



HAL
open science

Développement et validation d'une méthode de phénotypage de la dihydropyrimidine déhydrogénase par chromatographie ultraperformante

Clémence Marin

► **To cite this version:**

Clémence Marin. Développement et validation d'une méthode de phénotypage de la dihydropyrimidine déhydrogénase par chromatographie ultraperformante. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02368978

HAL Id: dumas-02368978

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02368978>

Submitted on 18 Nov 2019

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

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

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le 8 Novembre 2019

par
Clémence MARIN
Née le 19 août 1993 à Avignon

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988
tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE
PHÉNOTYPAGE DE LA DIHYDROPYRIMIDINE DÉHYDROGÉNASE
PAR CHROMATOGRAPHIE ULTRAPERFORMANTE**

----oOo----

Président du jury : M. le Professeur Bruno LACARELLE

Membres du jury : M. le Professeur Joseph CICCOLINI (Directeur de Thèse)

M. le Professeur Alexandre EVRARD

M. le Docteur Bertrand POURROY

M. le Professeur Sébastien SALAS

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FAC



27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

- Doyen :* Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
- Vice-Doyens :* M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
- Chargés de mission :* Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
- Conseiller du Doyen :* M. Patrice VANELLE
- Doyens honoraires :* M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
- Professeurs émérites :* M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri Portugal
- Professeurs honoraires :* M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BIRAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
- Chef des Services Administratifs :* Mme Florence GAUREL
- Chef de Cabinet :* Mme Aurélie BELENGUER
- Responsable de la Scolarité :* Mme Nathalie Besnard

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT

M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE
INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILI

Mme Odile RIMET-GASPARINI

Mme Pascale BARBIER

M. François DEVRED

Mme Manon CARRE

M. Gilles BREUZARD

Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA

Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE,
PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE

M. Emmanuel CAUTURE

Mme Véronique ANDRIEU

Mme Véronique ANDRIEU

Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET
CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE

Mme Laurence CAMOIN-JAU

Mme Florence SABATIER-MALATERRE

Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN

M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE
ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET
CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI

M. Thierry AUGIER

M. Edouard LAMY

Mme Alexandrine BERTAUD

Mme Claire CERINI

Mme Edwige TELLIER

M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER

M. Romaric LACROIX

Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET

M. Michel DE MEO

Mme Anne DAVIN-REGLI

Mme Véronique ROUX

M. Fadi BITTAR

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE,
HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE
Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT

M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE

M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE,
HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL

Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT

M. Alain NICOLAY

Mme ESTELLE WOLF

Mme Elise LOMBARD
Mme Camille DESGROUAS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIES

M. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA
Mme Manon ROCHE

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMA
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE,
HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Cyril PUJOL

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET
ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET
COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET
GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

M. Charles DESMARCHELIER

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE

Mme Diane BRAGUER

M. Stéphane HONORÉ

PHARMACODYNAMIE

M. Benjamin GUILLET

TOXICOLOGIE GENERALE

M. Bruno LACARELLE

TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE

M. Guillaume HACHE

Mme Ahlem BOUHLEL

M. Philippe GARRIGUE

PHYSIOLOGIE

Mme Sylvie LORTET

Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL

TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE

M. Joseph CICCOLINI

Mme Raphaëlle FANCIULLINO

Mme Florence GATTACECCA

TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE

M. Pierre-Henri VILLARD

Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE

M. Florian CORREARD

PHARMACOCINETIQUE

Mme Nadège NÉANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme Tonneau-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

*« L'UNIVERSITÉ N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION
AUX OPINIONS ÉMISES DANS LES THÈSES. CES OPINIONS DOIVENT ÊTRE
CONSIDÉRÉES COMME PROPRES À LEURS AUTEURS. »*

Remerciements

À **Monsieur le Professeur Bruno Lacarelle**, pour avoir accepté d'être le président de ce jury de thèse mais également, pour m'avoir déjà accueilli 3 ans et demi au sein du laboratoire de pharmacocinétique. Merci de me permettre de réaliser mes projets professionnels au sein de votre laboratoire.

À **Monsieur le Docteur Alexandre Evrard**, pour avoir accepté d'être dans ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance tant pour cette thèse ci que pour votre place dans le comité de suivi de mon *autre* thèse.

À **Monsieur le Docteur Bertrand Pourroy**, merci pour avoir accepté d'être dans ce jury et pour apporter votre vision de pharmacien hospitalier sur ce travail.

À **Monsieur le Professeur Sébastien Salas**, pour me faire l'honneur de faire partie de ce jury. Merci pour votre bonne humeur éternelle en toute circonstance y compris dans l'adversité que présente parfois l'administration.

À **Monsieur le Professeur Joseph Ciccolini**, directeur de cette thèse, pour m'avoir soutenue et accompagné dans ce projet. Merci pour votre humour à tout épreuve, tantôt rieur tantôt grogneur mais toujours avec le sourire (et l'accent corse). Merci de m'avoir accueilli dans cette famille qu'est la pharmacocinétique.

Aux labos, que ce soit le Laboratoire de Pharmacocinétique ou le SMARTc, vous qui m'avez accueilli, formé, et fait grandir en tant que professionnel (de santé, et/ou chercheuse) merci à vous toutes et tous : Caroline, Sylvie, Emmanuelle, Romain, Bénédicte, Christel, Robert, Julien, Raphaëlle, Florence, Manon, Mickaël, Cécile, Natalia, Michelle, Laurent & Laurent, Sarah, Carole, et Laurence.

À **Mady et Minnie**, qui m'ont étroitement accompagné sur ce projet ; Minnie pour ton éternel sourire et Mady pour ta capacité à *murmurer à l'oreille des chromato* un énorme merci à toute les deux !

À **Laetitia et Laurine**, avec qui même les journées difficiles se terminaient en sourire grâce à cette question devenue culte « On sort ? ☺ »

À **tous les stagiaires/externes/internes** qui ont travaillé avant moi sur ce projet qui en ont perdu leur latin je ne pouvais pas vous omettre ici : Anne, Valentin, Mathilde, Anis, Chloé et certainement d'autres que je n'ai pas eu la chance de connaître.

À **ma mère**, (oui je n'ai pas écrit **Maman** je t'entends *rainier* d'ici ^^) merci pour ton soutien inconditionnel et parfois déroutant parce que tu as cette capacité d'y croire à ma place quand je n'y croyais pas moi-même. Merci d'être ce que tu es, merci d'être là, merci d'être tout simplement.

À **ma famille, la vraie**, celle que l'on choisit de côtoyer, merci d'être la contre vent et marée, dans les joies comme dans les prises de bec passagères. Merci pour cette phrase culte de notre « Dalida » préférée qui deviendra une blague familiale. Mamie, les Doudous, et Blandine, merci de m'écouter me raconter mes journées même lorsque vous avez l'impression que je parle chinois.

À **mon grand-père**, à toi qui a suivi presque tout mon parcours. Tu manques de peu ces dernières étapes, faute d'être parti trop vite. Je deviens aujourd'hui une « faiseuse de remède » comme tu le disais si bien.

Aux 4 fantastiques devenus 6 cette année (vous vous reconnaîtrez j'en suis sûre), merci pour ces fous rires, ces moments indescriptibles de grand n'importe quoi qui sont devenus notre marque de fabrique. Aujourd'hui je gagne mon pari d'être thésée la première. J'ai hâte de venir assister aux vôtres.

À **tous mes copains d'association**, que nous ayons fait partie de la même asso ou que nous nous soyons rencontrés grâce à nos asso respectives un grand merci à vous tous ! Dans ce monde qu'est l'internat vous avez toujours su être de bons conseils, me remonter le moral, partager des débats enflammés et me donner confiance en moi et pour tout cela merci : Moïse (mon frisé), Romain (la particule !), Quentin (J'irai ou tu iras), Koala Girl, Cha', Juju (#PunchLine), Aurélie (LaTruffe), Guigui, Alexandre, JD, Marion, Louis, mais aussi Jo, Walter, Jean-Sélim, Mathilde, Hêxa, Antoine, Charlotte, Chrystel, Guillaume, Stuti.

À ma Dream Team, mes plus vieux amis **Cha** et **Nico**, cela fait plus de 12 ans que nous nous suivons parfois de loin mais toujours aussi proche. Je n'imagine pas ce que serait ma vie si nous ne nous étions pas rencontrés durant cette année de seconde dans ce bar qui deviendra notre QG. Nico, malgré ta capacité à faire peur à la plupart de mes amies tu as toujours été là dans les bons moments et les galères et pour cela merci ! Quant à toi ma Cha, il n'y a aucun mot dans cette langue ni les autres pour définir ce que nous sommes l'une pour l'autre, j'ai hâte de partager avec toi chaque étape de nos vies, la seule chose qui soit sûre c'est que toi et moi cela n'aurait pu être autrement. Je vous aime tous les deux au-delà de la folie.

Tables des matières

Remerciements	10
Listes des abréviations	15
Listes des tableaux	17
Listes des Figures	18
PARTIE A : État des connaissances	19
I. Introduction	20
II. Le 5-FU	22
1. Historique	22
2. Structure	23
3. Indication	24
4. Pharmacodynamie	24
5. Pharmacocinétique	25
a. Généralités	25
b. Pharmacocinétique du 5-FU	27
6. Toxicités	28
7. Cas de la capécitabine (Xeloda®)	29
8. Antidote	30
III. La Dihydro Pyrimidine Déhydrogénase	31
1. Généralités	31
2. Pharmacogénétique	32
a. Généralités	32
b. Le gène DPYD et ses mutations	33
3. Détection de la déficience en DPD	34
a. Généralités	34
b. Génotypage	35
c. Phénotypage	35
4. Adaptation de posologie en fonction du déficit en DPD	36
PARTIE B : Travaux personnels	39
I. Objectifs	40

II.	Mise au point d'une technique de phénotypage de la DPD par UPLC-UV.....	41
1.	Matériel & Méthodes	41
a.	Appareillages	41
b.	Colonnes	41
c.	Choix de l'étalon interne (EI)	41
d.	Protocoles d'extraction	41
e.	Phases mobiles.....	43
f.	Détection par ultra-violet (UV).....	44
g.	Gamme d'étalonnage	44
h.	Étude de la stabilité	45
2.	Résultats	45
3.	Étude de stabilité des prélèvements.....	54
a.	Stabilité durant le transport.....	54
b.	Stabilité lors du cycle congélation/décongélation.....	56
III.	Une méthode UPLC-UV simple et rapide pour la détermination du statut fonctionnel de la DPD chez les patients atteints de cancer (Article).....	57
IV.	Étude de l'activité de dépistage du déficit en DPD dans le laboratoire de pharmacocinétique et toxicologie CHU Timone.....	87
1.	Phénotypage.....	87
2.	Génotypage	88
	CONCLUSION	90
	Bibliographie	91
	Listes des Annexes	99
	Annexes.....	100
	Glossaire	106

Listes des abréviations

5-FdUMP : 5-fluoro-désoxyuridine monophosphate

5-FdUTP : 5-fluoro-désoxyuridine triphosphate

5-FU : 5-fluorouracile

5-FUdR : 5-fluorodésoxyuridine

5-FUH2 : Dihydro-5-fluorouracile

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AP-HM : Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

BSA : Bovine Serum Albumin

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CQ : Contrôle de Qualité

DPD : Dihydropyrimidine Déhydrogénase

dUMP : Désoxyuridine monophosphate

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EI : Étalon Interne

EMA : Agence Européenne des Médicaments

FDA : Food and Drugs Administration

FUPA : Fluorouréidopropionique

GPCO-Unicancer : Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique-Unicancer

HAS : Haute Autorité de Santé

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

INCa : Institut National du Cancer

LQ : Limite de Quantification

PK : Pharmacocinétique

P.U.I : Pharmacie à Usage Intérieur

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

RNPGx : Réseau National de Pharmacogénétique Hospitalière

THF : Tétrahydrofolate

TS : Thymidine synthétase

U : Uracile

UPLC-UV : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à une détection par Ultra-Violet

TEA : TriEthylAmine

Listes des tableaux

Tableau 1 : Liste des analogues de la pyrimidine utilisés en oncologie

Tableau 2 : Principales mutations du gène *DPYD* rencontrées et leur impact sur l'activité de la DPD

Tableau 3 : Gradient des phases mobiles utilisées lors de la mise au point

Tableau 4 : Hauteurs des pics obtenues après injection d'une solution pure d'U, d'UH2, et d'EI pour différentes longueurs d'ondes

Tableau 5 : Courbe de calibration de l'U (265nm) et de l'UH2 (210nm) obtenue avec le protocole S/LI débit 0,25mL/min

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des tests statistiques effectués lors des tests de stabilité de transport de l'uracile et du dihydro-uracile ($\alpha = 10\%$)

Listes des Figures

Figure 1 : Charles Heidelberger (1920-1983)

Figure 2 : Structures de la Thymine, de l'Uracile et du 5-FU

Figure 3 : Cycles des folates

Figure 4 : Anabolisme du 5-FU

Figure 5 : Répartition entre anabolisme et catabolisme

Figure 6 : Transformation de la capécitabine en 5-FU

Figure 7 : Action de la DPD sur le 5-FU

Figure 8 : Adaptation de posologie en fonction de l'uracilémie selon les recommandations de décembre 2018 de l'HAS et l'INCa

Figure 9 : Chromatogrammes de deux points de gamme à 210 et 265 nm extraits à partir du protocole L/L sur la colonne H

Figure 10 : Chromatogrammes de deux points de gamme à 210 et 265 nm extraits à partir du protocole S/LI sur la colonne A

Figure 11 : Chromatogrammes d'un blanc (A et C) et du premier point de gamme = LQ (B et D) réalisé avec une BSA du fournisseur Sigma-Aldrich® ou MP Biomedicals®

Figure 12 : Évolution des taux d'U et d'UH2 en fonction de la durée et de la température du transport.

