

ACADEMIE D'ORLEANS-TOURS

UNIVERSITE DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2022

N°82

**THESE D'EXERCICE
pour le
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par
Langevin Marion
Née le 8 novembre 1993 à Pithiviers (45)

PRESENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 8 novembre 2022

**Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase : Impact
des conditions préanalytiques sur la prise en charge thérapeutique
des patients traités par fluoropyrimidines.**

Jury

Président : Gildas Prié, Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie-TOURS

Membres :

Hugo Alarcan, Pharmacien, Assistant hospitalier universitaire (AHU),
CHRU-TOURS

Laura Foucault-Fruchard, Pharmacien, Praticien Hospitalier, Maître de
conférences, CHRU-TOURS

Claude Vallet, Pharmacien d'officine, Docteur en pharmacie, Ascoux

ANNEE : 2021 - 2022

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUESOCQUE-DELAIE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

7 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDEAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistiques & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHÉMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

37 MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAIE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
ODIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

2 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

2 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

HILALI	Soukaïna	PHARMACOGNOSIE
--------	----------	----------------

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 08/11/2022

L'étudiant

Marion Langevin

Le Doyen de la Faculté
Professeur Denys BRAND

Remerciements

À mon président de jury, Monsieur Gildas Prié,
Merci de me faire l'honneur de présider cette thèse. Je tiens à vous remercier pour votre bienveillance et votre disponibilité.

À ma directrice de thèse, Mme Foucault-Fruchard Laura,
Merci d'avoir accepté de reprendre la direction de ma thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre gentillesse, vos conseils et de m'avoir guidé lors de mes doutes.

À mon directeur de thèse, Mr Alarcan Hugo,
Merci d'avoir accepté de prendre la direction de ma thèse. Un grand merci pour ton aide précieuse, ta disponibilité, ta bienveillance et tes conseils.
Merci de m'avoir fait confiance, je suis fière d'être ta première thésarde ! Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière.

À monsieur Vallet Claude, membre du jury,
Merci d'avoir accepté de juger mon travail et d'assister à ma soutenance. Je vous remercie pour votre gentillesse et vos encouragements au cours de ces derniers mois.
Je tiens à vous remercier de m'avoir fait confiance et de m'accueillir dans votre pharmacie.

À Mme Barin Chantal,
Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse, de m'avoir accompagné dans mes recherches et lors de la collecte des données cliniques.

À l'équipe de la pharmacie Vallet : Julie, Émilie, Hélène et Ilana
Un grand merci les filles pour votre accueil, votre bienveillance et vos conseils précieux.
Merci pour votre soutien et vos encouragements.
C'est un réel plaisir de travailler à vos côtés.

À Mr et Mme Gomez et toute l'équipe de la pharmacie Gomez,
Merci de la confiance que vous m'avez accordé au cours des 5 années passées avec vous.
Je vous remercie de m'avoir fait découvrir ce beau métier et transmis votre passion.
Merci à l'équipe pour vos précieux conseils, votre bienveillance et votre bonne humeur.

À Maud Maillard,
Je te remercie pour tous tes conseils, ta disponibilité et ta gentillesse même à l'autre bout du monde. Je te souhaite une bonne continuation pour la suite de ta carrière.

À mes parents,
Merci pour votre amour et votre soutien pendant toutes ces années. Merci papa d'avoir toujours su me faire rire et maman d'avoir toujours su me rassurer.
Merci de m'avoir fait confiance pendant toutes ces années et surtout ces derniers mois.
Merci d'avoir cru en moi et en mes projets jusqu'au bout.
Je vous dois en grande partie ma réussite, sans vous, je ne serai jamais devenu ce que je suis.
Je vous aime.

À ma petite sœur Océane,
À tous nos souvenirs d'enfances, nos bêtises, notre folie et notre complicité. Je serai toujours là pour toi. Je t'aime ma petite mouette.

À mes beaux-parents, Fabrice et Sabine,
Mes parents de substitution ! Un grand merci pour votre soutien tout au long de ces 7 dernières années. Merci de m'avoir adopté comme votre fille dans la famille Martot !
Merci Fabrice et Sabine pour votre disponibilité, vos conseils, la correction de mes fautes d'orthographe et les soirées crêpes !

À Bastien, mon amour,
Merci d'être toujours là pour moi, que ce soit dans les bons ou les mauvais moments.
Un grand merci pour ton soutien lors de ces derniers mois enclins aux doutes et au stress.
Pour toutes tes relectures et la correction des « quelques » fautes d'orthographe !
Il me tarde de pouvoir enfin entreprendre tous nos projets communs. À nos huit années passées ensemble et à notre Sandro.
Je t'aime.

À mes grands-parents,
Merci pour votre soutien au quotidien et vos encouragements.

À mes amies,
Merci pour toutes ces années sur les bancs de la fac qui seront inoubliables.
Un merci à Lucie, ma binôme de fac, pour tous les fous rires, nos soirées révisions et pour ton soutien tout au long de ces années.
À Marie, merci pour ta gentillesse et ton amitié. Notre soutien mutuel durant ces derniers mois a été crucial.
À Laura et Élodie, merci pour votre soutien et votre bienveillance.

Table des matières

Partie A : État des connaissances.....	13
I. Les fluoropyrimidines	13
1) Le 5-Fluorouracile	13
a. Mécanisme d'action.....	13
b. La capécitabine et le tégafer.....	15
c. Indications	17
d. Propriétés pharmacocinétiques du 5-FU	18
II. Toxicité	19
a. Toxicités digestives	20
b. Toxicités hématologiques	21
c. Cardiotoxicités	21
d. Autres toxicités	21
e. Antidote	21
III. La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD)	22
1) Généralités	22
2) Impact des déficits en DPD	22
3) Détection des déficits en DPD et adaptation posologique	23
a. Le génotypage (test pharmacogénétique).....	23
b. Le phénotypage	25
4) Personnalisation du traitement selon l'activité de la DPD	26
5) Le dépistage en pratique en France	29
6) Les conditions pré-analytiques	30
PARTIE B : Travail personnel.....	31
I. Objectif.....	31
II. Matériel et méthode	31
1) Planning de l'étude et collecte des données	31
2) Évaluation des paramètres préanalytiques.....	32
3) Variabilité intra-individuelle.....	33
4) Analyse statistique.....	33
III. Résultats.....	34
1) Type d'anticoagulants EDTA/Hépariné	34
2) Stabilité dans le sang total	35
3) Stabilité dans le plasma avant centrifugation	36
a. Stabilité de U et UH2 dans le plasma à +4°C et à température ambiante (TA)	36
b. Stabilité dans le plasma pendant la congélation	37
c. Stabilité du plasma durant des cycles de congélation/décongélation.....	38
d. Variabilité intra-individuelle	40
IV. Discussion	42
a. Les échantillons transportés à température ambiante devraient être pris en charge dans un délai <1h30	42
b. Les échantillons centrifugés devraient être congelés dans les plus brefs délais.	43

c.	Les échantillons congelés peuvent être conservés longtemps.....	43
d.	L'uracilémie est plus élevée sur tube EDTA	44
e.	Attention à la variabilité inter-laboratoire.....	44
e.	Variabilité intra-individuelle	44
V.	<i>Conclusion et perspectives</i>	46
VI.	<i>Bibliographie</i>	47

Liste des figures :

Figure 1: Structure des fluoropyrimidines	13
Figure 2: Métabolisme du 5-FU.	14
Figure 3 : Biotransformation de la capécitabine en 5-FU.	15
Figure 4: Biostranformation de l'UFT en 5-FU.	16
Figure 5: Illustration du principe de marge thérapeutique étroite.....	20
Figure 6: Localisation du gène DYPD.....	22
Figure 7: Adaptation posologique en fonction du phénotypage et génotypage	28
Figure 8: Impact du tube collecteur sur les concentrations d'U, d'UH2 et le rapport UH2/U (n=16)	34
Figure 9 : Conservation des échantillons de sang total à température ambiante en fonction du temps (heures) (n=22)	35
Figure 10: Conservation des échantillons de sang total à 4°C en fonction du temps (heures) (n=22)	35
Figure 11: Évolution de la concentration de U et UH2 dans le plasma à TA en fonction du temps (heures) (n=8).	36
Figure 12: Évolution de la concentration de U et UH2 dans le plasma à +4°C en fonction du temps (heures) (n=8).	36
Figure 13: Concentration d'U et UH2 mesurée après un cycle de congélation à -20°C et -80°C	37
Figure 14 : Concentration plasmatique en U et UH2 en fonction du nombre de décongélations.....	39

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Posologie des fluoropyrimidines utilisée en cancérologie	18
Tableau 2: Principaux variants DPYD recherchés et fréquences dans les populations d'origine caucasienne.	25
Tableau 3: Activité enzymatique des variants fonctionnels du gène DPYD	26
Tableau 4: Phénotype DPD prédit en fonction du score d'activité	26
Tableau 5: Impact de l'anticoagulant sur les concentrations d'U, UH2 et le ratio UH2/U.....	34
Tableau 6: Biais moyen d'U, UH2 et UH2/U en fonction de la durée et de la température de congélation	
Tableau 7: Variations de la concentration plasmatique en U et UH2 (%) entre les cycles de décongélation	39
Tableau 8: Calcul du coefficient de variation en pourcentage pour l'ensemble des patients conformes et non conformes	40
Tableau 9: Calcul du coefficient de variation en pourcentage pour les patients conformes aux conditions préanalytiques.....	40
Tableau 10: Calcul du coefficient de variation en pourcentage pour les patients non conformes aux conditions préanalytiques.....	40
Tableau 12: Variabilité intra-individuelle de U et du rapport UH2/U pour 9 patients avec des conditions préanalytiques respectées.	41

Liste des abréviations :

5-FU: 5-fluorouracile

5-FUH2: 5-fluorohydouracile

5-FUPA: acide 5-fluorouréidopropionique

5-FudR: 5-fluorodésoxyuridine

5-FdUMP: 5-fluorodésoxyuridine monophosphate

5-FdUDP: 5-fluorodésoxyuridine diphosphonate

5-FdUTP: 5-fluorodésoxyuridine triphosphonate

5-FUMP: 5-fluorouridinemonophosphate

5-FUDP: 5-fluorouridinediphosphate

5-FUTP: 5-fluorouridinetriphosphate

5'-DFUR: doxifluridine

5'-DFCR: 5'désoxy-5-fluorocytidine

ADN: acide désoxyribonucléique

ANSM: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARN: acide ribonucléique

ATU: autorisation temporaire d'utilisation

CE: carboxylestérase

CyD : cytidinedesaminase

CV : Coefficient de variation

DPD: dihydropyrimidine déshydrogénase

DPYD: gène de la dihydropyrimidine déshydrogénase

FBAL: α -fluoro- β -alanine

FDA: Food and Drug Administration (Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux)

HAS: Haute Autorité de Santé

INCa: Institut National du Cancer

OPRT: orotatephosphoribosyl transferase

Protocole FEC: 5-Fluorouracile-Epirubicine-Cyclophosphamide

SNP: single nucleotide polymorphism (polymorphisme nucléotidique)

T: thymidine

TA: température ambiante

TMP: thymidine monophosphate

U: uracile

UMP: uracile monophosphate

UTP: uracile triphosphate

Partie A : État des connaissances

I. Les fluoropyrimidines

La classe pharmacologique des fluoropyrimidines est utilisée comme chimiothérapie dans le traitement de nombreux cancers, principalement digestifs, du sein ou encore de la sphère Oto-Rhino-Laryngologie (ORL). Les principaux représentants de cette classe sont le 5-fluorouracile (5-FU) et ses pro-drogues orales, la capécitabine et la tégafur (Figure 1). Ce sont des antimétabolites, analogues des bases pyrimidiques utilisés comme antinéoplasiques.

Le chef de file est le 5-FU qui est utilisé depuis près d'un demi-siècle. C'est l'un des plus anciens médicaments anticancéreux et encore l'un des plus utilisés en France (1).

En effet, environ 80 000 personnes par an sont traitées par des chimiothérapies à base de 5-FU seul ou en association à d'autres anti-cancéreux (2).

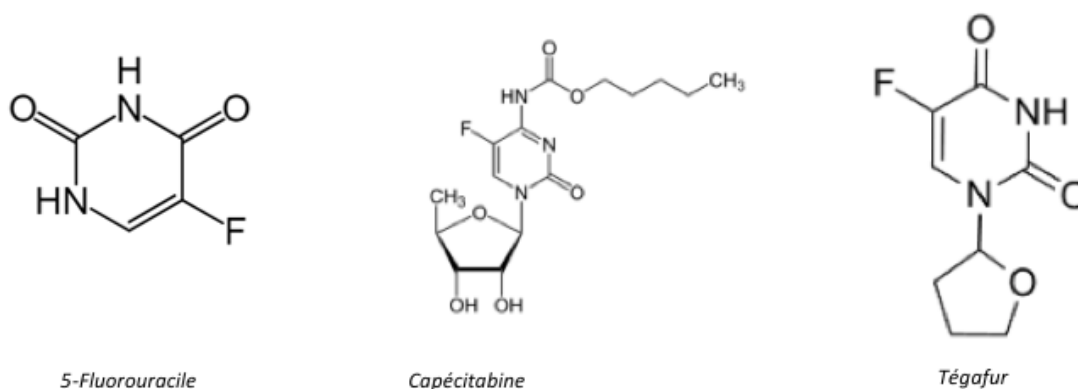


Figure 1: Structure des fluoropyrimidines

1) Le 5-Fluorouracile

En cancérologie, son indication peut être multiple, le 5-FU peut être utilisé pour des chimiothérapies néo-adjuvantes, adjuvantes ou métastatiques. Il possède également différentes voies d'administration : Perfusion en continu, bolus intraveineux et par voie orale (capécitabine et tégafur).

Le 5-FU comme la plupart des anticancéreux possède un index thérapeutique étroit.

a. Mécanisme d'action

Pour mieux comprendre l'action du 5-FU, nous allons nous intéresser à l'action de l'uracile. L'uracile est une base pyrimidique entrant dans la constitution de l'ARN. Elle est également le précurseur de la synthèse de la thymine (base nucléique de l'ADN) via sa transformation par la thymidylate synthétase. Cette molécule joue donc un rôle essentiel dans l'homéostasie du vivant.

Le 5-FU est un analogue fluoré de l'uracile. Il permet d'exercer plusieurs effets anti-métaboliques simultanément. D'une part, le 5-FU bloque la méthylation de l'uracile en thymine aboutissant à une inhibition de la synthèse de l'ADN. D'autre part, il est incorporé à la place de l'uracile dans l'ARN, entraînant des erreurs de lecture lors de la traduction (4).

