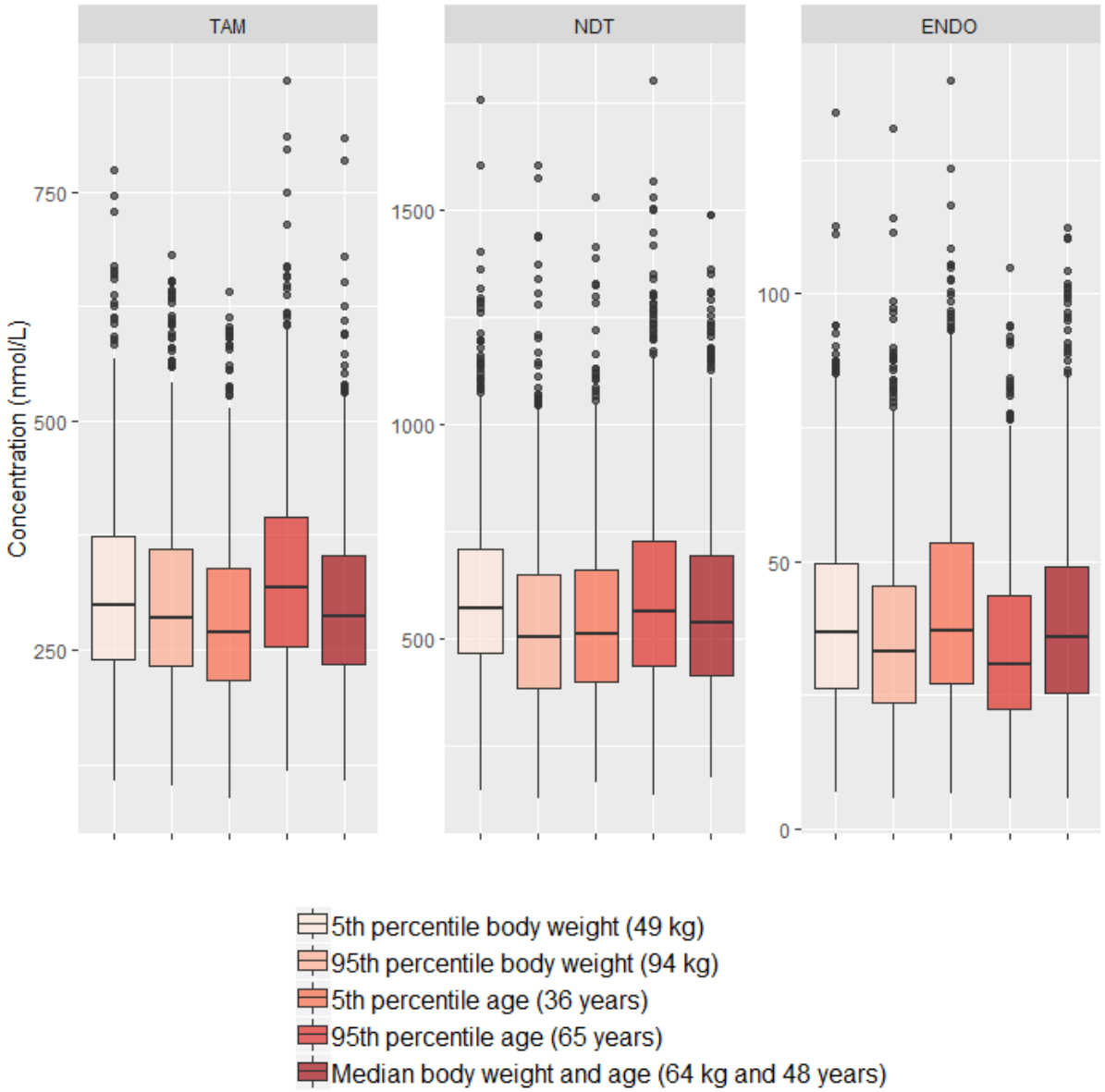
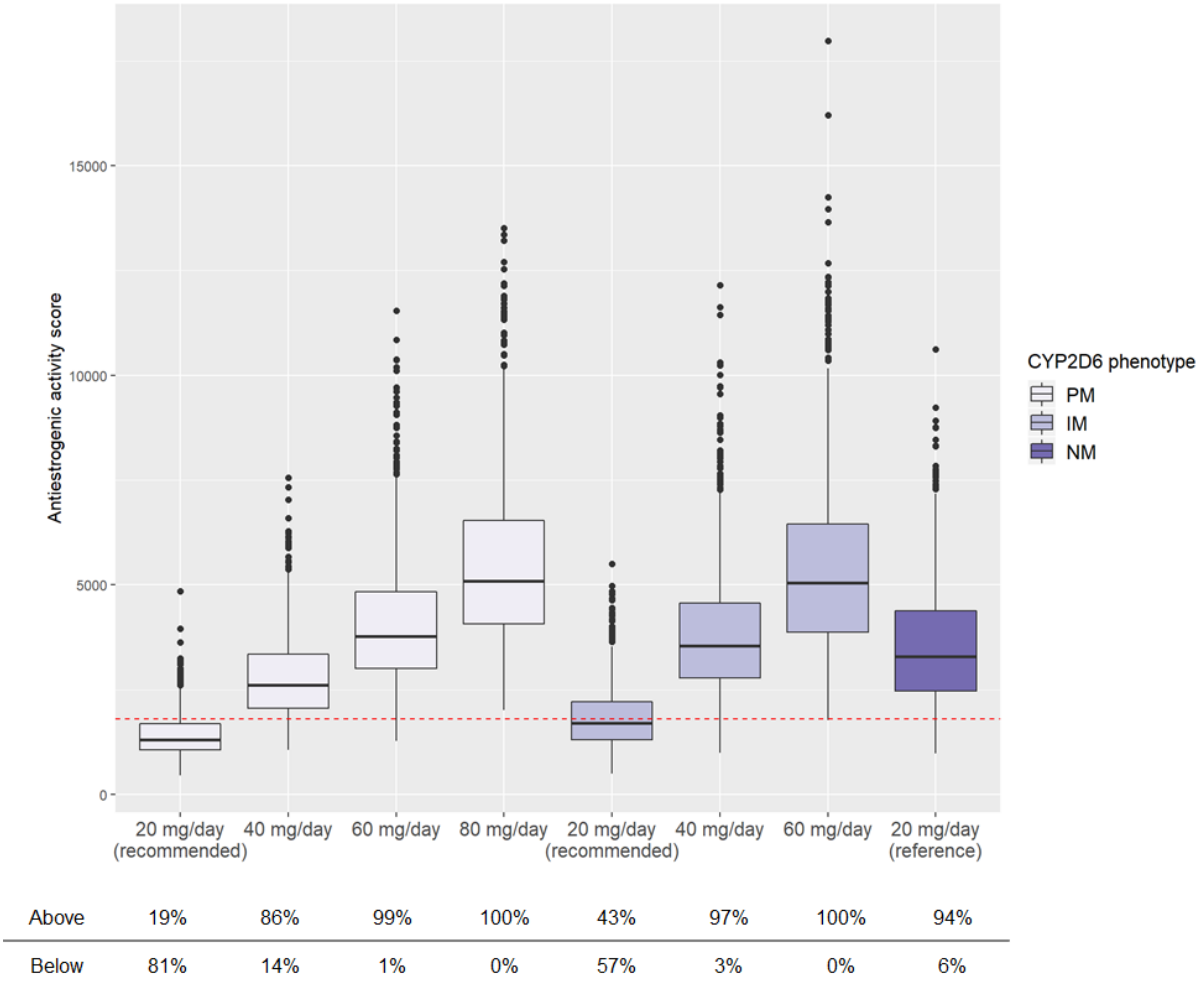


Figure S20 Simulated concentrations of tamoxifen (TAM), N-desmethyltamoxifen (NDT) and endoxifen (ENDO) according to body weight and age (n = 1000 simulations for each characteristic). The simulations were performed in a CYP2D6 NM patient.



Above	19%	86%	99%	100%	43%	97%	100%	94%
Below	81%	14%	1%	0%	57%	3%	0%	6%

Figure S21 Dose-adjustment simulations of alternative dosing regimens for patients with CYP2D6 PM and IM phenotype according to antiestrogenic activity score (AAS). *The red dashed line* represents the previously proposed threshold of AAS of 1798 [18].

Supplemental File S22 Control stream of the final model.

```
$PROBLEM FINAL MODEL

$INPUT ID VISIT TAD TIME RTIME=DROP Z=DROP DV CMT AMT EVID MDV SS II LLOQ BW AGE GEN3A4 GEN3A4_1B GEN2C19_2 GEN2C19_17 GEN3A5 GEN2B6 PHEN CMPL INH_2D6 INH_3A MS_2D6 MS_2C19_2 MS_2C19_17 MS_3A5 MS_3A4 MS_2B6

$DATA dataset_PAGE2019_15052019_2.prn IGNORE=@ NULL=.

$SUBROUTINES ADVAN5

$MODEL

NCOMP=8

COMP=(DEPOT)

COMP=(TAM)   ;2 TAM

COMP=(MET1)  ;3 NNDT

COMP=(MET2)  ;4 4-OHTAM

COMP=(MET3)  ;5 ENDO

COMP=(MET4)  ;6 Z'-ENDO

COMP=(MET5)  ;7 4'-OHTAM

COMP=(MET6)  ;8 NOX-TAM


$PK

;-------CYP3A4*22

CYP3A4=0

IF (GEN3A4.EQ.0.5.OR.GEN3A4.EQ.0) CYP3A4=1   ;CYP3A4*22 carriers


;-------CYP2D6 IM+PM phenotype

PMIM=0

MS_PHEN=0

IF (PHEN.EQ.0.AND.MS_2D6.NE.1) PMIM=1

IF (PHEN.EQ.1.AND.MS_2D6.NE.1) PMIM=1

IF (PHEN.EQ.-99.OR.MS_2D6.EQ.1) MS_PHEN=1    ;missing CYP2D6


;-------CYP2B6*6

CYP2B6=0

IF (GEN2B6.EQ.0) CYP2B6=1                    ;CYP2B6*6/*6 carriers
```

```
;-------CYP2D6 inhibitors
WM=0            ; weak or moderate
POT=0           ;potent
INH2D6=0        ;all confounded
IF (INH_2D6.EQ.1.OR.INH_2D6.EQ.2) WM=1
IF (INH_2D6.GE.3) POT=1
IF (INH_2D6.GE.1) INH2D6=1

;-------AGE et BW
IBW=BW
IAGE=AGE
IF (BW.EQ.-99) IBW=64    ;impute missing BW by median value
IF (AGE.EQ.-99) IAGE=48  ;impute missing AGE by median value

K12=THETA(1)
V2=THETA(2)

;-----TAM to NDT
TVK23=THETA(3)/1000*THETA(15)**CYP3A4*(IAGE/48)**THETA(16)
K23=TVK23*EXP(ETA(1))

;-----TAM to 4-OHTAM
TVK24=THETA(4)/1000*THETA(17)**PMIM*THETA(18)**MS_PHEN*(IAGE/48)**THETA(19)
K24=TVK24*EXP(ETA(2))

;-----TAM to 4'-OHTAM
TVK27=THETA(5)/1000
K27=TVK27*EXP(ETA(3))

;-----TAM to NOX-TAM
TVK28=THETA(6)/1000*THETA(20)**CYP2B6
K28=TVK28*EXP(ETA(4))
```

```
;-----NDT to ENDO

;-----NM

IF(PHEN.EQ.2.AND.MS_2D6.NE.1)TVK35=THETA(7)/1000*THETA(25)**WM*THETA(26)**POT*(IAGE/48)**
THETA(27)

;-----PM

IF(PHEN.EQ.0.AND.MS_2D6.NE.1)TVK35=THETA(21)/1000*(IAGE/48)**THETA(27)

;-----IM

IF(PHEN.EQ.1.AND.MS_2D6.NE.1)TVK35=THETA(22)/1000*(IAGE/48)**THETA(27)

;-----UM

IF(PHEN.EQ.3.AND.MS_2D6.NE.1)TVK35=THETA(23)/1000*THETA(25)**WM*THETA(26)**POT*(IAGE/48)
**THETA(27)

;-----MSNG

IF(MS_2D6.EQ.1)TVK35=THETA(24)/1000*(IAGE/48)**THETA(27)

K35=TVK35*EXP(ETA(5))


;-----NDT to Z'-ENDO

TVK36=THETA(8)/1000

K36=TVK36*EXP(ETA(6))


;-----4-OHTAM to ENDO

TVK45=THETA(9)/1000

K45=TVK45*EXP(ETA(7))


;-----elimination NDT

TVK30=THETA(10)/1000*THETA(28)**CYP3A4*(IBW/64)**THETA(29)

K30=TVK30*EXP(ETA(8))


;-----elimination ENDO

TVK50=THETA(11)/1000

K50=TVK50*EXP(ETA(9))


;-----elimination Z'-ENDO

TVK60=THETA(12)/1000
```

```
K60=TVK60*EXP(ETA(10))

;-----elimination 4'-OHTAM
TVK70=THETA(13)/1000
K70=TVK70*EXP(ETA(11))

;-----elimination NOX-TAM
TVK80=THETA(14)/1000
K80=TVK80*EXP(ETA(12))

S2=V2
S3=V2
S4=V2
S5=V2
S6=V2
S7=V2
S8=V2

$THETA (0.9) FIX                ; k12
$THETA (966) FIX                ; V2
$THETA (0, 7.3, 20)             ; k23
$THETA (0.0001, 0.060, 0.2)  ; k24
$THETA (0, 0.00008, 0.001)   ; k27
$THETA (0, 0.0002, 0.005)    ; k28
$THETA (0, 0.7, 2)              ; k35
$THETA (0, 0.00039, 0.01)    ; k36
$THETA (0, 3, 10)               ; k45
$THETA (0, 3.4, 10)             ; k30
$THETA (4, 10, 20)              ; k50
$THETA (0.0108) FIX             ; k60
$THETA (0.00201) FIX            ; k70
$THETA (0.00177) FIX            ; k80
$THETA (0, 0.7, 3)              ;15 CYP3A4*22/k23
```

```
$THETA (-0.252)              ;16 AGE/k23
$THETA (0,0.7, 3)            ;17 IM+PM/k24
$THETA (0,1, 3)              ;18 MS_PHEN/k24
$THETA (-0.399)              ;19 AGE/k24
$THETA (0, 0.745, 3)         ;20 CYP2B6*6/k28
$THETA (0, 0.131, 5)         ;21 k35 PM
$THETA (0, 0.247, 5)         ;22 k35 IM
$THETA (0, 1.03, 5)          ;23 k35 UM
$THETA (0, 0.9, 5)           ;24 k35 MSNG
$THETA (0, 0.7, 3)           ;25 WM INH2D6/k35
$THETA (0, 0.5, 3)           ;26 POT INH2D6/k35
$THETA (-0.49)               ;27 AGE/k35
$THETA (0, 0.8, 3)           ;28 CYP3A4*22/k30
$THETA (0.217)               ;29 BW/k30

$OMEGA 0.08          ;IIV k23
$OMEGA 0.3           ;IIV k24
$OMEGA 0.047         ;IIV k27
$OMEGA 0.17          ;IIV k28
$OMEGA 0.44          ;IIV k35
$OMEGA 0 FIX         ;IIV k36
$OMEGA 0 FIX         ;IIV k45
$OMEGA 0.18          ;IIV k30
$OMEGA 0 FIX         ;IIV k50
$OMEGA 0 FIX         ;IIV k60
$OMEGA 0 FIX         ;IIV k70
$OMEGA 0 FIX         ;IIV k80

$ERROR
DEL=0
IF (F.EQ.0) DEL=1
W=F+DEL
IF (CMT.EQ.2) Y=F+W*ERR(1)   ; TAM
```

```
IF (CMT.EQ.3) Y=F+W*ERR(2)   ; NDT
IF (CMT.EQ.4) Y=F+W*ERR(3)   ; 4-OHTAM
IF (CMT.EQ.5) Y=F+W*ERR(4)   ; ENDO
IF (CMT.EQ.6) Y=F+W*ERR(5)   ; Z'-ENDO
IF (CMT.EQ.7) Y=F+W*ERR(6)   ; 4'-OHTAM
IF (CMT.EQ.8) Y=F+W*ERR(7)   ; NOX-TAM
IPRED=F
IRES=DV-IPRED
IWRES=IRES/W

$SIGMA 0.09  ; TAM
$SIGMA 0.11   ; NDT
$SIGMA 0.13   ; 4-OHTAM
$SIGMA 0.15   ; ENDO
$SIGMA 0.15   ; Z'-ENDO
$SIGMA 0.11   ; 4'-OHTAM
$SIGMA 0.25    ; NOX-TAM

$EST MAXEVAL=9999 METHOD=1 INTERACTION NOABORT SIG=2
$COV MATRIX=S UNCONDITIONAL
$TABLE ID VISIT TAD TIME PRED IPRED IWRES CWRES EVID MDV CMT NOPRINT ONEHEADER FILE=sdtab033
$TABLE ID K23 K24 K27 K28 K35 K36 K45 K30 ETA(1) ETA(2) ETA(3) ETA(4) ETA(5) ETA(8) NOPRINT ONEHEADER FILE=patab033
$TABLE ID BW IBW AGE IAGE CMPL NOPRINT ONEHEADER FILE=cotab033
$TABLE ID GEN3A4 GEN3A4_1B GEN2C19_2 GEN2C19_17 GEN3A5 GEN2B6 PHEN INH_2D6 INH_3A NOPRINT ONEHEADER FILE=catab033
```

2.4 Discussion

Ces travaux de thèse avaient pour objectif d'étudier la relation pharmacocinétique-pharmacogénétique du tamoxifène chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant dans le cadre de l'étude PHACS.

Dans un premier temps, les analyses pharmacogénétiques ont été effectuées sur les données préliminaires à la visite de suivi à 6 mois. Ces analyses ont permis d'avoir une première évaluation de l'ensemble des polymorphismes génétiques recherchés dans l'étude PHACS avec les données de tous les métabolites. L'identification de l'impact significatif du *CYP2D6*, *CYP3A4*22*, *CYP2C19*2* et *CYP2B6*6* sur la pharmacocinétique de tamoxifène a permis de justifier le choix de ces génotypes pour l'analyse par approche de population effectuée dans un deuxième temps.

De plus, les analyses préliminaires ont permis d'évaluer la performance de la classification CPIC de génotype CYP2D6 en phénotype actuellement utilisée pour le tamoxifène. En effet, des études récentes ont souligné que la classification actuellement utilisée établie sur les données de dextramethorphan et codéine [127,349] s'avère ne pas être optimale pour le tamoxifène. En conséquence, les dernières recommandations du CPIC indiquaient la nécessité de réévaluer cette classification. Nos travaux ont démontré des différences significatives au niveau des concentrations d'endoxifène et du ratio métabolique *N*-desmethyltamoxifène/endoxifène parmi les diplotypes NM/NM (AS = 2), NM/IM (AS = 1.5), NM/PM (AS = 1) et IM/IM (AS = 1) tous classés en phénotype NM. En conséquence, l'activité enzymatique est sur-estimée chez les patientes avec le diplotype IM/IM ce qui, dans le cas de l'adaptation de dose en fonction du phénotype CYP2D6, pourrait s'accompagner d'une dose trop faible chez ces patientes. Nos travaux ont montré que le classement des patientes IM/IM (AS = 1) avec les IM/PM (AS = 0.5) serait plus approprié puisque ces deux diplotypes présentent des concentrations d'endoxifène comparables. Ce nouveau classement du phénotype CYP2D6, dans lequel les diplotypes NM/NM, NM/IM et NM/PM ont été regroupés en phénotype NM et les diplotypes IM/IM et IM/PM regroupés en phénotype IM, a été utilisé dans la suite de nos travaux effectués par approche de population.

Dans le cadre de l'article n°2, la totalité des données pharmacocinétiques de l'étude PHACS a été analysée par approche de population. Cette approche constitue un avantage majeur par rapport aux méthodes standards. En effet, un modèle pharmacocinétique décrivant simultanément les données de tamoxifène et six métabolites a été développé. Ce modèle a permis de décrire les voies de métabolisation de tamoxifène et de quantifier leur variabilité interindividuelle. Les covariables significatives identifiées dans le modèle étaient le phénotype CYP2D6, le génotype *CYP3A4*22* et *CYP2B6*6*, les inhibiteurs de CYP2D6, l'âge et le poids. De ce fait, le modèle de population a confirmé les résultats des analyses préliminaires à la visite de 6 mois. Les simulations effectuées avec le modèle final ont montré que l'exposition à l'endoxifène était diminuée de 75% et 60% chez les patientes présentant un phénotype CYP2D6 PM et IM respectivement et augmentée de 25% chez les patientes UM, par rapport aux patientes NM. Nos travaux basés sur les simulations des concentrations d'endoxifène ont montré qu'une augmentation de dose jusqu'à 40 et 80 mg/jour pourrait être proposée chez les patientes avec un phénotype PM et IM respectivement. En effet, ces doses alternatives permettraient d'atteindre le seuil de 16 nmol/L chez plus de 95% des patientes PM et IM contre seulement 11% et 40% à la dose standard (20 mg/jour). Ces résultats sont cohérents avec des études concernant l'escalade de dose. L'administration d'une dose moyenne de 46 mg/jour chez les IM et de 90 mg/jour chez les PM a permis d'atteindre le seuil de 16 nmol/L chez toutes les patientes [270]. Cependant, si l'on considère le score d'activité antiestrogénique tenant compte des concentrations de tamoxifène, *N*-desmethyltamoxifène, 4-hydroxytamoxifène et endoxifène, le seuil d'efficacité serait atteint chez plus de 95% des PM et IM patientes aux doses 60 et 40 mg/jour. Ainsi, une augmentation de dose au-delà de 60 mg/jour chez les patientes PM ne serait pas nécessaire. Dans les études d'escalade de dose, l'augmentation d'effets indésirables ou à une dégradation de la qualité de vie après 4 mois de traitement n'ont pas été observées [114]. Néanmoins, les conséquences à long terme d'un traitement à une dose plus élevée ne sont pas connues, ce qui souligne la nécessité d'études de suivi longitudinal.

Une administration orale directe de l'endoxifène permettrait de contourner l'impact du génotype CYP2D6 et de l'administration concomitante des inhibiteurs de CYP2D6 sur la bioactivation du tamoxifène. Ainsi, l'activité antitumorale pourrait être atteinte chez toutes les patientes. Goetz *et al.* ont rapporté l'étude de phase 1 évaluant le profil pharmacocinétique et la dose maximale tolérée de

l'endoxifène chez les patientes avec un cancer du sein ER+ au stade métastatique [350]. L'endoxifène a démontré une activité antitumorale et un profil de toxicité favorable pour des doses allant de 20 à 160 mg/jour. Les C_{ss} étaient de 146 ng/mL (390 nmol/L) et 1 950 ng/mL (5 200 nmol/L) pour une dose de 20 et 160 mg/jour, respectivement. Le CYP2D6 n'était pas associé à la CL/*F* de l'endoxifène ou à la survie sans progression. De plus, les résultats de cette étude suggèrent que les patientes résistantes au tamoxifène peuvent bénéficier d'un traitement par l'endoxifène. Ceci serait notamment observé chez les patientes qui n'auraient pas atteint de concentrations d'endoxifène efficaces pendant le traitement par tamoxifène à cause de la diminution de l'activité de CYP2D6. En effet, parmi les patientes ayant progressé sous tamoxifène (n = 24), une meilleure réponse à l'endoxifène en termes de survie sans progression a été observée chez les patientes avec une diminution d'activité de CYP2D6 comparées aux patientes avec une activité normale ou augmentée (PFS médiane = 157 jours, IQR = 72 – 296, n = 12 versus 60 jours, IQR = 31 – 132, n = 11). D'autres études cliniques évaluant l'endoxifène sont actuellement en cours dont une étude de phase 1 (NCT01327781) et une étude de phase 2 comparant l'efficacité de l'endoxifène (80 mg/jour) au tamoxifène (20 mg/jour) chez les patientes au stade avancé ou métastatique qui ont progressé sous inhibiteurs de l'aromatase (NCT02311933). Néanmoins, l'optimisation de thérapie par tamoxifène reste une problématique d'actualité pour des milliers de patientes qui sont et seront encore traitées par tamoxifène avant que l'endoxifène ne se démontre supérieur et le remplace dans la prise en charge du cancer du sein ER+ en situation adjuvante.