Figure 13 : Évolution du nombre de patients phénotypés par mois au sein du laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie du CHU Timone.

Figure 14 : Évolution du nombre de patients génotypés par mois au sein du laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie du CHU Timone.

PARTIE A : État des connaissances

I. Introduction

Le cancer est un ensemble de pathologies caractérisé par la prolifération incontrôlée de cellules, liée à un échappement aux mécanismes de régulation qui assurent le renouvellement cellulaire. En 2015, le cancer est la première cause de mortalité en France avec 149 500 décès, et environ 385 000 nouveaux cas [1]. Depuis plus de 50 ans maintenant, les équipes soignantes mènent un combat sans relâche pour endiguer ces pathologies. C'est dans ce contexte que de nombreuses stratégies thérapeutiques furent mises en place au cours du temps que ce soit la chirurgie, la chimiothérapie cytotoxique, la radiothérapie, l'immunothérapie cellulaire ou monoclonale, les thérapies ciblées orales ou encore les biothérapies.

Le 5-fluorouracile (5-FU) est une des plus anciennes chimiothérapies cytotoxiques développées. En effet, il est utilisé depuis plus de 60 ans dans le traitement de nombreuses tumeurs solides (cancer digestif, cancer du sein, cancer ovarien, et cancer de la sphère oro-pharyngée). Commercialisé par le laboratoire américain Hoffman-Laroche®, le 5-FU est un cytotoxique de la classe des anti-métabolites. Administré par voie intraveineuse, il va immédiatement subir un métabolisme hépatique intensif qui le rendra inactif. On estime ainsi que 90% de la dose administrée est dégradée par lors du premier passage hépatique. Pour contrebalancer ce phénomène, les posologies administrées sont donc beaucoup plus importantes que la dose nécessaire à l'activité cytotoxique. L'enzyme responsable de ce métabolisme hépatique est la dihydropyrimidine déhydrogénase (DPD). Cependant, l'activité de cette enzyme est soumise à une importante variabilité interindividuelle responsable de cas de toxicités sévères et dans de rares cas de décès toxiques. Pendant de nombreuses années, la recherche du déficit en DPD avant administration de fluoropyrimidines n'a pas été clairement conseillé par les tutelles. Toutefois, une contre-indication à l'utilisation de ces thérapeutiques était indiquée dans le Résumé des Caractéristiques du Produit si un déficit complet en DPD était connu avant administration, notamment avec la capécitabine, pro-drug orale du 5-FU. Suite à de nombreuses remontées (qu'elles soient médiatiques ou parlementaires), les autorités sanitaires se sont saisies de ce dossier. Au final, la délivrance du 5-FU ou de la capécitabine par le pharmacien de P.U.I. ou de ville est subordonnée à la mention sur l'ordonnance que le déficit en DPD ait bien été recherché en amont, en avril 2019.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris de réaliser les travaux exposés ici. Devant l'augmentation exponentielle de demande de dosage de l'uracilémie due à ces recommandations il était primordial de permettre à tous les laboratoires qui le souhaitent d'être en mesure de doser l'uracilémie. C'est pourquoi nous avons développé une méthode rapide, simple et compatible avec un screening à grand échelle de dosage de l'uracilémie.

Ainsi, après un rappel des connaissances disponibles à ce jour sur ce sujet, nous exposerons les étapes de la mise au point de cette méthode. Par la suite, nous présenterons les résultats de la validation de cette méthode selon les normes ISO 15189, issues des guidelines internationales. Enfin, nous présenterons une étude réalisée au sein du laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie du CHU Timone (AP-HM) sur l'évolution de l'activité de dépistage de la DPD en fonction du calendrier des recommandations.

II. Le 5-FU

1. Historique

C'est Charles Heidelberger professeur à l'université du Wisconsin qui, en étudiant la toxicité de l'atome de fluor dans l'acide fluoracétique a découvert que celui-ci bloquait une enzyme vitale pour le métabolisme cellulaire. Heidelberger voulut alors incorporer cet atome dans les pyrimidines qui forment les bases de l'ADN et collabora avec la firme Hoffmann-La Roche, qui synthétisa le fluoro-uracile en 1957 [2].



Figure 1 : Charles Heidelberger (1920-1983)

Commercialisé dans les années 60, le 5-FU deviendra alors une molécule essentielle dans l'arsenal thérapeutique des oncologues. Il appartient à la classe des médicaments anti-métabolites, sous classe des analogues de la pyrimidine. Il fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (liste mise à jour en mars 2017) [3]. Par la suite, d'autres analogues de la pyrimidine seront commercialisés, leur liste étant présentée dans le Tableau 1.

Analogues de la pyrimidine
5-Fluorouracile
Azacitidine
Capécitabine
Cytarabine
Décitabine
Gemcitabine

Tableau 1 : Liste des analogues de la pyrimidine utilisés en oncologie

2. Structure

Le 5-FU est l'analogue 5-fluoré de l'uracile (U), base azotée pyrimidique, qui se lie spécifiquement à l'adénine par deux liaisons hydrogènes dans l'ARN. Dans l'ADN, c'est la thymine qui joue ce rôle. Il faut noter que le précurseur de la thymine, via la thymidilate synthétase, est l'uracile.

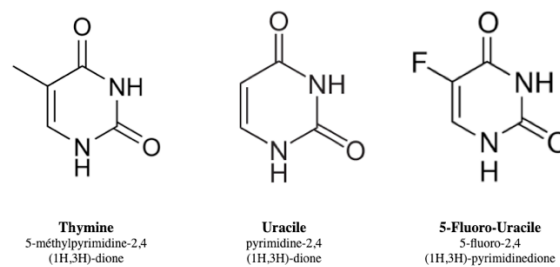


Figure 2 : Structures de la Thymine, de l'Uracile et du 5-FU

La thymidilate synthétase intervient également dans le cycle des folates comme indiqué dans la Figure 3.

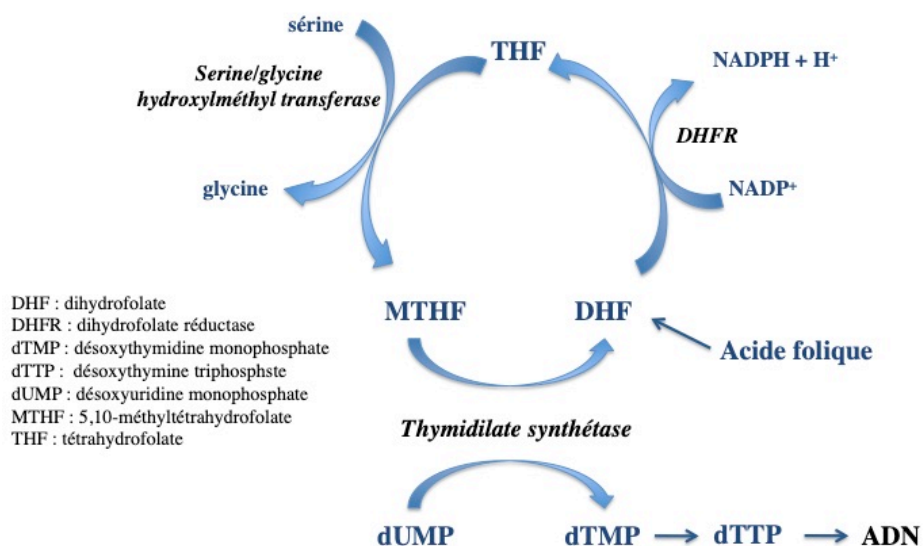


Figure 3 : Cycles des folates

3. Indication

En France, le 5-FU est utilisé chez l'adulte dans de nombreux cancers solides le plus souvent en association avec d'autres cytotoxiques et/ou thérapies ciblées de type biothérapies (anti-EGFR, anti-angiogéniques). En effet, selon le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP), le 5-FU est indiqué dans le traitement des adénocarcinomes digestifs évolués ou pour des cancers colorectaux après résection en situation adjuvante, des adénocarcinomes mammaires après traitement locorégional ou lors des rechutes, des adénocarcinomes ovariens, et dans les carcinomes épidermoïdes des voies aériennes aérodigestives supérieures et oesophagiennes [4].

4. Pharmacodynamie

Afin de mieux comprendre l'activité du 5-FU, il est important de rappeler que l'uracile joue un double rôle fondamental dans les tissus et notamment dans ceux à croissance rapide. D'une part, en étant le précurseur de la thymine, base nécessaire à la synthèse de l'ADN qui préside à la division cellulaire, et d'autre part en entrant dans la composition des ARNs qui président à la synthèse des protéines et des enzymes cellulaires. Ainsi le 5-FU exerce plusieurs effets antimétaboliques :

- il est métabolisé en 5-fluorodéoxyuridine 5'-monophosphate (5-FdUMP) qui, en présence de 6-méthylènetétrahydrofolate, se lie à la thymidilate-synthétase (TS), bloquant la méthylation de l'uracile en thymine, d'où une inhibition de la synthèse d'ADN, qui freine la prolifération cellulaire
- il est phosphorylé sous forme trisphosphatée (FUTP) et incorporé à la place de l'uracile dans les ARNs, entraînant des erreurs de lecture du code génétique lors de la synthèse des protéines et des enzymes, et de la production de co-enzymes inefficaces et de ribosomes immatures [4]
- il s'incorpore sous forme de 5-FdUTP (5-fluorodéoxyuridine triphosphate) dans l'ADN [5], ce qui provoque sa fragmentation [6].

- de perfusion des organes, balance masse maigre/masse grasse, pharmacogénétique des transporteurs membranaires, ...) impactant les concentrations tissulaires.
- **Métabolisme** : biotransformation le plus souvent hépatique par une ou plusieurs réactions enzymatiques du médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs sur le plan pharmacologique, aussi appelés métabolites. Cette biotransformation a pour objectif de faciliter l'élimination du médicament en augmentant son caractère hydrophile le rendant plus apte à subir les processus d'élimination rénaux ou biliaires en cas de métabolite liposoluble. Il existe deux types de réaction de métabolisme les réactions de phase I dites « de fonctionnalisation » (oxydation, réduction, hydrolyse), et les réactions de phase II dites « de conjugaison » (glucuro-, sulfo-conjugaison).
 - **Élimination** : étape lors de laquelle le médicament est excrété hors de l'organisme. Généralement il s'agit d'une élimination par voie rénale et/ou biliaire, cependant d'autres voies d'élimination existent telle que l'élimination pulmonaire, bien que très minoritaire.

Toutes ces étapes peuvent être soumises à des variations responsables de la variabilité interindividuelle de la réponse aux médicaments. L'absorption peut être influée par la prise concomitante avec un repas, et la distribution par une hypovolémie ou une hypo-albuminémie (déshydratation, patient cachexique). Le métabolisme quant à lui peut être impacté par des déficiences enzymatiques (génétique ou induite par un inhibiteur enzymatique), et enfin, l'élimination peut être très diminuée chez des patients présentant une insuffisance rénale ou hépatique.

En conséquence, pour une même dose administrée, deux individus peuvent présenter une grande variabilité de concentrations au niveau de l'organe cible et présenter une inefficacité ou une toxicité ; définissant la variabilité interindividuelle. Cette variabilité peut aussi être observée pour un même individu à deux instants différents ; définissant la variabilité intra-individuelle. La marge thérapeutique est définie comme l'intervalle d'exposition plasmatique entre le seuil d'efficacité et le seuil de toxicité.

b. Pharmacocinétique du 5-FU

Le 5-FU est administré par voie intraveineuse, il disparaît rapidement du sang circulant avec une demi-vie de l'ordre de 10 à 15 minutes. Il diffuse rapidement dans l'ensemble des tissus tumoraux et ceux à croissance rapide (moelle et muqueuse intestinale) car il ne se lie pas ou peu aux protéines plasmatiques (liaison inférieure à 30 %). On observe alors dans ces tissus des concentrations six à huit fois supérieures quatre heures après injection par rapport aux tissus à croissance normale. Il pénètre également dans les espaces extracellulaires (liquide céphalo-rachidien, ascite, épanchement pleural).

Le 5-FU n'est pas actif par lui-même, il est transformé successivement par une cascade enzymatique en divers métabolites intracellulaires actifs qui présentent des similarités structurales et chimiques avec des composés naturels impliqués dans la synthèse des acides nucléiques. Sous ces formes actives, il exerce des effets cytotoxiques en inhibant des enzymes clés ou par incorporation frauduleuse dans les séquences d'ADN et d'ARN, entraînant ainsi la rupture ou l'arrêt de la synthèse de ceux-ci. Comme présenté dans la Figure 4, le 5-FU subit d'abord l'action de la Thymidine Phosphorylase qui conduit à la formation de 5-Fluorouracile désoxyuridine (5-FUdR). La Thymidine Kinase va ensuite phosphoryler ce composé en 5-Fluoro-désoxyuridine monophosphate (5-FdUMP). Ce métabolite entrera en compétition avec le désoxyuridine monophosphate, ou dUMP, et inhibera la Thymidylate Synthétase en formant un complexe ternaire stable avec le cofacteur folate sous forme réduite THF. La croissance cellulaire est alors stoppée.

Parallèlement, le 5-FdUMP peut être phosphorylé par la Pyrimidine Monophosphate Kinase en 5-FdUDP, puis 5-FdUTP. Ce dernier bloque la synthèse de l'ADN après s'y être incorporé [7], [8].