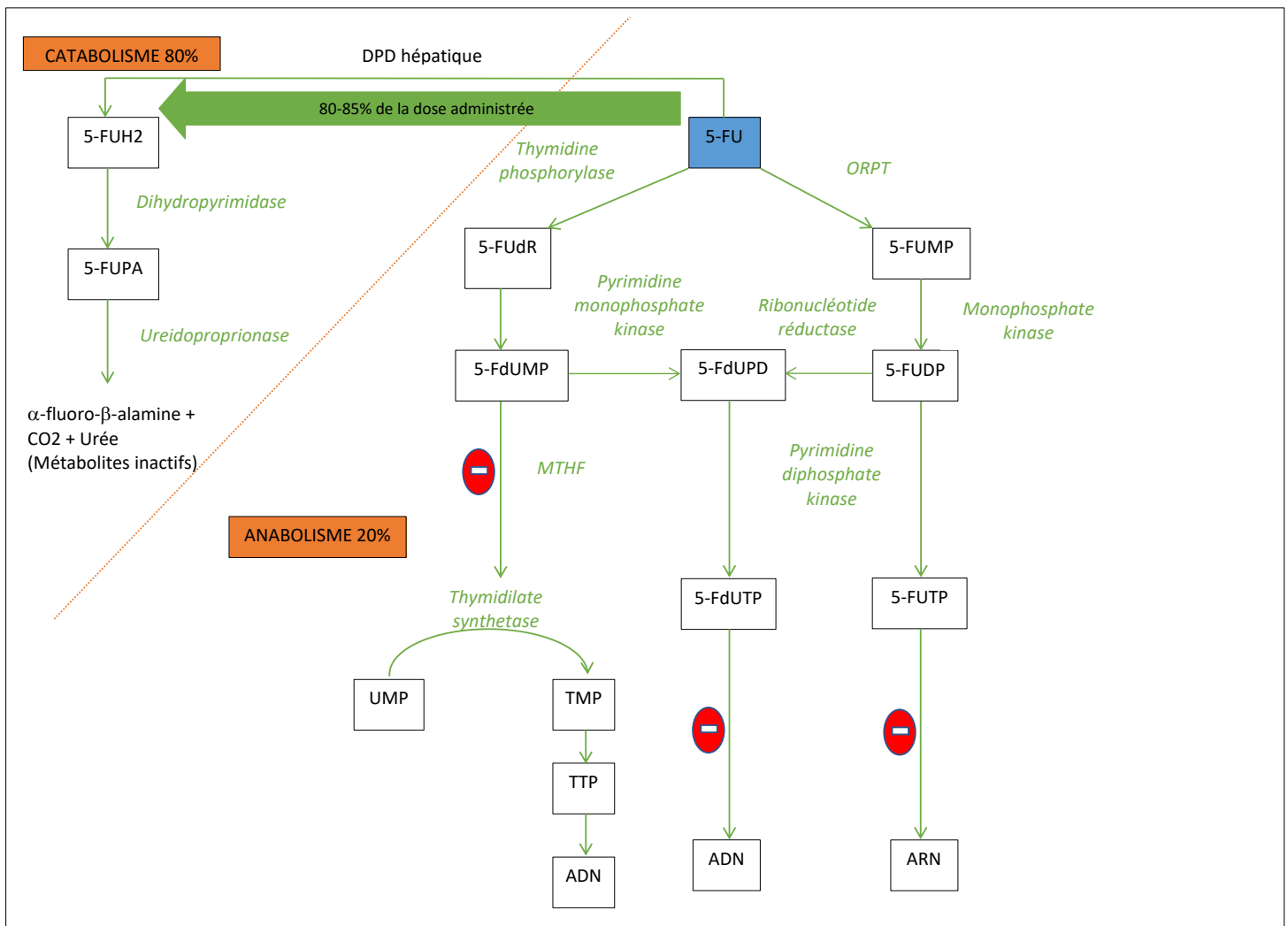


Figure 2: Métabolisme du 5-FU.

- **Premièrement** : le 5-FU est métabolisé en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) qui, en présence du 6-méthylénetetrahydrofolate, se lie à la thymidylate synthétase. Cette liaison crée un blocage de la méthylation de l'uracile en thymine, ce qui entraîne une inhibition de la synthèse d'ADN et donc un freinage de la prolifération cellulaire.
- **Deuxièmement** : le 5-FU est phosphorylé et triphosphaté pour devenir le 5-FUTP. Ce 5-FUTP est incorporé à la place de l'uracile dans les ARNs. Cette voie de métabolisation entraîne des erreurs de lecture du code génétique lors de la synthèse des protéines et des enzymes. Cela conduit à la production de co-enzymes inefficaces et de ribosomes immatures.
- **Troisièmement** : le 5-FU inhibe l'uridine phosphorylase, entraînant une inhibition de la synthèse d'ADN(2-4).

b. La capécitabine et le tégaful

Aujourd'hui, une seule fluoropyrimidine orale est disponible en France. Il s'agit de la capécitabine.

Une autre spécialité existe : Le tégaful (UFT association Tégaful/Uracile). Face à l'indisponibilité durable de l'UFT, il n'est plus commercialisé en France depuis 2013 (5,6).

Toutes deux sont des pro-drogues. Elles vont être transformées en 5-FU par différentes voies métaboliques : hépatique et rénale (figure 4 et 5). Une fois administrées par voie orale, leur profil pharmacodynamique est semblable à celui d'une perfusion continue de 5-FU (7,8).

Cependant, la capécitabine possède des caractéristiques pharmacocinétiques différentes du 5-FU (figure 4). La capécitabine traverse la barrière intestinale sans y subir de dégradation. Au niveau hépatique, elle est métabolisée en 5'DFCR (métabolite intermédiaire impliqué dans l'inhibition de la synthèse de l'ADN) par une carboxylestérase puis en 5'deoxy-5-fluoroxytidine (5'DFUR) par la cytidine désaminase dans le foie et les tissus tumoraux (7,8).

L'activation de la capécitabine suit plusieurs étapes enzymatiques. La formation du 5-FU se fait préférentiellement au niveau tumoral puisque la transformation finale de la capécitabine en 5-FU est médiée par la thymidine phosphorylase (figure 4). En effet, cette enzyme est surexprimée au niveau des cellules tumorales comparées aux cellules hépatiques (7,9). C'est pour cela que la concentration en 5-FU est en moyenne 3 fois plus élevée dans les cellules tumorales par rapport aux cellules hépatiques (10).

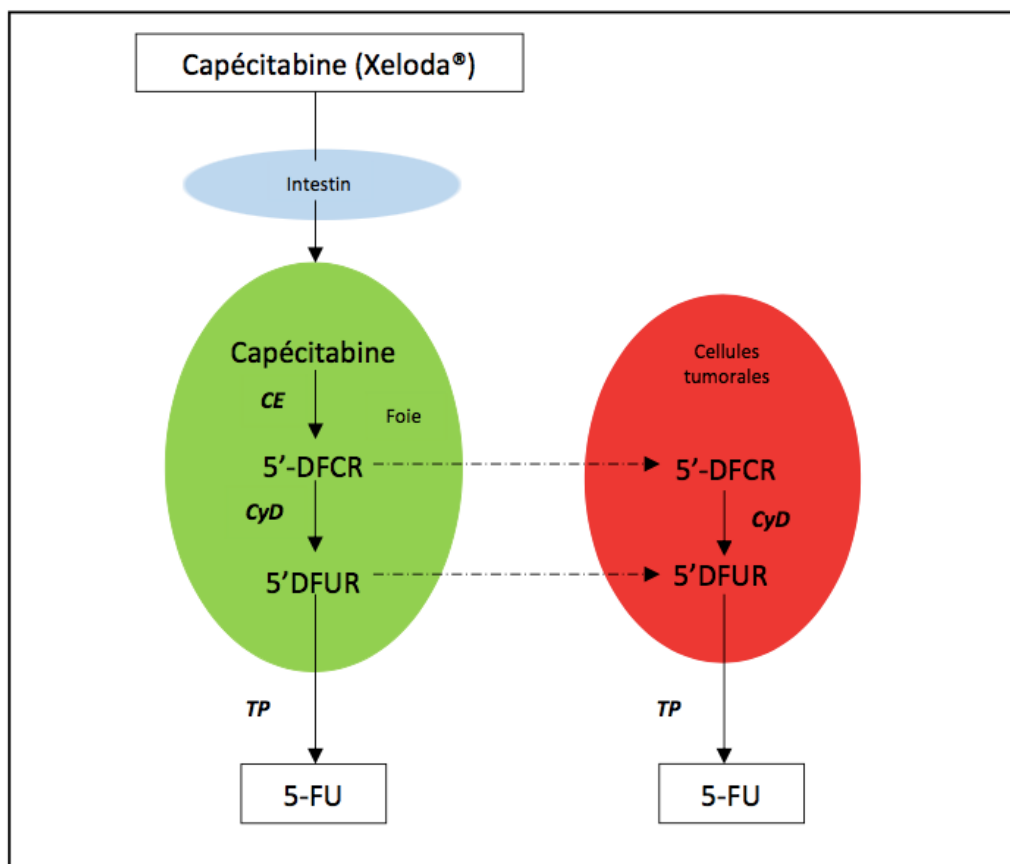


Figure 3 : Biotransformation de la capécitabine en 5-FU.

Pour le tégafur, il s'agit d'une association UFT® (Tégafur-Uracile). Le tégafur est un précurseur du 5-FU et l'uracile un substrat naturel de la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) (figure 5). L'UFT® est rapidement absorbé au niveau intestinal. Ensuite, le tégafur et l'uracile vont se séparer pour subir une métabolisation différente. Le tégafur va être métabolisé en 5-FU au niveau hépatique par le cytochrome P450 2A6. L'uracile permet une inhibition compétitive de la dégradation du 5-FU par la DPD, ce qui favorise la voie anabolique du 5-FU et donc la biodisponibilité. Elle permet ainsi d'augmenter la concentration disponible en principe actif (4,7,11).

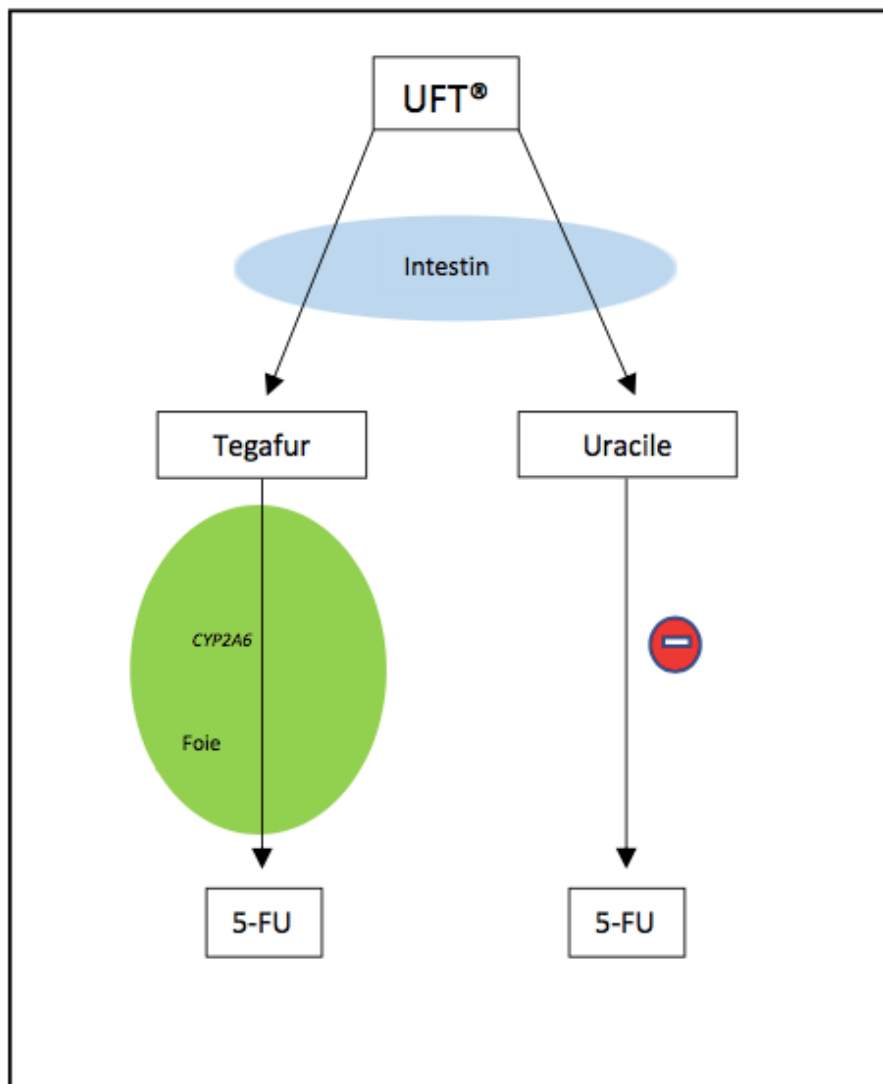


Figure 4: Biostratification de l'UFT en 5-FU.

c. Indications

Comme évoqué précédemment, environ 80 000 patients par an sont traités par fluoropyrimidines en France.

D'après le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) de ce médicament, les indications du 5-FU sont les suivantes :

- Adénocarcinomes digestifs évolués.
- Cancers colorectaux après résection en situation adjuvante.
- Adénocarcinomes mammaires après traitement locorégional ou lors des rechutes.
- Adénocarcinomes ovariens.
- Carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures et œsophagiennes.

Le 5-FU peut être administré seul ou en association. Le 5-FU ou la capécitabine sont utilisés dans différents protocoles de chimiothérapies en association à d'autres chimiothérapies (12,13). Voici une liste non exhaustive de protocoles utilisés en cancérologie :

- **FOLFOX** : 5-FU-Oxaliplatine (cancer colorectal)
- **FOLFORI** : 5-FU-Irinotécan-Bévacizumab (cancer colorectal)
- **FOLFORINOX** : 5-FU-Irinotécan-Oxiplastine (cancer colorectal)
- **XELOX** : Capécitabine-Oxaliplatine (cancer colorectal)
- **XELIRI** : Capécitabine-Irinotecan (cancer colorectal)
- **FAC** : 5-FU-Adriblastine-Cyclophosphamide (cancer du sein)
- **FEC** : 5-FU- Épirubicine-Cyclophosphamide (cancer du sein)
- **ECF** : Épirubicine-Cisplastine-5-Fluorouracile (cancer gastrique)

Les posologies du 5-FU sont très variables selon les protocoles utilisés, comme représentées dans le tableau 1 (2,4,14).

Tableau 1 : Posologie des fluoropyrimidines utilisée en cancérologie

Posologie	5-FU	Capécitabine
En monothérapie	400/600 mg/m ² /j 3 à 6 jours par mois	2500 mg/m ² /j en 2 prises pendant 14 jours. Avec un arrêt de 7 jours. (Cycle de 3 semaines)
En Association	300 à 600 mg/m ² /j 2 à 5 jours toutes les 3 à 4 semaines.	1500 à 1700 mg/ m ² /j en 2 prises pendant 14 jours. Avec un arrêt de 7 jours (Cycles de 3 semaines).
Autres	Perfusion en continu de 700 à 100 mg/m ² pendant 3 à 5 jours consécutifs.	
	Dans de nombreux protocoles le 5-FU est utilisé à diverses posologies jusqu'à 1500mg/m ²	

d. Propriétés pharmacocinétiques du 5-FU

- **Absorption**

Par voie orale, le 5-FU doit se présenter sous forme de pro-drogue car l'administration du 5-FU seul présente une absorption médiocre (15).

- **Distribution**

Le 5-FU possède une diffusion tissulaire très rapide et très sélective dans les tissus tumoraux, particulièrement ceux à croissance rapide (moelle et muqueuse intestinale). Dans ces tissus, 4 heures post injection, la concentration est 6 à 8 fois supérieure à celle des tissus à croissance normale. Au bout de 24 heures, la concentration en 5-FU dans les tissus sains est presque nulle contrairement aux tissus tumoraux où la concentration reste identique. Le 5-FU se lie de façon faible aux protéines plasmatiques (<30%) (4,8,16).

- **Métabolisation**

Le 5-FU est rapidement métabolisé dans l'organisme. Pour être actif, le 5-FU subit un métabolisme intracellulaire composé d'une voie anabolique afin d'obtenir des nucléotides actifs (comme décrit ci-dessus) et d'une voie catabolique qui assure la dégradation du 5-FU. Ce catabolisme est assuré par la Dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), enzyme codée par le gène *DPYD*. Au niveau hépatique, elle permet la dégradation du 5-FU en métabolites inactifs : La DPD dégrade plus de 80% de la dose de 5-FU administrée par voie injectable ou sous forme de pro-drogue orale (17).

Le 5-FU est réduit en 5-fluorohydouracile (5-FUH₂) via la DPD, puis par la dihydropyrimidase en acide 5-fluorouréidopropionique (5-FUPA) et enfin en α-fluoro-β-alanine (FBAL), (métabolite majeur inactif). Une faible fraction de 5-FU est réduite sous forme de fluor, urée et CO₂ (3,8,16).

- **Élimination**

La demi-vie plasmatique du 5-FU est rapide, de l'ordre de 6 minutes. Quelle que soit la voie d'administration, 60 à 95% du 5-FU sont éliminés dans les urines en 24 heures, dont 80% sous forme de α -fluoro- β -alanine (FBAL), 10% de 5-FU, 8% de FUPA, 2% d'ions fluorures et moins de 1% de FUH2. Le restant de 5-FU sera éliminé dans les 72 heures suivantes.

Cependant, les capacités d'élimination sont extrêmement variables d'un patient à un autre. Il existe plusieurs facteurs de variabilité interindividuelle de l'élimination du 5-FU : variations d'activité de la DPD d'origine génétique (polymorphismes du gène DYPD) ou non (insuffisance hépatique, rythme circadien, alimentation), les comorbidités associées (cachexie, obésité, insuffisance rénale), le sexe (clairance d'élimination diminuée d'environ 15% chez la femme), l'âge (diminution de l'élimination chez les personnes âgées) ou encore l'ethnicité (2,16,18,19).