Au cours de l'étude PHACS, les données sur la survenue des effets indésirables ont été recueillies. Les résultats préliminaires des analyses sur la relation entre la pharmacocinétique et effets indésirables du tamoxifène ont été présentés sous forme de deux posters au congrès *San Antonio Breast Cancer Symposium* en décembre 2017 par le Pr Henri Roché et le Dr Mélanie White-Koning [351,352]. Parmi les patientes traitées par tamoxifène, l'apparition ou la majoration d'effets indésirables à la première visite de suivi à 6 mois par rapport à la baseline a été rapportée notamment pour les bouffées de chaleur (42%), l'hypertension (1.9%), l'insomnie (19.4%), la fatigue (20.5%) et l'arthralgie (15.5%). L'analyse PK/PD a révélé une association significative entre les bouffées de chaleur et les concentrations plus faibles de *N*-desmethyltamoxifène (p = 0.012) ainsi qu'entre les douleurs et les concentrations plus faibles de tamoxifène, *N*-desmethyltamoxifène et *N*-oxyde tamoxifène (p = 0.04, p = 0.007 et p = 0.016

respectivement). Les concentrations plus faibles de tamoxifène et *N*-desmethyltamoxifène pourraient être un reflet de leur métabolisation en métabolites à l'activité antiestrogénique plus importante. En revanche, aucune association significative entre les effets indésirables et les concentrations d'endoxifène ni le 4-hydroxytamoxifène n'a été observée. Des analyses PK/PD sur la totalité des données de l'étude PHACS (visites de 6 à 36 mois) sont prévues. Nous sommes actuellement en attente d'un gel final de la base de données.

La non-adhérence (définie comme le fait d'avoir pris moins de 80% de traitement prescrit) peut être un autre facteur confondant dans les analyses PK/PD. Au cours de l'étude PHACS, la prise du traitement pendant les 10 jours précédant la consultation médicale a été rapportée par les patientes sous forme d'un questionnaire. Néanmoins, une étude française a récemment montré que seulement la moitié des patientes avec des concentrations faibles ou non-détectables de tamoxifène avait déclaré une non-adhérence [79]. Ainsi, une évaluation des concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre semble la méthode la plus objective pour identifier les patientes non-adhérentes. Dans le cadre des analyses présentées dans l'article n°1, les patientes avec des concentrations de tamoxifène et/ou d'endoxifène inférieures à LLOQ ont été considérées comme non-adhérentes et exclues des analyses. En revanche, dans le modèle de pharmacocinétique de population, toutes les patientes présentant au moins une concentration supérieure à LLOQ ont été incluses puisque nous avions espéré pouvoir identifier les patientes non-adhérentes par le modèle pharmacocinétique. Néanmoins, la complexité du modèle et le temps très important de chaque analyse n'a pas permis de prendre en compte la variabilité intra-individuelle des concentrations plasmatiques qui pourrait suggérer la non-observance. Par ailleurs, parmi les prélèvements inclus dans l'analyse de population, le nombre correspondant aux visites auxquelles les patientes avaient rapporté la non-adhérence était seulement de 0.8%. De ce fait, les futures analyses sur le tamoxifène devraient se focaliser sur l'identification des patientes non-adhérentes par l'évaluation de leurs concentrations plasmatiques de tamoxifène (voire d'autres métabolites) à l'état d'équilibre.

En conclusion, nos travaux ont démontré l'impact significatif des génotypes *CYP2D6*, *CYP3A4*22* et *CYP2B6*6*, des inhibiteurs de CYP2D6, de l'âge et du poids sur la pharmacocinétique du tamoxifène. Ainsi, la meilleure stratégie pour optimiser le traitement par tamoxifène consisterait en une adaptation

de la dose initiale en fonction du phénotype CYP2D6 accompagnée d'un TDM de l'endoxifène une fois l'état d'équilibre atteint. Nous sommes en attente de résultats d'études prospectives basées sur un grand nombre de patientes afin de conclure sur l'utilité clinique de l'adaptation de dose dans l'optimisation du traitement par tamoxifène.

3 Etude de la relation pharmacocinétique-pharmacogénétique du létrozole

3.1 Introduction

La deuxième partie de ces travaux de thèse a consisté en l'analyse des concentrations plasmatiques de létrozole par approche de population. Nous avons évalué l'impact des polymorphismes génétiques, traitements concomitants et facteurs démographiques sur la pharmacocinétique du létrozole. Le caractère longitudinal des données recueillies nous a permis d'utiliser différentes approches pour identifier les patientes non-adhérentes au cours de l'étude à l'aide de modèles pharmacocinétiques.

3.2 Analyse des données longitudinales du létrozole par approche de pharmacocinétique de population

3.2.1 Article scientifique n°3

Ces travaux sont en cours et ont été réalisés sur la totalité des données du létrozole de l'étude PHACS.

Longitudinal population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis of letrozole in breast cancer patients and identification of non-adherence

Alicja Puszkiel[1] et al.

1 Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm U1037, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

CORRESPONDING AUTHOR

Mélanie White-Koning, PhD

Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm U1037, Université Paul Sabatier - Toulouse III

2 Avenue Hubert Curien,

31100 Toulouse, France

melanie.white-koning@univ-tlse3.fr

Tel: +33 5 31 15 55 74

KEYWORDS

letrozole, pharmacokinetics, non-linear mixed-effects modelling, CYP2A6, CYP3A4/5, adherence

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

The PHACS study was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC 2009 #09-18-005). Alicja Puszkiel received a grant from French National Institute of Health and Medical Research (Inserm).

ABSTRACT

Background Letrozole is an aromatase inhibitor used in the treatment of postmenopausal women with estrogen receptor (ER)-positive breast cancer. Letrozole is metabolised via CYP2A6 and CYP3A4/5 enzymes and their variable activity might explain high inter-individual variability (IIV) of letrozole pharmacokinetics (PK) and therapeutic outcome (efficacy, toxicity). The aim of this work was to evaluate the impact of genetic polymorphisms, co-medications and demographic characteristics on letrozole PK in an adjuvant setting and to identify non-adherent patients based on their steady-state concentrations.

Methods Breast cancer patients enrolled in the prospective PHACS study and treated with adjuvant letrozole 2.5 mg/day were included in the analysis. Trough letrozole concentrations ($C_{ss,trough}$) were measured every 6 months for 3 years by a validated HPLC-MS/MS method. Blood samples for genotyping of *CYP2A6*1, *2, *9, CYP3A4*22, *1B* and *CYP3A5*3* were drawn at study inclusion. Concentration-time data were analysed using non-linear mixed effects modelling in NONMEM version 7.4.1. Three methods were evaluated for identification of non-adherent subjects using the base PK model.

Results A total of 619 patients contributing 2541 plasma concentrations were included in the analysis. A one-compartment model with linear absorption and elimination was fit to the data. Model-based methods identified 29% of patients as non-adherent based on high fluctuations of their $C_{ss,trough}$. The covariate analysis performed in adherent subjects revealed that CYP2A6 intermediate (IM) and slow metabolisers (SM) had 22% and 46% lower apparent clearance, respectively, compared to normal and ultrarapid metabolisers (NM+UM).

Conclusions Based on data from a prospective longitudinal study, we found that approximately 29% of patients could be identified as non-adherent during adjuvant letrozole treatment. These findings will be helpful in future investigations focusing on the exposure-response relationship for letrozole.

1 Introduction

Letrozole is a nonsteroidal third generation aromatase inhibitor used in the treatment of postmenopausal women with early stage or advanced estrogen receptor (ER)-positive breast cancer [1,2]. Its mechanism of action consists in prevention of hormone-dependent growth of cancer cells by inhibiting aromatase-mediated conversion of androgens to estrogens. In the adjuvant setting, letrozole is taken orally at a dose of 2.5 mg/day for 5 years.

The major route of letrozole elimination is metabolism into an inactive carbinol metabolite via both CYP2A6 and CYP3A4/5 isoenzymes and excretion in urines mainly as glucuronide metabolite [3,4]. It has been reported that there is a 10- to 16-fold variation in plasma exposure to letrozole among patients [4,5]. This high inter-individual variability (IIV) might be related to variable activity of the metabolising enzymes. Indeed, over 40 variant alleles for *CYP2A6* gene have been described [6]. The most common variant alleles in the Caucasian population are **2* and **4* loss-of-function alleles and **9* reduced function allele [6]. Moreover, duplication of *CYP2A6* gene results in an increase of CYP2A6 activity. Two previous studies have shown that *CYP2A6* genotype is associated with letrozole plasma concentrations in adjuvant breast cancer patients [4,5].

The genetic polymorphisms of CYP3A4 might also influence the pharmacokinetics (PK) of letrozole. More than 50 variants of *CYP3A4* gene have been reported [7]. *CYP3A4*22* variant allele is associated with a reduction of CYP3A4 mRNA expression resulting in an enzyme with reduced activity with a frequency of 8% in the Caucasian population [8]. It has been reported that the *CYP3A4*22* allele is associated with a significant reduction in the elimination of tacrolimus and cyclosporine A in renal transplant recipients [9]. However, little is known about its influence on letrozole plasma concentrations. Concerning *CYP3A5* genetic polymorphisms, **3* variant allele results in a non-functional protein and its frequency in the Caucasian population is 88 – 97% [10]. Therefore, a carrier of two variant alleles (**3*/**3* genotype) has a non-expresser phenotype whereas a carrier of **1* allele (**1*/**1* and **1*/**3* genotypes) has an expresser phenotype [7]. Only one study evaluated the influence of *CYP3A5*3* on letrozole concentrations and no association was found [4].

Since letrozole metabolism is mediated in part by CYP3A4/5 which is responsible for the metabolism of over 50% of all the prescribed drugs, drug-drug interactions with letrozole cannot be excluded.

However, to date, no data regarding the impact of CYP3A4 inhibitors on letrozole PK have been reported.

Finally, adverse events are the major issue regarding treatment with letrozole with approximately 50% of patients declaring arthralgia often leading to treatment discontinuation [11]. The occurrence of adverse events and the extensive duration of adjuvant treatment may reduce patients' adherence to treatment (defined as less than 80% of doses taken [12,13]). Indeed, it has been reported that approximately 10, 13% and 18% of patients treated with adjuvant aromatase inhibitors are non-adherent during the first, second and third year of the therapy, respectively, showing that the non-adherence rate increases with treatment duration [14]. Nonetheless, the available methods to record adherence (electronic devices, medical and self-reports) are often biased and Pistilli *et al.* have reported a high discordance between self-reported adherence and actual plasma levels of tamoxifen, another anti-hormonal therapy agent [15]. Therefore, identification of non-adherent subjects based on their steady-state plasma concentrations drawn at several occasions might constitute a promising approach to estimate whether a given patient is adherent to their treatment. Non-adherence to treatment is most often due to missed doses which could lead to lower bioavailability (F) of the drug. Hence, a possible approach to identify non-adherent subjects could be based on the assumption that in those subjects, the F is decreased. Another method was proposed by Gibiansky *et al.* [16] and is based on the individual residual error estimates. This method assumes that non-adherent patients present high fluctuations of steady-state plasma trough concentrations ($C_{ss,trough}$) resulting in increased residual error if intra-patient variability is not included in the model.

In light of the above considerations, the objectives of this study were to evaluate the impact of *CYP2A6* and *CYP3A4/5* genetic polymorphisms, demographic characteristics and CYP3A4 inhibitors on letrozole plasma concentrations and to identify non-adherent subjects using a population PK model based on longitudinal data in adjuvant breast cancer patients.

2 Materials and Methods

2.1 Study population

Data come from a prospective, multicenter, 3-year follow-up study aiming to investigate the relationship between PK, pharmacogenetics (PG) and adverse events of tamoxifen and aromatase inhibitors in adjuvant breast cancer patients (PHACS; ClinicalTrials.gov NCT01127295). The inclusion criteria were: histologically proven primary breast cancer, no metastatic disease at diagnosis, ER–positive and/or progesterone receptor (PR)–positive tumour assessed by locally performed immunohistochemistry. Eligible patients started treatment with tamoxifen (20 mg/day) or one of the aromatase inhibitors: letrozole (2.5 mg/day), anastrozole (1 mg/day), exemestane (25 mg/day) and were followed-up every 6 months over 3 years. This report focuses on the analysis of all the patients who were treated with letrozole at some point during the study including those who started treatment with letrozole at inclusion and those who switched to letrozole during the course of the study from tamoxifen or another aromatase inhibitor. During each follow-up visit, data on adverse events, co-medications and self-reported adherence during the month preceding the visit were collected. All patients provided written informed consent in adherence with the ethical principles of the revised Declaration of Helsinki and with French regulations.

2.2 Letrozole concentrations

Blood samples for letrozole quantification were collected in 5 mL lithium-heparin tubes at inclusion (pre-treatment) and 24-hours post-dose every 6 months during the follow-up visits. Samples were centrifuged at 1400 x g at ambient temperature, plasma was transferred to propylene tubes and stored at -20°C until analysis. Plasma concentrations of letrozole were quantified by a validated high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method. Briefly, letrozole and letrozole-D4 (internal standard, IS) were purchased from Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada). Separate stock solutions for calibration standards and internal quality controls (IQC) were prepared at 1 g/L in methanol and stored at -20°C. Working solutions of letrozole were prepared daily in drug-free plasma or serum. The working solution of IS was prepared at 1 mg/L in methanol with 3% (v/v) formic

acid. The range of the calibration curve was 1 – 1000 ng/mL. Sample preparation consisted of addition of 200 µL of methanol with 3% (v/v) formic acid and 100 µL of IS working solution into 200 µL of plasma or serum (patient sample, calibration standard, IQC). Next, the samples were mixed using a vortex for 30 seconds and centrifuged at 13000 RPM for 10 minutes. Finally, 5 µL of the supernatant were injected into chromatographic system. The chromatographic separation was performed on the Xbridge 2.5 µm column 50 mm x 2.1 mm (Waters®, Milford, MA, USA). The mobile phase consisted of a gradient of ammonium formate 2 mM and acetonitrile containing 10% (v/v) ammonium formate 2 mM. The detection was performed in Turbo Ion Spray in negative mode. Multiple reaction monitoring transitions were 284.00/242 and 288.2/246.100 for quantification of letrozole and letrozole-D4, respectively.

2.3 Genotyping

Blood samples for genotyping were collected in 7 mL EDTA tubes at study inclusion for all the participants. Genotyping for *CYP2A6*1, *2, *9*, *CYP3A4*22, *1B* and *CYP3A5*3* and CYP2A6 copy number variation (CNV) analysis was performed by IntegraGen SA, Evry, France and is detailed in Supplemental Material S1.

Patients were classified into CYP2A6 phenotype as proposed previously [17]. Normal metabolisers (NM) had no variant alleles (genotype **1/*1*), intermediate metabolisers (IM) had one copy of a decreased function variant allele (genotype **1/*9*) and slow metabolisers (SM) had two copies of a decreased function variant allele or one or two copies of a loss-of-function variant allele (genotypes **9/*9, *1/*2, *2/*2, *2/*9*). Patients with more than 2 copies of the CYP2A6 gene and no variant alleles were classified as ultrarapid metabolisers (UM). Due to the small number of patients in the UM category, NM and UM patients were combined into NM+UM category. Patients with *CYP3A5*1/*1* and **1/*3* genotypes were classified as CYP3A5 expressers whereas patients with **3/*3* genotype as non-expressers.

2.4 Population Pharmacokinetic Analysis

2.4.1 Model development

The concentration-time data were analysed using nonlinear mixed effects modelling in NONMEM software version 7.4.1 (ICON Development Solutions, Ellicott City, Maryland). Estimation of the parameters was performed using first order conditional estimation with interaction method. One- and two-compartment models with first order absorption and linear elimination were fit to the data. The inter-individual variability (IIV) of the PK parameters was modelled according to an exponential model, i.e. assuming a log-normal distribution of the PK parameters. The inter-occasion variability (IOV) was explored on PK parameters. The proportional and combined error models were tested for the residual variability. The concentrations below LLOQ were included in the PK model with values fixed to LLOQ/2.

2.4.2 Adherence

Three methods were tested on the base PK model in order to identify the non-adherent patients. The first method (M1) assumes decreased bioavailability (F) of letrozole in non-adherent patients. A mixture model was included on F and the model assigned each patient to one of two subpopulations: adherent ($F_{adh} = 1$, fixed) or non-adherent ($0 < F_{non\text{-}adh} < 1$) [18]. Since one patient could be adherent at some visits and non-adherent at others, the inclusion of IOV on $F_{non\text{-}adh}$ was tested (each follow-up visit was considered as a separate occasion).

Another approach (referred to hereafter as M2) was proposed by Gibiansky *et al.* [16] and relies on the assumption that non-adherent subjects show high fluctuations of $C_{ss,trough}$ between multiple occasions which is reflected by a high residual error when the model does not include IOV. Therefore, the non-adherent subjects could be identified based on their individual residual error estimates. The inclusion of a random effect $\eta_{i,\sigma}$ on the residual error makes it possible to investigate the distribution of residual error and search for subpopulations. For this method, the residual error of the model was described according to the proportional model and the random effect $\eta_{i,\sigma}$ was included on the residual error according to the following equation:

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} + C_{pred,ij} \cdot \varepsilon_{p,ij} \cdot \exp(\eta_{i,\sigma})$$

Where $C_{obs,ij}$ and $C_{pred,ij}$ represent the observed and predicted concentration, respectively, for the ith subject and the jth measurement, $\varepsilon_{p,ij}$ is the proportional residual error for the ith subject and jth measurement and $\eta_{i,\sigma}$ is the individual value of the random effect on the residual error for the ith subject. $\eta_{i,\sigma}$ is assumed to follow a normal distribution with mean 0 and variance ω_σ^2. In this manner, the identification of adherent and non-adherent subjects can be performed based on assumption that non-adherent subjects have $\eta_{i,\sigma} > 0$ while adherent subjects have $\eta_{i,\sigma} < 0$.

The third method (M3) is inspired by the previous consideration on M2 and consists of an estimation of a coefficient $\theta_{non\text{-}adh}$ on the residual error according to the following equation:

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} + C_{pred,ij} \cdot \varepsilon_{p,ij} \cdot \theta_{non\text{-}adh}$$

A mixture model is used to assign each subject into one of two subpopulations with different values of the coefficient: $\theta_{non\text{-}adh} = 1$ (fixed) for adherent and $\theta_{non\text{-}adh} > 1$ for non-adherent subjects (i.e. non-adherent subjects have a higher residual error).

2.4.3 Covariate Analysis

Visual exploration of the relationship between covariates and individual PK parameters from the base model was performed to search for possible associations. The following covariates were evaluated: body weight (BW), age, CYP2A6 phenotype, *CYP3A4*22* genotype (wild-type versus **22* carriers), *CYP3A4*1B* genotype (wild-type versus **1B* carriers), *CYP3A5*3* genotype (expressers versus non-expressers) and concomitant use of CYP3A4 inhibitors. When CYP2A6 phenotype was included in the model, a separate coefficient was estimated for SM, IM and missing phenotype, with NM+UM phenotype as the reference. The missing *CYP3A4*22*, **1B* and *CYP3A5*3* genotypes were imputed with the most frequent category (wild-type for *CYP3A4*22* and **1B* and non-expressors for *CYP3A5*3* genotype). The continuous covariates were included in the model according to linear function and were scaled to the population median whereas a separate parameter was estimated for each group of for categorical covariates (the reference group was the most frequent category).

In the stepwise procedure, each covariate was included separately on a PK parameter. Statistical discrimination between nested models was based on the log-likelihood ratio test using the objective function value (OFV = -2ln likelihood). A covariate was considered significant if its inclusion resulted in a drop in OFV of at least 3.84 points ($p<0.05$, 1 degree of freedom [df], $\chi 2$ test). Next, all the identified significant covariates were included in an intermediate model and a stepwise backward deletion was performed. If the removal of the covariate from the intermediate model resulted in an increase of at least 6.63 points in the OFV ($p<0.01$, 1 df, $\chi 2$ test), it was considered significantly associated with the PK parameter and remained in the final model.

2.4.4 Model evaluation and validation

During model development, a drop of at least 3.84 points in OFV ($p < 0.05$, 1 df, $\chi 2$ test) between nested models was considered statistically significant. Apart from the OFV, the selection of the model was based on goodness-of-fit plots, precision (relative standard error, RSE), stability and plausibility of the estimates. Goodness-of-fit plots included observed (DV) versus individual (IPRED) or population (PRED) predicted concentrations, conditional weighted residuals (CWRES) versus PRED and time and a visual predictive check (VPC) based on 1000 simulations of the original dataset. A bootstrap analysis with resampling (n = 500) was performed with the final model.

3 Results

3.1 Patients and data

Table 1 summarizes the demographic and genetic characteristics of 619 patients included in the analysis. A total of 2541 letrozole concentrations were analysed. Of those, 48 (1.9%) concentrations were below LLOQ. The median sampling time was 24.2 hours (range 0 – 384) after dose. Concentrations versus time after dose (all visits confounded) are presented on Figure S2. All the studied genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium after Bonferroni correction for multiple testing. Thirty-four patients (5.5%) had missing CYP2A6 phenotype because of a failed genotyping test.

3.2 Population pharmacokinetic analysis

The concentration-time data for letrozole were described by a one-compartment model with linear absorption and elimination. The parameters of the model were: clearance (CL), volume of distribution (V) and first order absorption rate constant (k_a). The parameters are considered apparent (i.e. CL/*F* and V/*F*) with the exception of the model including estimation of $F_{non\text{-}adh}$ (M1) where CL and V are the absolute values. A two-compartment model was also fitted to the data but the PK parameters (peripheral volume of distribution V_p and inter-compartmental clearance Q) and associated IIV were estimated with high imprecision without any significant benefit in terms of residual variability, therefore the two-compartment model was discarded. The IIV was included only on CL and was fixed to 0 for V and k_a as it could not be reliably estimated. The inclusion of IOV on CL did not improve the model. The residual variability was described by a combined error (M1) or proportional error (M2 and M3) model.

3.2.1 Identification of non-adherent patients

The performance of three different approaches to identify non-adherent subjects was investigated on the base model and the summary of these methods (M1, M2 and M3) is presented in Table 2.

Inclusion of a mixture model on F (M1) resulted in a drop in OFV of 59 points ($p < 0.00001$). The estimated $F_{non\text{-}adh}$ was 0.0107 (RSE = 36%) and fraction of the non-adherent subpopulation was 2%. The individual adjustment plots showed that only the patients with concentrations near LLOQ throughout all the visits were identified as non-adherent (Figure 1, Patient 6) whereas patients with several observations of which part of them were inexplicably lower than others suggesting non-adherence were assigned as adherent. Therefore, to allow the $F_{non\text{-}adh}$ to vary between different PK occasions, an inter-occasion term on $F_{non\text{-}adh}$ was introduced (each follow-up visit was considered as a separate occasion). The estimated fraction of non-adherent population (defined as non-adherent during at least one follow-up visit) was 5.4% and $F_{non\text{-}adh}$ was estimated to 0.0741 (RSE = 52%). However, high IIV and IOV (552% and 503%, respectively) were estimated on $F_{non\text{-}adh}$ which was related to the fact that some of the patients assigned into non-adherent subpopulation based on low concentrations at one of the follow-up visits had "normal" concentration levels at other occasions. In addition, this model was unstable and the estimates

of IIV and IOV on $F_{non\text{-}adh}$ were associated with high shrinkage values and therefore it was not considered for further analyses.