L'inhibition de la Thymidylate Synthétase est connue comme étant le principal mécanisme de cytotoxicité. Cependant, on estime que seul 15 à 20 % de la dose initiale est impliqué dans l'anabolisme en raison d'un très important catabolisme du 5-FU par la Dihydro Pyrimidine Déhydrogénase (DPD) de l'ordre de 80 à 85 % [9].

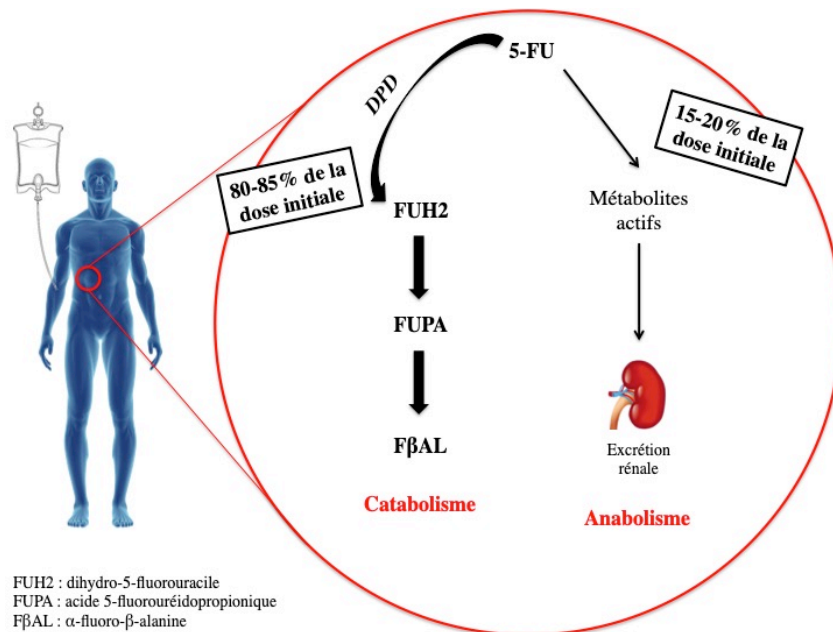


Figure 5 : Répartition entre anabolisme et catabolisme

6. Toxicités

Le 5-FU est connu pour induire des toxicités sévères de grade III/IV chez 10 à 30 % des patients, et des décès toxiques chez 0,3 à 2 % des patients, en fonction des protocoles [10]. La toxicité du 5-FU porte surtout sur les lignées cellulaires saines à division rapide tel que le tissu hématopoïétique ou la muqueuse digestive, ce qui induit un large éventail d'effets indésirables.

Toxicités digestives: Les toxicités non-hématologiques majeures (grade III/IV) sont les toxicités digestives. Elles incluent des diarrhées dans 10 à 15 % des cas et des mucites dans 10 à 25 % des cas [11].

Toxicités hématologiques: La principale toxicité hématologique est une neutropénie, rencontrée dans 10 à 45 % des cas, avec un possible sepsis [10].

Toxicités cardiaques: L'incidence des toxicités cardiaques induite par le 5-FU varie dans la littérature entre 1 et 18%, avec une mortalité de 2 à 13 % [12], [13]. Une revue récente sur la cardiotoxicité chez les patients atteints de cancer a identifié les douleurs thoraciques, palpitations, dyspnée, et hypotension comme les principaux symptômes avec un risque de mort subite défini autour de 0,5 % [14].

Toxicités neurologiques : Les toxicités neurologiques sont plus rares que les toxicités citées précédemment. Il existe par exemple des cas d'encéphalopathies, avec confusion mentale liée à une concentration élevée en ammoniacque [15]–[17], mais également des cas de neuropathies périphériques [18].

Autre toxicité : L'alopécie est un effet indésirable commun des chimio-thérapies.

Cependant, le 5-FU ne s'administrant quasiment jamais en monothérapie, il est difficile de connaître avec certitude la molécule incriminée dans les polychimiothérapies.

7. Cas de la capécitabine (Xeloda®)

La capécitabine, ou Xeloda® est un carbamate de la fluoropyrimidine non cytotoxique. Étant un précurseur du 5-FU, il s'agit donc de la prodrogue de celui-ci. Administrée par voie orale, elle permet de prendre en charge les patients traités par fluoropyrimidines en ambulatoire. La capécitabine possède les mêmes propriétés pharmacodynamiques que le 5-FU. L'activation de la capécitabine suit plusieurs étapes enzymatiques comme présenté dans la Figure 6. L'enzyme impliquée dans la conversion finale en 5-FU, la Thymidine Phosphorylase est principalement localisée dans les tissus tumoraux, bien qu'elle soit également présente à des taux moindres dans les tissus sains [19], [20].

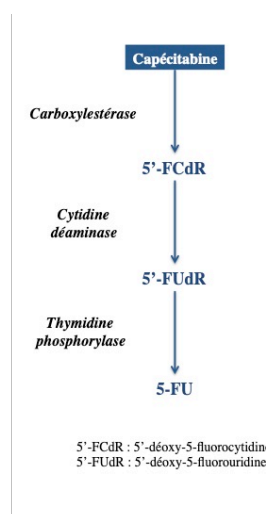


Figure 6 : Transformation de la capécitabine en 5-FU

La transformation en 5-FU semble rapide puisque le Tmax de la capécitabine et du 5-FU sont de 1,5 h et 3,34 h respectivement après quatorze jours de traitement à la dose de 1250 mg/m². La capécitabine est indiquée :

- en traitement adjuvant du cancer du côlon de stade III après résection,
- dans le traitement du cancer colorectal métastatique,
- en première ligne dans le traitement du cancer gastrique avancé
- dans le traitement du cancer du sein localement avancé ou métastatique, après échec d'une chimiothérapie cytotoxique [21].

8. Antidote

La FDA (Food and Drug Administration) a approuvé en décembre 2015 Vistogard® (triacétate d'uridine) en tant que médicament orphelin pour le traitement d'urgence des adultes et des enfants ayant reçu un surdosage en 5-FU ou capécitabine, qui développent certaines toxicités sévères ou menaçant le pronostic vital, dans les 4 jours suivant l'administration du traitement. Vistogard® est administré per os, sous forme de granulés. La posologie est de 10 g chez les adultes, et 6,2 mg/m² (max 10 g) chez l'enfant toutes les 6 h pour 20 doses. Il est commercialisé par Wellstat Therapeutics Corporation basée à Gaithersburg, Maryland.

Le triacétate d'uridine est un dérivé acétylé de l'uridine. Après administration, le triacétate d'uridine est déacétylé par une estérase non spécifique présente dans tout l'organisme, libérant ainsi de l'uridine triphosphate dans la circulation. Celle-ci va agir par compétition avec le 5-FUTP (métabolite toxique du 5-FU) dans la fixation de l'ARN. Le triacétate d'uridine délivre 4 à 6 fois plus d'uridine dans la circulation sanguine qu'une dose équimolaire d'uridine seule [22]. Ce traitement bénéficie en France d'une ATU nominative depuis février 2013. Le temps entre la demande initiale et l'administration au patient en France (envoi des États-Unis) varie entre 24 et 44 h avec une moyenne de 36 h [23].

III. La Dihydro Pyrimidine Déhydrogénase

1. Généralités

La Dihydro Pyrimidine Déhydrogénase (DPD) se trouve dans de nombreux tissus, mais majoritairement dans le foie. Cette enzyme, codée par le gène *DPYD*, est responsable de la détoxification du 5-FU. Sur le plan physiologique, elle transforme l'uracile (U) en dihydro-uracile (UH₂), mais dans le cadre du catabolisme du 5-FU elle transforme celui-ci en dihydro-5-fluorouracile (5-FUH₂). La dihydropyrimidinase clive ensuite le noyau pyrimidine pour donner l'acide 5-fluorouréidopropionique (FUPA) [24]. Enfin, l'uréidopropionase dégrade le FUPA en α -fluoro- β -alanine qui est éliminé dans l'urine. L'activité de la DPD constitue l'étape limitante de la détoxification du 5-FU. Ces derniers métabolites sont ensuite éliminés par voie urinaire.

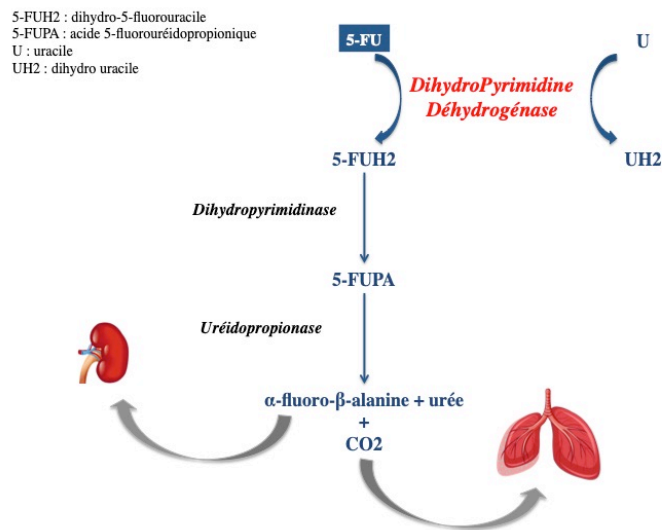


Figure 7 : Action de la DPD sur le 5-FU

La DPD présente une importante variabilité interindividuelle, on parle de « DPD deficiency syndrome » [25], [26]. Une déficience de la DPD est retrouvée chez 39 à 61 % des patients présentant une toxicité sévère [27]. En effet, les patients présentant un déficit de l'activité de cette enzyme ont un risque de surexposition et donc de toxicité aiguë, précoce après administration de 5-FU, potentiellement mortelle. La clairance du 5-FU passe de 65 à moins de

1 L.h⁻¹.m² avec une augmentation de la demi-vie de 0,7 à plus de 5 h chez des patients présentant des altérations profondes de l'activité de la DPD [28].

L'activité de la DPD suit une distribution gaussienne dans la population, selon un rythme circadien [7], [29]–[35] et d'importantes variations interindividuelles sont observées [36]. Les déficits en DPD, partiels ou totaux, sont rapportés chez environ 3 à 5 % et 0,2 % respectivement [35]. Cependant d'autres chiffres ont été énoncés par notre équipe dans les cancers ORL à plus de 15 % [37], ou dans les cancers colorectaux avec 23 % de patient présentant un déficit en DPD, dont un patient déficitaire profond [38].

L'absence totale connue d'activité de la DPD a toujours présenté une contre-indication formelle à l'administration de 5-FU et de capécitabine [4], [21]. Cependant, pendant de nombreuses années il n'existait aucune obligation de recherche du statut DPD pour la délivrance des fluoropyrimidines. Suite à diverses alertes médiatiques, diverses questions au gouvernement ont été posées à ce sujet lors de séances à l'Assemblée Nationale [39]–[42]. À la suite de ces sollicitations, en février 2018 l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) recommande, à la lecture des conclusions d'un groupe de travail pluridisciplinaire, le dépistage du déficit en DPD avant administration de toute fluoropyrimidine [43]. Cette recommandation faite suite aux recommandations du Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique (GPCO)-Unicancer, et du Réseau National de Pharmacogénétique Hospitalière (RNPGx) [44]. En décembre 2018, la Haute Autorité de Santé (HAS) et l'Institut National du Cancer (INCa) publient leurs recommandations sur les modalités de recherche du déficit en DPD. C'est le phénotypage par mesure de l'uracilémie qui a été retenu comme la méthode la plus fiable de détection du déficit total en DPD à ce jour [45]. Enfin, la recherche du déficit en DPD par mesure de l'uracilémie sera rendu obligatoire par l'ANSM en avril 2019 pour délivrer les fluoropyrimidines, notamment le 5-FU [46].

2. Pharmacogénétique

a. Généralités

L'Agence européenne du médicament (EMA) a donné en 2003 une première définition de la pharmacogénétique : « Étude des variations interindividuelles de la séquence de l'ADN reliées à la réponse aux médicaments. ». A l'instar de l'adaptation posologique tenant compte

des fonctions d'élimination d'un patient, le choix d'une thérapeutique et/ou de sa posologie repose également sur des informations pharmacogénétiques. Le terme « polymorphisme génétique » désigne de manière générale la coexistence de plusieurs versions d'un même gène (versions appelées « allèles ») ou d'un même locus dans la population, chacune retrouvée à une fréquence de moins de 1 %. Ce terme est communément utilisé en pharmacogénétique pour qualifier la variation de séquence d'ADN à l'origine d'un polymorphisme. Contrairement aux variations de séquences désignées par le terme « mutations », les polymorphismes sont généralement non pathogènes et sont transmis au cours des générations. Beaucoup peuvent être retrouvés à des fréquences inférieures au seuil théorique de 1 %.

b. Le gène *DPYD* et ses mutations

Le gène *DPYD* est situé sur le chromosome 1p22, il inclue 23 exons, et 22 introns. Au total, près de 160 sites de mutations potentielles ont été identifiés, et certains peuvent induire des réductions dans l'activité de la DPD [47]–[49]. La mutation la plus connue est le variant allélique *DPYD**2A [50], [51], il s'agit du remplacement d'une guanine par une adénine sur la séquence de reconnaissance d'épissage de l'intron 14 induisant une délétion de 165 paires de bases dans l'ARNm de la DPD. Elle est impliquée dans plus de 50 % des cas de déficits complets.