II. Toxicité

Les fluoropyrimidines sont des médicaments cytotoxiques à marge thérapeutique étroite qui sont soumis à une grande variabilité interindividuelle en termes de tolérance. De faibles variations de dose ou de concentration peuvent entraîner une inefficacité ou l'apparition de toxicités, comme illustré par la figure 6. On estime entre 15 et 40% le risque de toxicité sévère de grade III et IV (2,20). La sévérité des événements indésirables observés est classée selon les grades du *Common Terminology Criteria For Adverse Events* (CTCAE).

- Le grade I : léger
- Le grade II : modéré
- Le grade III : sévère
- Le grade IV : mettant en jeu le pronostic vital
- Le grade V : décès lié à l'évènement indésirable.

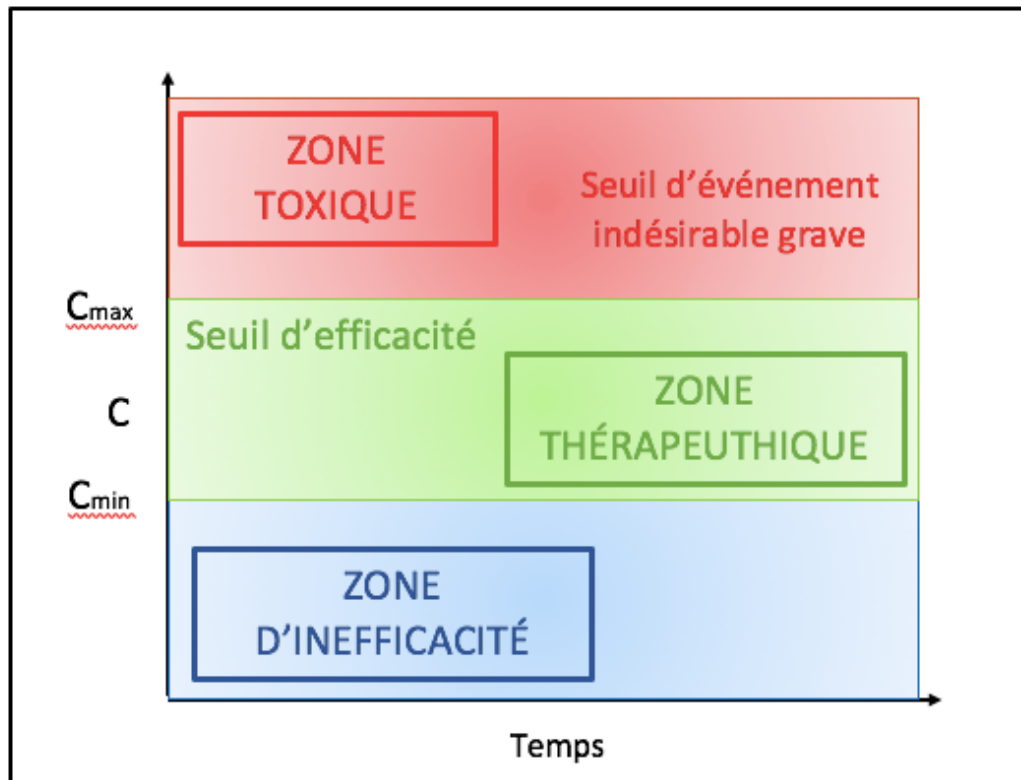


Figure 5: illustration du principe de marge thérapeutique étroite.

La toxicité du 5-FU est d'installation rapide avec une aggravation progressive et est très souvent poly-viscérale.

Le 5-FU n'agit pas seulement sur les cellules cancéreuses mais également sur des cellules saines, en particulier dans les tissus à croissance rapide, conduisant à des toxicités doses-dépendantes.

Les principaux effets indésirables rencontrés sont surtout d'ordre gastro-intestinal et hématologique. Des cas de cardiotoxicité et neurotoxicité sont également retrouvés.

De plus, la capécitabine induit des effets cutanés de type syndrome main-pied dans 50 à 60% des cas contre 6 à 34% avec le 5-FU par voie IV (16,21,22).

Ces effets indésirables sont préjudiciables pour l'efficacité de la chimiothérapie. Outre le risque intrinsèque de décès, certains patients se retrouvent contraints d'arrêter ou d'espacer les cycles de chimiothérapies. Ils doivent attendre que les effets indésirables graves diminuent d'intensité ou disparaissent pour reprendre les cycles.

a. Toxicités digestives

Les diarrhées chimio-induites sont un effet indésirable commun des fluoropyrimidines. Ces diarrhées représentent 10-15% des cas, tous types de cancers confondus, et sont observés dans 50-80% des cancers colorectaux. On retrouve également des mucites dans 10 à 25% des cas (17-18).

b. Toxicités hématologiques

Ce sont des effets indésirables très fréquents. Parmi ces troubles hématologiques, on distingue des leucopénies, neutropénies, thrombopénies et plus rarement des anémies (16,20).

c. Cardiotoxicités

Dans la littérature, l'incidence des toxicités cardiaques induites par le 5-FU tourne autour de 1 à 18% avec une mortalité de 2 à 13%. Les principaux symptômes sont des douleurs, thoraciques, palpitations, dyspnée et hypotension. Dans de rares cas, des infarctus du myocarde, des arythmies, des chocs cardiogéniques ou des morts subites ont été rapportés. Généralement, les premiers symptômes cardiaques apparaissent 2 à 5 jours post-chimiothérapie (20,23).

d. Autres toxicités

La neurotoxicité est considérée comme un effet secondaire extrêmement rare. Le 5-FU est distribué dans l'ensemble des tissus de l'organisme dont le liquide céphalorachidien. On retrouve des cas d'encéphalopathies avec confusion mentale, troubles cognitifs et paranoïa dus à une concentration élevée en ammoniac (24).

L'alopécie est un effet indésirable commun à toutes les chimiothérapies. Dans la majorité des cas, elle est réversible en quelques semaines ou en quelques mois après l'arrêt du traitement (23).

e. Antidote

Il existe un antidote aux intoxications par le 5-FU : le triacétate d'uridine (Vistogard®). C'est un médicament orphelin qui dispose d'une autorisation d'accès compassionnel obtenue uniquement sous ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) nominative acquise auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM).

Son intérêt est limité car il doit être utilisé dans les 96 heures qui suivent la fin de l'administration d'une fluoropyrimidine. Son efficacité et sa sécurité n'ont pas été démontrées au-delà des 96 heures (26). L'accès à ce médicament implique un délai d'acheminement depuis les États-Unis qui est compris entre 24 et 48 heures. Aucun stock n'est disponible en France ou en Europe (20,25,26). A ce jour, ce traitement n'a jamais été commandé par le CHU de Tours.

Les pharmaciens, médecins du service et les IDE ont un rôle majeur dans la prévention et la prise en charge de ces toxicités sévères précoces. En effet, toute situation à risques (survenue de toxicités sévères précoces en cours de perfusion continue ou immédiatement après administration, surdosage accidentel, erreur d'administration) impose une réaction rapide.

Comme évoqué précédemment, une partie des toxicités et décès associés aux fluoropyrimidines sont imputables à un déficit de l'enzyme responsable de leur dégradation, la DPD (20).

III. La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD)

1) Généralités

La DPD est une enzyme codée par le gène *DYPD*.

Le gène *DYPD* est situé sur le chromosome 1. Il comprend 23 exons et 22 introns (figure 7).

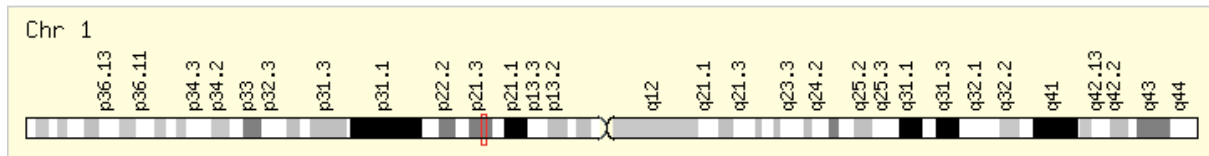


Figure 6: Localisation du gène *DYPD*.

La DPD est exprimée dans de nombreux tissus mais son activité est majoritaire au niveau hépatique et lymphocytaire. Physiologiquement, la DPD permet la réduction de l'uracile en dihydrouracile (UH₂). Elle intervient également dans le métabolisme du 5-FU en le catabolisant en métabolites inactifs (2,27).

L'activité de la DPD est soumise à une variabilité inter et intra-individuelle importante. On estime qu'environ 9% de la population caucasienne présente un déficit partiel en DPD et 0,5% présente une déficience complète (22). Cette déficience pourrait expliquer 39 à 61% des toxicités sévères (2).

Cette variation d'activité de la DPD est multifactorielle. Elle résulte d'une association de facteurs génétiques (polymorphismes du gène *DYPD*) et non génétiques (insuffisance hépatique, rythme circadien, alimentation...). Le déficit enzymatique est multifactoriel, c'est pour cela qu'une recherche multiparamétrique est nécessaire : pharmacogénétique, polymorphisme du gène *DYPD*, variation intra et interindividuelle et indice de métabolisation (uracile et dihydrouracile). La variabilité interindividuelle de l'activité de la DPD ne s'explique donc qu'en partie par des facteurs génétiques (11,28).

2) Impact des déficits en DPD

Les effets toxiques du 5-FU sont dus à une surexposition au médicament, dépendant en partie de l'activité de la DPD. On comprend qu'un déficit partiel ou total de l'enzyme peut entraîner des conséquences pouvant être réversibles (effets indésirables communs) voire irréversibles (décès). En effet, la demi-vie du 5-FU des patients déficitaires complets augmente considérablement. On passe d'une $t_{1/2}$ de 6 minutes à 5 heures. La clairance est également impactée, elle est inférieure à 1 L.h⁻¹.m² contre 65 L.h⁻¹.m² à la normale (30). Les patients déficitaires de cette enzyme présentent un risque accru de développer une toxicité aiguë, précoce et grave.

Pour illustrer ces propos, nous allons nous intéresser au cas clinique d'un patient de 75 ans qui a fait l'objet d'une étude à Nantes. Ce patient est décédé en 2010, 10 jours après avoir reçu une chimiothérapie d'après le protocole FOLFOX. Dès les premiers jours du traitement, le patient a présenté des toxicités de grade III et IV. La recherche d'un déficit en DPD a été

faite lors de l'apparition d'effets indésirables graves. Il s'est avéré que le patient avait un déficit total en DPD.

Les auteurs rapportent que si une recherche du statut DPD avait été faite avant l'instauration du traitement, le patient aurait probablement été encore en vie (31).

Effectivement, dans plusieurs études lues sur le déficit en DPD, on retrouve régulièrement des remarques telles que « *Identifier précocement les patients porteurs d'un déficit en DPD est crucial* » « *une priorité médicale et de santé publique* ».

Un déficit, qu'il soit partiel ou total, aura des conséquences sur la prise en charge thérapeutique du patient. Le traitement sera possible sous certaines conditions ou alors contre-indiqué. Une adaptation thérapeutique individuelle sera proposée et mise en place afin d'éviter au patient de contracter des toxicités plus ou moins importantes et de ne pas engager son pronostic vital.

Aujourd'hui, le lien entre un déficit en DPD et la survenue d'une toxicité sévère ou mortelle est largement décrit dans la littérature (26,29–31).

La recherche du déficit en DPD peut donc être réalisé selon deux stratégies différentes : par génotypage (recherche des principaux polymorphismes fonctionnels du gène *DPYD*) ou par phénotypage (mesure directe ou indirecte de l'activité enzymatique).

3) Détection des déficits en DPD et adaptation posologique

a. Le génotypage (test pharmacogénétique)

La pharmacogénétique est définie comme l'étude des variations de la séquence de l'ADN en lien avec la réponse aux médicaments. L'un des objectifs de cette discipline est de personnaliser la prise en charge médicamenteuse afin d'en augmenter l'efficacité et de réduire les toxicités (32).

À la pharmacogénétique se rajoute la notion de polymorphisme génétique. Ce terme désigne l'existence de plusieurs versions possibles d'un même gène ou locus donné, appelées allèles (33).

La pharmacogénétique s'appuie sur la recherche de polymorphismes génétiques d'un individu afin d'identifier un risque de développer des toxicités ou une inefficacité. Lorsque cette recherche est réalisée avant l'instauration du traitement, elle permet d'ajuster au mieux la thérapeutique du patient dès la première administration. Le génotypage consiste à rechercher la présence de polymorphisme à une position spécifique du génome.

Concernant le gène *DYPD*, plus d'une centaine de polymorphismes sont actuellement répertoriés et ces derniers peuvent conduire à des variations d'activités ou à des expressions transcriptionnelles de la DPD (28,34).

Certains polymorphismes du gène *DYPD* ont été associés à la survenue d'effets indésirables liés aux fluoropyrimidines. Les trois variants considérés de façon consensuelle comme étant associés à un risque augmenté de toxicité aux fluoropyrimidines sont : *DYPD**2A (c.1905+1G>A, rs3918290), *DYPD**13(c.1679T>G, p.I560S, rs55886062) et *p.D949V* (c.2846A>T, rs67376798)(29,35,36).

- Le variant *DPYD*2A* est le plus connu et le plus étudié. Ce variant, intronique, entraîne une perte de l'exon 14 au moment de l'épissage et aboutit à la formation d'une protéine non fonctionnelle (36). Cette mutation est retrouvée dans 50% des cas de déficit en DPD (2,30). Une augmentation significative de la survenue des toxicités de grade 3 et 4 est de l'ordre de 73% chez des patients ayant une mutation *DPYD*2A* contre des patients non mutés (26).
- Le variant *DPYD*13* est responsable d'un changement d'acide aminé associé à une modification structurale de la protéine affectant sa stabilité et altérant de façon importante l'activité catalytique. 55% des porteurs développent des toxicités de grade 3 et 4. Il existe une association significative entre ce variant et l'apparition d'une toxicité hématologique sévère et d'une toxicité gastro-intestinale sévère (26).
- Le polymorphisme p.D949V est associé à une modification structurale de la protéine affectant la liaison aux cofacteurs de l'enzyme. Les sujets hétérozygotes ont une activité enzymatique réduite d'environ 25% (26).

Il peut être associé à ces trois variants, la recherche de l'haplotype B3 (Hap B3), variant fonctionnel le plus fréquemment retrouvé chez les caucasiens (29).

L' Hap B3 correspond à une combinaison de cinq polymorphismes génétiquement liés incluant 4 variants introniques dont le c.1129-5923C>G et un variant exonique le c.1236G>A (2,37). Une association significative entre c.1236G>A/Hap B3 et l'apparition de toxicités sévères a été découverte en 2015. Les porteurs de ce variant développent des toxicités d'ordre gastro-intestinale et hématologique plus importantes par rapport aux autres mutations (29). Les patients hétérozygotes pour cet haplotype présentent une activité enzymatique réduite d'environ 35%.

La fréquence de portage de ces 4 variants dans la population caucasienne est présenté dans le tableau 2.

Tableau 2: Principaux variants DPYD recherchés et fréquences dans les populations d'origine caucasienne.

Variants DPYD	Fréquence en population (2)	Taux de porteurs	
		Hétérozygotes	Homozygotes
DPYD*2A	0,8%	1,5%	0,01%
p.D949V	0,1%	0,2%	0,0001%
DPYD *13	0,6%	1%	0,004%
Hap B3 (c.1236G>A)	2,4%	4,6%	0,06%

La recherche de ces 4 variants présente une faible sensibilité puisqu'elle explique seulement un quart des toxicités sévères précoces aux fluoropyrimidines. Ainsi, ne pas être porteur d'un de ces 4 polymorphismes ne garantit pas une bonne tolérance à la thérapie. En revanche, cette recherche présente une spécificité élevée puisque 95% des patients tolérants ne sont en effet pas porteurs de ces polymorphismes.

b. Le phénotypage

Le phénotypage est utilisé pour mesurer l'activité d'une enzyme donnée.

Différentes méthodes de phénotypage de la DPD ont été développées pour identifier les sujets déficitaires :

- dosage de l'activité DPD dans les cellules sanguines mononuclées circulantes (38)
- détermination de la clairance du 5-FU après administration d'une très faible dose (39)
- dosage de l'uracile plasmatique seul ou en association avec le dosage du dihydrouracile dans le plasma, la salive ou les urines après ou sans ingestion d'une dose test d'uracile (36,37,39,40)

Cette dernière méthode est la plus simple à réaliser en routine.