The M2 consisted on separation of patients into two subpopulations based on $\eta_{i,\sigma}$. When the non-adherent subjects were considered as those with $\eta_{i,\sigma} > 0$, 28% of patients were identified as non-adherent (Table S3). In the M3, a mixture model was used to assign subjects into two populations based on $\theta_{non\text{-}adh}$ estimate. The probability of being in the non-adherent population was estimated by the model as being 28%. Post-hoc analysis of the individual assignment into the adherent and non-adherent subpopulations showed that 18% of patients were classified as non-adherent. Interestingly, all of these subjects were also identified as non-adherent by M2 (Table S3). Figure S4 presents the distribution of $\eta_{i,\sigma}$ (obtained by M2) and subpopulations identified by the mixture model on $\theta_{non\text{-}adh}$ (M3).

M2 and M3 based on the residual error identified a higher percentage of non-adherent patients than M1. Indeed, M2 and M3 assigned all patients with high fluctuations of $C_{ss,trough}$ to non-adherent population whereas M1 considered as non-adherent only the patients with very low concentrations (< LLOQ) throughout all the study. Concerning comparison of the three methods, all of the patients identified by M3 were also identified by M2 whereas 92% and 75% patients identified as non-adherent by M1 were also identified by M2 and M3, respectively (Table S3).

Overall, the three evaluated methods identified 29% of patients as non-adherent (Table S3). Since PK analysis in a population with non-adherence patterns could lead to biased estimates, the covariate analysis was performed on the adherent subpopulation (n = 442) identified by all three methods. The characteristics of the population included in the covariate analysis are presented in Table 1. The comparison between included (adherent) and excluded (non-adherent) patients showed no statistically significant differences for any of the covariates except for the intake of CYP3A4 inhibitors (p=0.006). Specifically, a more frequent use of weak CYP3A4 inhibitors was observed in the non-adherent (4.1%) compared to the adherent subpopulation (1.9%) although the intake of moderate/strong CYP3A4 inhibitors was similar in both groups (2.1% for non-adherent patients versus 2.3% for adherent).

3.2.2 Covariate analysis

The plots of the individual CL obtained from the base model versus CYP2A6 phenotype, *CYP3A4*22*, **1B* and *CYP3A5*3* genotypes as well as BW and age are presented on Figure 2. In the univariable analysis, CYP2A6 phenotype ($p < 0.00001$) was the only covariate significantly associated with CL. CYP2A6 phenotype explained 16.3% of IIV on CL (decrease from 42.4% in the base model to 35.5% in the final model). The final equation to predict the individual CL_i was as follows:

$$CL_i = 1.3\ (L/h) \cdot 0.78^{IM} \cdot 0.54^{SM} \cdot 0.82^{missing} \cdot \exp(\eta_{CLi})$$

Where *IM*, *SM* and *missing* equal 1 if the patient has CYP2A6 IM, SM or missing phenotype, respectively, and 0 otherwise and η_{CLi} is the estimated IIV on CL for the ith subject. According to the estimates of the final model, CYP2A6 IM and SM patients had 22% and 46% lower CL, respectively, than NM+UM patients. Estimation of a separate coefficient for patients with missing CYP2A6 phenotype improved the model fit compared to when missing phenotype was imputed with the most frequent category (i.e. NM+UM; $\Delta OFV = 7$ points). Indeed, missing CYP2A6 phenotype was associated with an 18% lower CL than NM+UM. Finally, *CYP3A4*22*, **1B* and *CYP3A5*3* genotypes and concomitant CYP3A4 inhibitors were not significant covariates on CL ($p = 0.20$, $p = 0.87$, and $p = 0.29$, respectively).

The estimates of the final model and the results of the bootstrap analysis are presented in Table 3. The goodness-of-fit plots and VPC of the final model are presented in Figure 4 and Figure 5, respectively. The IPRED and PRED versus observed concentrations show that the model describe well the data and the residual diagnostics CWRES versus PRED and time do not show a significant misspecification of the model. The VPC stratified on CYP2A6 phenotype showed good agreement between the model-predicted median, 5th and 95th percentiles of the concentrations and the observed data.

4 Discussion

Herein we report a population PK analysis of letrozole in adjuvant breast cancer patients based on data from a prospective longitudinal study. To the best of our knowledge, this is the first population PK model for letrozole in breast cancer patients from a European population. The model identified a

significant impact of CYP2A6 on CL of letrozole and estimated the fraction of patients non-adherent to the treatment.

In our study, the sparse concentration-time data for letrozole were described by a one compartment model with linear absorption and elimination. The mean estimates of apparent CL/*F* (1.3 L/h in CYP2A6 NM+UM patients, CI95% = 1.25 – 1.35) and V/*F* (174 L, CI95% = 141 – 207) in our study are consistent with the values from a previously published non-compartmental analysis in 24 breast cancer patients (median CL/*F* at steady-state = 1.20 L/h and median V/*F* = 183 L) [3], validating our PK model.

The individual PK profiles in some patients showed high fluctuations of $C_{ss,trough}$ throughout the study whereas some patients had < LLOQ concentrations at all of the study visits which suggests non-adherence. Three different methods were used to identify the non-adherent subpopulation using the base PK model. In M1, the fraction of non-adherent patients estimated by the mixture model was 2%. However, this approach assigned to the non-adherent subpopulation only patients with very low concentrations (< LLOQ value) at all study visits. The attempts to include IOV on $F_{non\text{-}adh}$ to allow it to vary between occasions and therefore estimate a higher fraction of non-adherent patients resulted in an unstable model. Both M2 and M3 assumed that non-adherent patients were those with high fluctuations of $C_{ss,trough}$ (i.e. high residual error) between multiple occasions. M2 consisted in the evaluation of the distribution of $\eta_{i,\sigma}$ and the assumption that non-adherent patients have $\eta_{i,\sigma} > 0$ and resulted in the assignment of 28% of patients as non-adherent. In M3, a mixture model identified 18% of patients as non-adherent based on a $\theta_{non\text{-}adh}$ coefficient on the residual error.

Overall, we identified 29% of patients as non-adherent based on the M1, M2 and M3 methods. We considered all of them since one subject identified as non-adherent by M1 was adherent according to M2 and M3. However, this patient had $C_{ss,trough}$ near LLOQ throughout all study visits and since no fluctuations were observed, M2 did not identify this subject as non-adherent. The number of non-adherent patients estimated in this study is consistent with the previous studies based on evaluation of medical reports or self-reports [19]. However, since adherence is often under-reported, a combination of PK-based methods with conventional approaches might bring more insights about the true adherence during adjuvant treatment of breast cancer.

Overall, the methods proposed by Gibiansky *et al.* [16] based on the evaluation of the distribution of residual error seemed a better approach to identify non-adherent subjects. However, high fluctuations of $C_{ss,trough}$ might not only be related to adherence to treatment but also to intake of CYP inhibitors or inducers not reported in the study, or analytical variability. In our analysis, the analytical variability is not likely to be the confounding factor since for a given patient, all the samples were quantified by HPLC-MS/MS within the same day. However, a more frequent use of weak CYP3A4 inhibitors was observed in the non-adherent compared to the adherent subpopulation. This could explain the higher $C_{ss,trough}$ fluctuations observed in those patients. Nevertheless, no difference between the two subpopulations was observed for the use of moderate/potent CYP3A4 inhibitors. Finally, in the covariate analyses performed both in the adherent subpopulation and in the entire population (Table S5), the CYP3A4 inhibitors did not have a significant impact on CL.

In order to ensure unbiased estimates in the final PK model, we excluded patients identified as non-adherent by the PK model from the covariate analysis. CYP2A6 phenotype was the only covariate significantly associated with CL. In particular, IM and SM patients had 22% and 46%, respectively, lower CL than NM+UM patients. This is consistent with previous reports showing that impaired CYP2A6 activity due to genetic polymorphisms resulted in increased plasma exposure to letrozole, compared to patients with normal CYP2A6 activity [4,5]. In addition, estimation of a separate effect of the missing CYP2A6 phenotype on CL significantly improved the model fit compared to the model where missing phenotype was imputed with NM+UM phenotype. In this manner, patients with missing CYP2A6 phenotype had 18% lower CL than NM+UM patients suggesting that these patients are a mixed population of NM, IM and PM phenotypes leading to an intermediate value of CL decrease. Finally, CYP2A6 phenotype explained 16.3% of the IIV in letrozole CL in our analysis, consistently with Borrie *et al.* (17%) [5] whereas Desta *et al.* reported a slightly higher percentage (23%) probably due to a more extensive *CYP2A6* genotyping in their study [4].

In our study, *CYP3A4*22, *1B* and *CYP3A5*3* genetic polymorphisms were not correlated with letrozole CL. Consistently with our results, in one previous study no impact of *CYP3A5*3* on letrozole concentrations was observed [4]. The impact of *CYP3A4*22 and *1B* genetic polymorphisms on letrozole plasma concentrations in breast cancer patients has not been previously investigated. In addition, in our

analysis, concomitant CYP3A4 inhibitors did not have a significant impact on letrozole CL although the number of occasions corresponding to concomitant use of a CYP3A4 inhibitor was low (4.9%). Nevertheless, it has been demonstrated *in vitro* that CYP3A4 is a low-affinity component involved in the formation of the carbinol metabolite of letrozole compared to CYP2A6 [20]. Therefore, it might be suggested that CYP2A6 is the most important enzyme involved in the inactivation of letrozole *in vivo* and that CYP3A4 plays a minor role. However, further studies evaluating the impact of *CYP3A4*/*5* genetic polymorphisms and CYP3A4 inhibitors on letrozole PK should be performed to confirm our findings.

Previous studies have reported that patients who were older and had lower BMI had higher plasma letrozole concentrations [4,5]. In the present analysis, letrozole CL was not correlated with age nor BW. However, we performed a supplementary covariate analysis on the model including M1 based on the total study population (n = 619; Table S5) and it demonstrated that letrozole CL was positively correlated with BW and negatively correlated with age. Nevertheless, only a slight change in CL with change in age or BW would be expected based on this supplementary analysis. Indeed, a 6% decrease in CL every 10 years and a 3% increase in CL with every 10 kg increase in BW was estimated. This might explain why those covariates were not identified in the analysis performed on the adherent population.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first population PK model for letrozole in European breast cancer patients enrolled in an adjuvant, prospective, longitudinal clinical trial. The longitudinal character of this study allowed for the quantification of non-adherence based on plasma steady-state concentrations of letrozole. In addition, our results confirm that CYP2A6 plays an important role in the elimination of letrozole. Hence, its decreased activity due to genetic polymorphisms may increase the risk of adverse events. The results of this study will be helpful to perform further PKPD analysis for letrozole concerning occurrence of adverse events.

REFERENCES

1. Waks, A. G. & Winer, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA* **321**, 288–300 (2019).

2. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. at <www.fda.gov/medwatch.>

3. Pfister, C. U. *et al.* Effect of age and single versus multiple dose pharmacokinetics of letrozole (Femara®) in breast cancer patients. *Biopharm. Drug Dispos.* **22**, 191–197 (2001).

4. Desta, Z. *et al.* Plasma letrozole concentrations in postmenopausal women with breast cancer are associated with CYP2A6 genetic variants, body mass index, and age. *Clin. Pharmacol. Ther.* **90**, 693–700 (2011).

5. Borrie, A. E. *et al.* Letrozole concentration is associated with CYP2A6 variation but not with arthralgia in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **172**, 371–379 (2018).

6. Tanner, J.-A. & Tyndale, R. F. Variation in CYP2A6 Activity and Personalized Medicine. *J. Pers. Med.* **7**, (2017).

7. Werk, A. N. & Cascorbi, I. Functional Gene Variants of CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 340–348 (2014).

8. Wang, D., Guo, Y., Wrighton, S. A., Cooke, G. E. & Sadee, W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* **11**, 274–286 (2011).

9. Elens, L. *et al.* Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenomics* **12**, 1383–1396 (2011).

10. Roy, J.-N. *et al.* CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 884–7 (2005).

11. Mao, J. J. *et al.* Patterns and risk factors associated with aromatase inhibitor-related arthralgia among breast cancer survivors. *Cancer* **115**, 3631–3639 (2009).

12. Waterhouse, D. M., Calzone, K. A., Mele, C. & Brenner, D. E. Adherence to oral tamoxifen: a comparison of patient self-report, pill counts, and microelectronic monitoring. *J. Clin. Oncol.* **11**, (1993).

13. Fisher, B. *et al.* A Randomized Clinical Trial Evaluating Tamoxifen in the Treatment of Patients with Node-Negative Breast Cancer Who Have Estrogen-Receptor–Positive Tumors. *N. Engl. J. Med.* **320**, 479–484 (1989).

14. Huiart, L., Dell'Aniello, S. & Suissa, S. Use of tamoxifen and aromatase inhibitors in a large

population-based cohort of women with breast cancer. *Br. J. Cancer* **104**, 1558 (2011).

15. Pistilli, B. *et al.* 185O_PRSerum assessment of non-adherence to adjuvant endocrine therapy (ET) among premenopausal patients in the prospective multicenter CANTO cohort. *Ann. Oncol.* **29**, (2018).

16. Gibiansky, L., Gibiansky, E., Cosson, V., Frey, N. & Stark, F. S. Methods to detect non-compliance and reduce its impact on population PK parameter estimates. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **41**, 279–289 (2014).

17. Chenoweth, M. J., O'Loughlin, J., Sylvestre, M.-P. & Tyndale, R. F. CYP2A6 slow nicotine metabolism is associated with increased quitting by adolescent smokers. *Pharmacogenet. Genomics* **23**, 232 (2013).

18. Garcia-Cremades, M. *et al.* Individual level data meta-analysis from HIV pre-exposure prophylaxis (PrEP) clinical trials. *PAGE 28 Abstr 9196 [www.page-meeting.org/?abstract=9196]*

19. Murphy, C. C., Bartholomew, L. K., Carpentier, M. Y., Bluethmann, S. M. & Vernon, S. W. Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: a systematic review. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 459–478 (2012).

20. Murai, K., Yamazaki, H., Nakagawa, K., Kawai, R. & Kamataki, T. Deactivation of anti-cancer drug letrozole to a carbinol metabolite by polymorphic cytochrome P450 2A6 in human liver microsomes. **39**, 795–802 (2009).

Table 1 Characteristics of the total population and of the adherent patients included in the covariate analysis. Data are presented as median [range] or number (%).

Characteristic	All patients (n = 619)	Adherent patients included in the covariate analysis (n = 442)	p-value[a]
Age at inclusion (years)	61 [40 – 84]	61 [40 – 84]	0.83
Body weight (kg)	66 [37 – 122]	66 [40 - 122]	0.58
CYP2A6 phenotype			
Normal or ultrarapid (NM+UM)	459 (78.5%)	319 (76.1%)	
Intermediate (IM)	52 (8.9%)	40 (9.6%)	0.15
Slow (SM)	74 (12.6%)	60 (14.3%)	
Missing	34	23	
*CYP3A4*22* genotype			
Wild-type (**1/*1*)	562 (92.3%)	400 (92.4%)	
Heterozygous mutant (**1/*22*)	46 (7.5%)	32 (7.4%)	0.98[b]
Homozygous mutant (**22/*22*)	1 (0.2%)	1 (0.2%)	
Missing	10	9	
*CYP3A4*1B* genotype			
Wild-type (**1/*1*)	567 (92.3%)	402 (92.0%)	
Heterozygous mutant (**1/*1B*)	46 (7.5%)	34 (7.8%)	0.75[b]
Homozygous mutant (**1B/*1B*)	1 (0.2%)	1 (0.2%)	
Missing	5	5	
*CYP3A5*3* genotype			
Wild-type (**1/*1*)	5 (0.8%)	3 (0.7%)	
Heterozygous mutant (**1/*3*)	93 (15.3%)	62 (14.3%)	0.27[c]
Homozygous mutant (**3/*3*)	511 (83.9%)	368 (85.0%)	
Missing	10	9	

Co-medications	Number of occasions (%)		
CYP3A4 inhibitors			0.006
Weak[d]	68 (2.7%)	33 (1.9%)	
Moderate/potent[e]	57 (2.2%)	39 (2.3%)	

[a]Student's t-test and χ^2 test between the included (adherent) and excluded (non-adherent) populations;

[b]for the χ^2 test, the genotypes were grouped into wild-type (including missing) and carriers of a variant allele

[c]for the χ^2 test, the genotypes were grouped into expressers and non-expressers (including missing)

[d]weak CYP3A4 inhibitors: esomeprazole; fluvoxamine; fluoxetine, efavirenz;

[e]moderate/potent CYP3A4 inhibitors: amiodarone, ciprofloxacin, clarithromycin, diltiazem, erythromycin, fluconazole, idinavir, ketoconazole, verapamil;

Table 2 Evaluation of three approaches to identify non-adherent patients using the base pharmacokinetic model.

Parameter	Mean estimate (RSE %) [shrinkage %]			
	Base model	**M1[a]**	**M2[b]**	**M3[c]**
k_a (h^{-1})	2.08 (43)	2.36 (41)	1.69 (18)	1.68 (41)
V (L)	180 (11)	186 (11)	158 (17)	157 (12)
CL (L/h)	1.26 (2)	1.24 (2)	1.23 (2)	1.26 (2)
F_{adh}	-	1 FIX	-	-
$F_{non\text{-}adh}$	-	0.0107 (36)	-	-
$\theta_{non\text{-}adh}$	-	-	-	2.51 (5)
Estimated fraction of adherent population	-	0.98 (0.6)	-	0.72 (6)
Proportion of adherent patients (%) (obtained by post-hoc analysis)	-	98.0	72.0	82.0
Inter-individual variability on CL (CV %)	46.9 (4) [6]	42.2 (3.9) [5]	45.5 (7) [2]	49.2 (7) [3]
Inter-individual variability on proportional residual error (CV %)	-	-	40.5 (8) [20]	-
Proportional error (CV %)	17.9 (8) [11]	19.8 (12) [11]	19.7 (3) [7]	16.4 (5) [15]
Additive error (ng/mL)	11.2 (10)	8.94 (29)	-	-

CL clearance, *CV* coefficient of variation, F_{adh} bioavailability of the adherent population, $F_{non\text{-}adh}$, bioavailability of the non-adherent population, k_a first order absorption rate constant, $\theta_{non\text{-}adh}$ coefficient for non-adherent patients estimated on the residual error, *RSE* relative standard error, *V* volume of distribution

[a]M1 – Method based on inclusion of a mixture model on F

[b]M2 – Method based on estimation of a random effect $\eta_{i,\sigma}$ on residual error

[c]M3 – Method based on inclusion of a mixture model on $\theta_{non\text{-}adh}$

Table 3 Estimates of the final pharmacokinetic model and results of bootstrap analysis (n = 500).

Parameter	Mean estimate (RSE %) [shrinkage]	Bootstrap mean (CI95%)
k_a (h^{-1})	1.68 (47)	2.24 (0.82 – 5.56)
V (L)	174 (10)	174 (145 – 211)
CL (L/h)	1.3 (2)	1.3 (1.25 – 1.35)
CYP2A6 IM on CL	0.78 (6)	0.78 (0.69 – 0.88)
CYP2A6 SM on CL	0.54 (5)	0.54 (0.49 – 0.59)
missing CYP2A6 on CL	0.82 (8)	0.82 (0.69 – 0.98)
IIV on CL (CV %)	35.5 (4) [3]	35.2 (32.4 – 38.0)
Proportional error (CV %)	14.3 (2) [13]	14.1 (13.7 – 14.7)

CI confidence interval, *CL* clearance, *CV* coefficient of variation, *CYP2A6 IM* CYP2A6 intermediate metabolizer phenotype, *CYP2A6 SM* CYP2A6 slow metabolizer phenotype, *IIV* inter-individual variability, k_a first order absorption rate constant, *RSE* relative standard error, *V* volume of distribution

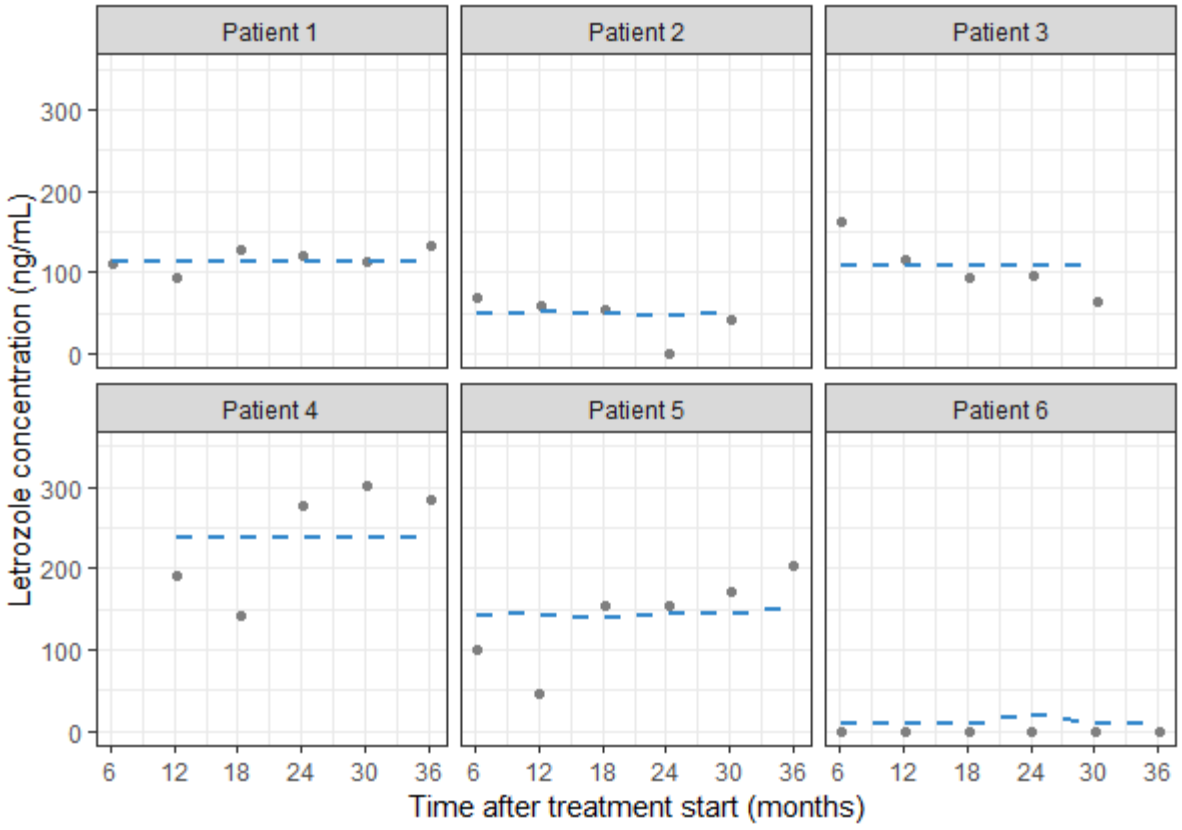


Figure 1 Individual pharmacokinetic profiles of 6 patients from the base model. The patient (1) was identified as adherent with M1, M2 and M3, patients (2 – 5) were identified as non-adherent with M2 and M3 and patient (6) was identified as non-adherent with M1, M2 and M3. *The points* represent observations and the dotted line represents individual predictions (IPRED) from the base model.