Mutation	Fréquence	Effet sur l'activité de la DPD
DPYD*2A	< 0,005 - 3,5 % rare chez les sujets asiatiques afro-américains 0,6 % chez la population turque [52]	Catalytiquement inactive Faible activité DPD (< 12,5 % activité), toxicité associée
D949V	0,56 %	Faible activité DPD (> 25 % activité), toxicité associée
I560S	rare (0,07 %)	Faible activité DPD (12,5 – 25 % activité), toxicité associée
DPYD*3	rare	Probable réduction de la fonction ou activité diminuée
DPYD*5	7 (sujets finlandais) – 30 %	Résultats contradictoires
DPYD*6	0,7 – 9 %	Résultats contradictoires
DPYD*9A	2,9 - 13,7 % [53]	Résultats contradictoires
DPYD*4	0,016 % [53]	Résultats contradictoires
Y186C	26 % dans la population présentant des ancêtres africains	46 % de réduction de l'activité

DPYD*7	0,003 % [53]	Enzyme non fonctionnelle
1156 G > T	-	Enzyme non fonctionnelle
DPYD*9B	-	Faible activité DPD (25 % activité)
DPYD*10	-	Interférence potentielle avec le flux d'électron
1590 T > C sur le gène promoteur de <i>DPYD</i>	-	Expression du gène <i>DPYD</i> inférieure
DPYD c.1786 T>C	-	Potentiellement pathogène [54]
IVS 6-29 g > t	4,7 % chez la population tunisienne [55]	-

Tableau 2 : Principales mutations du gène *DPYD* rencontrées et leur impact sur l'activité de la DPD

Deux mutations (DPYD*2A et D949V) ont été associées de façon significative avec une incidence de toxicité de grade 3 et plus [56]–[58]. Un troisième variant (I560S) n'a pas montré de relation significative en raison de sa trop faible fréquence [56]. Les associations entre toxicités sévères et mutations DPYD*2A, D949V, I560S, et HapB3 ont été confirmés par des méta-analyses [59]–[61].

Bien que l'intégrité du gène soit importante, l'importance des régulations génétiques et épigénétiques est aussi critique. D'importantes corrélations ont été rapportées entre l'activité de la DPD et les ARNm, suggérant que la régulation transcriptionnelle devrait être un important mécanisme induisant une variation marquée dans l'activité de la DPD, de nature à bruyier la relation génotype à phénotype [62].

3. Détection de la déficience en DPD

a. Généralités

Comme évoqué précédemment, il n'existait pas recommandations officielles quant à la technique à mettre en œuvre pour dépister le déficit en DPD jusqu'en décembre 2018. Ce retard à établir un consensus sur la méthode dépistage de la déficience en DPD était dû aux biais, limitation technique ou inadéquation des techniques développées avec la pratique clinique de routine qui requièrent une méthode simple, rapide, et très robuste. Ci-après sont décrites une

partie des diverse techniques développées et utilisées jusqu'au switch vers la mesure de l'uracilémie, ainsi que celle-ci.

b. Génotypage

Le génotypage du gène *DPYD* présente l'avantage de produire une réponse rapide, relativement bon marché et sans ambiguïté, de plus, c'est une technique qui peut être automatisée. La spécificité du génotypage est excellente, cependant sa sensibilité est relativement faible. En sachant que l'on ne trouve que ce que l'on cherche, on peut aisément imaginer que la recherche seule de quelques mutations avec chacune une incidence très faible ne permet pas de dépister tous les patients déficitaires, quel que soit la cause du déficit d'activité. De multiples méthodes sont utilisées. La plupart d'entre elles ne recherchent que quelques variants, le plus souvent il s'agira de *DPYD*2A*, *D949V*, et *I560S*. Certaines techniques recherchent toutes les mutations qu'elles soient connues ou non, mais ces techniques sont loin d'être majoritaires.

c. Phénotypage

Les techniques de phénotypage sont beaucoup plus chronophages, difficilement automatisables et difficiles à mettre en œuvre

Détermination de l'activité DPD dans les cellules mononucléées circulantes

Grâce au caractère ubiquitaire de la DPD il est possible de déterminer son activité dans n'importe quelle cellule, par exemple les lymphocytes et fibroblastes circulants, comme un reflet de l'activité hépatique. Il est admis que des niveaux de DPD dans les cellules sanguines mononucléées périphériques inférieurs à 150 pmol/min/mg de protéine sont associés avec un déficit partiel et des niveaux inférieurs à 50 pmol/min/mg de protéines à un déficit total [63]–[66].

L'activité enzymatique a longtemps été étudiée par des techniques coûteuses couplant les radiomarqueurs à la chromatographie liquide haute performance.

Une technique voisine consistant à déterminer l'activité de la DPD dans les cellules mononucléées circulantes après ingestion d'une dose d'uracile de 500 mg/m² a également été mise en œuvre par van Staveren et al. [67].

Détermination du statut DPD par mesure de du ratio dihydro-uracile/uracile dans la salive

Une étude brésilienne menée par Galarza et al. [68] a montré une supériorité de la mesure du ratio UH₂/U dans la salive par rapport à une mesure plasmatique dans la corrélation entre le statut DPD et les toxicités sévères observées chez des patients présentant des toxicités dues aux fluoropyrimidines.

Détermination du statut DPD par mesure de l'uracilémie avec ou sans dihydro-uracilémie

La technique de phénotypage la plus utilisée (et qui deviendra celle recommandée) est la détermination du statut DPD par le monitoring de l'uracilémie. Avant la parution des recommandations, elle était associée à la mesure de la dihydro-uracilémie. Cette technique consiste à déterminer les taux plasmatiques d'U et de UH₂ par chromatographie liquide couplée à une détection ultra-violet ou par spectrométrie de masse après extraction liquide-liquide ou solide-liquide [37], [69]–[73]. Malgré son caractère indirect cette technique est plus rapide et moins chère que le dosage direct de l'activité dans les cellules sanguines mononucléées périphériques. C'est cette technique qui est utilisé à Marseille depuis 2009, mais également dans des centres anticancéreux ou CHU français tel que Angers, Besançon, Bordeaux, Grenoble, Lyon, Paris, Saint-Etienne, et Toulouse.

« Uracil Breath Test »

La mesure du CO₂ marqué après ingestion de 2-(13)-C-uracile, dit « Uracil Breath Test » a été évalué comme marqueur du catabolisme des fluoropyrimidines avec une efficacité modérée [74], et peu confortable pour les patients, puisqu'ils doivent fournir des échantillons d'air expiré toutes les 5 minutes pendant 30 minutes, puis toutes les 10 minutes pendant les 150 minutes suivantes.

4. Adaptation de posologie en fonction du déficit en DPD

Étant maintenant établie que la recherche du déficit en DPD s'effectue par mesure de l'uracilémie il convient d'évoquer les seuils de concentration en uracile en relation avec le statut DPD. Les seuils d'uracilémie ainsi que leur signification quant au statut DPD sont présenté dans la Figure 8.

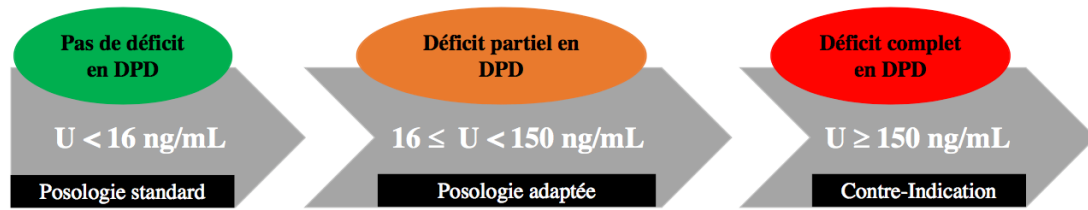


Figure 8 : Adaptation de posologie en fonction de l'uracilémie selon les recommandations de décembre 2018 de l'HAS et l'INCa

Au sein du Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie de Marseille les adaptations posologiques se font en concertation avec les cliniciens sur la base suivante :

- **$16 < U \leq 30 \text{ ng/mL}$** : « Absence de déficit complet en DPD ($U < 150 \text{ ng/mL}$). Patient présentant toutefois un ralentissement de l'activité DPD. En fonction d'autres covariables (âge, performance status, autres cytotoxiques associés, comorbidités), il appartient à l'équipe soignante de réduire ou non la posologie à la cure 1. En cas de réduction des doses en cure 1, la posologie sera ré-évaluée à la cure 2 au vu de la tolérance clinique du patient. »
- **$30 < U \leq 80 \text{ ng/mL}$** : « Absence de déficit complet en DPD ($U < 150 \text{ ng/mL}$). Patient présentant toute fois un ralentissement de l'activité DPD. Il est conseillé de réduire la posologie à la cure 1 de 25 à 50 % en fonction des autres covariables (âge, performance status, autres cytotoxiques associés, comorbidités). En cas de réduction des doses en cure 1, la posologie sera ré-évaluée à la cure 2 au vu de la tolérance clinique du patient. »
- **$80 < U < 150 \text{ ng/mL}$** : « Absence de déficit complet en DPD ($U < 150 \text{ ng/mL}$). Patient présentant toute fois un ralentissement marqué de l'activité DPD. Il est conseillé de réduire la posologie à la cure 1 de 25 à 50 % en fonction des autres covariables (âge, performance status, autres cytotoxiques associés, comorbidités). En cas de réduction des doses en cure 1, la posologie sera réévaluée à la cure 2 au vu de la tolérance clinique du patient.
- **$U \geq 150 \text{ ng/mL}$** : Déficit complet en DPD. Risque de toxicité sévère pouvant engager le pronostic vital. Ne pas administrer de fluopyrimidines. En cas de nécessité absolue de traiter le patient et en l'absence d'alternative thérapeutique, débiter à une posologie extrêmement réduite (maximum 1/10^{ème} de la dose initialement prévue) et suivre la tolérance en milieu hospitalier. »

De plus, la mesure du dihydrouracile est systématiquement associée à la mesure de l'uracilémie. Le non-respect des conditions de transports entraînant fréquemment une augmentation de l'U et de l'UH2, ainsi le suivi de l'UH2 permet d'identifier les prélèvements présentant une uracilémie élevée en raison d'un déficit en DPD ou en raison d'un transport incorrect du prélèvement (toute dihydrouracilémie > 400 ng/mL doit amener à vérifier les conditions d'acheminement du prélèvement).

PARTIE B : Travaux personnels

I. Objectifs

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous allons d'abord présenter les étapes de la mise au point d'une technique de dosage de l'uracilémie par chromatographie ultra-performante couplée à une détection ultra-violet (UPLC-UV). Puis, les résultats de la validation de cette technique selon la norme ISO 15189 seront présentés, ainsi qu'une étude observationnelle sur les analyses pratiquées au Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie du CHU Timone. Enfin, une étude de l'impact des dernières recommandations sur l'activité de dépistage du déficit en DPD au sein de notre laboratoire sera présentée.

II. Mise au point d'une technique de phénotypage de la DPD par UPLC-UV

1. Matériel & Méthodes

a. Appareillages

Le système chromatographique utilisé pour développer cette méthode est une UPLC Acquity couplée à un détecteur UV commercialisé par Waters®.

b. Colonnes

Durant le développement de ces techniques deux colonnes de chromatographies ont été testées :

- Colonne Hypercarb 5 µm, 2,1 x 100 mm commercialisée par Thermo Fisher Scientific® (maintenue à 40°C), nous la nommerons **colonne H**.
- Colonne Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm, 2,1 x 150 mm commercialisée par Waters® (maintenue à 30°C), nous la nommerons **colonne A**.

c. Choix de l'étalon interne (EI)

Le 5-FU a été choisi comme étalon interne. Étant un analogue structural de l'uracile, sa structure chimique ainsi que ses propriétés physico-chimiques sont très proches. Il fait donc un parfait étalon interne. D'autant plus que, le phénotypage trouvant tout son intérêt lorsqu'il est effectué avant l'initiation du traitement, le patient n'a pas encore reçu de 5-FU lors du dosage de l'uracilémie.

d. Protocoles d'extraction

Différentes pistes ont été testées pour optimiser l'extraction. En sachant que l'U et le UH2 sont présents physiologiquement dans le plasma, nous ne pouvions pas utiliser de plasma blanc pour constituer la gamme d'étalonnage et les contrôles de qualité (CQ). Ainsi, pour reproduire

la matrice du plasma humain, nous avons procédé à l'aide d'une solution de Bovine Serum Albumine (BSA) à 80 g/L correspondant à la concentration plasmatique en protéines. De cette manière, nous pouvions travailler sur une matrice très proche du plasma humain sans pour autant être biaisé par des interférences dues à l'U et l'UH2 endogènes.

Les protocoles d'extractions testés sont décrits ci-dessous.