Dans le cas d'un déficit en DPD, le taux d'uracile endogène augmente par une diminution de sa dégradation. De plus, la concentration plasmatique de son métabolite, le dihydrouracile est diminuée.

Trois études prospectives ont évalué les performances du phénotypage de l'U et du ratio UH2/U et ont conclu à la supériorité de l'uracilémie sur le ratio. Un seuil de 16 ng/mL a été fixé, au-delà, la survenue de toxicité sévère précoce est significativement accrue (35,41).

4) Personnalisation du traitement selon l'activité de la DPD

Le dépistage a pour but d'identifier les patients présentant un déficit en DPD afin de réduire le risque d'apparition de toxicités sévères. Il est maintenant admis qu'un déficit en DPD, qu'il soit mis en évidence par génotypage ou phénotypage, doit entraîner une réduction de posologie des fluoropyrimidines. Pour les personnes déficitaires partiels, une adaptation de la posologie initiale en fluoropyrimidines sera proposée. A l'inverse, pour les patients ayant un déficit complet, les fluoropyrimidines seront contre-indiquées.

Des propositions de réduction de posologie de ces médicaments en fonction du génotype *DPYD* ont été proposées par deux consortiums de renommée internationale, le Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) et le Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (31,46).

Pour le génotypage, la première étape consiste à attribuer un score d'activité (0, 0,5 ou 1) à chaque allèle, basé sur l'impact fonctionnel des variants, présenté en tableau 3. Dans un second temps, nous pourrons déduire le statut de métabolisation des patients avec la somme des activités des 2 allèles (tableau 4).

Tableau 3: Activité enzymatique des variants fonctionnels du gène *DPYD*

Activité enzymatique	Allèle <i>DPYD</i>
1 (référence)	*1 (allèle sauvage)
0,5	HapB3, p.949V
0	*2A, *13

Tableau 4: Phénotype DPD prédit en fonction du score d'activité

Score d'activité	Phénotype prédit
2	Normal
1-1,5	Déficit partiel
0-0,5	Déficit complet

Premièrement, il sera recommandé de ne pas administrer du 5-FU ou de la capécitabine chez les patients ayant un déficit complet en DPD (score de 0 ou 0,5). Deuxièmement, une réduction de 50% de la dose standard devra être faite chez les patients ayant un score de 1 ou 1,5. Troisièmement, pour les patients n'ayant pas de variants détectés (score de 2), une dose standard peut être administrée (figure 8).

Les adaptations de posologies des fluoropyrimidines basées sur la valeur du phénotype DPD ont fait l'objet de recommandations conjointes de la part de la Haute Autorité de Santé (HAS) et de l'institut National du Cancer (INCA) en décembre 2018 (26) (figure 8).

Le seuil fixé de l'uracilémie est de 16ng/mL. Au-delà, un déficit est évoqué (figure 8) (2,18,26,35) :

- Uracilémie <16ng/mL : absence de déficit en DPD, posologie standard.
- Uracilémie ≥ 16 -150ng/mL : déficit partiel en DPD, réduction de la dose. Il existe un risque majoré de survenue de toxicité aux fluoropyrimidines. Une diminution de la posologie initiale doit être effectuée. La diminution repose sur le résultat de l'uracilémie, le protocole de chimiothérapie et les critères physiopathologiques du patient. On estime une réduction de l'ordre de 25 à 50% de la dose standard. Une surveillance thérapeutique accrue doit être effectuée dès le 1^{er} cycle de la chimiothérapie. Un ajustement thérapeutique doit être mis en place dès le 2^{ème} cycle en fonction de la tolérance médicamenteuse. Il sera traduit par une augmentation ou une diminution de la posologie.
- Uracilémie ≥ 150 ng/mL : déficit complet en DPD, contre-indication aux fluoropyrimidines. Il existe un risque de toxicité très sévère avec le 5-FU et ses pro-drogues. En l'absence d'alternative thérapeutique, l'utilisation des fluoropyrimidines devra être faite avec des doses très réduites et sous surveillance thérapeutique étroite.

Bien que le résultat de l'uracilémie prime, le ratio UH_2/U peut également être une aide à l'interprétation du déficit. Un ratio supérieur à 5 évoque une activité normale de la DPD, entre 5 et 1, un déficit partiel et si inférieur à 1, un déficit complet.

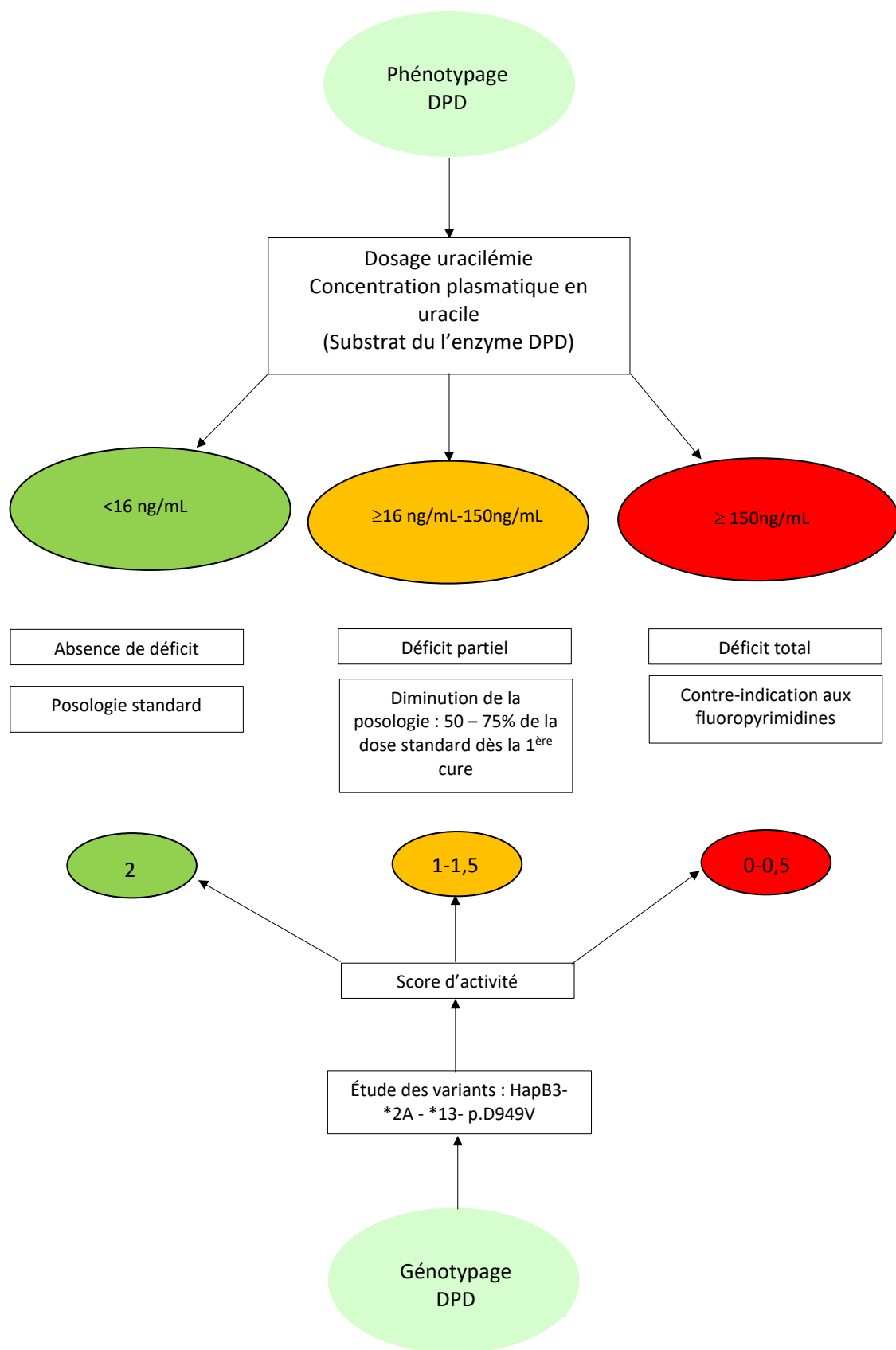


Figure 7: Adaptation posologique en fonction du phénotypage et génotypage

5) Le dépistage en pratique en France

Avant 2019, le dépistage d'un déficit en DPD était majoritairement réalisé en France par génotypage. En effet, ce dernier peut être réalisé par diverses techniques classiques de biologie moléculaire maîtrisées par un grand nombre de laboratoires et ne nécessite pas de précautions pré-analytiques particulières.

En février 2018, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) a préconisé la recherche d'un déficit en DPD pour tout patient concerné par une chimiothérapie par fluoropyrimidines.

En décembre 2018, l'Institut National du Cancer (INCa) et la Haute Autorité de Santé (HAS) ont publié des recommandations sur les modalités de recherche du déficit en DPD pour prévenir certaines toxicités sévères des chimiothérapies par fluoropyrimidines.

Compte tenu de la sensibilité insuffisante de la recherche d'un déficit partiel par génotypage et de sa valeur prédictive positive médiocre, les experts du groupe de travail recommandent l'utilisation du phénotypage avec mesure de l'uracilémie plasmatique pour dépister un déficit en DPD. Le génotypage peut encore présenter un intérêt en cas de phénotype altéré, mais il ne faut alors plus se limiter à la recherche des 4 variants présentés plus haut et réaliser un séquençage complet des parties codantes du gène DYPD.

Suite à cette publication conjointe de la HAS et d'INCa, l'ANSM rend obligatoire la recherche du déficit en DPD avant tout traitement par fluoropyrimidines en avril 2019. L'ANSM se base sur les recommandations émises par le Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique (GPCO)-Unicancer et du Réseau Francophone de Pharmacogénétique Hospitalière (RNPGx) (42).

Ces deux communiqués ont été suivis par la publication des recommandations européennes par L'agence Européenne du Médicament (EMA) sur la nécessité du dépistage d'un déficit en DPD avant l'instauration d'un traitement par fluoropyrimidines. Néanmoins, ce communiqué ne statue pas sur les conditions de recherche du déficit : phénotypage ou génotypage (43).

Pour la réalisation pratique du phénotypage l'INCa et la HAS préconisent (44):

- des conditions strictes de circuit du prélèvement sanguin, impératives pour la fiabilité des résultats
- des valeurs seuils pour l'interprétation des résultats
- un délai de rendu de résultats, de la prescription du test à la réception du résultat par le clinicien, idéalement de 7 jours, au maximum de 10 jours. Au-delà, l'initiation retardée du traitement pourrait être préjudiciable pour le patient

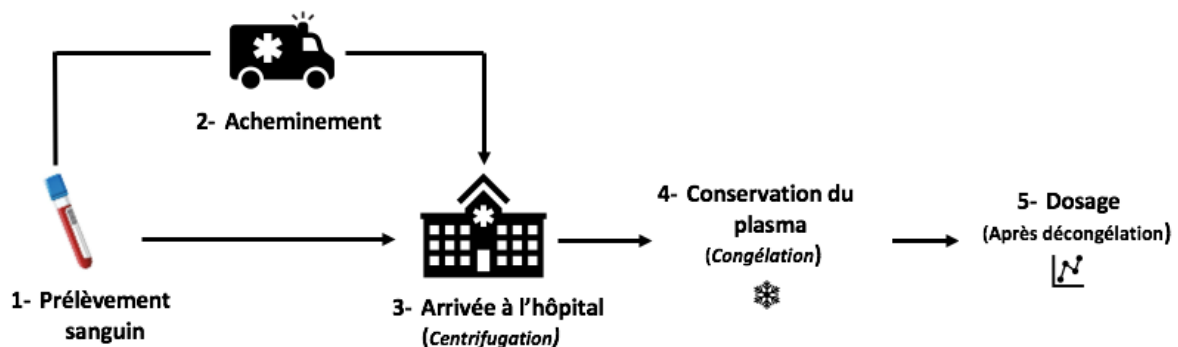
De plus, le prescripteur doit mentionner sur la prescription « résultats uracilémie pris en compte » et le pharmacien doit vérifier cette mention lors de la dispensation (12).

6) Les conditions pré-analytiques

Le respect des conditions pré-analytiques est indispensable à la fiabilité des résultats. L'uracile est instable, sa concentration plasmatique augmente rapidement entre le prélèvement sanguin et la centrifugation du tube.

Pour assurer la fiabilité des résultats fournis lors du phénotypage par détermination des concentrations sanguines en uracile et dihydrouracile, certaines conditions pré-analytiques doivent être impérativement respectées.

D'après l'INCA et l'HAS, les recommandations actuelles pré-analytiques sont les suivantes (45,46):



- 1) Prélèvement sanguin : utilisation de tubes EDTA ou héparine de lithium sans gel séparateur.
- 2) Acheminement du prélèvement : le délai entre le prélèvement et la centrifugation doit être de 1h30 si le prélèvement est conservé à température ambiante et de 4h s'il est conservé à +4°C.
Le transport doit impérativement respecter la chaîne du froid.
- 3) Centrifugation à l'arrivée au CHU (1500g, 10min) à 4°C
- 4) Congélation immédiate du plasma obtenu
- 5) Dosage (après décongélation)

Ces conditions préanalytiques doivent être impérativement contrôlées par le laboratoire responsable du compte-rendu des résultats via une fiche de traçabilité (annexe 1) : heure de prélèvement, condition de conservation du prélèvement avant centrifugation, température d'acheminement des échantillons jusqu'au laboratoire, l'heure et la date d'arrivée du prélèvement au laboratoire, l'heure de centrifugation et la température de congélation, etc...

En pratique, les délais sont souvent dépassés en raison de contraintes organisationnelles des services hospitaliers et des laboratoires. Cela entraîne un risque de faux-positifs, car l'U et l'UH2 ne sont pas stables dans le temps et leurs concentrations augmentent. Cela aura pour conséquence un retard dans la prise en charge du patient et un risque de mauvaise adaptation posologique en fluoropyrimidines.

PARTIE B : Travail personnel

I. Objectif

A l'heure actuelle, le dépistage d'un déficit de l'activité de la DPD par phénotypage est obligatoire en France depuis 2019 par l'ANSM avant l'instauration d'un traitement par fluoropyrimidines (26).

Depuis son passage obligatoire, le nombre de prescriptions a donc fortement augmenté. Cependant, le nombre de laboratoires réalisant le dépistage est limité, ce qui implique des sous-traitances et des délais d'acheminements souvent allongés. Malheureusement, en pratique, les délais stricts imposés par les recommandations sont souvent dépassés en raison des contraintes organisationnelles des services hospitaliers et des laboratoires. Cela entraîne donc un risque de surestimation des concentrations d'U et UH2.

Ces recommandations sont basées sur un faible nombre de données expérimentales. En effet, peu d'études ont été réalisées sur ces conditions pré-analytiques et aucune n'a été faite dans des conditions réelles (47–51).

L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer l'impact des paramètres pré-analytiques sur les concentrations en U et UH2. Cette étude a été entreprise en réponse à une demande de standardisation et de sécurité de différents laboratoires de CHU.

Il s'agit de la première étude menée dans des conditions réelles visant à déterminer l'impact des paramètres pré-analytiques sur les concentrations d'U et d'UH2. Il est à noter que les données présentées dans cette thèse sont des résultats préliminaires.

Les points critiques évalués dans le cadre de ce travail sont les suivants :

- l'impact du type de tube collecteur (EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) vs Hépariné)
- la stabilité dans le sang total : impact du délai entre le prélèvement et la centrifugation
- la stabilité dans le plasma avant congélation/dosage
- la conservation : durée et température de congélation
- l'impact des cycles de congélation/ décongélation
- la variabilité intra-individuelle
- l'impact de l'horaire de prélèvement
- le plasma non congelé immédiatement
- l'arrivée d'échantillons de plasma décongelés pendant le transport

II. Matériel et méthode

1) Planning de l'étude et collecte des données

Cette étude est à l'initiative du groupe Français d'oncopharmacologie clinique Oncologie (GPCO-Unicancer) et comprend la création d'un groupe de travail composé de 11 centres hospitalo-universitaires (CHU) : Besançon, Bruxelles, Clermont-Ferrand, Grenoble, Limoges, Marseille, Nice, Paris, Saint-Etienne, Toulouse, Tours.