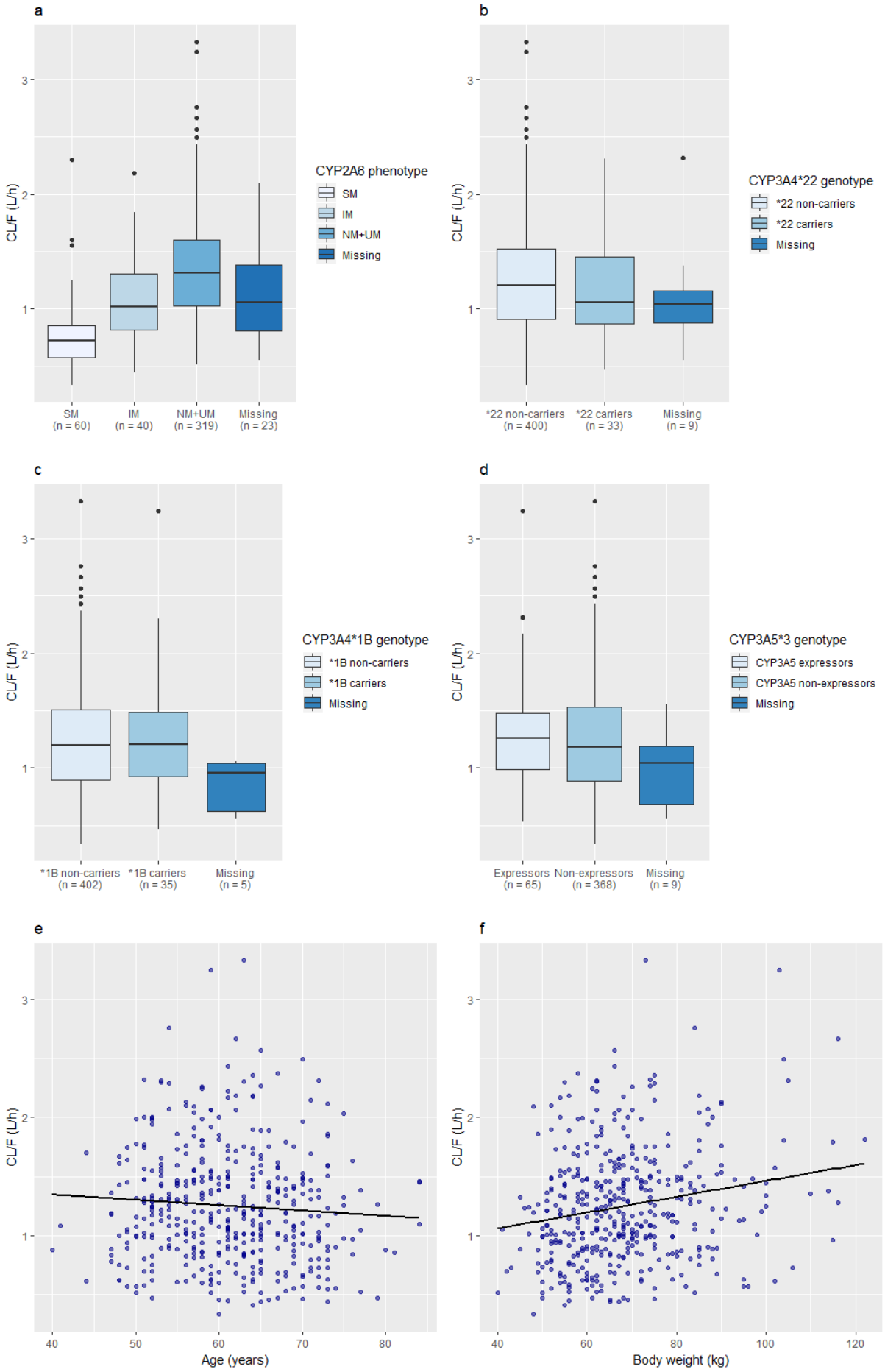


Figure 2 Individual clearance (L/h) from the base model according to (a) CYP2A6 phenotype, (b) *CYP3A4*22*, (c) *CYP3A4*1B* and (d) *CYP3A5*3* genotypes, (e) age and (f) body weight.

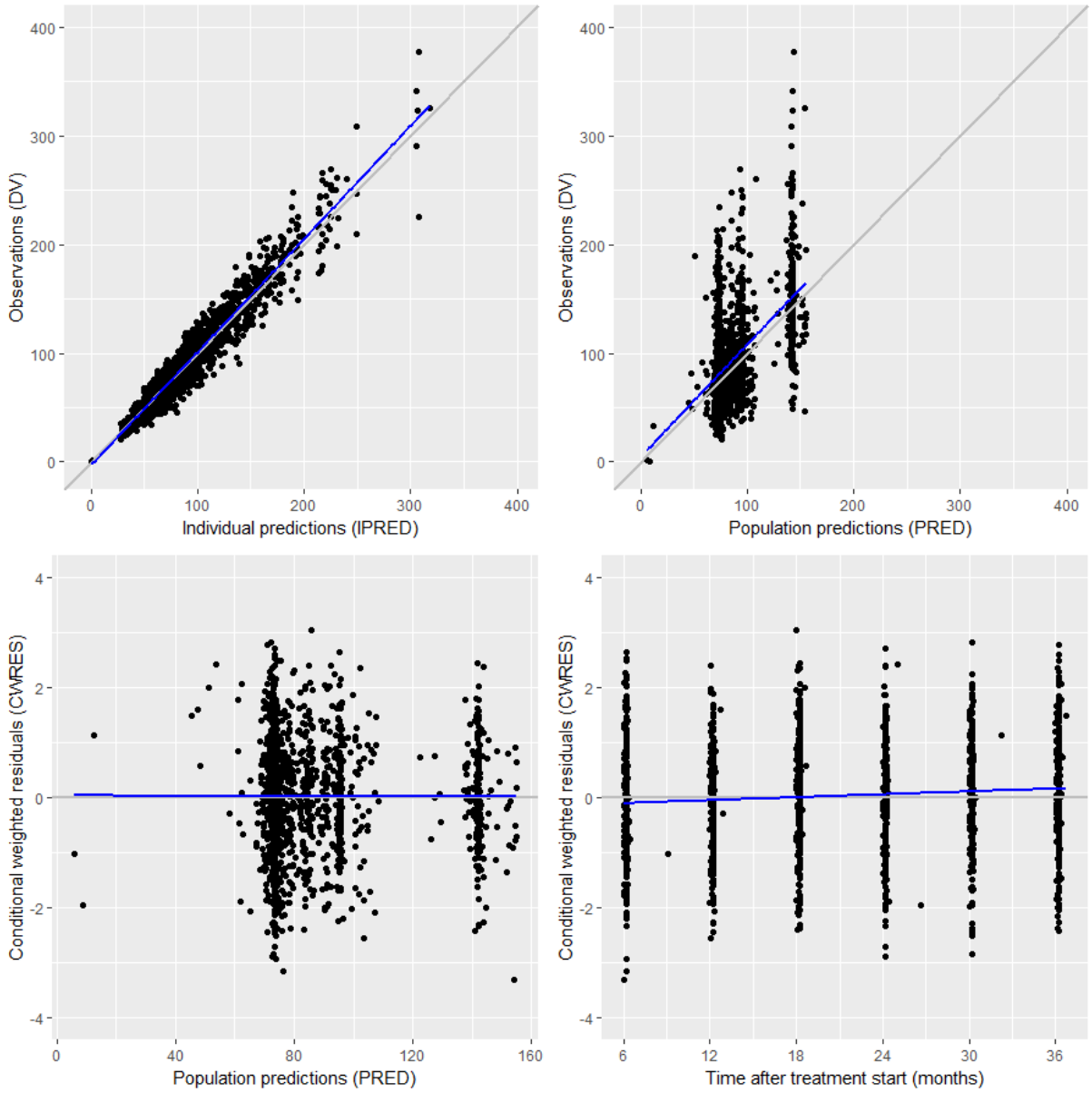


Figure 3 Goodness-of-fit plots of the final pharmacokinetic model. Concentrations are expressed in ng/mL. *The blue lines* represent linear regression *y~x*.

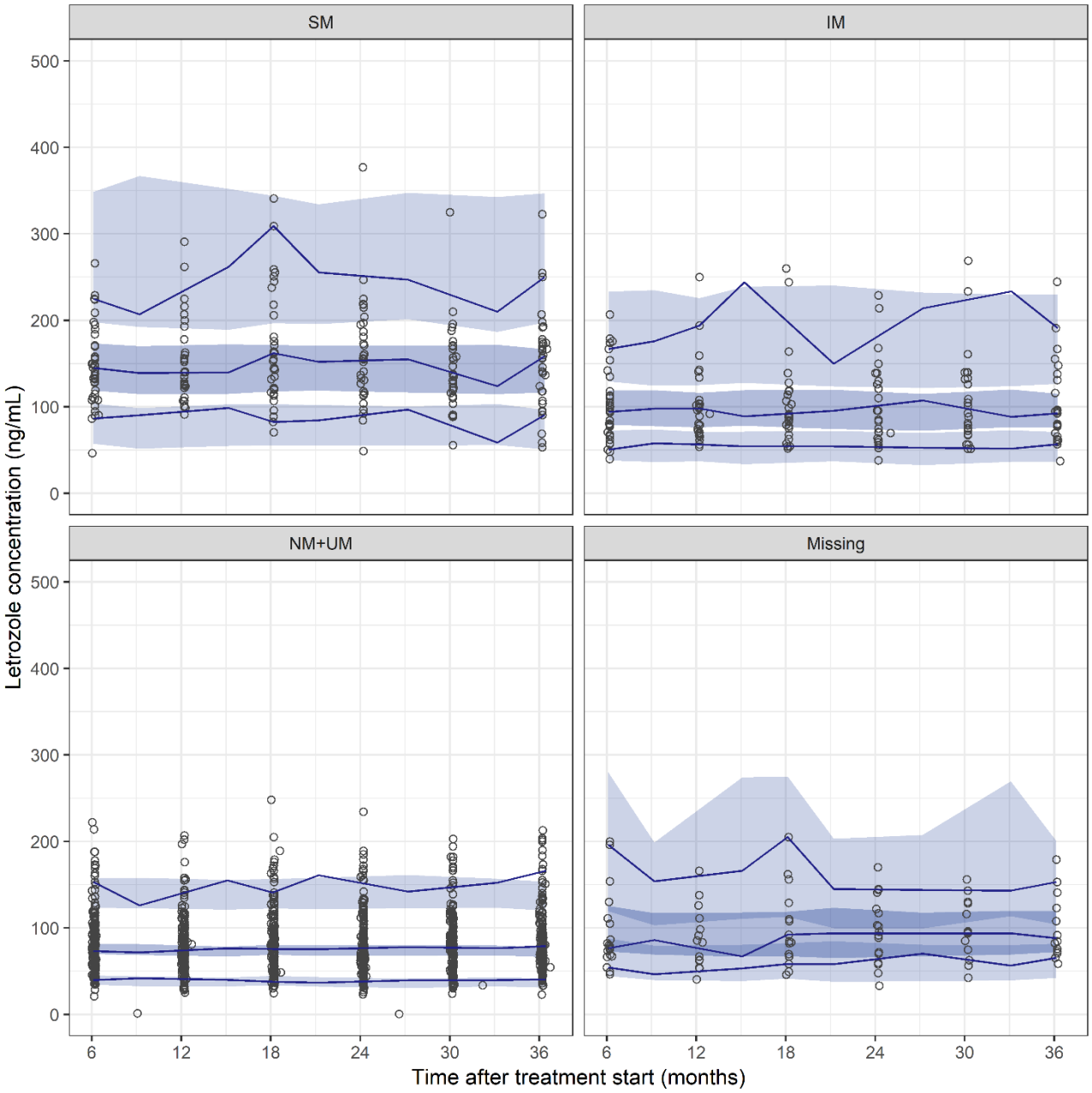


Figure 4 Visual predictive check of the final model stratified by the CYP2A6 phenotype (n = 1000). *The lines* represent the 5th, 50th (median) and 95th percentiles of the observed concentrations, *the black circles* represent the observed concentrations, *the blue area* represent the prediction intervals at 95% around the 5th, 50th (median) and 95th percentiles of the simulated concentrations.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental File S1 Details of the genotyping analysis.

The genotyping for *CYP2A6*2, *9, CYP3A4*22, *1B* and *CYP3A5*3* was performed on the Biomark (Fluidigm) in a microfluidic multiplex 96.96 dynamic array chip. One chip was used to analyze 90 samples for 96 SNP. Briefly, a 14-cycle preamplification reaction was performed for each sample in 5 µl by pooling 96 Taqman Assays, 1.25 µl gDNA, and 2.5 µl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN, Cat. no. 206143). For each individual assay, 4µl of an Assay Mix containing Taqman Assays and 1X Assay Loading Reagent was loaded into one of the Assay Inlets on the chip. References for Taqman assays were C__27861808_60 for rs1801272 (*CYP2A6*2*), C__30634332_10 for rs28399433 (*CYP2A6*9*), C__59013445_10 for rs35599367 (*CYP3A4*22*), C___1837671_50 for rs2740574 (*CYP3A4*1B*) and C__26201809_30 for rs776746 (*CYP3A5*3*).

The following solution (5 µl) was loaded in sample inlets: 2.1 µl Preamplified sample previously diluted to 1:5 in low TE Buffer, 2.5 µl 2X Taqman Genotyping Master Mix (ThermoFisher, Cat. no. 4371357), 0.25 µl 20X GT Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN 85000741), 0.05 µl Ampli Taq Gold DNA polymerase (ThermoFisher, Cat. no. 4311818).

The Biomark's specific cycling program was used to amplify fragments:

Hot start: 95°C 10 min

PCR cycle: 50 cycles

95°C 15 sec

60°C 60 sec

The genotypes were obtained by clustering, using Fluidigm SNP Genotyping Analysis version 4.1.3 according to Fluidigm's recommendations.

- **CNV analysis**

CNV genotyping was performed on the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in a 384wells plate. For each specific assay, the following solution (3 µl) was prepared and added in sample dilution aliquot (2 µl, 5 ng/µl): 2.5 µl 2X Taqman Genotyping Master Mix (ThermoFisher, Cat. No.

4371357), 0.3 µl 20X Taqman Copy Number Reference Assay (Thermofisher, Cat. No. 4403328), 0.1 µl 60X Taqman Copy Number Specific Assay (Thermofisher, Cat. No. 4400293, Hs07545274_cn for CYP2A6). Each measure was realized in 3 replicates.

The 7900HT's specific cycling program was used to amplify fragments:

Hot start: 95°C 10 min.

PCR cycles: 40 cycles

95°C 15 sec

60°C 60 sec

ABI 7900HT SDS (Sequence Detection Systems) software and CopyCaller software were used for CNV analysis, according to Applied Biosystems recommendations.

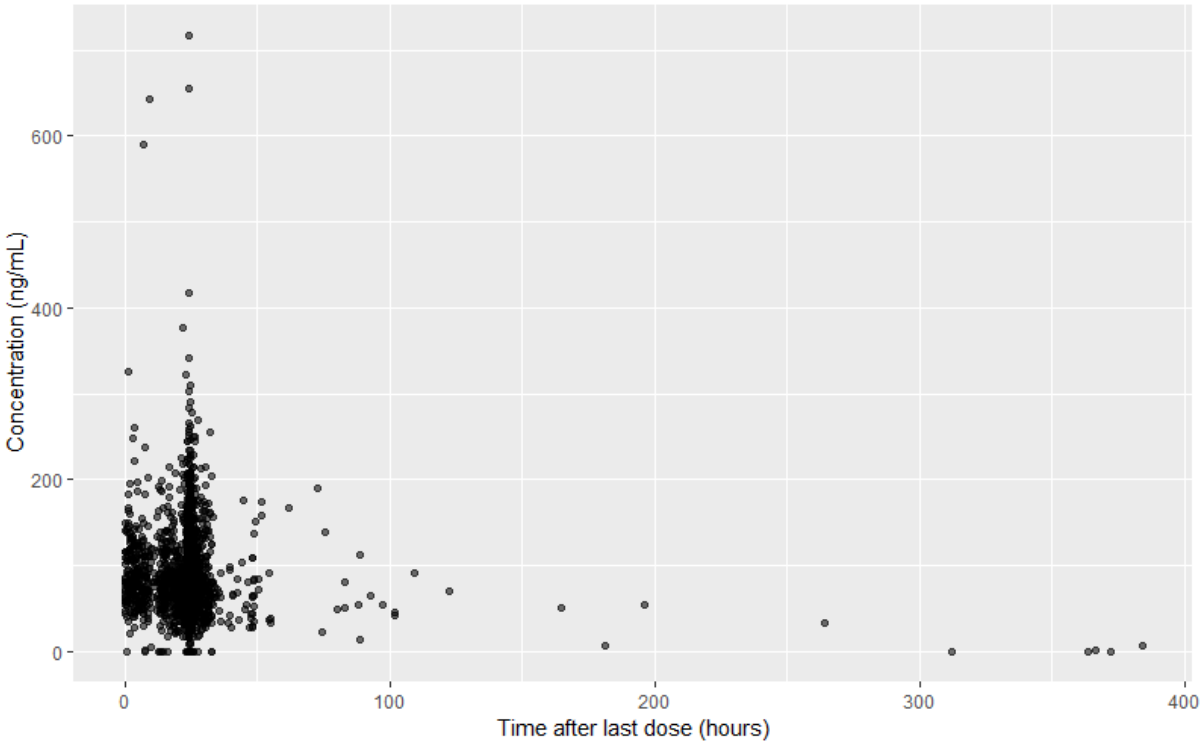


Figure S2 Steady-state plasma concentrations of letrozole versus time after last dose.

Table S3 Comparison of the performance of the three methods (M1, M2 and M3) to identify non-adherent subjects (1 = adherent, 0 = non-adherent).

M1[a]	**M2[b]**	**M3[c]**	**Number of patients (% of total)**
1	1	1	442 (71)
1	0	1	59 (9.5)
1	0	0	106 (17)
0	1	1	1 (0.16)
0	0	1	2 (0.32)
0	0	0	9 (1.4)

[a]M1 – Method based on inclusion of a mixture model on F

[b]M2 – Method based on estimation of a random effect $\eta_{i,\sigma}$ on residual error

[c]M3 – Method based on inclusion of a mixture model on $\theta_{non\text{-}adh}$

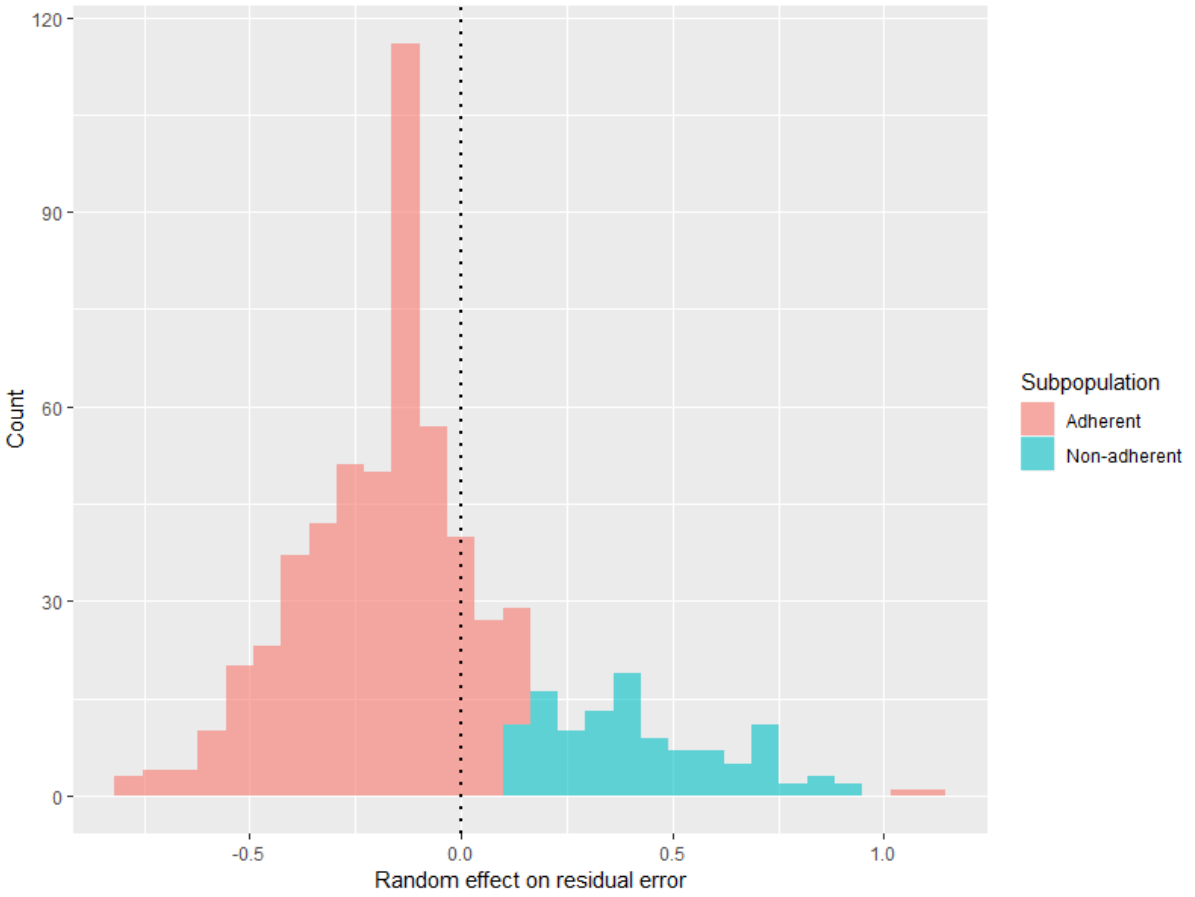


Figure S4 Distribution of the random effect on residual error ($\eta_{i,\sigma}$, method M2). *The colours* represent the populations identified by mixture model on $\theta_{\text{non-adh}}$ coefficient (M3). *The dashed line* represents the cutoff value of $\eta_{i,\sigma}$ for M2 method.

Table S5 Results of the covariate analysis on the model including M1 (n = 619).