Protocole Solide/Liquide Initiale (nommé S/LI)

Ce protocole est en fait le protocole utilisé depuis 2009 au sein du laboratoire sur un appareillage HPLC Agilent. À chaque prise d'essai :

- ajouter 500 µL de tampon phosphate 10 mM pH = 2
- vortexer manuellement 30 secondes
- centrifuger 5 min à 3000 rpm
- pendant ce temps : conditionner les cartouches d'extraction solide/liquide (Atoll CX 100-Interchim) par ajout de 1 mL de méthanol suivi de 1 mL d'eau Milli-Q®. Entre chaque ajout appliquer 1 min de vide
- récupérer le surnageant des essais et l'ajouter sur les colonnes préalablement conditionnées, puis appliquer une minute de vide
- laver avec 1 mL de tampon formate d'ammonium 10 mM pH = 5,1, appliquer 1 minute de vide
- éluer avec 500 µL de méthanol dans de nouveaux tubes à hémolyse
- évaporer sous flux d'azote au bloc chauffant (environ 45 °C)
- reprendre par 130 µL de phase mobile et transférer en eppendorf
- centrifuger 5 min à 15 000 rpm
- transférer en micro-vials avant d'injecter 6 µL

Protocole Solide/Liquide Hypercarb (S/LH)

Le protocole S/LH a été proposé par la société Thermo Fisher Scientific® en association avec l'utilisation de leur colonne H. À chaque prise d'essai :

- ajouter 500 µL de tampon H₃PO₄ 4 % pH < 2
- vortexer manuellement 30 secondes
- centrifuger 5 min à 3000 rpm

- pendant ce temps : conditionner les colonnes d'extraction (Hypersep Hypercarb Thermo Scientific) par ajout de 1 mL d'eau Milli-Q® suivi de 1 mL d'acétonitrile (ACN). Entre chaque ajout appliquer 1 min de vide
- récupérer le surnageant des essais et l'ajouter sur les colonnes préalablement conditionnées, puis appliquer 1 min de vide
- laver avec 1 mL d'ACN à 5%, appliquer 1 min de vide
- éluier avec 1 mL d'ACN dans de nouveaux tubes à hémolyse
- évaporer sous flux d'azote au bloc chauffant (environ 45°C)
- reprendre par 130 µL de phase mobile et transférer en eppendorf
- centrifuger 5 min à 15 000 rpm
- transférer en micro-vials avant d'injecter 10 µL

Protocole Liquide/Liquide (L/L)

Le protocole L/L est tiré de la méthode de dosage du 5-FU, celui-ci étant notre EI dans le cadre du dosage de l'U et de l'UH2. À chaque prise d'essai :

- ajouter 20 µL d'acide ortho-phosphorique à 5 %
- vortexer 5 sec
- ajouter 6mL d'un mélange n-propanol/diéthyl-éther (10/90 v/v)
- fermer les tubes hermétiquement avec un bouchon et du parafilm et agiter 30 min au vortex automatique
- centrifuger 15 min à 3000 rpm
- récupérer la phase organique
- évaporer sous flux d'azote au bloc chauffant (environ 45°C)
- reprendre par 130 µL de phase mobile
- vortexer 15 sec et transférer en eppendorf
- centrifuger 5 min à 15 000 rpm
- transférer en micro-vials et injecter 10 µL

e. Phases mobiles

Au cours des expérimentations nous avons utilisé plusieurs phases mobiles différentes associées à différents gradients. Tout d'abord le tampon KH₂PO₄, 5mM pH=3, auquel est ajouté 3 mL de TriEthylAmine (TEA). Il est associé à de l'ACN selon le gradient indiqué dans le

Tableau 3. Ensuite, une phase mobile H₂O/ACN, conçue pour la colonne H, donc le gradient est indiqué dans le Tableau 3.

	Temps (min)	Voie A (aqueuse) (%)	Voie B (solvant) (%)	Débit (mL/min)
Tampon KH ₂ PO ₄ /ACN (Voie A/B)	0	100	0	0,3
	3,5	100	0	0,3
	5	83	17	0,3
	8	83	17	0,3
	8,1	100	0	0,3
	12	100	0	0,3
H ₂ O/ACN (Voie A/B)	0	95	5	1
	10	50	50	1
	12	0	100	1
	12,5	95	5	1
	15	95	5	1

Tableau 3 : Gradient des phases mobiles utilisées lors de la mise au point

f. Détection par ultra-violet (UV)

La principale particularité de cette méthode repose sur une double détection en UV. En effet, le UH2 absorbe à 210 nm. C'est également le cas de l'U, cependant cette longueur d'onde n'est ni spécifique ni sensible ; de nombreux autres composés absorbent à cette longueur d'onde créant ainsi des interférences analytiques. Une seconde longueur d'onde de détection, à 265 nm, a été ajoutée à la méthode. À cette longueur d'onde seul l'U est détecté avec une excellente sensibilité et spécificité.

g. Gamme d'étalonnage

Lors du développement de cette méthode il était primordial que la gamme de concentrations cibles soit en accord avec les taux physiologiques et pathologiques habituellement observés. En effet, l'uracilémie physiologique est de l'ordre d'une dizaine de ng/mL. Ainsi, les gammes d'U et de UH2 sont de 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 100 ; 200 ; 500 ng/mL et de 40 ; 50 ; 75 ; 100 ; 200 ; 300 ; 500 ng/mL respectivement.

h. Étude de la stabilité

Pour étudier la stabilité durant le transport nous avons prélevé des échantillons sanguins (tube héparinate de lithium sans gel séparateur) sur 12 volontaires. Puis nous les avons séparés ces échantillons en deux groupes : les tubes qui resteraient à température ambiante (20-25°C) et ceux qui resteraient dans une enceinte réfrigérée (4°C). Puis nous avons centrifugé les tubes (3000 rpm 15 min) avant d'aliqoter le plasma et de le congeler à des intervalles de 2, 6, 12, et 24 h dans chacun des groupes.

Pour étudier la stabilité lors du cycle congélation/décongélation nous avons prélevé deux séries d'échantillons sanguins (tube héparinate de lithium sans gel séparateur) sur 3 volontaires sains. Ces échantillons ont été centrifugés puis aliquotés et congelés immédiatement après le prélèvement. Un premier dosage a été réalisé, puis les échantillons ont été recongelés avant d'être à nouveau décongelés pour être dosés à nouveau.

2. Résultats

Dans cette partie, seront présentées chronologiquement la démarche de mise au point de la méthode ainsi que les résultats obtenus.

Tests effectués sur la colonne H

En premier lieu, le protocole S/LH a été testé sur la colonne H tel que décrit précédemment. La phase mobile utilisée était le mélange H₂O/ACN avec un temps de run de 15 minutes. Les temps de rétentions obtenus pour l'UH2, l'U, et l'EI sont respectivement de 0,5 minutes, 1,3 minutes, et 1,9 minutes. Cette première expérimentation n'a pas donné de résultats concluants. Les pics d'U, de UH2 et d'EI étaient bas voire inexistantes.

Nous avons ensuite tenté de modifier les paramètres d'extraction pour améliorer ces résultats, à savoir :

- lavage avec de l'ACN à 2 % au lieu de 5 %
- élution avec de l'ACN à 50 % au lieu d'ADN pur
- lavage avec de l'ACN à 2 % et élution avec de l'ACN 50 %

Ces essais n'ont apporté aucunes améliorations sur les résultats précédents.

Suite à ces expérimentations, nous avons radicalement changé de méthode d'extraction. En utilisant toujours la colonne H nous avons procédé à l'extraction L/L selon le protocole présenté ci-dessus. La phase mobile utilisée était le mélange H₂O/ACN avec un temps de run de 15 minutes. Les temps de rétention étaient identiques à ceux obtenus lors des premières expérimentations. Les chromatogrammes issus de cet essai sont présentés ci-après.

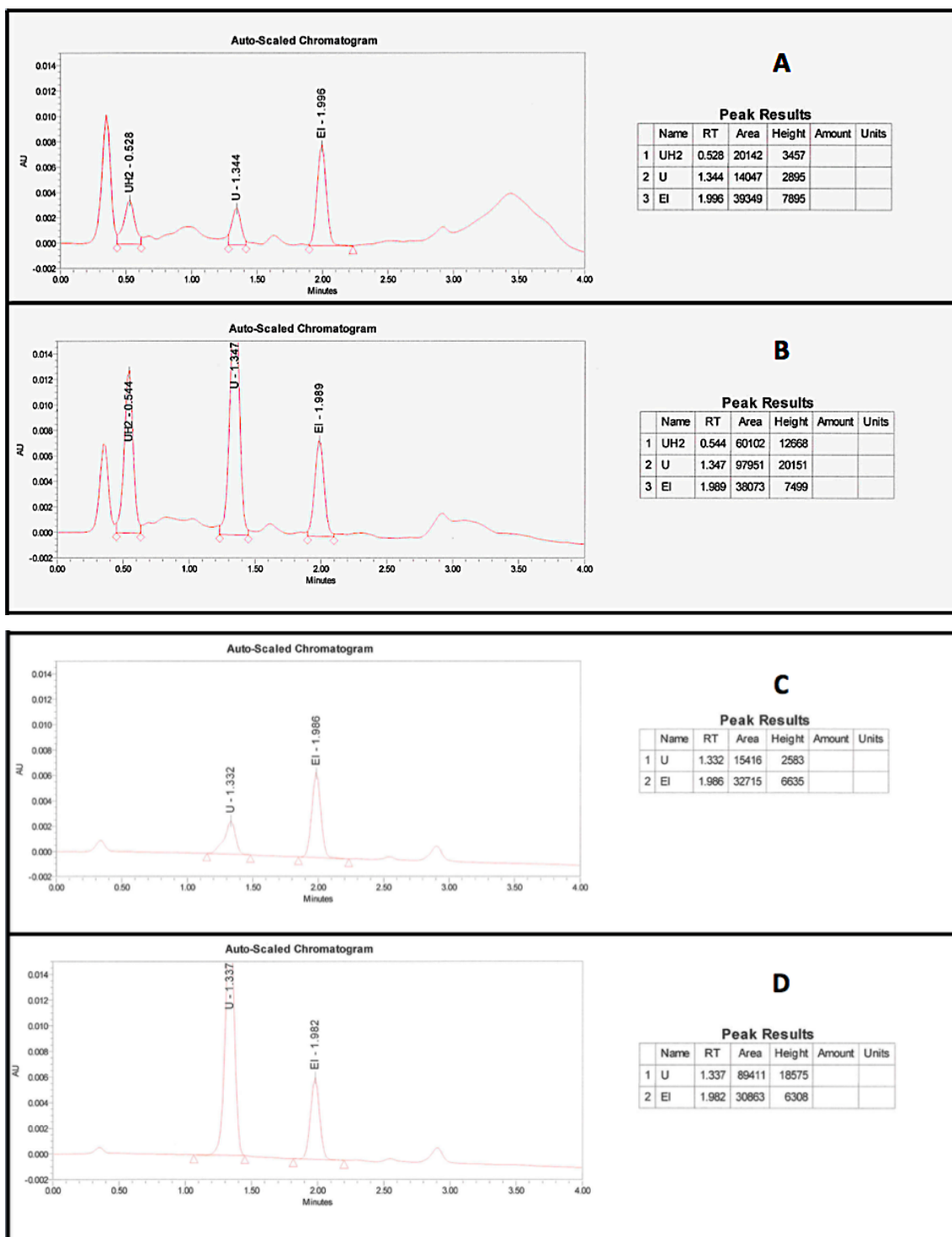


Figure 9: Chromatogrammes de deux points de gamme à 210 et 265 nm extraits à partir du protocole L/L sur la colonne H (**A** : U = UH2 = 50 ng/mL, EI = 200 ng/mL, λ = 210 nm ; **B** : U = UH2 = 500 ng/mL, EI = 200 ng/mL, λ = 210 nm ; **C** : U = UH2 = 50 ng/mL, EI = 200 ng/mL, λ = 265 nm ; **D** : U = UH2 = 200 ng/mL, EI = 200 ng/mL, λ = 265 nm)

Cet essai montre une bonne séparation des pics. Cependant de nombreuses impuretés restent encore présentes. Nous avons donc réalisé un nouvel essai en modifiant le mélange de solvant utilisé dans l'extraction liquide/liquide ainsi que leurs proportions.

Les mélanges testés sont :

- acétate d'éthyl/n-propanol : (v/v) 95/5 ; 90/10 ; 80/20
- diéthyl-éther/n-propanol : (v/v) 95/5 ; 90/10 ; 80/20
- acétate d'éthyl/iso-propanol : (v/v) 95/5 ; 90/10 ; 80/20
- diéthyl-éther/iso-propanol : (v/v) 95/5 ; 90/10 ; 80/20

Ces nombreux testent n'ont conduits à aucuns résultats concluants. Les chromatogrammes présentés autant d'impuretés, sans pour autant mieux extraire les composés d'intérêts. Il faut cependant noter que l'usage du n-propanol donnait plus d'impuretés que l'usage de l'iso-propanol.

Par la suite, nous avons souhaité augmenter notre spécificité et sensibilité de détection à 210 nm. Pour ce faire, nous avons recherché de nouvelles longueurs d'ondes de détection. Les résultats de ces essais sont présentés ci-dessous.

	Hauteurs des pics (mAU) pour différentes longueurs d'ondes de détection			
	210 nm	220 nm	230 nm	265 nm
UH2	176	87	32	∅*
U	201	85	59	181
EI	87	42	16	65

Tableau 4 : Hauteurs des pics obtenues après injection d'une solution pure d'U, d'UH2, et d'EI pour différentes longueurs d'ondes (* : l'UH2 n'absorbe pas à 265 nm)

Les longueurs d'ondes testées bien qu'apportant une diminution des impuretés montrent une nette détérioration de la sensibilité. En effet, les hauteurs des pics obtenues à 220 et 230 nm sont très inférieures à celles obtenues à 210 nm.

Suite aux difficultés rencontrées, nous avons poursuivi la mise au point sur une autre colonne, la colonne A.

Tests effectués sur la colonne A

Dans un premier temps, nous avons testé le protocole S/LI avec la colonne A. La phase mobile utilisée est celle composé d'un mélange $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{ACN}$ avec un temps d'analyse de 12 minutes. Les chromatogrammes obtenus lors de cette expérimentation sont présentés ci-dessous.