Début 2019, un premier contact entre 15 laboratoires regroupant 18 personnes s'est déroulé pour soumettre l'idée de cette étude. En juillet 2019, une réunion téléphonique a été effectuée et a permis de regrouper 11 laboratoires au total. De juillet à septembre 2019, un travail d'organisation pour la collecte des données a été mis en place avec la création d'un document commun de recueil de données. Enfin, de septembre 2019 à mars 2020 les données ont été recueillies puis analysées jusqu'en août 2020.

Tous les échantillons récoltés proviennent de patients prélevés en routine dans les laboratoires des villes citées précédemment. Tous les patients ont été informés par écrit que le reste de leurs échantillons prélevés serait conservé pour une recherche clinique. C'est pour cela que notre étude ne sera pas considérée comme un essai clinique.

L'obtention des résultats par collecte des données en vie réelle représente un réel atout.

Nous sommes ici au début de l'étude et nous avons recueilli des résultats préliminaires. Comme nous le verrons par la suite, cette étude a été poursuivie et est actuellement en cours de publication.

2) Évaluation des paramètres préanalytiques

Les différents tests de stabilité évalués dans l'étude ont été effectués à partir d'aliquots restants de patients prélevés pour le dépistage d'un déficit en DPD. Le sang total a été prélevé sur tube d'héparine de lithium (HepLi) et/ou EDTA.

La valeur de référence pour U et UH2 correspond aux échantillons immédiatement centrifugés (moins de 30 minutes après le prélèvement) et congelés à -20°C ou -80°C selon les procédures établies dans les différents centres.

L'influence du type d'anticoagulant (EDTA ou HepLi) sur la stabilité de U et UH2 a été testée en utilisant deux tubes de prélèvement différents au même moment de prélèvement pour un patient donné (n=16). Le tube (HepLi) était considéré comme tube de référence.

La stabilité de U et UH2 dans le sang total (avant centrifugation et congélation) a été évaluée à partir d'échantillons (n= 22) prélevés sur tubes héparinés ou EDTA laissés soit à température ambiante (TA), soit à +4°C pendant des durées variables [0 ; 30min ; 1h30 ; 2h ; 3h ; 4 ; 6h ; 16 ; 24h].

La stabilité dans le plasma a été évaluée à partir d'échantillons (n=8) immédiatement centrifugés mais dont le plasma a été laissé à TA ou à +4°C pendant des durées variables [0 ; 1h30 ; 4H ; 16h] avant congélation.

L'impact de la durée de congélation a été déterminé à partir d'échantillons (n=25) immédiatement centrifugés et congelés à -20°C ou à -80°C pendant différentes périodes. Pour connaître l'impact de la congélation et de la décongélation du plasma sur U et UH2, des échantillons de plasma de plusieurs patients (n=31) ont subi plusieurs cycles de congélation/décongélation (1,2,3 ou 19 cycles). Le plasma a été congelé directement après centrifugation à -20°C ou à -80°C, décongelé (dosage des concentrations de U et UH2) puis congelé à nouveau pendant des durées variables [1j ; 7j ; 1mois ; 3mois].

La détermination des concentrations de U et UH2 a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) selon les protocoles d'extraction ou de séparation en vigueur dans les différents centres.

Les méthodes de détection utilisées après séparation chromatographique sont variables selon les centres. En effet, plusieurs techniques peuvent être utilisées comme la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) ou la détection UV.

3) Variabilité intra-individuelle

La variabilité intra-individuelle a été mesurée pour U et UH2 chez 102 patients. Pour chaque patient, deux échantillons ont été prélevés à deux moments différents.

Tous les échantillons ont été prélevés en routine.

Les conditions de conformité pour les échantillons recueillis sont basées sur les recommandations existantes (44,52).

Les prélèvements considérés comme conformes répondaient aux conditions suivantes :

- conservation du sang total à TA pendant 1h30 maximum
- conservation du plasma à +4°C pendant 4h maximum, avec vérification de la traçabilité réalisée par les différents centres
- Inscription des horaires de prélèvements et des centrifugations des échantillons

Un patient ayant une non-conformité à l'un de ses deux prélèvements a été classé comme « non conforme » ; tandis qu'un patient ayant ses deux prélèvements conformes a été classé comme « conforme ».

4) Analyse statistique

La stabilité des paramètres (U, UH2 et le ratio UH2/U) dans le plasma ou le sang total a été déterminée en calculant le ratio entre les concentrations obtenues à un temps donné (Ct) et la concentration de référence (C0) : $Ct/C0 \times 100$. Un intervalle de +20% est considéré comme acceptable pour les variations.

La stabilité de U et UH2 dans le plasma congelé a été évaluée par le calcul du biais entre les concentrations obtenues à un intervalle de temps donné T1 (C_{T1}) en fonction de la concentration de référence au temps initial T0 (C_{T0}) : $\text{biais} = ((C_{T1} - C_{T0}) / C_{T0} \times 100)$. Un intervalle de +/-20% a été considéré comme acceptable pour les variations.

Pour la comparaison du type d'anticoagulant, une comparaison statistique non paramétrique a été effectuée (test de Wilcoxon apparié). Une valeur de $p < 0,05$ a été retenue pour considérer un résultat comme étant significatif. Le biais a été calculé selon la formule $(C_{\text{EDTA}} - C_{\text{HepLi}}) / C_{\text{HepLi}} \times 100$.

Pour la variabilité intra-individuelle, nous avons calculé le coefficient de variation (CV) entre deux échantillons d'un même patient prélevés à deux moments différents. $CV = (\text{écart type} / \text{moyenne}) \times 100$.

Les graphiques ont été créés à partir du logiciel GraphPad Prism et Rstudio.

III. Résultats

1) Type d'anticoagulants EDTA/Hépariné

L'influence du type d'anticoagulant (EDTA ou HepLi) sur la stabilité de l'U et de l'UH2 a été testée sur 16 échantillons prélevés au même moment dans deux tubes différents. Les résultats sont présentés sur la figure 8.

Tableau 5: Impact de l'anticoagulant sur les concentrations d'U, UH2 et le ratio UH2/U

		Nombre d'échantillons (n)	Tube Hep-Li	Tube EDTA	Biais %	p-value (test de wilcoxon apparié)
U (ng/mL)	Moyenne [Min ; Max]	16	7,65 [5 ;25,1]	9 [5,2 ; 36,7]	12	0,003
UH2 (ng/mL)	Moyenne [Min ; Max]	16	106,65 [66,8 ; 217,4]	108,25 [71,9 ; 217,4]	2,5	0,63
UH2/U (ng/mL)	Moyenne [Min ; Max]	16	14,05 [6,5 ; 18,78]	12,77 [4,8 ; 17,96]	-6,9	0,017

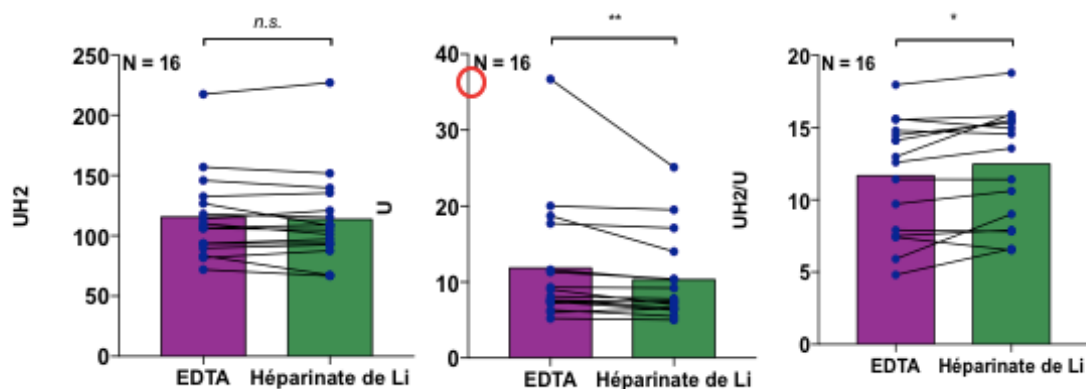


Figure 8: Impact du tube collecteur sur les concentrations d'U, d'UH2 et le rapport UH2/U (n=16)

Les barres représentent les valeurs moyennes d'U, UH2 et du rapport UH2/U obtenues sur EDTA (violet) ou HepLi (Vert). Chaque trait relie les échantillons provenant du même patient. n.s. : non significatif ; * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,01.

Nous avons retrouvé une différence significative (p-value=0,003) pour l'uracile entre l'anticoagulant HepLi et EDTA. L'uracilémie est plus élevée (biais moyen de +12%) dans les tubes EDTA par rapport au tube Hep-Li (tableau 5).

Pour l'UH2, nous n'avons pas d'impact significatif entre les deux types de tubes (p-value= 0,63, biais moyen= +2,5% sur EDTA).

Et enfin, pour le rapport UH2/U, nous avons obtenu une différence significative (p -value= 0,017, biais moyen= -6,9% sur EDTA) en lien avec les variations de concentration de l'uracile (tableau 5).

2) Stabilité dans le sang total

Pour la stabilité des concentrations de U, UH2 et UH2/U, 22 échantillons ont été prélevés et analysés. Les résultats sont présentés sur les figures 10 et 11.

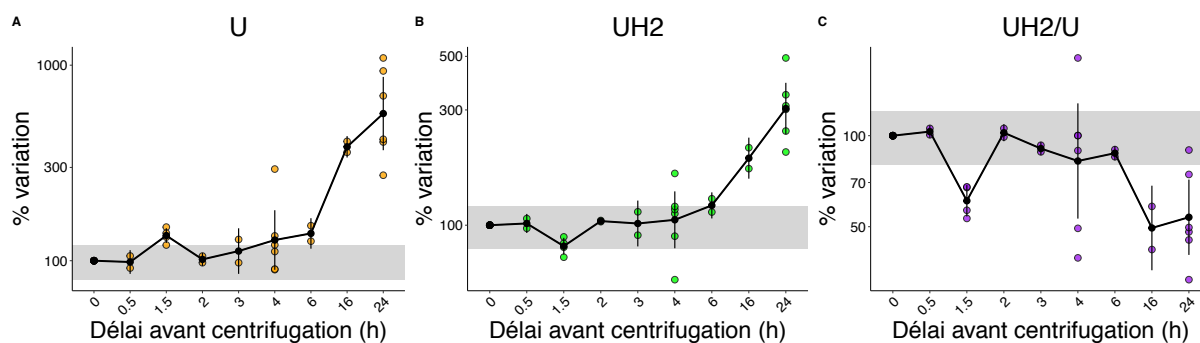


Figure 9 : Conservation des échantillons de sang total à température ambiante en fonction du temps (heures) (n=22)

Moyennes des ratios de concentrations obtenues lors de la conservation du sang total à température ambiante pendant différents temps, pour l'U(A), UH2 (B) et UH2/U (C). La zone grise représente la zone d'acceptation de la variabilité (+/- 20%).

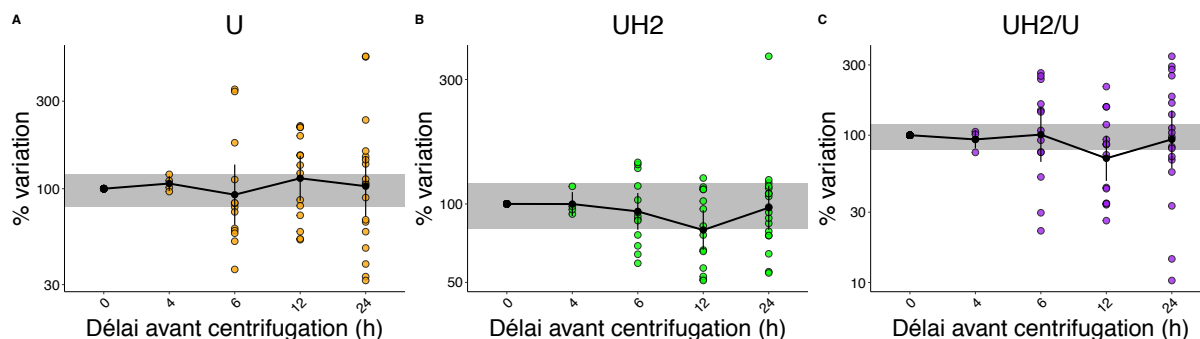


Figure 10: Conservation des échantillons de sang total à 4°C en fonction du temps (heures) (n=22)

Moyennes des ratios de concentrations obtenues lors de la conservation du sang total à +4°C pendant différents temps, pour l'U(A), UH2 (B) et UH2/U (C). La zone grise représente la zone d'acceptation de la variabilité (+/- 20%).

A température ambiante (Figure 9), nous avons retrouvé une élévation rapide des concentrations de U (+ 35% dès 1h30). Cette élévation s'accroît lorsque le temps de conservation à température ambiante augmente. En effet, nous pouvons retrouver des valeurs très élevées (concentrations multipliées par 5 au bout de 24 h) (Figure 9A).

L'UH2 semble plus stable que l'uracile puisque ses concentrations ne varient pas jusqu'à 6h avant centrifugation (21%). Dépassé ce délai, elles augmentent également drastiquement (Figure 9B). Comme ces deux analytes varient dans le même sens, le ratio UH2/U reste plus

stable, mais a quand même tendance à diminuer en lien avec l'élévation plus rapide des concentrations de U (Figure 9C).

A +4°C, la concentration de U semble stable et la moyenne des variations ne dépasse pas la valeur de référence mais nous pouvons cependant noter une grande variabilité selon les échantillons à partir de 6h (figure 10A). La même remarque peut être faite pour UH2 (figure 10B) et UH2/U (figure 10C). A 12h, nous observons une augmentation de la concentration en U (+38%) et une diminution de celle de l'UH2 (24%).

Nous pouvons noter qu'un stockage à +4°C pourrait maintenir des concentrations stables d'U et d'UH2 jusqu'à 12 heures. Alors qu'une conservation à température ambiante entraîne une instabilité très rapide pour U, UH2 et UH2/U.

3) Stabilité dans le plasma

a. Stabilité de U et UH2 dans le plasma à +4°C et à température ambiante (TA)

Pour évaluer cette variable, nous avons récolté seulement 8 échantillons : 6 provenant de Saint-Étienne et 2 de Toulouse. Les résultats sont présentés sur les figures 12 et 13.

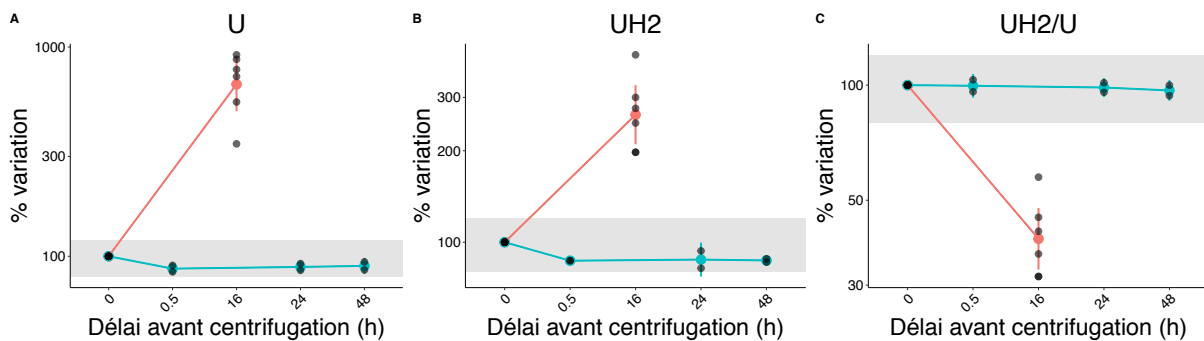


Figure 11: Évolution de la concentration de U et UH2 dans le plasma à TA en fonction du temps (heures) (n=8)
Moyennes des ratios de concentrations obtenues lors de la conservation du plasma à température ambiante pendant différents temps, pour l'U (A), UH2 (B) et UH2/U (C). Les échantillons en bleu sont ceux de Toulouse, et en rose ceux de Saint-Étienne. La zone grise représente la zone d'acceptation de la variabilité (+/- 20%).