Parameter	Mean estimate (RSE %) [shrinkage]
k_a (h^{-1})	2.48 (43)
V (L)	186 (11)
CL (L/h)	1.38 (2)
CYP2A6 IM on CL	0.78 (5)
CYP2A6 SM on CL	0.52 (5)
missing CYP2A6 on CL	0.79 (6)
Age on CL	-0.0058 (33)
BW on CL	0.0032 (32)
F_{adh}	1 FIX
$F_{non\text{-}adh}$	0.0114 (39)
Fraction of adherent subpopulation	0.98 (0.6)
IIV on CL (CV %)	34.4 (4) [7]
Proportional error (CV %)	19.8 (13) [10]
Additive error (ng/mL)	8.9 (32)

BW body weight, *CI* confidence interval, *CL* clearance, *CV* coefficient of variation, *CYP2A6 IM* CYP2A6 intermediate metabolizer phenotype, *CYP2A6 SM* CYP2A6 slow metabolizer phenotype, F_{adh} bioavailability of the adherent subpopulation, $F_{non\text{-}adh}$ bioavailability of the non-adherent subpopulation, *IIV* inter-individual variability, k_a first order absorption rate constant, *RSE* relative standard error, *V* volume of distribution

Supplemental File S6 Control stream of the model including M1.

```
$PROBLEM PK LETROZOLE METHOD M1

$INPUT ID VISIT TAD TIME RTIME CMT AMT Z=DROP DV MDV EVID SS II AGE BW GEN3A4 GEN3A5 CLUST GEN3A4_1B CYP2A6 CMPL INH_3A

$DATA letrozole_pk_cov_cleaned_31072019.prn IGNORE=@ NULL=.

$SUBROUTINES ADVAN2 TRANS2

$PK

TVKA=THETA(1)

KA=TVKA*EXP(ETA(1))

TVCL=THETA(2)

CL=TVCL*EXP(ETA(2))

TVV=THETA(3)

V=TVV*EXP(ETA(3))


EST=MIXEST

IF (MIXNUM.EQ.1) THEN

F1=THETA(4)

ELSE

F1=THETA(5)

ENDIF


S2=V


$MIX

P(1)=THETA(6)

P(2)=1-THETA(6)

NSPOP=2


$ERROR

 IPRED=F

 IF (F.GT.0) THEN

 W=(F*F*THETA(7)**2+THETA(8)**2)**0.5

 ELSE
```

```
W=1
ENDIF
Y=F+W*EPS(1)
IRES=DV-IPRED
IWRES=IRES/W

$THETA (0, 1.5)       ; Ka
$THETA (0, 1.2)       ; CL
$THETA (0, 150)       ; V
$THETA (1 FIX)        ; F
$THETA (0, 0.01, 1)   ; F for non-adh
$THETA (0, 0.9, 1)    ; freq pop F=1
$THETA (0, 0.15)      ; err prop
$THETA (0, 7)          ; err add

$OMEGA 0 FIX
$OMEGA 0.2
$OMEGA 0 FIX

$SIGMA 1 FIX

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION MAXEVAL=9999 NOABORT
$COVARIANCE
$TABLE ID VISIT TAD TIME PRED IPRED IWRES CWRES EVID MDV CMT NOPRINT ONEHEADER
FILE=sdtab007
$TABLE ID KA CL V F1 EST ETA(2) NOPRINT ONEHEADER FILE=patab007
$TABLE ID AGE BW NOPRINT ONEHEADER FILE=cotab007
$TABLE ID GEN3A4 GEN3A5 CLUST GEN3A4_1B CYP2A6 CMPL INH_3A NOPRINT ONEHEADER
FILE=catab007
```

Supplemental File S7 Control stream of the model including M2.

```
$PROBLEM PK LETROZOLE M2 METHOD

$INPUT ID VISIT TAD TTIME=TIME RTIME CMT AMT Z=DROP DV MDV EVID SS II AGE BW GEN3A4 GEN3A5 CLUST GEN3A4_1B CYP2A6 CMPL INH_3A

$DATA letrozole_pk_cov_cleaned_31072019.prn IGNORE=@ NULL=.

$SUBROUTINES ADVAN2 TRANS2

$PK

TVKA=THETA(1)

KA=TVKA*EXP(ETA(1))

TVCL=THETA(2)

CL=TVCL*EXP(ETA(2))

TVV=THETA(3)

V=TVV*EXP(ETA(3))

S2=V

$ERROR

IPRED=F

DEL=0

IF (F.EQ.0) DEL=1

W=F+DEL

Y = F + W * ERR(1)*EXP(ETA(4))

IPRED = F

IRES = DV - IPRED

IWRES = IRES/W

$THETA (0, 1.5)      ; Ka

$THETA (0, 1.2)      ; CL

$THETA (0, 150)      ; V

$OMEGA 0 FIX

$OMEGA 0.2

$OMEGA 0 FIX
```

```
$OMEGA 0.3          ;IIV err prop


$SIGMA  0.1


$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION MAXEVAL=9999 NOABORT

$COVARIANCE

$TABLE ID VISIT TAD TIME PRED IPRED IWRES CWRES EVID MDV CMT NOPRINT ONEHEADER
FILE=sdtab010

$TABLE ID KA CL V ETA(2) ETA(4) NOPRINT ONEHEADER FILE=patab010

$TABLE ID AGE BW NOPRINT ONEHEADER FILE=cotab010

$TABLE ID GEN3A4 GEN3A5 CLUST GEN3A4_1B CYP2A6 CMPL INH_3A NOPRINT ONEHEADER
FILE=catab010
```

Supplemental File S8 Control stream of the model including M3.

```
$PROBLEM PK LETROZOLE M3 METHOD

$INPUT ID VISIT TAD TTIME=TIME RTIME CMT AMT Z=DROP DV MDV EVID SS II AGE BW GEN3A4 GEN3A5 CLUST GEN3A4_1B CYP2A6 CMPL INH_3A

$DATA letrozole_pk_cov_cleaned_31072019.prn IGNORE=@ NULL=.

$SUBROUTINES ADVAN2 TRANS2

$PK

TVKA=THETA(1)

KA=TVKA*EXP(ETA(1))

TVCL=THETA(2)

CL=TVCL*EXP(ETA(2))

TVV=THETA(3)

V=TVV*EXP(ETA(3))

EST=MIXEST

SD=1

IF(MIXNUM.EQ.2)SD=THETA(4)

S2=V


$MIX

P(1)=THETA(5)

P(2)=1-THETA(5)

NSPOP=2


$ERROR

IPRED=F

DEL=0

IF (F.EQ.0) DEL=1

W=F+DEL

Y = F + W * ERR(1)*SD

IPRED = F

IRES = DV - IPRED

IWRES = IRES/W
```

```
$THETA (0, 1.5)       ; Ka
$THETA (0, 1.2)       ; CL
$THETA (0, 150)       ; V
$THETA (0, 1.7)       ; SD non-adh
$THETA (0, 0.7, 1)    ; freq pop adh

$OMEGA 0 FIX
$OMEGA 0.2
$OMEGA 0 FIX

$SIGMA 0.1

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION MAXEVAL=9999 NOABORT
$COVARIANCE
$TABLE ID VISIT TAD TIME PRED IPRED IWRES CWRES EVID MDV CMT NOPRINT ONEHEADER FILE=sdtab011
$TABLE ID KA CL V EST ETA(1) NOPRINT ONEHEADER FILE=patab011
$TABLE ID AGE BW NOPRINT ONEHEADER FILE=cotab011
$TABLE ID GEN3A4 GEN3A5 CLUST GEN3A4_1B CYP2A6 CMPL INH_3A NOPRINT ONEHEADER FILE=catab011
```

Supplemental File S9 Control stream of the final model.

```
$PROBLEM PK LETROZOLE FINAL MODEL

$INPUT ID VISIT TAD TIME RTIME CMT AMT Z=DROP DV MDV EVID SS II AGE BW GEN3A4 GEN3A5 CLUST GEN3A4_1B CYP2A6_old CYP2A6 CMPL INH_3A

$DATA letrozole_pk_cov_adherent_19082019.prn IGNORE=@ NULL=.

$SUBROUTINES ADVAN2 TRANS2

$PK

CYP2A6_SM=0

CYP2A6_IM=0

CYP2A6_MSNG=0

IF(CYP2A6.EQ.0)CYP2A6_SM=1

IF(CYP2A6.EQ.1)CYP2A6_IM=1

IF(CYP2A6.EQ.-99)CYP2A6_MSNG=1

;else CYP2A6 = 2 (NM+UM)


TVKA=THETA(1)

KA=TVKA

TVCL=THETA(2)*THETA(4)**CYP2A6_IM*THETA(5)**CYP2A6_SM*THETA(6)**CYP2A6_MSNG

CL=TVCL*EXP(ETA(1))

TVV=THETA(3)

V=TVV

S2=V

AUC=AMT/CL


$ERROR

IPRED=F

DEL=0

IF (F.EQ.0) DEL=1

W=F+DEL

Y = F + W * ERR(1)

IPRED = F

IRES = DV - IPRED

IWRES = IRES/W
```

```
$THETA (0, 2)         ; Ka
$THETA (0, 1.2)       ; CL
$THETA (50, 150)      ; V
$THETA (0, 0.7)       ; CYP2A6_IM / CL
$THETA (0, 0.5)       ; CYP2A6_SM / CL
$THETA (0, 1)         ; CYP2A6_MSNG / CL

$OMEGA 0.2

$SIGMA 0.1

$ESTIMATION METHOD=1 INTERACTION MAXEVAL=9999 NOABORT
$COVARIANCE
$TABLE ID VISIT TAD TIME PRED IPRED IWRES CWRES EVID MDV CMT NOPRINT ONEHEADER FILE=sdtab031
$TABLE ID VISIT KA CL V AUC ETA(1) NOPRINT ONEHEADER FILE=patab031
$TABLE ID AGE BW NOPRINT ONEHEADER FILE=cotab031
$TABLE ID GEN3A4 GEN3A5 CLUST GEN3A4_1B CYP2A6 CMPL INH_3A NOPRINT ONEHEADER FILE=catab031
```

3.2.2 Résultats complémentaires

Les résultats de l'analyse sur la relation entre les effets indésirables et les concentrations observées à la visite à 6 mois ont fait l'objet d'une présentation sous forme de poster au congrès *San Antonio Breast Cancer Symposium* en 2017 [353]. Cette analyse était indépendante du modèle pharmacocinétique.

Sur 486 patientes pour lesquelles les données de toxicité et un prélèvement pharmacocinétique à 6 mois ont été disponibles, l'apparition ou la majoration des effets indésirables à la visite de suivi à 6 mois par rapport à la baseline a été notée pour les bouffées de chaleur (33% des patientes), la dépression (16%), les douleurs (43%), les douleurs articulaires (32%), la fatigue (23%), les troubles gynécologiques (10%), les évènements thromboemboliques (0.9%). Au moins une toxicité a été rapportée chez 65% des patientes. L'arrêt ou le changement du traitement pour toxicité a été noté chez 0.2% et 1.25% des patientes respectivement.

La concentration médiane du létrozole à la visite à 6 mois était de 74.1 ng/mL (intervalle: 0 – 591, n = 486). Un test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney a été utilisé pour étudier la relation entre les effets indésirables et les concentrations observées du létrozole à la visite à 6 mois. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 Résultats de l'analyse PK/PD (concentrations observées) du létrozole à la visite à 6 mois.

Effet indésirable	**Concentration médiane (intervalle) (ng/mL)**		**p-value**
	Oui	**Non**	
Bouffées de chaleur (n = 455)	70.9 (0 – 591) (n = 151)	75.8 (0 – 225) (n = 304)	0.46
Dépression (n = 457)	86.8 (0 – 229) (n = 74)	72.5 (0 – 591) (n = 383)	0.11
Douleurs (n = 455)	72.8 (0 – 229) (n = 198)	74.9 (0 – 591) (n = 257)	0.69
Douleurs articulaires (n = 417)	71.2 (1.3 – 229) (n = 132)	73.5 (0 – 591) (n = 285)	0.92
Fatigue (n = 458)	72.2 (0 – 229) (n = 107)	74.9 (0 – 591) (n = 351)	0.88
Troubles gynécologiques	75.2 (1.3 – 229)	73.8 (0 – 591)	0.57

(n = 454)	(n = 48)	(n = 406)	
Evénements thromboemboliques (n = 456)	58.6 (20.3 – 102) (n = 4)	74.1 (0 – 591) (n = 452)	0.32
Arrêt de traitement pour toxicité (n = 486)	68.5 (n = 1)	74.1 (0 – 591) (n = 485)	0.81
Changement de traitement pour toxicité (n = 486)	104 (50.7 – 229) (n = 6)	74 (0 – 591) (n = 480)	0.21

L'analyse PK/PD avec les concentrations observées a montré que les patientes ayant rapporté l'apparition ou la majoration de la dépression à la visite à 6 mois ont eu des concentrations plus élevées de létrozole que les patientes n'ayant pas eu cet effet indésirable (médiane: 86.8 ng/mL, n = 74 versus 72.5 ng/mL, n = 383) mais cette différence n'était pas statistiquement significative (p = 0.11). Les patients ayant changé le traitement pour toxicité présentaient les concentrations du létrozole plus élevées que les autres patientes (104 ng/mL, n = 6 versus 74 ng/mL, n = 480), mais cette différence n'était pas statistiquement significative (p = 0.21). Par ailleurs, les douleurs articulaires, étant les effets indésirables les plus fréquents du létrozole, n'ont pas été significativement associés à la concentration plasmatique de létrozole (p = 0.92).

Grâce à l'analyse par approche de population, la relation entre les paramètres pharmacocinétiques individuels prédits par le modèle et l'apparition ou la majoration des effets indésirables à la première visite de suivi à 6 mois a pu être étudiée.

Premièrement, les paramètres individuels obtenu par l'analyse de population ont été utilisés pour calculer les AUC du létrozole à l'état d'équilibre ($AUC_{ss,\tau}$):

$$AUC_{ss,\tau} = DOSE / CL/F$$

où DOSE est la dose administrée et CL/*F* est la clairance apparente individuelle prédite par le modèle.

L'$AUC_{ss,\tau}$ médiane était de 2058 ng/mL.h (intervalle: 762 – 7505, n = 333) accompagnée d'une variabilité interindividuelle de l'ordre de 47.7% (CV %). L'$AUC_{ss,\tau}$ médiane chez les patientes avec un phénotype CYP2A6 SM, IM et NM+UM était de 3457 ng/mL.h (1298 – 7505), 2468 ng/mL.h (1198 – 5621) et 1882 ng/mL.h (762 – 4685), respectivement.

Un test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney a été utilisé pour comparer l'$AUC_{ss,\tau}$ entre les patientes ayant présenté ou non un effet indésirable à la visite à 6 mois. Cette analyse a été effectuée pour les patientes incluses dans le modèle final avec les covariables (i.e. considérées comme adhérentes) et pour lesquelles les données de toxicité à 6 mois étaient disponibles (n = 333). Les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 Résultats de l'analyse PK/PD (AUCss,τ) du létrozole à la visite à 6 mois.

Effet indésirable	**$AUC_{ss,\tau}$ médiane (intervalle) (ng/mL.h)**		**p-value**
	Oui	**Non**	
Bouffées de chaleur (n = 309)	1968 (910 – 7505) (n = 104)	2085 (762 – 5723) (n = 205)	0.64
Dépression (n = 311)	2230 (762 – 5573) (n = 51)	2034 (774 – 7505) (n = 260)	0.34
Douleurs (n = 308)	1982 (762 – 5573) (n = 133)	2070 (1082 – 7505) (n = 175)	0.42
Douleurs articulaires (n = 283)	2042 (762 – 5573) (n = 86)	2025 (774 – 5723) (n = 197)	0.78
Fatigue (n = 311)	1903 (762 – 5319) (n = 72)	2070 (1006 – 7505) (n = 239)	0.65
Troubles gynécologiques (n = 309)	1965 (762 – 5319) (n = 35)	2071 (910 – 7505) (n = 274)	0.9
Evénements thromboemboliques (n = 311)	2187 (2134 – 2239) (n = 2)	2050 (762 – 7505) (n = 309)	0.77
Arrêt de traitement pour toxicité (n = 333)	1789 (n = 1)	2058 (762 – 7505) (n = 332)	0.61
Changement de traitement pour toxicité (n = 333)	2486 (1367 – 5319) (n = 6)	2057 (762 – 7505) (n = 327)	0.68

L'$AUC_{ss,\tau}$ médiane était plus élevée chez les patientes ayant déclaré l'apparition ou la majoration de la dépression (2230 ng/mL.h, n = 51 versus 2034 ng/mL.h, n = 260) et des événements thromboemboliques (2187 ng/mL.h, n = 2 versus 2050, n = 309) à la visite à 6 mois par rapport aux patientes qui n'ont pas rapporté cet effet indésirable, mais ces différences n'étaient pas statistiquement significatives (p = 0.34 et p = 0.77 respectivement). Les patientes ayant changé le traitement pour toxicité avaient l'$AUC_{ss,\tau}$ plus

élevée que les autres patientes (2486 ng/mL.h, n = 6 versus 2057 ng/mL.h, n = 327), mais cette différence n'était pas statistiquement significative (p = 0.68). Enfin, les douleurs articulaires n'ont pas été significativement associés à l'$AUC_{ss,\tau}$ du létrozole (p = 0.78).

3.3 Discussion

Ces travaux de thèse ont porté sur la totalité des données pharmacocinétiques du létrozole de l'étude PHACS. Leur objectif était d'étudier la relation pharmacocinétique-pharmacogénétique du létrozole par approche de population. Pour la première fois, un modèle pharmacocinétique a été développé dans une population européenne.

Un des objectifs de l'étude PHACS est d'évaluer l'observance réelle au traitement adjuvant et de la comparer à celle rapportée par les patientes. En utilisant l'approche de population, nous avons étudié trois méthodes permettant d'identifier la non-adhérence. Deux de ces méthodes sont basées sur l'hypothèse que les patientes non-adhérentes montrent des fluctuations des concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre au cours des différentes occasions qui ne sont pas expliquées par le modèle de variabilité intra-individuelle. Contrairement aux patientes adhérentes qui sont bien ajustées par le modèle et dont l'erreur résiduelle sera proche de la valeur moyenne, ces patientes ont une erreur résiduelle plus importante. Ainsi, d'après ces approches, approximativement 29% des patientes seraient non-adhérentes au cours du traitement adjuvant par létrozole. Néanmoins, ces méthodes n'ont pas permis d'estimer le nombre de patientes non-adhérentes à chaque visite de l'étude ce qui rend difficile la comparaison avec les données d'adhérence rapportées par les patientes. En effet, il a été démontré que l'adhérence au traitement adjuvant du cancer du sein diminue au cours de la thérapie. Il serait donc intéressant de pouvoir évaluer la non-adhérence à chaque visite et de la comparer à celle rapportée par les patientes. L'estimation de notre analyse suggèrerait donc que 29% des patientes sont non-adhérentes au moins une fois pendant la thérapie. Cette approche constitue une méthode prometteuse pour les futures évaluations de l'adhérence au tamoxifène et sa performance pourrait également être évaluée dans le cas d'autres thérapies orales anti-cancéreuses.

Pour certaines patientes, les prédictions individuelles de la CL/*F* du modèle de base étaient très différentes de la valeur moyenne dans la population. Ceci était en lien avec les concentrations très faibles observées chez ces patientes dont la raison la plus probable était la mauvaise adhérence. De ce fait, l'analyse de covariables a été effectuée sur la population identifiée comme adhérente par les méthodes citées ci-dessus. Dans le modèle de base dans la population adhérente, la variabilité interindividuelle de

la CL/*F* a été estimée à 42.4%. L'inclusion du phénotype CYP2A6 a expliqué 16.5% de cette variabilité constituant ainsi la seule covariable identifiée dans le modèle final. En effet, le CYP2A6 est impliqué dans la conversion de létrozole en métabolite inactif constituant ainsi la voie majeure de son élimination. Des concentrations plus élevées de létrozole ont été observées chez les patientes présentant une diminution de l'activité du CYP2A6 (phénotypes SM et IM), par rapport aux patientes avec une activité normale (phénotype NM+UM). La diminution de l'activité de CYP2A6 pourrait donc être associée à un risque accru de toxicité.

Les premières évaluations des données de toxicité à la visite à 6 mois ont montré que parmi les patientes traitées par létrozole, les bouffées de chaleur (33%), la dépression (16%), les douleurs (43%), la fatigue (23%) et les troubles gynécologiques (10%) ont été les effets indésirables les plus souvent rapportés. Nous avons effectué une analyse PK/PD avec les $AUC_{ss,\tau}$ prédites par le modèle final pour les patientes adhérentes (n = 333) et avec les concentrations observées à 6 mois pour toutes les patientes (n = 486). Une tendance à une exposition plasmatique au létrozole plus élevée chez les patientes ayant rapporté l'apparition ou la majoration de la dépression à la visite à 6 mois par rapport à la baseline a été observée aussi bien dans l'analyse effectuée sur les $AUC_{ss,\tau}$ (médiane: 2230 ng/mL.h, n = 51 versus 2034 ng/mL.h, n = 260, p = 0.34) que sur les concentrations observées (médiane: 86.8 ng/mL, n = 74 versus 72.5 ng/mL, n = 383, p = 0.11). De plus, les patientes ayant suivi un changement de traitement pour toxicité avant la visite à 6 mois ont montré une tendance à une $AUC_{ss,\tau}$ et concentration plasmatique plus élevée par rapport aux autres patientes ($AUC_{ss,\tau}$ médiane: 2486 ng/mL.h, n = 6 versus 2057 ng/mL.h, n = 327, p = 0.68; concentration observée médiane: 104 ng/mL, n = 6 versus 74 ng/mL, n = 480, p = 0.21). La relation entre la dépression, d'autres effets indésirables et l'exposition au létrozole n'a pas été démontrée dans d'autres études [300,325]. Néanmoins, leur effectif était moins important (n = 126 et n = 215). Les analyses à 6 mois ont un caractère exploratoire et les analyses sur les données longitudinales (visites de 6 à 36 mois) permettront de répondre de manière plus complète à la question d'une relation entre la pharmacocinétique et pharmacodynamie.

En conclusion, nos travaux par approche de population ont mis en évidence un impact significatif du phénotype CYP2A6 sur la pharmacocinétique du létrozole. Les analyses PK/PD réalisées sur les données de la première visite de suivi n'ont pas démontré de relation significative. Une tendance à une

exposition au létrozole plus élevée chez les patientes ayant rapportée la dépression à 6 mois ou ayant suivi un changement de traitement pour toxicité a été observée. Les futures analyses PK/PD se focaliseront sur la totalité des données de l'étude PHACS (visite de 6 à 36 mois). La mise en évidence d'une relation significative permettrait de statuer sur l'implémentation de TDM dans l'individualisation des doses de létrozole en pratique clinique.

Conclusion générale et perspectives

Nos travaux de thèse ont porté sur deux médicaments utilisés actuellement dans le traitement adjuvant du cancer du sein hormonodépendant. Bien que le tamoxifène et le létrozole présentent une forte variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique et de la réponse clinique (efficacité, toxicité), à ce jour l'adaptation de dose pour ces médicaments n'est pas recommandée en raison de l'absence d'arguments cliniques. Nos travaux de thèse apportent des informations importantes sur les facteurs génétiques et non-génétiques influençant la pharmacocinétique du tamoxifène et du létrozole dans le cadre du traitement adjuvant du cancer du sein, qui peuvent ainsi être pris en compte lors des analyses PK/PD de l'hormonothérapie adjuvante.

Pour la première fois, un modèle pharmacocinétique incluant le tamoxifène et six métabolites majeurs a été développé. Ce modèle a permis de décrire les voies de métabolisation et d'identifier et de quantifier l'impact du *CYP2D6*, *CYP3A4*22*, *CYP2B6*6*, des inhibiteurs de CYP2D6, de l'âge et du poids sur l'exposition à l'endoxifène. Par le moyen de simulations, nous avons montré qu'une adaptation de dose chez les patientes avec une diminution d'activité de CYP2D6 permettrait d'atteindre des concentrations d'endoxifène efficaces. Ainsi, le modèle pharmacocinétique du tamoxifène et de ses métabolites pourrait être utilisé pour effectuer un TDM en pratique clinique. Cependant, au vu des résultats contradictoires sur la relation entre l'exposition à l'endoxifène et la réponse clinique, l'évaluation de cette relation dans des études prospectives est primordiale afin de juger sur l'apport du TDM dans l'optimisation du traitement. Bien que les rechutes précoces soient rapportées au cours de l'étude PHACS, la durée de suivi de 3 ans ne permettra pas d'atteindre la puissance suffisante pour détecter une relation significative entre exposition et réponse clinique. Les données de l'étude PHACS pourraient être incluses dans les méta-analyses évaluant la relation PK/PD en termes d'efficacité et contribuer ainsi à donner une réponse définitive sur l'utilité de l'adaptation de dose du tamoxifène. Enfin, les premières analyses PK/PD de l'étude PHACS n'a pas mis en évidence de relation significative entre l'endoxifène et la survenue des effets indésirables à 6 mois.

Pour ce qui concerne le létrozole, nos travaux ont montré que le CYP2A6 influence de manière significative l'élimination du létrozole. De ce fait, les patientes avec une diminution de l'activité de CYP2A6 présentent les concentrations de létrozole plus élevées. Cependant, à ce jour la relation entre l'efficacité ou la toxicité du létrozole et les concentrations plasmatiques n'a pas été démontrée. Nos résultats ont montré une tendance pour des concentrations plus fortes de létrozole chez les patientes avec l'apparition ou la majoration de la dépression à la visite de suivi à 6 mois mais elle n'était pas statistiquement significative. De plus, le caractère longitudinal des données pharmacocinétiques nous a permis d'évaluer l'adhérence au cours du traitement. En effet, nous avons démontré l'apport de la modélisation dans l'identification des patientes non-adhérentes à partir de leurs concentrations plasmatiques.