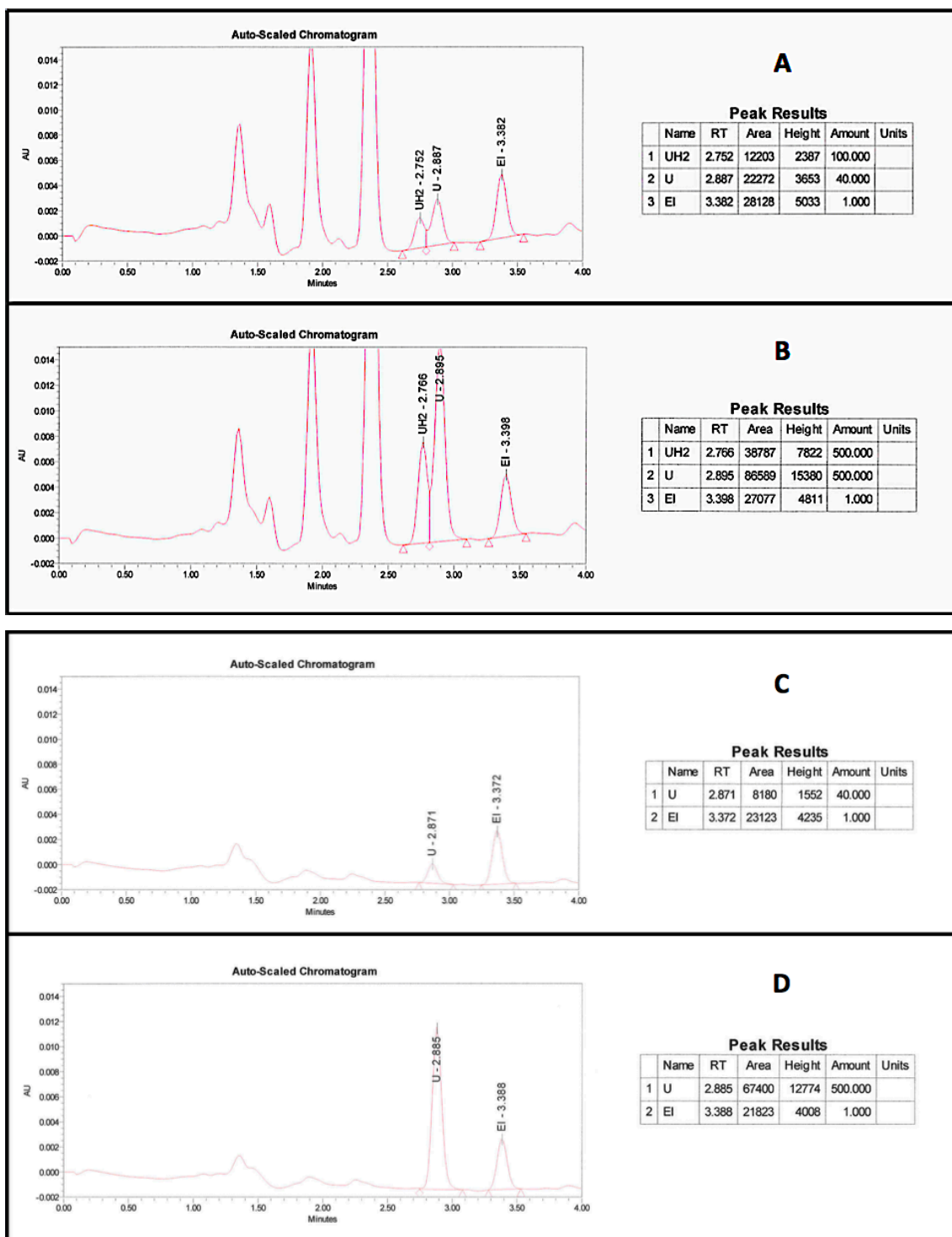


Figure 10 : Chromatogrammes de deux points de gamme à 210 et 265 nm extraits à partir du protocole S/LI sur la colonne A (**A** : U = 40 ng/mL, UH2 = 100 ng/mL, EI = 200 ng/mL, λ = 210 nm ; **B** : U = UH2 = 500 ng/mL, EI = 200 ng/mL, λ = 210 nm ; **C** : U = 40 ng/mL, UH2 = 100 ng/mL, EI = 200 ng/mL, λ = 265 nm ; **D** : U = UH2 = 500 ng/mL, EI = 200 ng/mL, λ = 265 nm)

Les temps de rétention sont allongés par rapport aux méthodes testées précédemment en raison de la diminution du débit du gradient. Pour la détection à 265 nm, l'extraction paraît correcte, en effet, il y a peu d'impuretés et les pics sont bien séparés. À 210 nm, bien que les impuretés soient bien séparées des pics d'U et d'UH2, ceux-ci présentent une mauvaise résolution. Pour corriger ce problème de résolution des pics, nous avons réduit le débit à 0,25 mL/min. Les temps de rétention des composés ont de nouveau été allongés et les pics d'U et d'UH2 présentent maintenant des temps de rétention respectifs de 4,17 et 4,52 min, avec un retour à la ligne de base entre les deux pics attestant d'une bonne séparation (résolution moyenne de 1,65 sur les sept points de gamme). Les courbes de calibrations obtenues (Tableau 5) présentent des coefficients de variations > 0,99 ainsi que des coefficients de déviations < 20 % (excepté pour un point). L'extraction S/LI associée à un débit de 0,25 mL/min permet donc d'obtenir des gammes valides selon les normes iso 15189 avec une bonne résolution des pics.

	λ (nm)	Coefficient de corrélation (R)	Niveau	Valeur théorique	Valeur mesurée	% de déviation
U	265	0,999419	1	5	8,19	63,8
			2	10	11,93	19,29
			3	20	21,36	6,81
			4	40	38,99	-2,53
			5	100	100,0	0,02
			6	200	190,9	-4,54
			7	500	503,6	0,72
UH2	210	0,998429	1	40	46,84	17,09
			2	50	56,75	13,50
			3	75	64,55	-13,81
			4	100	101,2	1,21
			5	200	203,1	1,56
			6	300	284,0	-5,34
			7	500	506,4	1,69

Tableau 5 : Courbe de calibration de l'U (265 nm) et de l'UH2 (210 nm) obtenue avec le protocole S/LI débit 0,25 mL/min.

Cependant, des impuretés résiduelles restent présentes. Elles apparaissent aux temps de rétention de l'U et du UH2 à des concentrations proches de la limite de quantification. Ce qui explique que le premier point de gamme (correspondant à la limite de quantification = LQ)

présente un coefficient de déviation $> 20 \%$. Ces impuretés étant également présente sur les blancs, nous nous sommes penchés sur la BSA utilisée pour reproduire la matrice.

Pour cela, nous avons extrait plusieurs blancs avec le protocole d'extraction retenu (S/LI ; débit = 0,25 mL/min) réalisés avec des BSA de fournisseurs différents. Les résultats de ces essais sont présentés dans la figure ci-dessous.

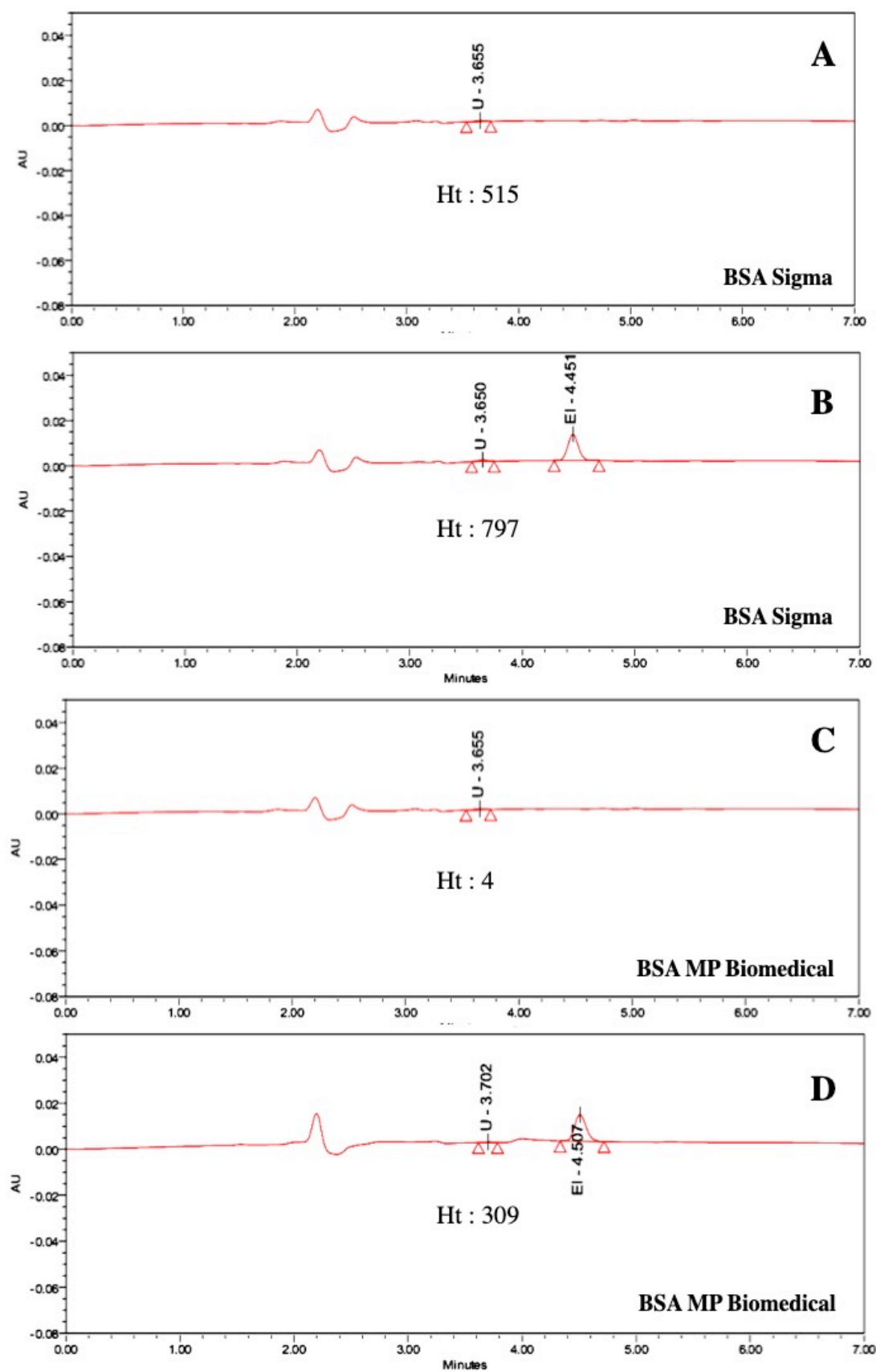


Figure 11 : Chromatogrammes d'un blanc (A et C) et du premier point de gamme = LQ (B et D) réalisé avec une BSA du fournisseur Sigma-Aldrich® ou MP Biomedicals®

La BSA du fournisseur Sigma-Aldrich® présente des résidus d'U interférant avec l'analyse (hauteur du blanc/LQ*100 = 64 %) en témoigne son pourcentage de pureté $\geq 96 \%$, à la différence de la BSA de MP Biomedical® qui présente un pourcentage de pureté $\geq 98 \%$, et qui présente donc beaucoup moins de trace d'U (hauteur du blanc/LQ*100 = 1,3 %). Après avoir testé plusieurs lots de BSA issus de ce fournisseur, nous avons choisi d'utiliser la BSA de MP Biomedical® pour réaliser notre méthode.

Suite à la mise au point de la méthode de phénotypage de la DPD (dosage de l'uracilémie) décrite ci-dessus nous avons procédé à la validation de cette technique selon les normes ISO 15189 [75]. Cette validation ainsi qu'une étude de l'activité du dosage de l'uracilémie au laboratoire de la Timone durant un mois sont décrites dans la section III et IV.

3. Étude de stabilité des prélèvements

Nous avons cherché à évaluer la stabilité des prélèvements lors de leur transport et lors du cycle congélation/décongélation de manière à pouvoir mieux informer les cliniciens sur les conditions de transport des prélèvements. De plus, l'étude sur le cycle congélation/décongélation des prélèvements nous permettra de savoir si en cas de vérification nous pouvons effectuer à nouveau le dosage de l'uracilémie sur le même échantillon.

Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel Excel® et la plateforme BioStatTGV® [76].

a. Stabilité durant le transport

La valeur de référence pour ce test de stabilité est l'uracilémie (U) et la dihydro-uracilémie (UH2) obtenue sur les échantillons conservés 2 h à 4°C avant centrifugation. Nous comparerons les dosages d'U et de UH2 deux à deux au moyen d'un t-test apparié ($\alpha = 10\%$) par rapport à la valeur de référence. Les données récapitulatives des essais sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Température de transport	Temps de transport	U		UH2	
		Stabilité	p-value	Stabilité	p-value
4°C	6h	STABLE	0,825	STABLE	0,60
	12h	STABLE	0,721	STABLE	0,10
	24 h	STABLE	0,935	INSTABLE	0,04
20°C	2h	STABLE	0,594	INSTABLE	0,02
	6h	INSTABLE	0,058	INSTABLE	0,001
	12h	INSTABLE	0,0009	INSTABLE	1,60E-6
	24h	INSTABLE	0,001	INSTABLE	3,25E-7

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des tests statistiques effectués lors des tests de stabilité de transport de l'uracile et du dihydro-uracile ($\alpha = 10\%$)

Ainsi, on constate que l'uracilémie est stable pendant 24°C si le prélèvement est conservé à 4°C, et pendant 2 h uniquement à température ambiante (20°C). La dihydro-uracilémie est stable pendant 12 h à 4°C, et n'est pas stable à température ambiante. Ainsi nous avons adapté les consignes de transport au sein de notre laboratoire : 2 h à température ambiante, 6 h à 4°C, et pour les prélèvements extérieurs à notre CHU il est recommandé de congeler le plasma sur place et de nous l'envoyer en transport à -20°C.