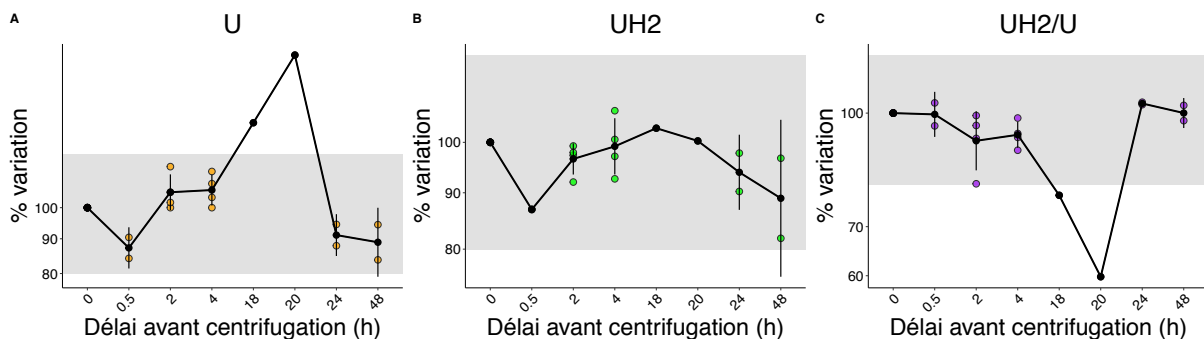


Figure 12: Évolution de la concentration de U et UH2 dans le plasma à +4°C en fonction du temps (heures) (n=8)
Moyennes des ratios de concentrations obtenues lors de la conservation du plasma à +4°C pendant différents temps, pour l'U (A), UH2 (B) et UH2/U (C). La zone grise représente la zone d'acceptation de la variabilité (+/- 20%).

Nous avons retrouvé des écarts importants dans les valeurs obtenues en U et UH2 pour les deux villes. A température ambiante, pour Toulouse (n=2), les valeurs de U, UH2 et UH2/U restent stables au cours de temps. Contrairement à Saint-Étienne (n=6) qui n'a étudié qu'un délai de 16h, les concentrations d'U et UH2 augmentent très rapidement à partir de 30 min pour atteindre une variation de 200% à 16h (figure 11).

À +4°C, la concentration plasmatique de l'uracile reste stable jusqu'à 4h (figure 12A). Pour l'UH2, sa concentration reste stable dans le temps (figure 12B). La stabilité du ratio UH2/U suit celle de l'uracile jusqu'à 4h (figure 12C).

Au vu de la taille des échantillons, nous n'avons pas réalisé de tests statistiques.

b. Stabilité dans le plasma pendant la congélation

Nous avons étudié la stabilité du plasma pendant la congélation sur 25 échantillons. Les prélèvements ont été conservés à -20°C ou -80°C durant différentes durées (tableau 6).

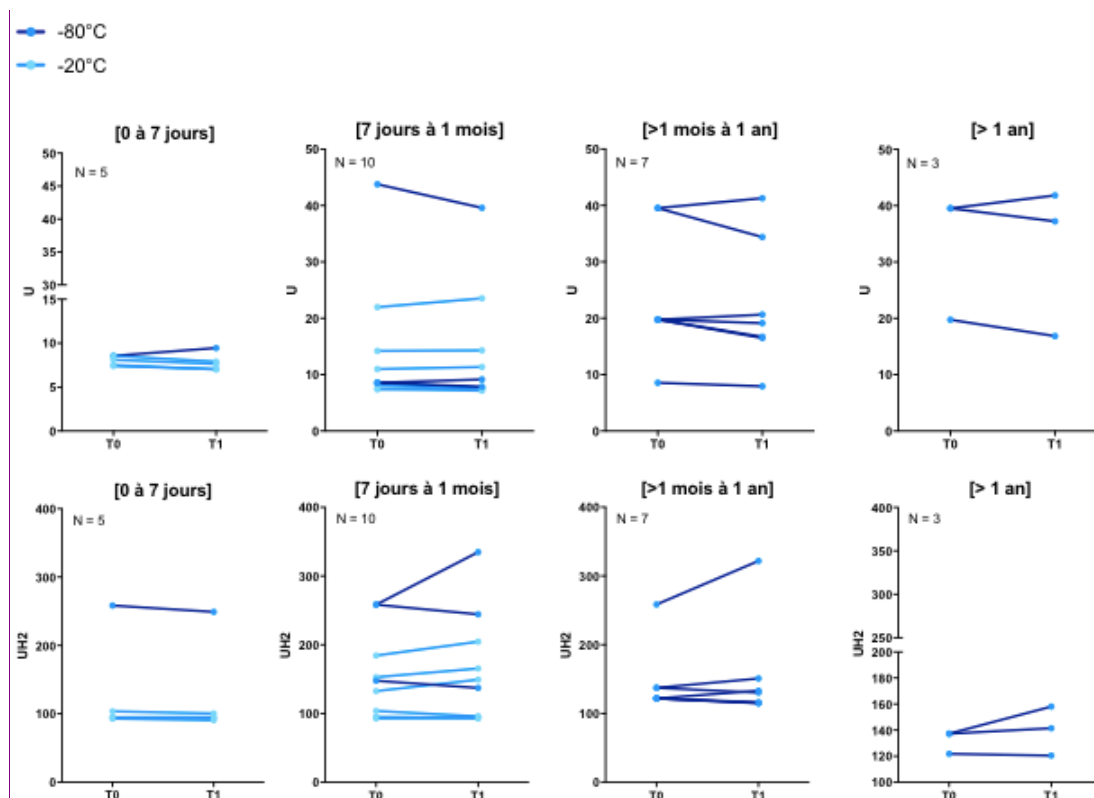


Figure 13: Concentration d'U et UH2 mesurée après un cycle de congélation à -20°C et -80°C
T0 : dosage avant congélation T1 : dosage après congélation

Tableau 6: Biais moyen d'U, UH2 et UH2/U en fonction de la durée et de la température de congélation

Analyte	Température	Biais selon T1			
		0-7 jours	7-1 mois	>1mois-1an	>1an
U	-20°C	-5,8 (n=4)	-5% (n=7)		
	-80°C	±10% (n=1)	-4% (n=3)	-7% (n=7)	-5% (n=3)
UH2	-20°C	-1,8% (n=4)	-3,1% (n=7)		
	-80°C	±4% (n=1)	±6% (n=3)	±3% (n=7)	±6% (n=3)
UH2/U	-20°C	±5,2% (n=4)	±3,2% (n=7)		
	-80°C	-13%	±9% (n=3)	±11% (n=7)	±12% (n=3)

A partir des données nous avons calculé les variations (%) entre T0 et T1 : T0 : dosage des paramètres avant la congélation et T1 : Dosage des paramètres après congélation

Les concentrations plasmatiques de U et UH2 sont stables dans le temps quelle que soit la température de congélation utilisée (-20°C ou -80°C). Aucune forte variation entre le premier prélèvement (T0) et le dosage après la congélation n'a été relevée (Tableau 6).

c. Stabilité du plasma durant des cycles de congélation/décongélation

Nous avons évalué l'impact des concentrations de U et UH2 après plusieurs cycles de congélation-décongélation du plasma à partir de 31 échantillons (figure 14). Pour tous les échantillons, le plasma a été congelé à -20°C ou -80°C directement après centrifugation. Ensuite, 28 d'entre eux ont subi jusqu'à 3 cycles pendant des durées variables [1j ; 7j ; 30j ; 90j] à -20°C ou -80°C. Et les 3 échantillons restant eux, ont subi 19 cycles de congélation/décongélation à -20°C pendant 20 jours.

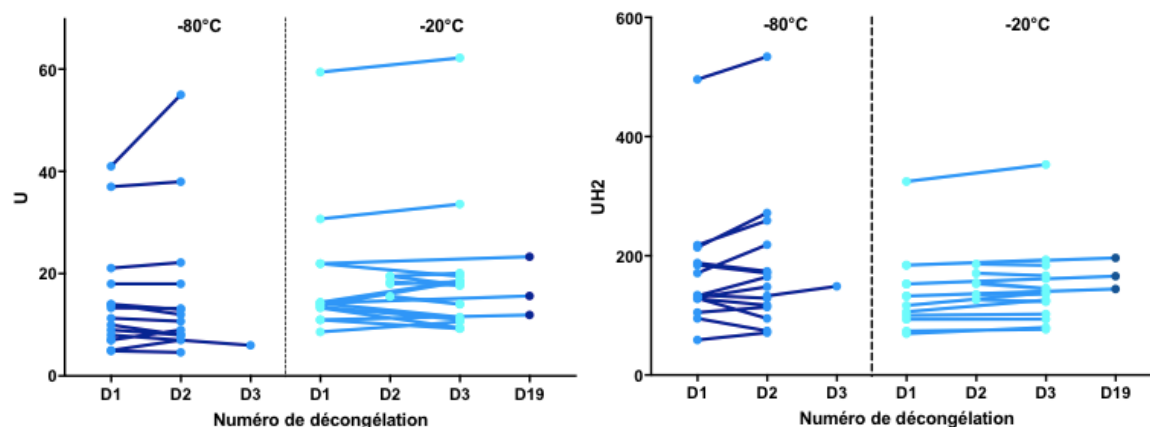


Figure 14 : Concentration plasmatique en U et UH2 en fonction du nombre de décongelations

Calcul des variations (%) de la concentration plasmatique en U et UH2 :

Tableau 7: Variations de la concentration plasmatique en U et UH2 (%) entre les cycles de décongelation

		Variation (%)	D1-D2	D2-D3	D1-D3	D1-D19
U	-20°C	Moyenne		-4,42%	2,33%	8,17%
		Min		-9,68%	-29,32%	6,05%
		Max		2,2%	33,33	9,92%
	-80°C	Moyenne	0,42%			
		Min	-20%			
		Max	34,15%			
UH2	-20°C	Moyenne		-2,85%	8%	7,99%
		Min		-6,26%	0,43%	6,58%
		Max		0,59%	18,46%	8,95%
	-80°C	Moyenne	5,17%			
		Min	-26,26%			
		Max	27,82%			

Au vu des résultats, il n'existe pas d'impact du nombre de cycles de congélation/décongélation et de leur durée sur les concentrations de U et UH2. Nous n'observons aucune variation significative sur les concentrations d'uracile et du dihydrouracile (tableau 7). La variation moyenne de l'uracilémie est de 1,70% et de 10% pour l'UH2.

d. Variabilité intra-individuelle

Nous avons évalué la variabilité intra-individuelle sur 102 patients. Pour chaque patient, deux échantillons ont été prélevés à deux moments différents puis classés en fonction de leur conformité aux conditions préanalytiques.

Tableau 8: Calcul du coefficient de variation en pourcentage pour l'ensemble des patients conformes et non conformes

Patients totaux (n=102)			
CV (%)	U (n=98)	UH2 (n=79)	UH2/U (n =79)
Moyenne	29%	21%	21%
Médiane	20%	14%	19%
Max	129%	96%	78%
Min	0%	0%	0%

Parmi les 102 patients au total, 42% présentent une non-conformité sur l'un ou l'ensemble des prélèvements et 58% ont les deux prélèvements conformes (tableau 8).

Tableau 9: Calcul du coefficient de variation en pourcentage pour les patients conformes aux conditions préanalytiques

Patients aux conditions préanalytiques CONFORMES (n=59)			
CV (%)	U (n=56)	UH2 (n=40)	UH2/U (n =40)
Moyenne	25%	20%	20%
Médiane	19,6%	16%	15,8%
Max	105%	87%	75%
Min	1%	2%	0%

Tableau 10: Calcul du coefficient de variation en pourcentage pour les patients non conformes aux conditions préanalytiques

Patients aux conditions préanalytiques NON CONFORMES (n=43)			
CV (%)	U (n=43)	UH2 (n=39)	UH2/U (n =39)
Moyenne	34%	22%	22%
Médiane	20%	14%	20%
Max	129%	96%	78%
Min	0%	0%	0%

Nous avons retrouvé une augmentation du coefficient de variation (CV) chez les patients n'ayant pas des conditions préanalytiques respectées. En effet, on retrouve un CV de 34% pour l'U chez les patients non conformes contre 25% chez les patients conformes. L'UH2, lui,

reste cohérent entre les deux groupes, 20% pour les patients conformes et 22% pour les patients non conformes (tableau 9 et 10).

Des concentrations d'U>16 ng/mL, en faveur d'un déficit en DPD, ont été retrouvées dans au moins un des deux prélèvements chez 23 patients (22,6%), dont 14 (60,9%) non conformes et 9 (39,1%) conformes. Les 14 patients non conformes se sont avérés être des faux positifs, puisque le dosage d'U dans l'échantillon, ayant des conditions pré-analytiques cette fois-ci respectées, était bien <16ng/mL.

Pour les 9 patients conformes, les résultats des concentrations obtenus sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 11: Variabilité intra-individuelle de U et du rapport UH2/U pour 9 patients avec des conditions préanalytiques respectées.

Analyte	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
U P1 (ng/mL)	12,4	11,5	15,4	21	37,5	7,7	32,7	20,8	14,7
U P2(ng/mL)	23,1	16	16,5	12	36	52,44	12,3	8,6	16,2
UH2/U P1 (ng/mL)	8,19	10,52	6,98	NR	NR	13,38	2,05	9,11	7,27
UH2/U P2 (ng/mL)	6,10	9,81	10,24	NR	NR	8,16	6,67	10,59	4,29
Délais entre les 2 prélèvements (jours)	43	80	53	10	10	25	21	112	8

NR : Non réalisé ; P1 : prélèvement n°1 ; P2 : prélèvement n°2 ; les résultats supérieurs à 16ng/mL) sont en rouge

Parmi les 59 patients ayant eu des conditions préanalytiques conformes, 9 ont présenté des seuils d'uracilémie supérieurs à 16ng/mL.

Parmi les 9 patients, 8 (analyte #1, #2, #3, #4, #6, #7, #8 et #9) ont eu une divergence sur leur concentration d'uracilémie sur l'un des deux prélèvements (tableau 11). Le patient restant (analyte #5), lui, a présenté une concentration supérieure à 16ng/mL pour les deux prélèvements.

Cela permet de démontrer qu'il existe une variabilité intra-patient indépendante aux conditions pré-analytiques.

Nous devons également prendre en compte le facteur analytique lié à la méthode. Pour les analytes #2, #3 et #9, les résultats dépassent à peine le seuil limite. Ces résultats sont dus à la variabilité analytique.

IV. Discussion

Depuis 2018, il est recommandé de rechercher la présence d'un déficit en DPD par mesure de l'uracilémie plasmatique avant toute instauration de traitement par fluoropyrimidine. Cette recherche a été rendue obligatoire en 2019, et par conséquent, de nombreux laboratoires ont été contraints de mettre rapidement au point une méthode de dosage de l'uracilémie et/ou d'organiser un circuit de sous-traitance. Cependant, les conditions préanalytiques actuellement préconisées sont strictes et difficiles à respecter dans la pratique. De plus, elles reposent sur un nombre insuffisant de données. L'objectif de ce projet était d'initier la constitution d'un groupe de travail, piloté par le GPCO, afin d'apporter plus de données sur les conditions préanalytiques de cette analyse et d'harmoniser les pratiques entre les différents centres hospitaliers. Dans cette étude en conditions réelles, nous avons confirmé que l'U augmente rapidement dans le sang total à température ambiante, mais qu'elle est plus stable à +4°C. Nous avons également observé une bonne stabilité au cours de la conservation au long terme par congélation et la possibilité d'effectuer plusieurs cycles de décongélation-recongélation. Nous avons également pointé du doigt la présence d'une variété intra-individuelle non négligeable pour certains patients.

a. Les échantillons transportés à température ambiante devraient être pris en charge dans un délai <1h30

Bien que notre observation repose sur un faible nombre d'échantillons, nous avons détecté un risque de surestimation de l'uracilémie plasmatique dès la durée d'1 h 30 entre le prélèvement et la centrifugation, lorsque ce dernier est acheminé au laboratoire à température ambiante. Ces résultats sont en accord avec ceux de Capiou et al. qui ont également évalué la stabilité dans le sang total de l'U et UH2 chez 10 volontaires sains et retrouvé une élévation croissante de l'U et ce, dès un temps de 2 h après centrifugation, bien que leur intervalle d'acceptabilité (+/- 15%) soit un peu plus restrictif que le nôtre (53). Ils ont également retrouvé une élévation de U au bout de seulement 1 h de conservation, mais ne dépassant pas +15%. Dans une autre étude, sur 10 volontaires sains également, une élévation d'U de 27% a été observée au bout d'une heure de conservation à température ambiante avant centrifugation (54). Le travail initié au cours de cette thèse a été poursuivi par le GPCO, permettant d'une part, l'augmentation du nombre de centres hospitaliers participants (passant de 11 à 14) et surtout du nombre d'échantillons analysés (52). Pour l'U et l'UH2, 170 échantillons ont ainsi été mesurés pour la conservation dans le sang total avant centrifugation, confirmant une élévation dès 1h30 de conservation à température ambiante. UH2, lui, semble en effet moins sensible, avec une élévation >20 % retrouvée à partir de 6 h conservation (52).