En termes de perspectives, les analyses PK/PD longitudinales incluant les effets indésirables et les données pharmacocinétiques des visites de 6 à 36 mois seront effectuées. Ces analyses seront notamment enrichies par les résultats des analyses de pharmacocinétique de population et les prédictions individuelles des paramètres pharmacocinétiques (AUC_{τ}, $C_{ss,trough}$, constantes de conversion). De plus, l'intensité des effets indésirables associés à l'hormonothérapie a été cotée suivant les critères définis par l'échelle de toxicité CTC-NCI Version 3. La meilleure stratégie consisterait donc à évaluer ces données comme des données catégorielles ordinaires au caractère longitudinal. Pour cela, des modèles plus complexes pourront être construits soit dans NONMEM soit dans des logiciels statistiques. Cependant, nous sommes actuellement en attente des données finalisées de l'étude PHACS et les analyses PK/PD seront effectuées par la suite. Néanmoins, au vu de la nature subjective des effets indésirables de l'hormonothérapie (bouffées de chaleur, fatigue, douleurs ...), il peut être difficile de démontrer une relation significative.

De plus, une évaluation de la non-adhérence au tamoxifène basée sur les concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre est envisagée. Cette analyse constitue un avantage par rapport aux méthodes basées sur les questionnaires et permettra ainsi d'estimer le vrai nombre de patientes non-adhérentes au cours du traitement. Il serait aussi intéressant de comparer la non-adhérence estimée à partir des concentrations plasmatiques et celle rapportée par les patientes aussi bien pour le tamoxifène que pour le létrozole.

En conclusion, l'étude PHACS est une des plus grandes études internationales dans l'hormonothérapie adjuvante par le nombre des patientes incluses et l'exhaustivité des données recueillies. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse montrent que l'adaptation de dose chez les patientes avec une diminution de l'activité de CYP2D6 permettrait d'atteindre les concentrations d'endoxifène efficaces. La meilleure stratégie reposerait donc sur une adaptation de dose initiale en fonction du phénotype CYP2D6 accompagnée d'un suivi thérapeutique des concentrations d'endoxifène une fois l'état d'équilibre atteint. Cependant, en l'absence de confirmation de l'existence d'une association entre l'exposition à l'endoxifène et l'efficacité clinique, l'utilité clinique de d'adaptation de dose du tamoxifène n'est pas encore démontrée. Les résultats discordants sur la relation PK/PD du tamoxifène suggèrent que la survenue des rechutes chez les patientes sous tamoxifène dépend de plusieurs facteurs et non seulement de l'exposition à l'endoxifène. Enfin, il est également possible que l'effet antitumoral du tamoxifène soit dépendant non seulement de l'endoxifène mais également d'autres métabolites à l'activité antiestrogénique dont les concentrations sont suffisantes même chez les patientes avec le phénotype CYP2D6 PM. Pour ce qui concerne le létrozole, les résultats des analyses PK/PD durant les 3 ans de suivi permettront de répondre à la question de l'individualisation du traitement en termes de réduction de risque des effets indésirables, mais d'ores et déjà, l'analyse que nous avons réalisée sur les données à 6 mois ne semble pas être en faveur d'une relation exposition plasmatique-toxicité franche.

Références bibliographiques

1. UNICANCER - Les chiffres du cancer en France. at <http://www.unicancer.fr/le-groupe-unicancer/les-chiffres-cles/les-chiffres-du-cancer-en-france>

2. Waks, A. G. & Winer, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA* **321**, 288–300 (2019).

3. Pearce, S. T. & Jordan, V. C. The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **50**, 3–22 (2004).

4. Heldring, N. *et al.* Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* **87**, 905–931 (2007).

5. Howlader, N. *et al.* US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, (2014).

6. Hammond, M. E. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2784–95 (2010).

7. Chavez-MacGregor, M. *et al.* Incorporating Tumor Characteristics to the American Joint Committee on Cancer Breast Cancer Staging System. *Oncologist* **22**, 1292–1300 (2017).

8. Slamon, D. *et al.* Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1273–1283 (2011).

9. Baselga, J. *et al.* Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 109–119 (2012).

10. Emborgo, T. *et al.* Abstract P2-09-08: Universal BRCA testing and family outreach for women with triple negative breast cancer. In *Poster Sess. Abstr.* **76**, P2-09-08-P2-09–08 (American Association for Cancer Research, 2016).

11. Patel, H. K. & Bihani, T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol. Ther.* **186**, 1–24 (2018).

12. Shao, W. & Brown, M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* **6**, 39 (2003).

13. Lønning, P. E., Lien, E. A., Lundgren, S. & Kvinnsland, S. Clinical Pharmacokinetics of Endocrine Agents Used in Advanced Breast Cancer. *Clin. Pharmacokinet.* **22**, 327–358 (1992).

14. Jordan, V. C. Tamoxifen: Catalyst for the change to targeted therapy. *Eur. J. Cancer* **44**, 30–38

(2008).

15. Miller, W. R., Hawkins, R. A. & Forrest, A. P. Significance of aromatase activity in human breast cancer. *Cancer Res.* **42**, 3365s-3368s (1982).

16. Nelson, L. R. & Bulun, S. E. Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45**, S116–S124 (2001).

17. Lu, Q. *et al.* Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology* **137**, 3061–3068 (1996).

18. Santen, R. J. *et al.* A Randomized Trial Comparing Surgical Adrenalectomy with Aminoglutethimide plus Hydrocortisone in Women with Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **305**, 545–551 (1981).

19. Cardoso, F. *et al.* 4th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)†. *Ann. Oncol.* **29**, 1634–1657 (2018).

20. *Recommandations Hormonothérapie adjuvante dans les cancers du sein non métastatiques*. at <http://www.canceraquitaine.org>

21. Katzenellenbogen, B. S., Norman, M. J., Eckert, R. L., Peltz, S. W. & Mangel, W. F. Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy-tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **44**, 112–9 (1984).

22. Desta, Z., Ward, B. A., Soukhova, N. V & Flockhart, D. A. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 1062–1075 (2004).

23. Mürdter, T. E. *et al.* Activity Levels of Tamoxifen Metabolites at the Estrogen Receptor and the Impact of Genetic Polymorphisms of Phase I and II Enzymes on Their Concentration Levels in Plasma. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 708–717 (2011).

24. Teunissen, S. F. *et al.* Investigational study of tamoxifen phase I metabolites using chromatographic and spectroscopic analytical techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55**, 518–526 (2011).

25. Brauch, H., Mürdter, T. E., Eichelbaum, M. & Schwab, M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin. Chem.* **55**, 1770–82 (2009).

26. Crewe, H. K. *et al.* Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-

4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 869–74 (2002).

27. Jordan, V. C. & Chem., C. Metabolites of tamoxifen in animals and man: Identification, pharmacology, and significance. *Breast Cancer Res. Treat.* **2**, 123–138 (1982).

28. Lim, Y. C., Desta, Z., Flockhart, D. A. & Skaar, T. C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 471–478 (2005).

29. Stearns, V. *et al.* Active Tamoxifen Metabolite Plasma Concentrations After Coadministration of Tamoxifen and the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Paroxetine. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1758–1764 (2003).

30. Wu, X. *et al.* The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res.* **69**, 1722–7 (2009).

31. Gong, I. Y. *et al.* Determination of clinically therapeutic endoxifen concentrations based on efficacy from human MCF7 breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 61–69 (2013).

32. Bates, D. J. *et al.* Metabolism of tamoxifen by isolated rat hepatocytes: anti-estrogenic activity of tamoxifen N-oxide. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 2823–2827 (1982).

33. Lu, W. J. *et al.* The tamoxifen metabolite norendoxifen is a potent and selective inhibitor of aromatase (CYP19) and a potential lead compound for novel therapeutic agents. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 99–109 (2012).

34. Miller, M. A., Lippman, M. E. & Katzenellenbogen, B. S. Antiestrogen binding in antiestrogen growth-resistant estrogen-responsive clonal variants of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **44**, 5038–45 (1984).

35. Knabbe, C. *et al.* Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* **48**, 417–28 (1987).

36. Lam, H.-Y. P. Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **118**, 27–32 (1984).

37. Lien, E. A., Solheim, E. & Ueland, P. M. Distribution of Tamoxifen and Its Metabolites in Rat and Human Tissues during Steady-State Treatment. *Cancer Res.* **51**, 4837–4844 (1991).

38. Gupta, V. *et al.* Enhancement of glioblastoma cell killing by combination treatment with temozolomide and tamoxifen or hypericin. *Neurosurg. Focus* **20**, E20 (2006).

39. Pollack, I. F. *et al.* Effect of tamoxifen on DNA synthesis and proliferation of human malignant

glioma lines in vitro. *Cancer Res.* **50**, 7134–8 (1990).

40. Schweikart, K. M. *et al.* Comparative uterotrophic effects of endoxifen and tamoxifen in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Pathol.* **42**, 1188–96 (2014).

41. Johnson, M. D., Westley, B. R. & May, F. E. Oestrogenic activity of tamoxifen and its metabolites on gene regulation and cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **59**, 727–38 (1989).

42. Murphy, C. S., Langan-Fahey, S. M., McCague, R. & Jordan, V. C. Structure-function relationships of hydroxylated metabolites of tamoxifen that control the proliferation of estrogen-responsive T47D breast cancer cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* **38**, (1990).

43. Wiebe, V. J., Osborne, C. K., McGuire, W. L. & DeGregorio, M. W. Identification of estrogenic tamoxifen metabolite(s) in tamoxifen-resistant human breast tumors. *J. Clin. Oncol.* **10**, 990–4 (1992).

44. Rose, C. & Mouridsen, H. T. Endocrine Therapy of Advanced Breast Cancer. *Acta Oncol. (Madr).* **27**, 721–728 (1988).

45. Gale, K. E. *et al.* Hormonal treatment for metastatic breast cancer. An Eastern Cooperative Oncology Group Phase III trial comparing aminoglutethimide to tamoxifen. *Cancer* **73**, 354–61 (1994).

46. Gill, P. G. *et al.* Randomized comparison of the effects of tamoxifen, megestrol acetate, or tamoxifen plus megestrol acetate on treatment response and survival in patients with metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* **4**, 741–744 (1993).

47. Mouridsen, H. *et al.* Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J. Clin. Oncol.* **19**, 2596–606 (2001).

48. Bonneterre, J. *et al.* Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3748–57 (2000).

49. Paridaens, R. J. *et al.* Phase III study comparing exemestane with tamoxifen as first-line hormonal treatment of metastatic breast cancer in postmenopausal women: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Breast Cancer Cooperative Group. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4883–90 (2008).

50. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* **351**, 1451–1467 (1998).

51. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), E. B. C. T. C. G. *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771–84 (2011).

52. Davies, C. *et al.* Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* **381**, 805–16 (2013).

53. Fisher, B., Dignam, J., Bryant, J. & Wolmark, N. Five Versus More Than Five Years of Tamoxifen for Lymph Node-Negative Breast Cancer: Updated Findings From the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 Randomized Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 684–690 (2001).

54. Stewart, H. J., Prescott, R. J. & Forrest, A. P. M. Scottish Adjuvant Tamoxifen Trial: a Randomized Study Updated to 15 Years. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 456–462 (2001).

55. Fisher, B. *et al.* Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1371–1388 (1998).

56. Cuzick, J. *et al.* Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet (London, England)* **361**, 296–300 (2003).

57. Braithwaite, R. S. *et al.* Meta-analysis of vascular and neoplastic events associated with tamoxifen. *J. Gen. Intern. Med.* **18**, 937–47 (2003).

58. Love, R. R., Barden, H. S., Mazess, R. B., Epstein, S. & Chappell, R. J. Effect of Tamoxifen on Lumbar Spine Bone Mineral Density in Postmenopausal Women After 5 Years. *Arch. Intern. Med.* **154**, 2585 (1994).

59. Coates, A. S. *et al.* Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J. Clin. Oncol.* **25**, 486–92 (2007).

60. Cuzick, J. *et al.* Long-Term Results of Tamoxifen Prophylaxis for Breast Cancer--96-Month Follow-up of the Randomized IBIS-I Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 272–282 (2007).

61. Mortimer, J. E. *et al.* Tamoxifen, hot flashes and recurrence in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **108**, 421–426 (2008).

62. Ruddy, K. J. *et al.* Personalized medicine in breast cancer: tamoxifen, endoxifen, and CYP2D6 in clinical practice. *Breast Cancer Res. Treat.* **141**, 421–427 (2013).

63. Lorizio, W. *et al.* Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **132**, 1107–1118 (2012).

64. Jin, Y. *et al.* Estrogen receptor genotypes influence hot flash prevalence and composite score before and after tamoxifen therapy. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5849–54 (2008).

65. Fallowfield, L. *et al.* Quality of life of postmenopausal women in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) Adjuvant Breast Cancer Trial. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4261–71 (2004).

66. Rae, J. M. *et al.* Cytochrome P450 2D6 activity predicts discontinuation of tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Pharmacogenomics J.* **9**, 258–64 (2009).

67. Jones, M. E. *et al.* Endometrial cancer survival after breast cancer in relation to tamoxifen treatment: pooled results from three countries. *Breast Cancer Res.* **14**, R91 (2012).

68. Cutuli, B. *et al.* Adjuvant tamoxifen in breast-cancer-treatment in postmenopausal women - occurrence of thromboembolic complications. *Oncol. Rep.* **1**, 59–63 (1994).

69. Meier, C. R. & Jick, H. Tamoxifen and risk of idiopathic venous thromboembolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **45**, 608–12 (1998).

70. Mouridsen, H. *et al.* Cardiovascular adverse events during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer using letrozole or tamoxifen: safety analysis of BIG 1-98 trial. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5715–22 (2007).

71. Fisher, B. *et al.* A Randomized Clinical Trial Evaluating Tamoxifen in the Treatment of Patients with Node-Negative Breast Cancer Who Have Estrogen-Receptor–Positive Tumors. *N. Engl. J. Med.* **320**, 479–484 (1989).

72. Waterhouse, D. M., Calzone, K. A., Mele, C. & Brenner, D. E. Adherence to oral tamoxifen: a comparison of patient self-report, pill counts, and microelectronic monitoring. *J. Clin. Oncol.* **11**, (1993).

73. Hershman, D. L. *et al.* Early discontinuation and nonadherence to adjuvant hormonal therapy in a cohort of 8,769 early-stage breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4120–8 (2010).

74. Owusu, C. *et al.* Predictors of tamoxifen discontinuation among older women with estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 549–55 (2008).

75. Barron, T. I., Connolly, R., Bennett, K., Feely, J. & Kennedy, M. J. Early discontinuation of tamoxifen. *Cancer* **109**, 832–839 (2007).

76. Aiello Bowles, E. J. *et al.* Patient-reported discontinuation of endocrine therapy and related adverse effects among women with early-stage breast cancer. *J. Oncol. Pract.* **8**, e149-57 (2012).

77. McCowan, C. *et al.* Cohort study examining tamoxifen adherence and its relationship to

mortality in women with breast cancer. *Br. J. Cancer* **99**, 1763–1768 (2008).

78. Murphy, C. C., Bartholomew, L. K., Carpentier, M. Y., Bluethmann, S. M. & Vernon, S. W. Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: a systematic review. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 459–478 (2012).

79. Pistilli, B. *et al.* 185O_PRSerum assessment of non-adherence to adjuvant endocrine therapy (ET) among premenopausal patients in the prospective multicenter CANTO cohort. *Ann. Oncol.* **29**, (2018).

80. Dezentjé, V. O. *et al.* Effect of concomitant CYP2D6 inhibitor use and tamoxifen adherence on breast cancer recurrence in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2423–9 (2010).

81. Partridge, A. H., Wang, P. S., Winer, E. P. & Avorn, J. Nonadherence to adjuvant tamoxifen therapy in women with primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 602–6 (2003).

82. Wilkinson, P., Ribeiro, G., Adam, H. & Patterson, J. Clinical pharmacology of tamoxifen and N-desmethyltamoxifen in patients with advanced breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **5**, 109–11 (1980).

83. Fuchs, W. S. *et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of tamoxifen in postmenopausal healthy women. *Arzneimittelforschung.* **46**, 418–22 (1996).

84. Fabian, C., Sternson, L., El-serafi, M., Cain, L. & Hearne, E. Clinical pharmacology of tamoxifen in patients with breast cancer: Correlation with clinical data. *Cancer* **48**, 876–882 (1981).

85. Kisanga, E. R. *et al.* Tamoxifen and metabolite concentrations in serum and breast cancer tissue during three dose regimens in a randomized preoperative trial. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2336–43 (2004).

86. Kiyotani, K. *et al.* Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **131**, 137–145 (2012).

87. Graan, A.-J. M. de *et al.* Dextromethorphan as a phenotyping test to predict endoxifen exposure in patients on tamoxifen treatment. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3240–6 (2011).

88. Fox, P. *et al.* Dose Escalation of Tamoxifen in Patients with Low Endoxifen Level: Evidence for Therapeutic Drug Monitoring-The TADE Study. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3164–71 (2016).

89. Jin, Y. *et al.* CYP2D6 Genotype, Antidepressant Use, and Tamoxifen Metabolism During Adjuvant Breast Cancer Treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 30–39 (2005).

90. Dickschen, K. J. R. *et al.* Physiologically based pharmacokinetic modeling of tamoxifen and its metabolites in women of different CYP2D6 phenotypes provides new insight into the tamoxifen

mass balance. *Front. Pharmacol.* **3**, 92 (2012).

91. Adam, H. K., Patterson, J. S. & Kemp, J. V Studies on the metabolism and pharmacokinetics of tamoxifen in normal volunteers. *Cancer Treat. Rep.* **64**, 761–4

92. Slee, P. H. T. J., Vos, D. De, Chapman, D. & Stevenson, D. The bioavailability of Tamoplex® (tamoxifen). *Pharm. Weekbl.* **10**, 22–25 (1988).

93. Buzdar, A. U. *et al.* Bioequivalence of 20-mg once-daily tamoxifen relative to 10-mg twice-daily tamoxifen regimens for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **12**, 50–4 (1994).

94. Hutson, P. R., Love, R. R., Havighurst, T. C., Rogers, E. & Cleary, J. F. Effect of exemestane on tamoxifen pharmacokinetics in postmenopausal women treated for breast cancer. *Clin. Cancer Res. An Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 8722–8727 (2005).

95. Fromson, J. M. & Sharp, D. S. The selective uptake of tamoxifen by human uterine tissue. *An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **81**, 321–323 (1974).

96. Lien, E. A. *et al.* Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. *Cancer Res.* **49**, 2175–83 (1989).

97. Rao, U. S., Fine, R. L. & Scarborough, G. A. Antiestrogens and steroid hormones: Substrates of the human P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 287–292 (1994).

98. Callaghan, R. & Higgins, C. F. Interaction of tamoxifen with the multidrug resistance P-glycoprotein. *Br. J. Cancer* **71**, 294–9 (1995).

99. Clarke, R., Leonessa, F. & Trock, B. Multidrug Resistance/P-Glycoprotein and Breast Cancer: Review and Meta-Analysis. *Semin. Oncol.* **32**, 9–15 (2005).

100. Bekaii-Saab, T. S., Perloff, M. D., Weemhoff, J. L., Greenblatt, D. J. & Moltke, L. L. von Interactions of tamoxifen, N-desmethyltamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with P-glycoprotein and CYP3A. *Biopharm. Drug Dispos.* **25**, 283–289 (2004).

101. Iusuf, D. *et al.* P-glycoprotein (ABCB1) transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **337**, 710–7 (2011).

102. Teft, W. A., Mansell, S. E. & Kim, R. B. Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metab. Dispos.* **39**, 558–62 (2011).

103. Crewe, H. K., Ellis, S. W., Lennard, M. S. & Tucker, G. T. Variable contribution of cytochromes

p450 2d6, 2c9 and 3a4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 171–178 (1997).

104. Coller, J. K. *et al.* The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **54**, 157–167 (2002).

105. Poon, G. K. *et al.* Analysis of phase I and phase II metabolites of tamoxifen in breast cancer patients. *Drug Metab. Dispos.* **21**, (1993).

106. Parte, P., Kupfer, D. & Pape, C. W. Oxidation of tamoxifen by human flavin-containing monooxygenase (FMO) 1 and FMO3 to tamoxifen-N-oxide and its novel reduction back to tamoxifen by human cytochromes P450 and hemoglobin. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1446–52 (2005).

107. Lim, J. S. L. *et al.* Association of CYP2C19*2 and associated haplotypes with lower norendoxifen concentrations in tamoxifen-treated Asian breast cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **81**, 1142–52 (2016).

108. Nishiyama, T. *et al.* Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 1817–1830 (2002).

109. Ogura, K. *et al.* Quaternary ammonium-linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1358–1369 (2006).

110. Sun, D. *et al.* Characterization of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants. *Breast Cancer Res.* **8**, R50 (2006).

111. Fromson, J. M., Pearson, S. & Bramah, S. The Metabolism of Tamoxifen (I.C.I. 46,474) Part II: In Female Patients. *Xenobiotica* **3**, 711–714 (1973).

112. Lien, E. A., Solheim, E., Kvinnsland, S. & Ueland, P. M. Identification of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen as a metabolite of tamoxifen in human bile. *Cancer Res.* **48**, 2304–8 (1988).

113. Ahmad, A. *et al.* Endoxifen, a new cornerstone of breast cancer therapy: demonstration of safety, tolerability, and systemic bioavailability in healthy human subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **88**, 814–817 (2010).

114. Hertz, D. L. *et al.* Tamoxifen Dose Escalation in Patients With Diminished CYP2D6 Activity Normalizes Endoxifen Concentrations Without Increasing Toxicity. *Oncologist* **21**, 795–803 (2016).

115. Peyrade, F. *et al.* Age-related difference in tamoxifen disposition. *Clin. Pharmacol. Ther.* **59**, 401–410 (1996).

116. Lien, E. A. *et al.* Serum concentrations of tamoxifen and its metabolites increase with age during steady-state treatment. *Breast Cancer Res. Treat.* **141**, 243 (2013).

117. Marcath, L. A. *et al.* Comprehensive assessment of cytochromes P450 and transporter genetics with endoxifen concentration during tamoxifen treatment. *Pharmacogenet. Genomics* **27**, 402–409 (2017).

118. Schroth, W. *et al.* Improved Prediction of Endoxifen Metabolism by CYP2D6 Genotype in Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen. *Front. Pharmacol.* **8**, 582 (2017).

119. Saladores, P. *et al.* Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J.* **15**, (2014).

120. Madlensky, L. *et al.* Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 718–725 (2011).

121. DeGregorio, M. W., Wiebe, V. J., Venook, A. P. & Holleran, W. M. Elevated plasma tamoxifen levels in a patient with liver obstruction. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **23**, 194–5 (1989).

122. Floren, L. C. *et al.* Tamoxifen in liver disease: Potential exacerbation of hepatic dysfunction. *Ann. Oncol.* **9**, 1123–1126 (1998).

123. Sutherland, C. M., Sternson, L. A., Muchmore, J. H., Ball, J. E. & Cerise, E. J. Effect of impaired renal function on tamoxifen. *J. Surg. Oncol.* **27**, 222–223 (1984).

124. Gaedigk, A., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Klein, T. & Leeder, J. S. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet. Med.* **19**, 69–76 (2017).

125. Lyon, E. *et al.* Laboratory testing of CYP2D6 alleles in relation to tamoxifen therapy. *Genet. Med.* **14**, 990–1000 (2012).