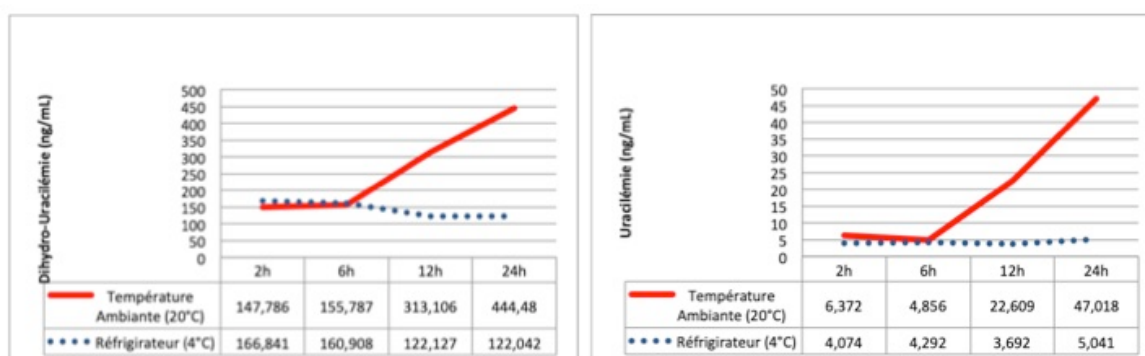


Figure 12 : Évolution des taux d'U et d'UH2 en fonction de la durée et de la température du transport.

b. Stabilité lors du cycle congélation/décongélation

La valeur de référence pour ces tests est la valeur d'U et d'UH2 obtenue lors du premier dosage après un cycle congélation/décongélation. Pour l'uracilémie et la dihydro-uracilémie, aucunes différences significatives n'ont été observées ($p = 0,16$ et $p = 0,27$ respectivement ; t-test apparié).

III. Une méthode UPLC-UV simple et rapide pour la détermination du statut fonctionnel de la DPD chez les patients atteints de cancer (Article)

Au vu des récentes recommandations, développer une méthode de phénotypage de la DPD permettant un screening à grande échelle devenait primordial. C'est pour cette raison que nous avons développé la méthode présentée dans l'article suivant. La particularité de cette technique repose d'une part sur l'appareillage utilisé et d'autre part sur la technique d'extraction. La plupart des techniques actuellement utilisées reposent sur l'utilisation d'une UPLC couplée à une détection par spectrométrie de masse. Bien que cet appareillage permette d'obtenir une bonne sensibilité et une excellente spécificité, il reste très coûteux. À l'inverse, les méthodes utilisant une HPLC couplée à une détection par UV sont peu onéreuses mais présentent une sensibilité, et une spécificité bien plus faible. La technique que nous proposons ici est donc un bon équilibre permettant ainsi à toutes les structures de pouvoir réaliser cette analyse. De plus, l'utilisation d'un protocole d'extraction solide/liquide permet d'envisager une automatisation de cette activité.

**A SIMPLE AND RAPID UPLC-UV METHOD FOR
DETERMINING DPD FUNCTIONAL STATUS IN PATIENTS
WITH CANCER**

Clémence Marin^{1,2}, Anis Krache², Chloé Palmaro¹, Mathilde Lucas¹,
Valentin Hilaire¹, Renée Ugdonne¹, Bénédicte De Victor¹, Sylvie Quaranta¹,
Caroline Solas^{1,2}, Bruno Lacarelle^{1,2}, Joseph Ciccolini^{1,2}

1 : Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie – La Timone University Hospital of Marseille
– Assistance Publique Hôpitaux de Marseille – Marseille – France.

2 : SMARTc unit, Center de Recherche en Cancérologie de Marseille UMR Inserm U1068, Aix
Marseille Univ, Marseille France.

Corresponding author: Pr Joseph Ciccolini, Ciccolini.joseph@gmail.com

Clinical Pharmacokinetics Laboratory - CHU Timone

265, rue saint Pierre 13385 Marseille - FRANCE

Tel: +33 491 835 509

Key words: *UPLC-UV, dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), 5-FU, uracil, dihydro-uracil, phenotyping, toxicity*

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

None

ABSTRACT

Background: Detecting patients with DPD deficiency is becoming a major concern in clinical oncology. Monitoring physiological plasma uracil and/or plasma uracil-to-dihydrouracil metabolic ratio is a common surrogate frequently used to picture the DPD phenotype in patients without direct measurement of the enzymatic activity. With respect to the rising number of patients to be analyzed, developing simple, rapid and affordable methods suitable to routine screening is critical. Methods: We have developed and validated a simple and robust UPLC-UV method with shorten (i.e., 12 minutes) analytical run times, compatible with these requirements of large-scale upfront screening. The method enabled detection of U over a 5-500 ng.mL⁻¹ range (265 nm) and of UH2 over a 40-500 ng.mL⁻¹ range (210 nm) in plasma with no chromatographic interference, even at 210 nm. Results: When used as part of routine screening for DPD deficiency, this method was fully able to discriminate non-deficient patients (i.e., with U levels below 16 ng.mL⁻¹) from deficient patients at risk of severe toxicities (i.e., U > 16 ng.mL⁻¹). Results from one month of routine testing are presented and although no patients with complete deficit were detected, 10.7% of the screened patients present some levels of DPD deficiency and would require cut in dosing. Conclusion: Overall, this new method, using a simple pre-analytical solid-phase extraction procedure and based upon the use of standard UPLC apparatus is both cost- and time-effective and can be easily implemented at low cost in any laboratory about to start DPD testing in routine.

INTRODUCTION

Fluoropyrimidine drugs (i.e., 5-FU, oral capecitabine) remain a mainstay to treat a wide range of solid tumors in adults. 5-FU is characterized by extensive liver metabolism leading to

inactive compounds, depending on a unique catabolic step driven by dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). DPD is coded by the *DPYD* gene known to be highly polymorphic with marked changes in phenotypic status. Consequently, patients exhibit a wide range of DPD activities, leading to high risk of experiencing severe/lethal toxicities in individuals with poor metabolizer (PM) phenotype^{1,2}. DPD deficiency accounts for the vast majority of life-threatening toxicities in patients treated with 5-FU or oral capecitabine, as demonstrated by numerous clinical reports and meta-analysis over the last decades³. Upfront detection of DPD deficiency is thus critical to customize dosing and ensure optimal treatment without triggering potentially lethal toxicities⁴. To this end, establishing DPD phenotype is appealing because genotyping *DPYD* and search for allelic variants usually associated with PM phenotype is highly specific but hindered by poor sensitivity^{5,6,7}. Several methods have thus been proposed over the last 20 years to establish DPD status on a functional, rather than genetic, basis. Direct measurement of DPD activity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or the Uracil Breath Test (UBT), does not meet the requirements of routine testing due to cost- and time-effectiveness concerns^{8,9}. For instance, isolating PBMCs requires large volume of blood and time-consuming, multi-steps isolation procedures, whereas the UBT requires specific apparatus such as infra-red spectroscopy not necessarily available in most hospital laboratories. Because DPD converts physiological uracil (U) into dihydrouracil (UH₂), monitoring UH₂/U ratio or uracil levels in plasma has been proposed as a cheap, rapid and convenient alternative to get an insight on DPD activity using a surrogate test⁵. First methods were mostly based upon HPLC-UV techniques^{10,11}. Because UH₂ is better detected at 210 nm, i.e. at a wavelength with little specificity and numerous endogenous signals from plasma compounds, most HPLC methods required long run times because several columns had to be used in line to achieve optimal separation of the analytes. Some alternative HPLC methods managed to reduce analytical run times to about 15 min, but then required large volume of plasma¹². This makes such methods

unsuitable for large screening campaign, when thousands of patients have to be quickly tested for DPD deficiency prior to starting treatment. For instance in France, a country where an estimated 80 000 new patients receive 5-FU every year, since 2019 all patients scheduled for fluoropyrimidine treatment are legally required to be DPD-tested, primarily through measurement of their uracil levels in plasma¹³. A cut-off of 150 ng.mL⁻¹ uracilemia has been identified by French Health Authorities as a warning signal associated with complete deficiency and risk for toxic-death. Patients with U comprised between 16 and 150 ng.mL⁻¹ are considered as moderately/partially DPD deficient because several reports have shown that U \geq 16 ng.mL⁻¹ is a first warning signal associated with increased risk to experience severe toxicities with either 5-FU or capecitabine^{14,15}. As a consequence and with respect to the number of new patients due to be treated with a fluoropyrimidine drug, developing methods with simplified analytics is required to test an increasing number of samples as part of routine detection of DPD deficiency. Here, we present the performances and a direct clinical application of a new UPLC-UV method with run-times below 12 minutes, thus allowing analysis of several dozen of samples in a single batch and expediting the interpretation of the results.

METHODS

1. Chemicals

Uracil (U), dihydrouracil (UH2), and 5-fluorouracil (5-FU) used as internal standard (IS) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). TriEthylAmine (TEA) was purchased from Acros Organics (part of Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany), formic acid and acetonitrile (ACN) from Fisher Chemical (part of Thermo Fisher Scientific Dreieich, Germany), and phosphoric acid from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Potassium phosphate (KH₂PO₄), ammonium formate (CHO₂NH₄), and Bovine Serum Albumin (BSA) were supplied by MP Biomedical (Illkirch Graffenstaden, France).

2. Stock solutions, calibration standards (QC) and quality control samples

Stock solutions of U, UH2, and IS 5-FU were prepared in ultra-pure water at a concentration of 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively. Working solutions were further prepared by diluting stock solutions in ultra-pure water. All stock solutions were stored at -20°C.

Calibration standards and Quality Controls (QC) were prepared by addition of working solution to BSA (80 g/L). Nominal concentrations of 10, 40, and 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ were used for U QC samples (Low, Mid and High concentrations, respectively), similarly nominal concentrations of 50, 100, and 300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ were used for UH2 QC samples. For the calibration standards the following levels were used: 5, 10, 20, 40, 100, 200, 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, and 40, 50, 75, 100, 200, 300, 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for U and UH2, respectively. To get rid of possible operator-dependent biases, QCs and standards, including stock solutions, were prepared by two different laboratory technicians.

3. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC)

All UPLC experiments were performed using H-CLASS Acquity UPLC system, consisting of an auto sampler, pump, column oven, and TUV detector (Waters, Guyancourt, France). Chromatographic separation is performed on Acquity UPLC HSST3 analytical column (150 x 2,1 mm, 1,8 μm particle size (Waters, Guyancourt, France)) using a 0,2 μm in-line filter. The column oven was set at 30°C and the auto sampler tray at 15°C. Elution was achieved using a mixture of 5 mM potassium phosphate in water with 0,3% of TEA with pH adjusted at 3 with phosphoric acid (eluent A), and ACN (eluent B). The flow rate was set at 0,2 ml/min. Starting at 100% eluent A, the gradient decreases from 3,5 min to 5 min linearly to 83% of eluent A until 8 min. From 8 min to 8,1 min the gradient then goes back to 100% eluent A until the end

of the run. Dual wavelengths U.V. detection was used over the 12 min analytical run, as U and UH2 were respectively best detected at 265 and 210 nm. IS 5-FU was detectable at both wavelengths because of its high concentration (i.e., 200 ng/ml).

4. Sample preparation

Five-hundreds μL of heparinized plasma were transferred in a hemolysis tube of 5 ml. 500 μL of a 10 mM phosphate buffer (pH = 2) was added before manual mixing (30 seconds). The sample was proceeded by Solid Phase Extraction (SPE) using Atoll CX100-Interechim cartridges (San Diego, CA, USA) first conditioned with methanol and water. Cartridges was washed with 10 mM formate buffer (pH = 5,1), and further eluted by 500 μL methanol. Methanol was then evaporated under a gentle stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 100 μL of eluent A, vortexed and centrifuged for 5 min at 20 000 rcf. Finally,

the solution was transferred to an auto sampler vial and 10 μL were injected into the UPLC system.

5. Bioanalytical validation

The bioanalytical method validation was conducted in accordance with the EMEA guidelines¹⁶. The following validation parameters were primarily assessed: calibration model, accuracy and precision (Lower Limit Of Quantification (LLOQ) and QC), dilution integrity, selectivity, instrument carry-over, recovery and stability.

6. Calibration

Linear regression (1/x) was applied to fit the calibration curves (height peak ratio vs. concentration). At least five calibration levels in each run had to be within $\pm 20\%$ of the nominal value. The regression coefficient was calculated for each analytical run, and should be over 0,99. These tests were replicated six times as independent experiments.

7. Accuracy and precision

Accuracy and precision were determined as 6 separate validation runs by injecting QC samples at Low, Mid, and High concentrations and LLOQ samples. For intra-run tests, six replicates of QC and LLOQ samples were injected. Intra-run and inter-run accuracies were expressed as the relative bias. The intra-run and inter-run precisions were calculated as the coefficient of variation (CV). At each concentration level, the bias had to be within $\pm 15\%$ and the precision $\leq 15\%$. For the LLOQ, concentration bias had to be within $\pm 20\%$ and the precision $\leq 20\%$.

8. Dilution integrity

The dilution integrity was studied by analyzing six replicates at 400 ng.mL⁻¹ and 800 ng.mL⁻¹ for U, and 600 ng.mL⁻¹ and 1200 ng.mL⁻¹ for UH2. These samples were diluted two times (for 400, and 600 ng.mL⁻¹ solutions), and four times (for 800 and 1200 ng.mL⁻¹ solutions). Predefined limits for bias and precision were set at $\pm 15\%$ and $\leq 15\%$ respectively.

9. Selectivity

The selectivity of the assay was determined for possible cross analyte/drugs interferences. Blank samples spiked with different drugs frequently used in oncology such as pain-killers, anti-emetic drugs or other drugs or cytotoxics likely to be co-administered with 5-FU (i.e., acetaminophen, morphine, voriconazole, posaconazole, clobazam, metoclopramide, granisetron, cisplatin, irinotecan, docetaxel, oxaliplatin) were analyzed. These peak heights were compared with the peak height of the LLOQ in the same analytical run. The drug interferences were considered acceptable if signal was $\leq 20\%$ of the response of the LLOQ for U and UH2.