Nous avons observé en revanche, que la conservation du sang total à +4°C avant centrifugation permettait de repousser le délai d'élévation de l'U et l'UH2. Pour notre part, nous n'avons pas observé de modifications notables quel que soit le temps évalué probablement car le nombre d'échantillons obtenus était trop faible. Le GPCO a continué ces analyses sur une cinquantaine d'échantillons et a conclu à une stabilité d'U et UH2 d'au minimum 5 h à +4°C (52). Bien que les raisons de cette élévation ne soient pas complètement élucidées, il a été suggéré qu'elle pourrait provenir de la digestion d'acide nucléique présents dans la circulation plasmatique (55).

Au vu de l'ensemble de ces éléments, nous pouvons conclure que le délai maximal d'acheminement d'1h30 à température ambiante préconisé par l'HAS et l'INCA est nécessaire, voire même qu'un délai plus court pourrait être proposé. L'acheminement à +4°C devra être préconisé si ce délai ne peut être respecté.

b. Les échantillons centrifugés devraient être congelés dans les plus brefs délais

Le nombre d'échantillons évalués ici (n=8) et surtout la discordance observée entre les centres de Saint-Etienne et Toulouse empêchent l'interprétation de nos résultats pour la conservation plasmatique avant congélation de l'U et l'UH2. Depuis ce travail, une élévation de l'U plasmatique a été détectée au bout d'1h30 à température ambiante et de 5h à +4°C. (52). L'UH2 semble encore une fois plus stable. L'intérêt de ce paramètre réside surtout lors de la sous-traitance de l'examen. En effet, lorsque l'analyse est réalisée directement par le laboratoire recevant le prélèvement, ce délai ne dépasse généralement jamais 1h30. En revanche, si le laboratoire responsable de la centrifugation du prélèvement doit ensuite le faire parvenir à un autre laboratoire réalisant l'analyse, ce délai détermine les conditions de transport des échantillons. Ainsi, si le prélèvement ne se fait pas sur place, l'échantillon devra être transporté congelé, ce qui est plus onéreux.

c. Les échantillons congelés peuvent être conservés longtemps

Nous avons pu mettre évidence que les échantillons congelés pouvaient être conservés pendant au moins un mois à -20°C et un an à -80°C sans modification notable des concentrations d'U et UH2. Ce délai est important à connaître puisqu'il permet de conditionner ; d'une part la fréquence minimale de réalisation de l'examen (bien qu'ici elle soit au minimal hebdomadaire au vu du délai de rendu préconisé) et d'autre part, la durée de conservation des solutions servant à la préparation des gammes d'étalonnage ainsi que des contrôles internes de qualité (CIQ). Le GPCO a depuis confirmé que les prélèvements congelés à -20°C pouvaient également être stockés pendant au moins 1 an (52).

De plus, nos résultats concordent avec différentes études. À savoir, celle de Jacobs Bart A.W qui a déterminé sur 6 échantillons, une conservation possible à -70°C du plasma pendant au moins 93 jours sans avoir d'incidence sur les concentrations de U et UH2 (47). Pour Gaëlle Renaud, le plasma peut être conservé au moins pendant 14 jours à -20°C (51). Jiang H, lui, a démontré un stockage possible d'aliqots durant 6 mois à -20°C sans avoir de conséquence sur les concentrations d'U (56).

Un long délai de conservation est un avantage puisque cela permet d'éviter la répétition fréquentes des étapes de préparation ou reconstitution de solutions mères, qui sont chronophages et sources d'erreurs analytiques en cas d'erreurs de manipulation.

Ce travail a également permis de montrer qu'il était possible de congeler-décongeler plusieurs fois un échantillon sans altération de ses concentrations. Premièrement, cela peut permettre de réaliser un deuxième dosage en cas de doute ou d'erreur sur la première analyse. Deuxièmement, le prélèvement peut être envoyé à un autre centre en cas de panne d'appareillage ou pour confirmer un résultat difficile à interpréter ; sans pour autant devoir prélever à nouveau le patient.

d. L'uracilémie est plus élevée sur tube EDTA

Nous avons observé des concentrations plus importantes d'U en cas de prélèvement sur tube EDTA. La différence de concentration pour les analytes entre les deux types d'anticoagulants reste inexpliquée. Cette différence reste cependant peu élevée, +12 %, retrouvée à +14 % lors de la poursuite de ce travail (52). Cela peut quand même avoir un impact non négligeable pour des patients proches des valeurs seuils qui pourraient être considérés comme déficitaires avec un prélèvement EDTA ou normal avec prélèvement sur tube HepLi.

L'étude sur laquelle a été basée la détermination du seuil de 16 ng/ml avait déterminé les concentrations sériques d'U. Il aurait donc été intéressant de comparer également avec cette matrice, mais nous n'avons pas eu la possibilité de le faire dans cette étude réalisée sur « fonds de tubes ». Dans ces conditions, nous n'avons pas la possibilité de conclure sur le choix de la matrice (EDTA ou HepLi) pour doser les vraies valeurs d'uracilémie. Cependant, cela démontre l'intérêt d'harmoniser le type de tube de prélèvement entre les différents centres, ce qui n'était pas spécifié par les recommandations de l'HAS et l'INCA.

e. Attention à la variabilité inter-laboratoire

Comme évoqué plus haut, nous avons retrouvé des différences notables entre les échantillons de Saint-Etienne et de Toulouse lors de l'analyse de la stabilité du plasma à température ambiante. Le dosage de l'U ou UH2 n'est actuellement pas standardisé, et devant l'absence de kits commerciaux existant, chaque laboratoire a été contraint de développer lui-même sa méthode de dosage. De plus, si la majorité des centres utilisent maintenant la spectrométrie de masse comme mode de détection, certains, dont Tours, utilisent encore la détection UV, certes plus sensible mais aussi à risque d'interférences analytiques. Cette variabilité inter-laboratoire est un frein à l'implémentation du phénotypage en France mais également en Europe. En effet, une récente étude néerlandaise a montré des différences significatives d'uracilémie selon les modalités de traitement d'échantillons des différents centres hospitaliers (57). Afin de lutter contre cette variabilité inter-laboratoire, des programmes d'évaluation externes de qualité et comparaison inter-laboratoires ont été organisés en France.

e. Variabilité intra-individuelle

Nous avons retrouvé une variabilité intra-individuelle non négligeable. Cette variabilité était plus importante chez les patients ayant eu un prélèvement ne respectant pas les conditions préanalytiques. Cependant, même chez les patients ayant eu deux prélèvements conformes, des discordances de phénotype (normal vs déficit partiel) ont été observées. Certaines de ces discordances peuvent être attribuées à la variabilité analytique du dosage de l'U, pour des concentrations proches du seuil : patients #2, #3 et #9. Pour d'autres patients : #1, #2, #3, #6, #9 diverses possibilités peuvent être envisagées. En effet, plusieurs situations ont été reportées comme pouvant entraîner une accumulation d'U dans le sang, sans forcément signifier un réel déficit en DPD. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les situations d'insuffisance hépatique (58), d'insuffisance rénale (59), ou bien encore le syndrome de lyse tumorale qui peut être observé si le patient est déjà à un stade avancé de la tumeur (60). L'instauration du traitement par fluoropyrimidines est lui-même un facteur d'élévation de l'uracile (par inhibition compétitive

de la DPD) et peut aussi expliquer le fait que certains patients non déficitaires sur un premier prélèvement aient une uracilémie >16 ng/ml par la suite (61). La présence d'informations erronées concernant l'heure de prélèvement n'est pas exclue. Ces discordances soulignent les limites d'un seuil biologique arbitraire pour ce paramètre qui est soumis à autant de sources de variabilité. Dans ces situations, le recours au génotypage peut être envisagé de même que le ratio UH2/U qui pourrait être une aide à l'interprétation.

Il est donc crucial que les conditions pré-analytiques soient respectées afin de minimiser au maximum cette variabilité intra-individuelle.

V. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de consolider nos connaissances sur les conditions préanalytiques de l'U et de l'UH2. Un des points majeurs qui en découle est qu'une élévation des concentrations d'uracile dans le sang total est retrouvée dès 1 h 30 après acheminement au laboratoire à température ambiante. Ainsi, le délai préconisé par l'HAS et l'INCA semble insuffisant. Cette étude aura probablement un impact sur les conditions de réalisation du phénotypage puisqu'il a été décidé au sein du GPCO d'envoyer une lettre d'information à l'HAS demandant de revenir sur ces recommandations et de préconiser un délai d'acheminement à température ambiante inférieur à 1 heure. Une fiche de traçabilité doit être également remplie afin de déterminer si les conditions pré-analytiques ont bien été respectées.

Ce délai peut être très difficile à respecter en pratique clinique. Ainsi, l'acheminement à +4°C semble préférable. Cependant, afin de ne pas entraîner de retard de prise en charge en cas de délai d'acheminement dépassé (notamment en cas de prélèvement lors de consultations externes, le patient étant rentré chez lui), le dosage est actuellement quand même réalisé et si l'uracilémie est inférieure à 16 ng/mL, le résultat sera alors transmis au clinicien. En revanche, si le laboratoire trouve une U >16 ng/ml, la confirmation sur un nouveau prélèvement sera demandée.

L'utilisation d'un seul type d'anticoagulant dans le tube de prélèvement semble également être indispensable. Une harmonisation des pratiques va être nécessaire par l'ensemble des laboratoires, avec probablement la décision de privilégier les prélèvements sur tube hépariné.

Les études d'évaluation des conditions préanalytiques vont encore être poursuivies. En effet, l'hémolyse, qui entraîne la libération du contenu des globules rouges dans le plasma ou bien encore une hypertriglycémie sont des sources fréquentes d'interférences analytiques. L'impact de ces différents facteurs sur les concentrations d'U et UH2 doit maintenant être recherché.

Ce travail donne également lieu à de nouveaux questionnements au regard de la variabilité inter-individuelle reportée ici. Il va désormais être crucial d'améliorer nos connaissances sur les facteurs pouvant entraîner une élévation de l'U qui ne soit pas en lien avec un déficit en DPD. Il serait intéressant de regarder l'évolution du ratio UH2/U dans ces situations, car si ce dernier reste stable, il pourrait être une aide précieuse à l'interprétation biologique.

VI. Bibliographie

1. Launay M, Ciccolini J, Fournel C, Blanquicett C, Dupuis C, Fakhry N, et al. UPFRONT DPD DEFICIENCY DETECTION TO SECURE 5-FU ADMINISTRATION: PART 2- APPLICATION TO HEAD-AND-NECK CANCER PATIENTS. Clin Cancer Drugs. 2017;4(2):122-8.
2. recherche_dun_deficit_en_dihydropyrimidine_deshydrogenase_visant_a_prevenir_certaines_toxicites_severes_associees_aux_traite.pdf [Internet]. [cité 24 nov 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-12/recherche_dun_deficit_en_dihydropyrimidine_deshydrogenase_visant_a_prevenir_certaines_toxicites_severes_associees_aux_traite.pdf
3. essaycompany.com | Essay | Dipole Moment of 5- Fluorouracil Molecule [Internet]. Essaycompany. [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.essaycompany.com/>
4. Le 5-FU oral [Internet]. FMC-HGE. 2008 [cité 26 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.fmcgastro.org/postu-main/archives/postu-2008-paris/le-5-fu-oral/>
5. Information de sécurité - Médicaments à base de 5-fluorouracile - ANSM [Internet]. [cité 30 août 2022]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/informations-de-securite/medicaments-a-base-de-5-fluorouracile-voie-parenterale-capecitabine-tegafur-et-flucytosine-recommandations-europeennes-concernant-la-recherche-du-deficit-en-dihydropyrimidine-deshydrogenase-dpd>
6. Meddispar - UFT, gélule : arrêt de commercialisation prévu début 2013 [Internet]. [cité 22 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.meddispar.fr/Actualites/2012/UFT-gelule-arret-de-commercialisation-prevu-debut-2013#nav-buttons>
7. 492.pdf [Internet]. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.fmcgastro.org/wp-content/uploads/file/pdf/492.pdf>
8. xeloda-h-c-316-a31-1481-epar-assessment-report-article-31_en.pdf [Internet]. [cité 13 mars 2021]. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/xeloda-h-c-316-a31-1481-epar-assessment-report-article-31_en.pdf
9. Czejka M, Schueller J, Farkouh A, Gruenberger B, Scheithauer W. Plasma disposition of capecitabine and its metabolites 5'DFCR and 5'DFUR in a standard and dose-intensified monotherapy regimen. Cancer Chemother Pharmacol. mars 2011;67(3):613-9.
10. Schüller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, et al. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol. 2000;45(4):291-7.
11. Boisdron-Celle M, Alain M, Gamelin E. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and toxicity to fluoropyrimidine. Ann Biol Clin (Paris). 1 janv 2010;68:27-32.
12. CHIMIOTHÉRAPIES À BASE DE 5-FLUOROURACILE (5-FU) OU CAPÉCITABINE ET DÉFICIT EN DIHYDROPYRIMIDINE DÉSHYDROGÉNASE (DPD). 2019;2.
13. InfoCancer - ARCAGY - GINECO - Traitements - Traitements systémiques - Chimiothérapie - Les médicaments - Les antimétabolites - Les antipyrimidiques [Internet]. [cité 24 juill 2022]. Disponible sur: <http://www.arcagy.org/infocancer/traitement-du-cancer/traitements-systemiques/chimiotherapie/les-medicaments/les-antimetabolites/les-antipyrimidiques.html/>
14. Résumé des Caractéristiques du Produit [Internet]. [cité 24 juill 2022]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0306675.htm>
15. Taïeb J, Desramé J, Artru P. Chimiothérapie orale. In: Les cancers digestifs [Internet]. Paris: Springer-Verlag; 2006 [cité 3 sept 2022]. p. 303-17. (Oncologie Pratique). Disponible

sur: http://link.springer.com/10.1007/2-287-30874-1_16

16. Lemaitre F, Goirand F, Launay M, Chatelut E, Boyer JC, Evrard A, et al. [5-fluorouracil therapeutic drug monitoring: Update and recommendations of the STP-PT group of the SFPT and the GPCO-Unicancer]. *Bull Cancer (Paris)*. sept 2018;105(9):790-803.
17. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, McLeod HL, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics*. avr 2011;21(4):237-42.
18. 492.pdf [Internet]. [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.fmcgastro.org/wp-content/uploads/file/pdf/492.pdf>
19. Mercier C, Ciccolini J. Profiling dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with cancer undergoing 5-fluorouracil/capecitabine therapy. *Clin Colorectal Cancer*. nov 2006;6(4):288-96.
20. Launay M, Pourroy B, Ciccolini J. Gestion des toxicités précoces sévères au 5-fluorouracile : point sur le uridine triacetate (Vistogard®). *Pharm Hosp Clin*. 1 mai 2018;53.
21. Nouvelles recommandations ESMO : prise en charge du syndrome main-pied [Internet]. Nouvelles recommandations ESMO : prise en charge du syndrome main-pied | Univadis. [cité 3 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.univadis.fr/viewarticle/nouvelles-recommandations-esmo-prise-en-charge-du-syndrome-main-pied-735665>
22. guidelines_gpcO-unicancer_dpd_et_fluoropyrimidines.pdf [Internet]. [cité 24 nov 2020]. Disponible sur: http://www.unicancer.fr/sites/default/files/guidelines_gpcO-unicancer_dpd_et_fluoropyrimidines.pdf
23. Teixeira L, Barry S, Debourdeau P, Cohen A, Tournigand C. [Cardiotoxicity of 5-fluorouracil]. *Bull Cancer (Paris)*. nov 2004;91 Suppl 3:154-8.
24. Kwon KA, Kwon HC, Kim MC, Kim SH, Oh SY, Lee S, et al. A case of 5-fluorouracil induced encephalopathy. *Cancer Res Treat*. juin 2010;42(2):118-20.
25. Médicaments utilisés en cancérologie .pdf.
26. Chimiothérapies à base de 5-FU ou capécitabine : recherche obligatoire du déficit en DPD avant tout traitement - Point d'Information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 9 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Chimiotherapies-a-base-de-5-FU-ou-capecitabine-recherche-obligatoire-du-deficit-en-DPD-avant-tout-traitement-Point-d-Information>
27. Phenotypic and clinical implications of variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 11 mai 2021]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0925443916000107?token=F336734B431C7F8C9A2BB2360DA021C780E5C772300A1AFC655FAACD2E6B0D5E7AF8939BAABDF8B84589B22126F04FF8&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210511134822>
28. 54_Focus_5-FU.pdf [Internet]. [cité 9 mai 2021]. Disponible sur: https://www.eurofins-biomnis.com/wp-content/uploads/2016/04/54_Focus_5-FU.pdf
29. Meulendijks D, Henricks L, Sonke G, Deenen M, Froehlich T, Amstutz U, et al. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: A systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 1 oct 2015;16.
30. Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, Barbarino J, Schellens JHM, Swen JJ, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther*. févr 2018;103(2):210-6.
31. Lorient MA, Masskouri F, Carni P, Le Malicot K, Seitz JF, Michel P, et al. [Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency screening for management of patients receiving a fluoropyrimidine: Results of two national practice surveys addressed to clinicians

and biologists]. Bull Cancer (Paris). sept 2019;106(9):759-75.