126. Hicks, J. K. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Tricyclic Antidepressants. *Clin. Pharmacol. Ther.* **93**, 402–408 (2013).

127. Gaedigk, A. *et al.* The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 234–242 (2008).

128. Pharmacogene Variation Consortium. CYP2D6 gene. at <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>

129. Goetz, M. P. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for

CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 770–777 (2018).

130. Borges, S. *et al.* Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**, 61–74 (2006).

131. Kiyotani, K. *et al.* Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1287–93 (2010).

132. Sanchez Spitman, A. B. *et al.* Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A combined genotypes on tamoxifen metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **73**, 1589–1598 (2017).

133. Antunes, M. V. *et al.* CYP3A4*22 is related to increased plasma levels of 4-hydroxytamoxifen and partially compensates for reduced CYP2D6 activation of tamoxifen. *Pharmacogenomics* **16**, 601–617 (2015).

134. Werk, A. N. & Cascorbi, I. Functional Gene Variants of CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 340–348 (2014).

135. Sim, S. C. & Ingelman-Sundberg, M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum. Genomics* **4**, 278–81 (2010).

136. Wang, D., Guo, Y., Wrighton, S. A., Cooke, G. E. & Sadee, W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* **11**, 274–286 (2011).

137. Jonge, H. de, Elens, L., Loor, H. de, Schaik, R. H. van & Kuypers, D. R. J. The CYP3A4*22 C>T single nucleotide polymorphism is associated with reduced midazolam and tacrolimus clearance in stable renal allograft recipients. *Pharmacogenomics J.* **15**, 144–152 (2015).

138. Elens, L. *et al.* CYP3A4 intron 6 C>T SNP (CYP3A4*22) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenomics* **14**, 137–149 (2013).

139. Elens, L. *et al.* A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin. Chem.* **57**, 1574–83 (2011).

140. Teft, W. A. *et al.* CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 95–105 (2013).

141. Baxter, S. D., Teft, W. A., Choi, Y.-H., Winquist, E. & Kim, R. B. Tamoxifen-associated hot

flash severity is inversely correlated with endoxifen concentration and CYP3A4*22. *Breast Cancer Res. Treat.* **145**, 419–428 (2014).

142. Antunes, M. V. *et al.* Influence of CYP2D6 and CYP3A4 Phenotypes, Drug Interactions, and Vitamin D Status on Tamoxifen Biotransformation. *Ther. Drug Monit.* **37**, 733–744 (2015).

143. Shi, W.-L., Tang, H.-L. & Zhai, S.-D. Effects of the CYP3A4*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis. *PLoS One* **10**, e0127995 (2015).

144. Fernández-Santander, A. *et al.* Relationship between Genotypes Sult1a2 and Cyp2d6 and Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients. *PLoS One* **8**, e70183 (2013).

145. Kuehl, P. *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat. Genet.* **27**, 383–391 (2001).

146. Roy, J.-N. *et al.* CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 884–7 (2005).

147. Hesselink, D. *et al.* Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin. Pharmacol. Ther.* **74**, 245–254 (2003).

148. Gjerde, J. *et al.* Associations between tamoxifen, estrogens, and FSH serum levels during steady state tamoxifen treatment of postmenopausal women with breast cancer. *BMC Cancer* **10**, 313 (2010).

149. Lim, J. S. L. *et al.* Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **71**, 737–750 (2011).

150. Tucker, A. N. *et al.* Polymorphisms in cytochrome P4503A5 (CYP3A5) may be associated with race and tumor characteristics, but not metabolism and side effects of tamoxifen in breast cancer patients. *Cancer Lett.* **217**, 61–72 (2005).

151. Powers, J. L. *et al.* Multigene and Drug Interaction Approach for Tamoxifen Metabolite Patterns Reveals Possible Involvement of CYP2C9, CYP2C19, and ABCB1. *J. Clin. Pharmacol.* **56**, 1570–1581 (2016).

152. Desta, Z., Zhao, X., Shin, J.-G. & Flockhart, D. A. Clinical Significance of the Cytochrome P450 2C19 Genetic Polymorphism. *Clin. Pharmacokinet.* **41**, 913–958 (2002).

153. SIM, S. *et al.* A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin. Pharmacol.*

Ther. **79**, 103–113 (2006).

154. Zanger, U. M. & Klein, K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front. Genet.* **4**, 24 (2013).

155. Woo, H. I. *et al.* Variations in plasma concentrations of tamoxifen metabolites and the effects of genetic polymorphisms on tamoxifen metabolism in Korean patients with breast cancer. *Oncotarget* **8**, 100296–100311 (2017).

156. Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Otterness, D. M., Loon, J. A. Van & Weinshilboum, R. M. Phenol Sulfotransferase Pharmacogenetics in Humans: Association of Common SULT1A1 Alleles with TS PST Phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 298–304 (1997).

157. Nowell, S. *et al.* Relationship of phenol sulfotransferase activity (SULT1A1) genotype to sulfotransferase phenotype in platelet cytosol. *Pharmacogenetics* **10**, 789–97 (2000).

158. Gjerde, J. *et al.* Effects of CYP2D6 and SULT1A1 genotypes including SULT1A1 gene copy number on tamoxifen metabolism. *Ann. Oncol.* **19**, 56–61 (2007).

159. Yu, X. *et al.* Functional genetic variants in the 3'-untranslated region of sulfotransferase isoform 1A1 (SULT1A1) and their effect on enzymatic activity. *Toxicol. Sci.* **118**, 391–403 (2010).

160. Sanchez-Spitman, A. B. *et al.* Genetic polymorphisms of 3′-untranslated region of SULT1A1 and their impact on tamoxifen metabolism and efficacy. *Breast Cancer Res. Treat.* **172**, 401–411 (2018).

161. Ehmer, U. *et al.* Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology* **39**, 970–977 (2004).

162. Mori, A., Maruo, Y., Iwai, M., Sato, H. & Takeuchi, Y. UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 672–5 (2005).

163. Ghotbi, R. *et al.* Carriers of the UGT1A4 142T>G gene variant are predisposed to reduced olanzapine exposure—an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **66**, 465–474 (2010).

164. Gulcebi, M. I. *et al.* The relationship between UGT1A4 polymorphism and serum concentration of lamotrigine in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* **95**, 1–8 (2011).

165. Saeki, M. *et al.* Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **20**, 144–51 (2005).

166. Huang, Y.-H. *et al.* Identification and functional characterization of UDP-

glucuronosyltransferases UGT1A8*1, UGT1A8*2 and UGT1A8*3. *Pharmacogenetics* **12**, 287–97 (2002).

167. rs28365062 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs28365062>

168. Wiener, D., Fang, J.-L., Dossett, N. & Lazarus, P. Correlation between UDP-Glucuronosyltransferase Genotypes and 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone Glucuronidation Phenotype in Human Liver Microsomes. *Cancer Res.* **64**, 1190–1196 (2004).

169. Chung, J.-Y. *et al.* Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interaction of Lorazepam and Valproic Acid in Relation to UGT2B7 Genetic Polymorphism in Healthy Subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 595–600 (2008).

170. Court, M. H. *et al.* Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1125–33 (2003).

171. Blevins-Primeau, A. S. *et al.* Functional Significance of UDP-Glucuronosyltransferase Variants in the Metabolism of Active Tamoxifen Metabolites. *Cancer Res.* **69**, 1892–1900 (2009).

172. Chatzistefanidis, D., Georgiou, I., Kyritsis, A. P. & Markoula, S. Functional impact and prevalence of polymorphisms involved in the hepatic glucuronidation of valproic acid. *Pharmacogenomics* **13**, 1055–1071 (2012).

173. Matic, M. *et al.* Effect of UGT2B7 -900G>A (-842G>A; rs7438135) on morphine glucuronidation in preterm newborns: results from a pilot cohort. *Pharmacogenomics* **15**, 1589–1597 (2014).

174. rs7438135 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7438135#frequency_tab>

175. Milosheska, D. *et al.* Pharmacokinetics of lamotrigine and its metabolite N-2-glucuronide: Influence of polymorphism of UDP-glucuronosyltransferases and drug transporters. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **82**, 399–411 (2016).

176. rs3924194 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3924194#frequency_tab>

177. He, X. *et al.* Evidence for oxazepam as an *in vivo* probe of UGT2B15: oxazepam clearance is reduced by *UGT2B15* D85Y polymorphism but unaffected by *UGT2B17* deletion. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **68**, 721–730 (2009).

178. Levesque, E. *et al.* Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics* **7**, 317–325 (1997).

179. Court, M. H. *et al.* UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y genotype and gender are major determinants of oxazepam glucuronidation by human liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 656–65 (2004).

180. Wilson, W. *et al.* Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15. *Genomics* **84**, 707–714 (2004).

181. Romero-Lorca, A., Novillo, A., Gaibar, M., Bandrés, F. & Fernández-Santander, A. Impacts of the Glucuronidase Genotypes UGT1A4, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17 on Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients. *PLoS One* **10**, e0132269 (2015).

182. Desai, P. B. *et al.* Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 608–12 (2002).

183. Sane, R. S. *et al.* Role of human pregnane X receptor in tamoxifen- and 4-hydroxytamoxifen-mediated CYP3A4 induction in primary human hepatocytes and LS174T cells. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 946–54 (2008).

184. Harmsen, S., Meijerman, I., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64**, 35–43 (2009).

185. Zhang, B., Xie, W. & Krasowski, M. D. PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics* **9**, 1695–1709 (2008).

186. Lim, H.-S. *et al.* Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3837–45 (2007).

187. Zembutsu, H., Sasa, M., Kiyotani, K., Mushiroda, T. & Nakamura, Y. Should CYP2D6 inhibitors be administered in conjunction with tamoxifen? *Expert Rev. Anticancer Ther.* **11**, 185–193 (2011).

188. Binkhorst, L. *et al.* Augmentation of Endoxifen Exposure in Tamoxifen-Treated Women Following SSRI Switch. *Clin. Pharmacokinet.* **55**, 249–255 (2016).

189. Niemi, M., Backman, J. T., Fromm, M. F., Neuvonen, P. J. & Kivist, K. T. Pharmacokinetic Interactions with Rifampicin. *Clin. Pharmacokinet.* **42**, 819–850 (2003).

190. Binkhorst, L. *et al.* Effects of CYP Induction by Rifampicin on Tamoxifen Exposure. *Clin. Pharmacol. Ther.* **92**, 62–67 (2012).

191. Henderson, S. L., Teft, W. A. & Kim, R. B. Profound reduction in tamoxifen active metabolite endoxifen in a breast cancer patient treated with rifampin prior to initiation of an anti-TNFα biologic for ulcerative colitis: a case report. *BMC Cancer* **16**, 304 (2016).

192. Gryn, S. E., Teft, W. A. & Kim, R. B. Profound reduction in the tamoxifen active metabolite endoxifen in a patient on phenytoin for epilepsy compared with a CYP2D6 genotype matched cohort. *Pharmacogenet. Genomics* **24**, 367–9 (2014).

193. Lønning, P. E. Aminoglutethimide enzyme induction: pharmacological and endocrinological implications. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **26**, 241–244 (1990).

194. Lien, E. A., Anker, G., Lønning, P. E., Solheim, E. & Ueland, P. M. Decreased serum concentrations of tamoxifen and its metabolites induced by aminoglutethimide. *Cancer Res.* **50**, 5851–7 (1990).

195. Ingle, J. N. *et al.* Evaluation of tamoxifen plus letrozole with assessment of pharmacokinetic interaction in postmenopausal women with metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1642–9 (1999).

196. Dowsett, M. *et al.* Impact of tamoxifen on the pharmacokinetics and endocrine effects of the aromatase inhibitor letrozole in postmenopausal women with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2338–43 (1999).

197. Dowsett, M. *et al.* The effect of anastrozole on the pharmacokinetics of tamoxifen in post-menopausal women with early breast cancer. *Br. J. Cancer* **79**, 311–5 (1999).

198. Pharmacokinetics of anastrozole and tamoxifen alone and in combination, during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer in postmenopausal women: a sub-protocol of the 'Arimidex™ and Tamoxifen Alone or in Combination' (ATAC) trial. *Br. J. Cancer* **85**, 317–324 (2001).

199. Rivera, E. *et al.* Pilot Study Evaluating the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of the Combination of Exemestane and Tamoxifen. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1943–1948 (2004).

200. Damery, S. *et al.* The use of herbal medicines by people with cancer: a cross-sectional survey. *Br. J. Cancer* **104**, 927–33 (2011).

201. Langin, H. *et al.* Prevalence of herbal medicine (HM) use among breast cancer patients treated with chemotherapy, hormone therapy, or targeted therapy. *J. Clin. Oncol.* **36**, e13108–e13108 (2018).

202. Bahramsoltani, R., Rahimi, R. & Farzaei, M. H. Pharmacokinetic interactions of curcuminoids with conventional drugs: A review. *J. Ethnopharmacol.* **209**, 1–12 (2017).

203. Yang Wan-Hua, T. J. *et al.* P-gp Induction by Curcumin: An Effective Antidotal Pathway. *J. Bioequiv. Availab.* **05**, 0–0 (2013).

204. Hussaarts, K. *et al.* Impact of Curcumin (with or without Piperine) on the Pharmacokinetics of Tamoxifen. *Cancers (Basel).* **11**, 403 (2019).

205. Al-Akoum, M. *et al.* Effects of Hypericum perforatum (St. John's wort) on hot flashes and quality of life in perimenopausal women: a randomized pilot trial. *Menopause* **16**, 307–14 (2009).

206. Borrelli, F. & Izzo, A. A. Herb-drug interactions with St John's wort (Hypericum perforatum): an update on clinical observations. *AAPS J.* **11**, 710–27 (2009).

207. Goey, A. K. L. *et al.* The Effect of St John's Wort on the Pharmacokinetics of Docetaxel. *Clin. Pharmacokinet.* **53**, 103–110 (2014).

208. Wang, Z. *et al.* The effects of St John's wort (Hypericum perforatum) on human cytochrome P450 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.* **70**, 317–26 (2001).

209. Wang, L.-S. *et al.* The Influence of St. John's Wort on CYP2C19 Activity with Respect to Genotype. *J. Clin. Pharmacol.* **44**, 577–581 (2004).

210. Vardy, J. *et al.* Investigation of herb-drug interactions with ginkgo biloba in women receiving hormonal treatment for early breast cancer. *Springerplus* **2**, 126 (2013).

211. Tocaciu, S. *et al.* The Effect of Undaria pinnatifida Fucoidan on the Pharmacokinetics of Letrozole and Tamoxifen in Patients With Breast Cancer. *Integr. Cancer Ther.* **17**, 99–105 (2018).

212. Thummel, K. E. *et al.* Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3. *Mol. Pharmacol.* **60**, 1399–406 (2001).

213. Thirumaran, R. K. *et al.* Intestinal CYP3A4 and midazolam disposition in vivo associate with VDR polymorphisms and show seasonal variation. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 104–112 (2012).

214. Jaremko, M. *et al.* Tamoxifen Metabolite Isomer Separation and Quantification by Liquid Chromatography−Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 10186–10193 (2010).

215. Teunissen, S. F. *et al.* Development and validation of a quantitative assay for the determination of tamoxifen and its five main phase I metabolites in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **879**, 1677–1685 (2011).

216. Nuland, M. van *et al.* Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the therapeutic drug monitoring of oral anti-hormonal drugs in oncology. *J. Chromatogr. B* **1106**–

1107, 26–34 (2019).

217. Dahmane, E. *et al.* An ultra performance liquid chromatography–tandem MS assay for tamoxifen metabolites profiling in plasma: First evidence of 4′-hydroxylated metabolites in breast cancer patients. *J. Chromatogr. B* **878**, 3402–3414 (2010).

218. Arellano, C., Allal, B., Goubaa, A., Roché, H. & Chatelut, E. An UPLC–MS/MS method for separation and accurate quantification of tamoxifen and its metabolites isomers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **100**, 254–261 (2014).

219. Jager, N. G. L., Rosing, H., Linn, S. C., Schellens, J. H. M. & Beijnen, J. H. Importance of highly selective LC–MS/MS analysis for the accurate quantification of tamoxifen and its metabolites: focus on endoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 793–798 (2012).

220. Goetz, M. P. *et al.* Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J. Clin. Oncol.* **23**, 9312–9318 (2005).

221. Schroth, W. *et al.* Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J. Clin. Oncol.* **25**, 5187–93 (2007).

222. Schroth, W. *et al.* Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* **302**, 1429–1436 (2009).

223. Goetz, M. P. *et al.* The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* **101**, 113–121 (2007).

224. Schroth, W. *et al.* CYP2D6 polymorphisms as predictors of outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen: expanded polymorphism coverage improves risk stratification. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4468–4477 (2010).

225. Newman, W. G. *et al.* Impaired tamoxifen metabolism reduces survival in familial breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5913–5918 (2008).

226. Bijl, M. J. *et al.* The CYP2D6*4 polymorphism affects breast cancer survival in tamoxifen users. *Breast Cancer Res. Treat.* **118**, 125–130 (2009).

227. Rae, J. M. *et al.* CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 452–460 (2012).

228. Regan, M. M. *et al.* CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 Trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 441–451 (2012).

229. Markkula, A., Hjertberg, M., Rose, C., Ingvar, C. & Jernström, H. No association found between

CYP2D6 genotype and early breast cancer events in tamoxifen-treated patients. *Acta Oncol. (Madr).* **53**, 195–200 (2014).

230. Lei, L. *et al.* Association of CYP2D6*10 (c.100C>T) polymorphisms with clinical outcome of breast cancer after tamoxifen adjuvant endocrine therapy in Chinese population. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 3585–92 (2016).

231. Damodaran, S. E. *et al.* Genetic polymorphisms of CYP2D6 increase the risk for recurrence of breast cancer in patients receiving tamoxifen as an adjuvant therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **70**, 75–81 (2012).

232. Hertz, D. L. *et al.* CYP2D6 genotype is not associated with survival in breast cancer patients treated with tamoxifen: results from a population-based study. *Breast Cancer Res. Treat.* **166**, 277–287 (2017).

233. Argalacsova, S., Slanar, O., Bakhouche, H. & Pertuzelka, L. Impact of ABCB1 and CYP2D6 polymorphisms on tamoxifen treatment outcomes and adverse events in breast cancer patients. *J. BUON.* **22**, 1217–1226

234. Province, M. A. *et al.* CYP2D6 Genotype and Adjuvant Tamoxifen: Meta-Analysis of Heterogeneous Study Populations. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 216–227 (2014).

235. Neven, P. *et al.* Tamoxifen metabolism and efficacy in breast cancer - a prospective multicentre trial. *Clin. Cancer Res.* (2018).doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3028

236. Sanchez-Spitman, A. *et al.* Tamoxifen Pharmacogenetics and Metabolism: Results From the Prospective CYPTAM Study. *J. Clin. Oncol.* JCO1800307 (2019).doi:10.1200/JCO.18.00307

237. Lynn Henry, N. *et al.* Association between CYP2D6 genotype and tamoxifen-induced hot flashes in a prospective cohort. *Breast Cancer Res. Treat.* **117**, 571–575 (2009).

238. Madlensky, L. *et al.* Hot flashes are associated with CYP2D6 genotype in breast cancer survivors taking tamoxifen. In *Poster Sess. Abstr.* **69**, 6045 (American Association for Cancer Research, 2009).

239. Dezentjé, V. O. *et al.* CYP2D6 genotype in relation to hot flashes as tamoxifen side effect in a Dutch cohort of the tamoxifen exemestane adjuvant multinational (TEAM) trial. *Breast Cancer Res. Treat.* **143**, 171–179 (2014).

240. Sestak, I. *et al.* Relationships between CYP2D6 phenotype, breast cancer and hot flushes in women at high risk of breast cancer receiving prophylactic tamoxifen: results from the IBIS-I trial. *Br. J. Cancer* **107**, 230–233 (2012).

241. Jansen, L. E., Teft, W. A., Rose, R. V., Lizotte, D. J. & Kim, R. B. CYP2D6 genotype and

endoxifen plasma concentration do not predict hot flash severity during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **171**, 701–708 (2018).

242. Wegman, P. *et al.* Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.* **9**, R7 (2007).

243. Sensorn, I. *et al.* Association of CYP3A4/5, ABCB1 and ABCC2 polymorphisms and clinical outcomes of Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Pharmgenomics. Pers. Med.* **6**, 93 (2013).

244. Sim, S., Lövrot, J., Lindh, J. D., Bergh, J. & Xie, H. Effect of CYP2C19 and CYP2D6 genotype on tamoxifen treatment outcome indicates endogenous and exogenous interplay. *Pharmacogenomics* **19**, 1027–1037 (2018).

245. Ruiter, R. *et al.* CYP2C19*2 polymorphism is associated with increased survival in breast cancer patients using tamoxifen. *Pharmacogenomics* **11**, 1367–1375 (2010).

246. Schaik, R. H. van *et al.* The *CYP2C19*2* genotype predicts tamoxifen treatment outcome in advanced breast cancer patients. *Pharmacogenomics* **12**, 1137–1146 (2011).

247. Beelen, K. *et al.* CYP2C19*2 predicts substantial tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant tamoxifen and no systemic treatment. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 649–655 (2013).

248. Okishiro, M. *et al.* Genetic polymorphisms of CYP2D6*10 and CYP2C19*2,*3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer* **115**, 952–961 (2009).

249. Damkier, P. *et al.* CYP2C19*2 and CYP2C19*17 variants and effect of tamoxifen on breast cancer recurrence: Analysis of the International Tamoxifen Pharmacogenomics Consortium dataset. *Sci. Rep.* **7**, 7727 (2017).

250. Mwinyi, J. *et al.* Impact of variable CYP genotypes on breast cancer relapse in patients undergoing adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **73**, 1181–1188 (2014).

251. Moyer, A. M. *et al.* SULT1A1 , CYP2C19 and disease-free survival in early breast cancer patients receiving tamoxifen. *Pharmacogenomics* **12**, 1535–1543 (2011).

252. Nowell, S. *et al.* Association between sulfotransferase 1A1 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1635–40 (2002).

253. Grabinski, J. L. *et al.* Genotypic and allelic frequencies of SULT1A1 polymorphisms in women receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **95**, 13–16 (2006).

254. Serrano, D. *et al.* Efficacy of tamoxifen based on cytochrome P450 2D6, CYP2C19 and SULT1A1 genotype in the Italian Tamoxifen Prevention Trial. *Pharmacogenomics J.* **11**, (2010).

255. Nowell, S. A. *et al.* Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **91**, 249–258 (2005).

256. Teh, L. K. *et al.* The risk of recurrence in breast cancer patients treated with tamoxifen: polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *AAPS J.* **14**, 52–9 (2012).

257. Helland, T. *et al.* Serum concentrations of active tamoxifen metabolites predict long-term survival in adjuvantly treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **19**, 125 (2017).

258. Vries Schultink, A. H. M. de *et al.* An Antiestrogenic Activity Score for tamoxifen and its metabolites is associated with breast cancer outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* **161**, 567–574 (2017).

259. Vries Schultink, A. de *et al. Evaluation of Therapeutic Drug Monitoring of endoxifen*. at <https://www.page-meeting.org/pdf_assets/5157-Friday June 14 - 9.20-9.40 - Prospective evaluation of TDM of endoxifen feasibility of trials.pdf>

260. Goetz, M. P. *et al.* Tamoxifen Metabolism and Breast Cancer Recurrence: A Question Unanswered by CYPTAM. *J. Clin. Oncol.* **37**, 1982–1983 (2019).

261. Gallicchio, L. *et al.* Association of Tamoxifen (TAM) and TAM Metabolite Concentrations with Self-Reported Side Effects of TAM in Women with Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **85**, 89–97 (2004).