32. Bouché O, Laurent-Puig P. Médecine personnalisée en cancérologie digestive: vers un traitement à la carte. Paris Berlin Heidelberg: Springer; 2013.

33. La pharmacogénétique en quelques définition.pdf.

34. Boisdron-Celle M. Dérivés fluoropyrimidiques et déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase – Fluoropyrimidines and DPD deficiency. 2008;22:4.

35. Meulendijks D, Henricks LM, Jacobs BAW, Aliev A, Deenen MJ, de Vries N, et al. Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity. Br J Cancer. 23 mai 2017;116(11):1415-24.

36. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renée N, et al. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. nov 1994;12(11):2248-53.

37. Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) et sécurisation des chimiothérapies à base de fluoropyrimidines : mise au point et recommandations nationales du GPCO-Unicancer et du RNPGx | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 24 nov 2020].

Disponible sur:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0007455118300535?token=8186A65EED5D3B5975A0B67F3EA536573CDA8D779A4F8F3955FDB0C2AF6A7F4797A5FDFC383CB0E12F86425A40DA26EC>

38. Staveren MC van, Kuilenburg ABP van, Guchelaar HJ, Meijer J, Punt CJA, Jong RS de, et al. Evaluation of an oral uracil loading test to identify DPD-deficient patients using a limited sampling strategy. Br J Clin Pharmacol. 2016;81(3):553-61.

39. Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, et al. Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. Br J Cancer. 19 mai 2009;100(10):1549-57.

40. Neto OV, Raymundo S, Franzoi MA, do Carmo Artmann A, Tegner M, Müller VV, et al. DPD functional tests in plasma, fresh saliva and dried saliva samples as predictors of 5-fluorouracil exposure and occurrence of drug-related severe toxicity. Clin Biochem. juin 2018;56:18-25.

41. Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Gamelin L, Morel A, et al. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Cancer Lett. 8 mai 2007;249(2):271-82.

42. boss. Dépistage systématique du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD): mesure de l'uracilémie [Internet]. RESEAU FRANCAIS DES CENTRES REGIONAUX DE PHARMACOVIGILANCE. 2019 [cité 10 mai 2021]. Disponible sur:

<https://www.rfcrpv.fr/depistage-systematique-deficit-dihydropyrimidine-deshydrogenase-dpd-mesure-de-luracilemie/>

43. EMA. EMA recommendations on DPD testing prior to treatment with fluorouracil, capecitabine, tegafur and flucytosine [Internet]. European Medicines Agency. 2020 [cité 23 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommendations-dpd-testing-prior-treatment-fluorouracil-capecitabine-tegafur-flucytosine>

44. Des recommandations pour prévenir certaines toxicités sévères des chimiothérapies par fluoropyrimidines [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 1 déc 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2892234/fr/des-recommandations-pour-prevenir-certaines-toxicites-severes-des-chimiotherapies-par-fluoropyrimidines

45. recherche_dun_deficit_en_dihydropyrimidine_deshydrogenase_visant_a_prevenir_certaines_toxicites_severes_associees_aux_traite.pdf [Internet]. [cité 26 mai 2022]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-12/recherche_dun_deficit_en_dihydropyrimidine_deshydrogenase_visant_a_prevenir_certaines_toxicites_severes_associees_aux_traite.pdf)

[12/recherche_dun_deficit_en_dihydropyrimidine_deshydrogenase_visant_a_prevenir_certaines_toxicites_severes_associees_aux_traite.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-12/recherche_dun_deficit_en_dihydropyrimidine_deshydrogenase_visant_a_prevenir_certaines_toxicites_severes_associees_aux_traite.pdf)

es_toxicites_severes_associees_aux_traite.pdf

46. Fiche-pratique-dépistage-déficit-en-DPD-V6.pdf [Internet]. [cité 30 déc 2020].

Disponible sur: <https://www.onco-hdf.fr/app/uploads/2019/05/Fiche-pratique-d%C3%A9pistage-d%C3%A9ficit-en-DPD-V6.pdf>

47. Jacobs BAW, Rosing H, de Vries N, Meulendijks D, Henricks LM, Schellens JHM, et al. Development and validation of a rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for determination of uracil and dihydrouracil in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 15 juill 2016;126:75-82.

48. Coudoré F, Roche D, Lefeuvre S, Faussot D, Billaud EM, Lorient MA, et al. Validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for quantifying uracil and 5,6-dihydrouracil in human plasma. *J Chromatogr Sci.* déc 2012;50(10):877-84.

49. Chavani O, Jensen BP, Strother RM, Florkowski CM, George PM. Development, validation and application of a novel liquid chromatography tandem mass spectrometry assay measuring uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil, 5,6-dihydro-5-fluorouracil, α -fluoro- β -ureidopropionic acid and α -fluoro- β -alanine in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 5 août 2017;142:125-35.

50. Büchel B, Rhyn P, Schürch S, Bühr C, Amstutz U, Largiadèr CR. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomed Chromatogr BMC.* janv 2013;27(1):7-16.

51. Remaud G, Boisdron-Celle M, Hameline C, Morel A, Gamelin E. An accurate dihydrouracil/uracil determination using improved high performance liquid chromatography method for preventing fluoropyrimidines-related toxicity in clinical practice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 5 sept 2005;823(2):98-107.

52. Quantitative impact of pre-analytical process on plasma uracil when testing for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency - Maillard - *British Journal of Clinical Pharmacology* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 22 oct 2022]. Disponible sur: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcp.15536>

53. Capiou S, Landschoot AV, Reyns T, Stepman H. Pre-analytical considerations for the analysis of uracil and 5,6-dihydrouracil in heparin plasma. *Clin Chem Lab Med CCLM.* 1 avr 2022;60(5):e112-5.

54. van den Wildenberg SAH, Streng AS, van den Broek R, Broeren MAC, Deenen MJ, van Dongen LJ, et al. Quantification of uracil, dihydrouracil, thymine and dihydrothymine for reliable dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) phenotyping critically depend on blood and plasma storage conditions. *J Pharm Biomed Anal.* 30 nov 2022;221:115027.

55. Henricks LM, Jacobs BAW, Meulendijks D, Pluim D, van den Broek D, de Vries N, et al. Food-effect study on uracil and dihydrouracil plasma levels as marker for dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* déc 2018;84(12):2761-9.

56. Jiang H, Jiang J, Hu P, Hu Y. Measurement of endogenous uracil and dihydrouracil in plasma and urine of normal subjects by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25 mars 2002;769(1):169-76.

57. de With M, Knikman J, de Man FM, Lunenburg CATC, Henricks LM, van Kuilenburg ABP, et al. Dihydropyrimidine Dehydrogenase Phenotyping Using Pretreatment Uracil: A Note of Caution Based on a Large Prospective Clinical Study. *Clin Pharmacol Ther.* 2022;112(1):62-8.

58. The impact of liver resection on the dihydrouracil:uracil plasma ratio in patients with colorectal liver metastases | SpringerLink [Internet]. [cité 22 oct 2022]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00228-018-2426-4>

59. Pretherapeutic screening for Dihydropyrimidine deshydrogenase deficiency in measuring uracilemia in dialysis patients leads to a high rate of falsely positive results - PubMed [Internet]. [cité 22 oct 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34515833/>
60. Clinical considerations for DPD deficiency testing in advanced cancer patients: tumor lysis syndrome should be considered as a major interference - PubMed [Internet]. [cité 22 oct 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35525375/>
61. Artificial increase of uracilemia during fluoropyrimidine treatment can lead to DPD deficiency misinterpretation - Annals of Oncology [Internet]. [cité 22 oct 2022]. Disponible sur: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(21\)00160-5/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(21)00160-5/fulltext)

Annexe :

Annexe 1 : Fiche de traçabilité des conditions pré-analytiques lors d'un prélèvement sanguin avant l'instauration d'un traitement par fluoropyrimidines. (CHRU Tours).

 Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire Unité de pharmacogénétique, CHU Bretonneau, 2 bis boulevard Tonnellé – 37044 TOURS Cedex Contact : Dr Chantal BARIN - Tel 02-47-47-80-60 - chantal.barin-leguellec@univ-tours.fr	
PHARMACOGENETIQUE - Traitement par fluoropyrimidines et/ou irinotecan	
PATIENT (Etiquette) Nom : Prénom : Sexe : Date de naissance : LABORATOIRE DEMANDEUR Correspondant : Tel : Cachet :	MEDECIN PRESCRIPTEUR Nom : Etablissement : Service : Adresse : CP : Ville : Tel :
ANALYSES DEMANDEES (cocher la/les cases) ☐ Déficit en DPD (Dihydropyrimidine Deshydrogénase, DPD) ☐ Génotypage DPYD ☐ Phénotypage DPD (dosage uracile et UH2) ☐ Génotypage UGT1A1 (UDP-glucuronyl-transférase) Les résultats sont habituellement disponibles sous 7 à 14 jours	CONTEXTE (cocher la/les cases) ☐ Dépistage pré-thérapeutique Date prévue de la chimiothérapie :/...../..... ☐ Exploration d'une toxicité ☐ 5-Fluorouracile ☐ Capécitabine ☐ Irinotecan ☐ Cancer colo-rectal ☐ Cancer ORL ☐ Cancer sein
PRELEVEMENT Date de prélèvement :/...../..... Identité préleveur : Génotypage DPYD et/ou UGT1A1 : Un tube héparinate de Li sans gel séparateur (bouchon vert) de 5 mL, bien rempli.  Phénotypage DPD : Un tube héparinate de Li sans gel séparateur (bouchon vert) de 8 mL bien rempli, ou 2 tubes de 4 mL  • Noter impérativement l'heure de prélèvement :hmin	
TRANSMISSION AU LABORATOIRE Adresser le ou les tubes à votre laboratoire dans un délai de 1h30 maximum si température ambiante ou de 5h à +4°C Joindre cette fiche complétée Joindre le consentement éclairé, signé du patient et du médecin prescripteur.	
CADRE RESERVE AU LABORATOIRE RECEVANT LES PRELEVEMENTS/ TRAITEMENT PRE-ANALYTIQUE Si demande de génotypage : Ne pas centrifuger le tube et le conserver à +4°C Si demande de phénotypage : Centrifuger le tube dès réception (notez ci-dessous l'heure d'arrivée au laboratoire), séparer le plasma et congeler deux aliquots de 1 à 1.5 mL à -20°C. • Date/...../..... et heure d'arrivée au laboratoire: lehmin • Heure de congélation des aliquots de plasma :hmin Envoyer les échantillons (sang total à température ambiante et plasmas à -20°C), la présente fiche et le consentement au laboratoire de biochimie et biologie moléculaire du CHU de Tours dans un délai de 4 jours maximum.	
CADRE RESERVE LABO DU CHU DE TOURS • Date/...../..... et heure d'arrivée au laboratoire: lehmin	

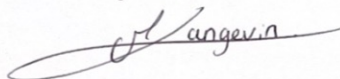
ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e)Langevin.....Daccien.....

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (Décret n°92-657 du 13 juillet 1992)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21202494

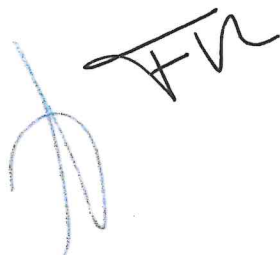
N° Thèse : 82

Nom et Prénom : Langevin Marion

Sujet : Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase : Impact des conditions préanalytiques sur la prise en charge thérapeutique des patients traités par fluoropyrimidines.

Tours, le : 08/11/2022

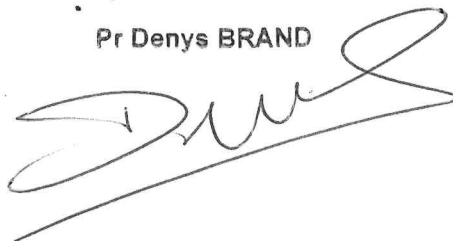
Le(s) Directeur(s) de Thèse :



Vu et Transmis :
Le Doyen

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



LANGEVIN MARION

N° 82

Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase : Impact des conditions préanalytiques sur la prise en charge thérapeutique des patients traités par fluoropyrimidines.

Les chimiothérapies à base de fluoropyrimidines (5-fluorouracile, capécitabine) sont associées à des effets indésirables sévères, voire mortels. Ce phénomène peut être en partie expliqué par un dysfonctionnement d'une enzyme impliquée dans le métabolisme de ces médicaments, la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD). En 2019, l'ANSM a imposé la recherche d'un déficit en DPD pour tout patient recevant une chimiothérapie par fluoropyrimidines. Cette recherche doit être réalisée par la détermination des concentrations sanguines en uracile (U), substrat endogène de la DPD, éventuellement associé à celle de son métabolite, le dihydrouracile (UH2). Cependant, des conditions préanalytiques très strictes sont recommandées pour cette détermination : acheminement au laboratoire dans un délai <1h30 à température ambiante (TA) ou < 4h à +4h, alors même que le dosage est réalisé par peu de laboratoires spécialisés. De plus, ces recommandations reposent sur un très faible nombre d'études ou échantillons.

Dans ce contexte, nous avons initié la constitution d'un groupe de travail regroupant plusieurs CHRU, afin de mettre en commun les données et d'harmoniser les pratiques en routine.

Nous avons évalué la stabilité des concentrations plasmatiques d'uracile et du dihydrouracile dans le sang total et dans le plasma à température ambiante et à +4°C ; ainsi que la stabilité du plasma pendant la congélation et durant des cycles de congélation/recongélation. En parallèle, l'impact de l'anticoagulant (EDTA ou HEP-Li) utilisé dans le tube collecteur a été analysé ; de même que la variabilité intra-individuelle sur les concentrations d'U, UH2 pour un même patient.

Nous avons retrouvé que le sang total doit être centrifugé immédiatement ou jusqu'à 1h s'il est conservé à température ambiante ou 12h s'il est conservé à +4°C. Le plasma, lui, peut être conservé pendant 1h à température ambiante, 4h à +4°C et congelé pendant 1 an à -20°C ou -80°C. Quant au prélèvement, il doit s'effectuer en utilisant des tubes EDTA avec un transport réfrigéré jusqu'au laboratoire.

Pour conclure, ces recommandations sur les conditions préanalytiques doivent être respectées et contrôlées avant d'effectuer le phénotypage. En effet, le non-respect des conditions peut causer des faux-positifs, entraînant un risque d'une mauvaise interprétation du déficit et donc une diminution de dose ou d'un changement de chimiothérapie.

Fluoropyrimidines, 5-fluorouracile, dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase, génotypage, phénotypage, conditions pré-analytiques, variabilité intra-individuelle

JURY

PRÉSIDENT : Gildas Prié, Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie-TOURS

MEMBRES :

Hugo Alarcan, Pharmacien, Asistant Hospitalier Universitaire, CHRU- TOURS

Laura Foucault-Fruchard, Pharmacien, Maître de conférence, Praticien Hospitalier, CHRU- TOURS

Claude Vallet, Pharmacien d'officine, Docteur en pharmacie, Ascoux

Thèse soutenue le 8 novembre 2022 à la Faculté de Pharmacie de Tours