262. Helland, T. *et al.* Drug monitoring of tamoxifen metabolites predicts vaginal dryness and verifies a low discontinuation rate from the Norwegian Prescription Database. *Breast Cancer Res. Treat.* (2019).doi:10.1007/s10549-019-05294-w

263. Jager, N. G. *et al.* Hot flashes are not predictive for serum concentrations of tamoxifen and its metabolites. *BMC Cancer* **13**, 612 (2013).

264. Benetkiewicz, M. *et al.* Chromosome 22 array-CGH profiling of breast cancer delimited minimal common regions of genomic imbalances and revealed frequent intra-tumoral genetic heterogeneity. *Int. J. Oncol.* **29**, 935–945 (2006).

265. Goetz, M. P. *et al.* Loss of heterozygosity at the CYP2D6 locus in breast cancer: implications for germline pharmacogenetic studies. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, (2014).

266. Pharoah, P. D. P., Abraham, J. & Caldas, C. Re: CYP2D6 Genotype and Tamoxifen Response

in Postmenopausal Women With Endocrine-Responsive Breast Cancer: The Breast International Group 1-98 Trial and Re: CYP2D6 and UGT2B7 Genotype and Risk of Recurrence in Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 1263–1264 (2012).

267. Klopp-Schulze, L. *et al.* Exploiting Pharmacokinetic Models of Tamoxifen and Endoxifen to Identify Factors Causing Subtherapeutic Concentrations in Breast Cancer Patients. *Clin. Pharmacokinet.* **57**, 229–242 (2018).

268. Irvin, W. J. *et al.* Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3232–9 (2011).

269. Barginear, M. F. *et al.* Increasing Tamoxifen Dose in Breast Cancer Patients Based on CYP2D6 Genotypes and Endoxifen Levels: Effect on Active Metabolite Isomers and the Antiestrogenic Activity Score. *Clin. Pharmacol. Ther.* **90**, 605–611 (2011).

270. Dezentjé, V. O. *et al.* CYP2D6 genotype- and endoxifen-guided tamoxifen dose escalation increases endoxifen serum concentrations without increasing side effects. *Breast Cancer Res. Treat.* **153**, 583–590 (2015).

271. Bhatnagar, A. ., Brodie, A. M. ., Long, B. ., Evans, D. . & Miller, W. . Intracellular aromatase and its relevance to the pharmacological efficacy of aromatase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **76**, 199–202 (2001).

272. Brodie, A., Lu, Q., Liu, Y. & Long, B. Aromatase inhibitors and their antitumor effects in model systems. *Endocr. Relat. Cancer* **6**, 205–10 (1999).

273. Jelovac, D., Macedo, L., Goloubeva, O. G., Handratta, V. & Brodie, A. M. H. Additive Antitumor Effect of Aromatase Inhibitor Letrozole and Antiestrogen Fulvestrant in a Postmenopausal Breast Cancer Model. *Cancer Res.* **65**, 5439–5444 (2005).

274. Lu, Q. *et al.* The effects of aromatase inhibitors and antiestrogens in the nude mouse model. *Breast Cancer Res. Treat.* **50**, 63–71 (1998).

275. Klein, K. O. *et al.* Use of ultrasensitive recombinant cell bioassay to measure estrogen levels in women with breast cancer receiving the aromatase inhibitor, letrozole. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 2658–2660 (1995).

276. Dowsett, M. *et al.* In vivo measurement of aromatase inhibition by letrozole (CGS 20267) in postmenopausal patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1511–5 (1995).

277. Geisler, J., Haynes, B., Anker, G., Dowsett, M. & Lønning, P. E. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast

cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J. Clin. Oncol.* **20**, 751–7 (2002).

278. Geisler, J. *et al.* Letrozole is Superior to Anastrozole in Suppressing Breast Cancer Tissue and Plasma Estrogen Levels. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6330–6335 (2008).

279. Iveson, T. J. *et al.* Phase I study of the oral nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 20267 in postmenopausal patients with advanced breast cancer. *Cancer Res.* **53**, 266–70 (1993).

280. Tominaga, T. *et al.* 373 Phase II trial of letrozole (a novel oral nonsteroidal aromatase inhibitor) in postmenopausal patients with advanced or recurrent breast cancer. *Eur. J. Cancer* **31**, S81 (1995).

281. Lipton, A. *et al.* Letrozole (CGS 20267). A phase I study of a new potent oral aromatase inhibitor of breast cancer. *Cancer* **75**, 2132–2138 (1995).

282. Bisagni, G. *et al.* Letrozole, a new oral non-steroidal aromastase inhibitor in treating postmenopausal patients with advanced breast cancer. A pilot study. *Ann. Oncol.* **7**, 99–102 (1996).

283. Dombernowsky, P. *et al.* Letrozole, a new oral aromatase inhibitor for advanced breast cancer: double-blind randomized trial showing a dose effect and improved efficacy and tolerability compared with megestrol acetate. *J. Clin. Oncol.* **16**, 453–61 (1998).

284. Mouridsen, H. *et al.* Phase III study of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy of advanced breast cancer in postmenopausal women: analysis of survival and update of efficacy from the International Letrozole Breast Cancer Group. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2101–2109 (2003).

285. Rugo, H. S. *et al.* Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with extended follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* **174**, 719–729 (2019).

286. The Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group A Comparison of Letrozole and Tamoxifen in Postmenopausal Women with Early Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2747–2757 (2005).

287. The Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group Letrozole Therapy Alone or in Sequence with Tamoxifen in Women with Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 766–776 (2009).

288. Goss, P. E. *et al.* A Randomized Trial of Letrozole in Postmenopausal Women after Five Years of Tamoxifen Therapy for Early-Stage Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1793–1802 (2003).

289. Goss, P. E. *et al.* Randomized Trial of Letrozole Following Tamoxifen as Extended Adjuvant Therapy in Receptor-Positive Breast Cancer: Updated Findings from NCIC CTG MA.17. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1262–1271 (2005).

290. Jin, H., Tu, D., Zhao, N., Shepherd, L. E. & Goss, P. E. Longer-term outcomes of letrozole versus placebo after 5 years of tamoxifen in the NCIC CTG MA.17 trial: analyses adjusting for treatment crossover. *J. Clin. Oncol.* **30**, 718–21 (2012).

291. Goss, P. E. *et al.* Extending Aromatase-Inhibitor Adjuvant Therapy to 10 Years. *N. Engl. J. Med.* **375**, 209–219 (2016).

292. Mamounas, E. P. *et al.* Use of letrozole after aromatase inhibitor-based therapy in postmenopausal breast cancer (NRG Oncology/NSABP B-42): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **20**, 88–99 (2019).

293. Perrone, F. *et al.* Adjuvant zoledronic acid and letrozole plus ovarian function suppression in premenopausal breast cancer: HOBOE phase 3 randomised trial. *Eur. J. Cancer* (2019).doi:10.1016/j.ejca.2019.05.004

294. Ellis, M. J. *et al.* Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3808–16 (2001).

295. Thorne, C. Management of arthralgias associated with aromatase inhibitor therapy. *Curr. Oncol.* **14 Suppl 1**, S11-9 (2007).

296. Fontaine, C. *et al.* Tolerance of adjuvant letrozole outside of clinical trials. *The Breast* **17**, 376–381 (2008).

297. Crew, K. D. *et al.* Prevalence of joint symptoms in postmenopausal women taking aromatase inhibitors for early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3877–3883 (2007).

298. Mao, J. J. *et al.* Patterns and risk factors associated with aromatase inhibitor-related arthralgia among breast cancer survivors. *Cancer* **115**, 3631–3639 (2009).

299. Henry, N. L. *et al.* A prospective study of aromatase inhibitor-associated musculoskeletal symptoms and abnormalities on serial high-resolution wrist ultrasonography. *Cancer* **116**, 4360–4367 (2010).

300. Kadakia, K. C. *et al.* Patient-Reported Outcomes and Early Discontinuation in Aromatase Inhibitor-Treated Postmenopausal Women With Early Stage Breast Cancer. *Oncologist* **21**, 539–46 (2016).

301. Thomas, R. *et al.* Giving patients a choice improves quality of life: a multi-centre, investigator-blind, randomised, crossover study comparing letrozole with anastrozole. *Clin. Oncol.* **16**, 485–491 (2004).

302. Lee, H.-R., Kim, T.-H. & Choi, K.-C. Functions and physiological roles of two types of estrogen

receptors, ERα and ERβ, identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab. Anim. Res.* **28**, 71 (2012).

303. Elisaf, M. S. *et al.* Effect of letrozole on the lipid profile in postmenopausal women with breast cancer. *Eur. J. Cancer* **37**, 1510–3 (2001).

304. Harper-Wynne, C. *et al.* Effects of the Aromatase Inhibitor Letrozole on Normal Breast Epithelial Cell Proliferation and Metabolic Indices in Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomarkers* **11**, 614–621 (2002).

305. Heshmati, H. M. *et al.* Role of Low Levels of Endogenous Estrogen in Regulation of Bone Resorption in Late Postmenopausal Women. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 172–178 (2002).

306. Shien, T. *et al.* Serum lipid and bone metabolism effects of Toremifene vs. Letrozole as adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer patients: results of a multicenter open randomized study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **81**, 269–275 (2018).

307. Wasan, K. M. *et al.* The influence of letrozole on serum lipid concentrations in postmenopausal women with primary breast cancer who have completed 5 years of adjuvant tamoxifen (NCIC CTG MA.17L). *Ann. Oncol.* **16**, 707–715 (2005).

308. DeCensi, A. *et al.* Bone mineral density and circulating biomarkers in the BIG 1-98 trial comparing adjuvant letrozole, tamoxifen and their sequences. *Breast Cancer Res. Treat.* **144**, 321–329 (2014).

309. Perez, E. A. *et al.* Effect of letrozole versus placebo on bone mineral density in women with primary breast cancer completing 5 or more years of adjuvant tamoxifen: a companion study to NCIC CTG MA.17. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3629–35 (2006).

310. Nuzzo, F. *et al.* Bone effect of adjuvant tamoxifen, letrozole or letrozole plus zoledronic acid in early-stage breast cancer: the randomized phase 3 HOBOE study. *Ann. Oncol.* **23**, 2027–2033 (2012).

311. Safra, T. *et al.* The Protective Effect of Zoledronic Acid on Bone Loss in Postmenopausal Women with Early Breast Cancer Treated with Sequential Tamoxifen and Letrozole: A Prospective, Randomized, Phase II Trial. *Oncology* **81**, 298–305 (2011).

312. Sioufi, A. *et al.* Absolute bioavailability of letrozole in healthy postmenopausal women. *Biopharm. Drug Dispos.* **18**, 779–789 (1997).

313. US Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Letrozole clinical pharmacology and biopharmaceutics review. at <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/20726_FEMARA

2.5MG_BIOPHARMR.PDF>

314. Pfister, C. U. *et al.* Effect of age and single versus multiple dose pharmacokinetics of letrozole (Femara®) in breast cancer patients. *Biopharm. Drug Dispos.* **22**, 191–197 (2001).

315. Jeong, S., Woo, M. M., Flockhart, D. A. & Desta, Z. Inhibition of drug metabolizing cytochrome P450s by the aromatase inhibitor drug letrozole and its major oxidative metabolite 4,4′-methanol-bisbenzonitrile in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **64**, 867–875 (2009).

316. Desta, Z. *et al.* Plasma letrozole concentrations in postmenopausal women with breast cancer are associated with CYP2A6 genetic variants, body mass index, and age. *Clin. Pharmacol. Ther.* **90**, 693–700 (2011).

317. Colussi, D. M., Parisot, C. Y. & Lefèvre, G. Y. Plasma Protein Binding of Letrozole, a New Nonsteroidal Aromatase Enzyme Inhibitor. *J. Clin. Pharmacol.* **38**, 727–735 (1998).

318. Miyajima, M. *et al.* Investigation of the effect of active efflux at the blood-brain barrier on the distribution of nonsteroidal aromatase inhibitors in the central nervous system. *J. Pharm. Sci.* **102**, 3309–19 (2013).

319. Dave, N., Gudelsky, G. A. & Desai, P. B. The pharmacokinetics of letrozole in brain and brain tumor in rats with orthotopically implanted C6 glioma, assessed using intracerebral microdialysis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72**, 349–357 (2013).

320. Dave, N. *et al.* Preclinical Pharmacological Evaluation of Letrozole as a Novel Treatment for Gliomas. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 857–864 (2015).

321. Murai, K., Yamazaki, H., Nakagawa, K., Kawai, R. & Kamataki, T. Deactivation of anti-cancer drug letrozole to a carbinol metabolite by polymorphic cytochrome P450 2A6 in human liver microsomes. **39**, 795–802 (2009).

322. Femara - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (eMC). at <https://www.medicines.org.uk/emc/product/1029/smpc>

323. Sioufi, A. *et al.* Comparative Bioavailability of Letrozole Under Fed And Fasting Conditions in 12 Healthy Subjects After a 2.5 mg Single Oral Administration. *Biopharm. Drug Dispos.* **18**, 489–497 (1997).

324. Tanii, H., Shitara, Y. & Horie, T. Population pharmacokinetic analysis of letrozole in Japanese postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **67**, 1017–1025 (2011).

325. Borrie, A. E. *et al.* Letrozole concentration is associated with CYP2A6 variation but not with arthralgia in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **172**, 371–379 (2018).

326. FDA *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. at <www.fda.gov/medwatch.>

327. Pelkonen, O., Rautio, A., Raunio, H. & Pasanen, M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* **144**, 139–147 (2000).

328. Tanner, J.-A. & Tyndale, R. F. Variation in CYP2A6 Activity and Personalized Medicine. *J. Pers. Med.* **7**, (2017).

329. Ho, M. *et al.* Association of Nicotine Metabolite Ratio and CYP2A6 Genotype With Smoking Cessation Treatment in African-American Light Smokers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **85**, 635–643 (2009).

330. Park, S. L. *et al.* Genetic determinants of CYP2A6 activity across racial/ethnic groups with different risks of lung cancer and effect on their smoking intensity. *Carcinogenesis* **37**, 269–279 (2016).

331. Chenoweth, M. J., O'Loughlin, J., Sylvestre, M.-P. & Tyndale, R. F. CYP2A6 slow nicotine metabolism is associated with increased quitting by adolescent smokers. *Pharmacogenet. Genomics* **23**, 232 (2013).

332. Jin, S.-J. *et al.* The pharmacokinetics of letrozole: association with key body mass metrics. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **50**, 557–565 (2012).

333. Pfister, C. U. *et al.* Development, Application and Comparison of an Enzyme Immunoassay and a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of the Aromatase Inhibitor CGS 20 267 in Biological Fluids. *J. Pharm. Sci.* **83**, 520–524 (1994).

334. Marfil, F., Pineau, V., Sioufi, A. & Godbillon, S. J. High-performance liquid chromatography of the aromatase inhibitor, letrozole, and its metabolite in biological fluids with automated liquid-solid extraction and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **683**, 251–8 (1996).

335. Beer, B. *et al.* Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of tamoxifen, anastrozole, and letrozole in human plasma and its application to a clinical study. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 1791–1800 (2010).

336. Rodríguez, J., Castañeda, G. & Muñoz, L. Rapid determination of letrozole, citalopram and their metabolites by high performance liquid chromatography-fluorescence detection in urine: Method validation and application to real samples. *J. Chromatogr. B* **913–914**, 12–18 (2013).

337. Shao, R. *et al.* Development and validation of a rapid LC-MS/MS method to quantify letrozole in human plasma and its application to therapeutic drug monitoring. *Biomed. Chromatogr.* **30**, 632–637 (2016).

338. Vanol, P. G. *et al.* SPE–UPLC–MS/MS assay for determination of letrozole in human plasma and its application to bioequivalence study in healthy postmenopausal Indian women. *J. Pharm. Anal.* **6**, 276–281 (2016).

339. Precht, J. C. *et al.* Simultaneous quantitative analysis of letrozole, its carbinol metabolite, and carbinol glucuronide in human plasma by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 301–308 (2012).

340. Henry, N. L. *et al.* Predictors of aromatase inhibitor discontinuation as a result of treatment-emergent symptoms in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **30**, 936–42 (2012).

341. Hertz, D. L. *et al.* Variable aromatase inhibitor plasma concentrations do not correlate with circulating estrogen concentrations in post-menopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **165**, 659–668 (2017).

342. Groenland, S. L. *et al.* Therapeutic Drug Monitoring of Oral Anti-Hormonal Drugs in Oncology. *Clin. Pharmacokinet.* **58**, 299–308 (2019).

343. Sheiner, L. B., Rosenberg, B. & Melmon, K. L. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput. Biomed. Res.* **5**, 441–459 (1972).

344. Mould, D. R. & Upton, R. N. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* **2**, e38 (2013).

345. Bonate, P. L. *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation.* (Springer, 2014).

346. Savic, R. M. & Karlsson, M. O. Importance of Shrinkage in Empirical Bayes Estimates for Diagnostics: Problems and Solutions. *AAPS J.* **11**, 558–569 (2009).

347. Yu, H. *et al.* Integrated semi-physiological pharmacokinetic model for both sunitinib and its active metabolite SU12662. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **79**, 809–819 (2015).

348. Bertrand, J., Laffont, C. M., Mentré, F., Chenel, M. & Comets, E. Development of a complex parent-metabolite joint population pharmacokinetic model. *AAPS J.* **13**, 390–404 (2011).

349. Crews, K. R. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Cytochrome P450 2D6 Genotype and Codeine Therapy: 2014 Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 376–382 (2014).

350. Goetz, M. P. *et al.* First-in-Human Phase I Study of the Tamoxifen Metabolite Z-Endoxifen in Women With Endocrine-Refractory Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **35**, 3391–3400 (2017).

351. Roché, H. *et al.* Abstract P3-12-10: First 6-month report of the longitudinal PHACS study (Pharmacology and Hormonotherapy (HT) for Adjuvant breast Cancer (BC) Study, NCT01127295). In *Poster Sess. Abstr.* **78**, P3-12-10-P3-12–10 (American Association for Cancer Research, 2018).

352. White-Koning, M. *et al.* Abstract P3-12-03: Impact of genetic polymorphisms on plasma levels of tamoxifen and its metabolites and toxicity: 6-months results of the adjuvant breast cancer longitudinal PHACS study (NCT01127295). In *Poster Sess. Abstr.* **78**, P3-12-03-P3-12–03 (American Association for Cancer Research, 2018).

353. Thomas, F. *et al.* Abstract P3-12-07: Pharmacogenetic determinants of aromatase inhibitors pharmacokinetics and side effects: 6-month results of the adjuvant breast cancer longitudinal PHACS study (NCT01127295). In *Poster Sess. Abstr.* **78**, P3-12-07-P3-12–07 (American Association for Cancer Research, 2018).

TITLE: Pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and letrozole in patients with hormone-dependent breast cancer

---

SUMMARY: Tamoxifen and aromatase inhibitors are the main therapeutic options for adjuvant treatment of hormone-dependent breast cancer. High inter-individual variability of efficacy and toxicity of these drugs is observed which may be related to the variability of plasma drug concentrations. In the case of tamoxifen, its pharmacological activity depends on the formation of active metabolites, mainly endoxifen, via the cytochromes P450 (CYP2D6, CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19). Concerning letrozole, it is metabolised via the CYP2A6 and CYP3A4 isoenzymes. The variable activity of CYP, due to genetic polymorphisms or concomitant use of CYP inhibitors or inducers, may impact the plasma exposure to the active compounds and *in fine*, the efficacy and toxicity of the treatment.

The pharmacokinetic-pharmacogenetic analyses of the data from first follow-up visit in the PHACS study (prospective, multicenter, national, 2000 patients, 6 follow-up visits during 3 years) demonstrated the impact of CYP2D6 phenotype, *CYP3A4*22*, *CYP2C19*2*, and *CYP2B6*6* genotypes and of the concomitant use of CYP2D6 inhibitors on tamoxifen metabolism. The longitudinal pharmacokinetic data for tamoxifen and its metabolites (6 to 36 months follow-up visits) were analysed simultaneously using non-linear mixed effects modelling (population approach). A joint pharmacokinetic model for tamoxifen and six metabolites was developed and validated. The significant covariates in the final model were: CYP2D6 phenotype, *CYP3A4*22* and *CYP2B6*6* genotypes, CYP2D6 inhibitors, age and body weight. Simulations of alternative dosing regimens were performed to propose an individualised dose of tamoxifen for patients at risk of subtherapeutic exposure to endoxifen.

The pharmacokinetic-pharmacogenetic data for letrozole were analysed using the population approach. A one-compartment model was developed and validated. CYP2A6 activity was significantly associated with letrozole clearance. The model was used for identification of non-adherent patients based on their steady-state plasma concentrations.

AUTEUR: Alicja PUSZKIEL

TITRE: Pharmacocinétique et pharmacogénétique du tamoxifène et du létrozole chez les patientes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant

DIRECTEURS DE THESE: Dr Mélanie WHITE-KONING et Dr Fabienne THOMAS

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE: le 4 novembre 2019, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse

---

RESUME: Le tamoxifène et les inhibiteurs de l'aromatase constituent les principaux médicaments en hormonothérapie utilisées dans le traitement adjuvant des cancers du sein hormono-dépendants. Une grande variabilité de l'efficacité et de la toxicité de ces traitements est observée et pourrait être liée à des différences de concentration du médicament au niveau du plasma. Dans le cas du tamoxifène, son activité pharmacologique est dépendante de la formation de métabolites actifs, notamment de l'endoxifène, par l'intermédiaire des cytochromes de la famille P450 (CYP2D6, CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19). Le létrozole, quant à lui, est métabolisé par le CYP2A6 et le CYP3A4. La variabilité de l'activité enzymatique de ces enzymes, due notamment aux polymorphismes génétiques et à la prise concomitante d'inhibiteurs ou d'inducteurs enzymatiques, pourrait avoir un impact sur les concentrations plasmatiques et *in fine*, sur l'efficacité et la toxicité du traitement.

Les analyses pharmacocinétiques-pharmacogénétiques sur les données de la première visite de suivi de l'étude PHACS (étude prospective, multicentrique, nationale, 2000 patientes, 6 visites de suivi pendant 3 ans) ont démontré l'impact du phénotype CYP2D6, génotypes *CYP3A4*22*, *CYP2C19*2* et *CYP2B6*6* ainsi que de la prise concomitante des inhibiteurs de CYP2D6 sur la métabolisation du tamoxifène. L'analyse simultanée des concentrations plasmatiques du tamoxifène et de ses métabolites sur une durée de 3 ans (visites de 6 à 36 mois) a été effectuée par des modèles non-linéaires à effets mixtes (approche de pharmacocinétique de population). Un modèle pharmacocinétique décrivant les concentrations de tamoxifène et de six métabolites a été développé et validé. Les covariables significatives dans le modèle final étaient: le phénotype CYP2D6, les génotypes *CYP3A4*22* et *CYP2B6*6*, les inhibiteurs de CYP2D6, l'âge et le poids. Des simulations de schémas d'administration alternatifs ont été effectuées afin de proposer des doses adaptées aux patientes à risque de sous-exposition à l'endoxifène.

Les données pharmacocinétiques et pharmacogénétiques du létrozole ont été analysées par approche de pharmacocinétique de population. Un modèle monocompartimental a été développé et validé. L'activité de CYP2A6 était significativement associée à la clairance du létrozole. Le modèle pharmacocinétique a été utilisé pour identifier les patientes non-adhérentes au traitement en se basant sur leurs concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre.

TITRE ET RESUME EN ANGLAIS: voir au recto de la dernière page de la thèse

MOTS CLES: Cancer du sein hormonodépendant, Tamoxifène, Létrozole, Pharmacocinétique, Pharmacogénétique

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE: Sciences de la vie et de la santé – Pharmacologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE:

Equipe 14, Inserm U1037

Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT)

2 avenue Hubert Curien

31100 Toulouse