10. Instrument carry-over

The instrument carry-over was tested by injecting three blank samples after an Under-LOQ (ULOQ) sample. The carry-over was calculated as the ratio of the peak height in the blanks and the peak height of the LLOQ. The carry-over was considered acceptable if signal at the analytes respective retention times (U, UH2) was $\leq 20\%$ of the LLOQ in each blank.

11. Sample pretreatment recovery

Recovery was determined by dividing the peak height of extracted sample by the peak height of non-extracted pure solutions at the three calibration levels (i.e., 5/40, 40/100 and 500/500 ng.mL⁻¹ for U and UH2, respectively).

12. Stability

12.1 Short-term stability

The short-term stability in plasma was assessed at ambient temperature. All this stability analysis was carried out at the QC Low, Mid, and High concentrations after two, six, or twenty-four hours at ambient temperature. Samples were considered to be stable if the measured concentration was within $\pm 15\%$ of the nominal value.

12.2 Long-term stability

The long-term stability in plasma was assessed at -20°C . All this stability analysis was carried out at the QC Low, Mid, and High concentrations after two weeks, one month, or four months at -20°C . Samples were considered to be stable if the measured concentration was within $\pm 20\%$ of the nominal value.

12.3 Freezing thawing cycles

The stability of freezing/thawing was studied at the QC Low, Mid, and High concentrations after one or two freezing-thawing cycles. Samples were considered to be stable if the second cycle measured concentration was within $\pm 20\%$ of the first cycle measured concentration.

13. Application in routine DPD testing.

Once validated, the method was applied routinely in our hospital laboratory to establish DPD phenotype on a double: U and UH2/U measurement in plasma strategy as part of routine screening for DPD deficiency per French Health Authorities recommendations. Two hundred sixty three blood samples from 14 different institutes were collected over one month of routine analysis and analyzed in single weekly analytical batches (4 different batches). Phenotype interpretation and dose recommendations were performed following current guidelines in France, i.e. $U > 150 \text{ ng.mL}^{-1}$ was considered as a marker for complete DPD deficiency whereas U levels comprised between 16 and 150 ng.mL^{-1} were associated with intermediary deficiency¹³. Additionally, monitoring UH2/U ratio has been previously proposed by several groups as an additional marker for DPD deficiency; the lower the value, the deeper the deficiency^{4,11,17}.

14. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using MedCalc® 18.10.2. software (MedCalc Software, Ostend, Belgium). A p value of 0.05 was regarded as statistically significant.

RESULTS

1. Calibration

The mean of deviation percentage for each calibration levels is provided in Table 1. The mean of regression coefficient for the six runs on both U and UH2 was $0,9991 \pm 1,78E^{-03}$.

2. Accuracy & Precision

2.1. Intra-run tests

For LLOQ and each QC levels all the biases were respectively within $\pm 20\%$ or $\pm 15\%$, and all the precision $\leq 20\%$ or $\leq 15\%$. The mean bias and precision are provided in Table 2. Representative blank BSA chromatograms are shown in Figure 1.

2.2. Inter-run tests

For LLOQ and each QC levels all bias were within $\pm 20\%$ or $\pm 15\%$, and all the precisions $\leq 20\%$ or $\leq 15\%$, respectively. The means of bias and precision are provided in Table 2.

3. Dilution integrity

All bias and precision were within $\pm 15\%$ and $\leq 15\%$, respectively.

4. Selectivity

Analysis of plasma samples spiked with representative drugs (i.e., acetaminophen, morphine, voriconazole, posaconazole, clobazam, metoclopramide, granisetron, oxaliplatin, irinotecan, cisplatin, docetaxel) did not show interfering signals at the retention times of U and UH2 (data not shown).

5. Instrument carry-over

The ratios blank response to LLOQ response after injection of a concentrated sample (i.e., 1500 ng/ml) are within $\leq 20\%$.

6. Recovery

The uracile and dihydro-uracil means recoveries of three levels were 48,9% and 43,7%, respectively.

7. Stability

7.1. Short-term Stability

Short-term stability results are expressed as percentage of the baseline levels. All U and UH2 levels were between $\pm 20\%$ of baseline values.

7.2. Long-term stability

Long-term stability results are expressed as percentage of the baseline levels. All U and UH2 levels were between $\pm 20\%$ of baseline values.

7.3. Freezing/ thawing cycles

Freezing/thawing cycle's stability results are expressed as percentage of the baseline levels. All U and UH2 levels were between $\pm 20\%$ of baseline values over two freezing/thawing cycles.

8. DPD screening in routine patients.

Performance of the method in real-life condition was evaluated over one week of routine sampling in our laboratory. Mean calibration curves were $y = 3.21e^{-3} * x + 5.3e^{-7}$ for UH2 and $y = 6.91e^{-3} * x + 8.1e^{-3}$ for U. A mean of 5 sets of internal QCs were included in each analytical batch and were all in the 15% range of their respective target values (i.e., $51.3 \pm 9.8 \text{ ng.mL}^{-1}$, $100.9 \pm 8.1 \text{ ng.mL}^{-1}$ and $316.8 \pm 21.4 \text{ ng.mL}^{-1}$ for UH2 and $10.0 \pm 1.4 \text{ ng.mL}^{-1}$, $40.6 \pm 4.0 \text{ ng.mL}^{-1}$ and $205.3 \pm 8.5 \text{ ng.mL}^{-1}$ for U). A total of 263 adult patients (143F/120M; mean age $65 \pm 11,4$ years; range 36-88) had blood sample collected over one-month of routine upfront DPD-screening performed in La Timone University Hospital of Marseille and surroundings General Hospitals and Cancer Centers. Of note, 27 patients had samples with handling/shipping issues (e.g., blood samples sent to the laboratory at room temperature in more than 90 minutes, blood samples sent to the lab at 4°C in more than 4 hours, or frozen plasma found thaw upon arrival), failing to meet guidelines regarding proper sample handling when testing DPD¹³, one patient was wrongly sampled on a polymer gel tube and one patient was wrongly sampled during 5-FU infusion. Therefore these 29 samples could not be interpreted for DPD status, mostly because of the instability of the analytes upon sampling leading to artefactual increase in both U and UH2 possibly generating false-positive results^{18,12}. Of the remaining 234 samples fully analyzed (128F/106M; mean age $64,9 \pm 11,3$ years; range 36-88), mean/median U

concentrations were 11.4 ng.mL⁻¹ and 10.2 ng.mL⁻¹, respectively (range: <5ng/ml -85,6). Additionally, mean/median UH2 concentrations were 138,8 ng.mL⁻¹ and 125,5 ng.mL⁻¹, respectively (range: 34-585). Mean/median calculated UH2/U ratio were 15,2 and 12,6 respectively (range:1.7-40.8). Twenty five patients (i.e., 10,7 %) had plasma U >16 ng.mL⁻¹ indicative potential DPD deficiency including 12 patients (5,1%) with U values comprised between 16 and 20 ng.mL⁻¹, 8 patients (3,4%) comprised between 20 and 30 ng.mL⁻¹, two patients (0,85%) comprised between 30 and 40 ng.mL⁻¹, two patients (0,85%) comprised between 40 and 50 ng.mL⁻¹ and one patient (0,42%) with U = 85,6 ng.mL⁻¹ (Figure 2). No difference in gender (p=0.109, Chi² test) or age (p=0.58, t test) was evidenced between patients with U > 16 ng.mL⁻¹ and patients with U < 16 ng.mL⁻¹ (p=0.05, Chi² test). No patient with complete DPD deficiency (i.e., U> 150 ng.mL⁻¹) was observed over this one-month period of screening. Of note, the patient with U = 85,6 ng.mL⁻¹ displayed an UH2/U ratio of 2,6, thus confirming his profoundly DPD deficient status (Figure 3). Figure 4 shows the distribution in U values among our patients. Additionally, we have analyzed the 27 samples which failed to be properly shipped to our laboratory. We found that both U and UH2 mean values were significantly higher than the mean values of the samples with correct shipping (U: 23.6 VS. 11.4 ng.mL⁻¹, p=0.040 t test and UH2: 201.3 VS. 139.3 ng.mL⁻¹, p= 0.018, t test), thus confirming that uridine was probably converted to U then to UH2 after sampling, leading to an artificial increase of both analytes and preventing DPD phenotype to be properly assessed. Consequently, 52% of the samples with improper shipping conditions had U values > 16 ng.mL⁻¹, thus wrongly suggesting PM phenotypes.

DISCUSSION

Determining the best way to evaluate DPD status in 5-FU patients is a more than decades-old story now in clinical oncology. Historically, direct DPD activity measurement by radio-HPLC in PBMCs has been proposed – but this method was costly, time-consuming and required

radioactive standards, thus failing to meet the requirements of large-scale screening¹⁹. Alternate methods in the 2000's such as the Uracil Breath Test were similarly hard to transpose in routine practice⁸. Conversely, monitoring physiological uracil in plasma and its conversion rate to UH2 was proposed as early as the mid-90's as a convenient surrogate, only requiring basic apparatus such as UV-HPLC²⁰. Many improved HPLC-UV, GC-MS or LC-MS/MS methods have been published ever since²¹⁻²³. Recently, several groups have proposed to assay U and UH2 from saliva samples, so as to facilitate large-scale screening from an easily accessible tissue but these assays are still based next upon HPLC-UV or LC-MS/MS analysis²⁴⁻²⁶. Similarly, alternate DPD testing using a loading dose of exogenous uracil required Mass Spectrometry analysis next²⁷. With respect to the increasing number of patients to be screened, developing a simple, rapid and affordable bioanalytical method easily transposable in any laboratory is challenging. In particular, shifting from HPLC to UPLC is critical so as to cut the analytical runtimes. Indeed, most published HPLC-UV methods relied on several columns in line so as to increase the separation of the analytes, especially at 210 nm, with subsequent run times often exceeding 40 minutes^{11,24}. However to date, all the published UPLC-based methods to assay U and UH2 are coupled to MS/MS detection^{17,24}, thus limiting the number of platforms or hospital laboratories able to implement the methods at low cost such as with a basic double-wavelength UV detection. Indeed MS-based analysis, although presenting excellent analytical performances, requires apparatus, labeled standards and maintenance all much more expensive than basic UPLC-UV analysis. This could be an issue in emerging countries where 5-FU remains the backbone of most anticancer regimen to treat adult patients with solid tumors, and as such is on the WHO list of Essential Medicines²⁹.

Here we have developed and validated following current bioanalytical guidelines a new UPLC method to assay both U and UH2 at two different U.V. wavelengths as a surrogate for DPD phenotype. Provided that blood samples are processed rapidly to the analytical laboratory to

prevent *in silico* degradation of analytes, U plasma values and possibly UH2/U ratio calculation give a rapid and convenient insight on underlying DPD phenotype, without measuring the actual enzymatic activity. Sample preparation was inspired by previous attempts to assay U and UH2 using standard HPLC methods. Pyrimidine derivatives such as 5-FU are classically extracted from biological matrix using Liquid-Liquid Extraction (LLE) procedure, mostly based upon diethyl ether or ethyl acetate/isopropanol use³⁰. Several extraction methods were tested (data not shown), such as standard LLE, pre-treatment of plasma with buffers such as addition of ammonium sulfate, or use of several SPE cartridges (e.g., Chromabond® HR-X, Chromabond® NH2, Hypersep® Hypercarb) or analytical columns (e.g. Hypercarb), but all failed to provide better results in terms of recovery and specificity than the extraction method and the chromatographic conditions we present. Here, SPE extraction was used because it can be easily automated next, should large batches of samples have to be processed. Mean recovery was around 45% for both U and UH2. All other endpoints regarding method validation were met, making this method suitable for clinical use in patients. Of note, run-times were remarkably short (i.e., 12 minutes), which was considered as a critical point with respect with the ever rising number of patients to be DPD-tested in routine. As a comparison, our previous HPLC-based method used to assay U and UH2 required 45 minutes of run time⁴ and elsewhere analytical time of 50 minutes was reported by others³⁴. Overall, relatively simple sample preparation step plus reduced run time allows 100 patients samples to be ran in a single batch over one or two consecutive working days in our laboratory, meaning that up to 250 samples could be easily analyzed per week. To illustrate the performances of this UPLC-UV method, we have presented results from a representative activity of DPD screening in our laboratory over one month of routine testing. Over one representative month, a total of 263 samples were sent to our laboratory (mean: 66 samples a week), but only 234 had full final DPD status interpretation because of shipping issues affecting 27 of them (10.2% of the whole samples) and other issues

for two samples. This underlines how drastic control of shipping conditions (i.e., time and temperature) is critical when developing routine screening for DPD deficiency based upon U and/or UH2/U ratio monitoring in plasma. Actually our internal blood samples stability testing showed that U and UH2 were stable for 12 hours at 4°C and 2 hours at ambient temperature (data not shown). However per French guidelines, blood samples for DPD testing are to be discarded when time from sampling to centrifugation exceeds 90 min with ambient temperature shipping, or 4 h upon 4°C shipping. When samples which failed to meet these shipping criteria were nevertheless analyzed, we found that significant differences both on U and UH2 levels as compared with samples with proper handling, thus confirming that these should be discarded because of an elevated risk of false-positive results. Indeed 52% of these samples had U values theoretically associated with a DPD deficiency syndrome (range: 18-157 ng.mL⁻¹). In addition, unusually high UH2 values (i.e., up to 612 ng.mL⁻¹, whereas mean/median value in our patients was 139.3/125 ng.mL⁻¹) helped to detect probable *in silico* degradation for these samples, thus illustrating how measuring UH2 can be helpful. No chromatographic interference was observed among our patients, either at 210 nm or 265 nm, despite the fact that cancer patients are all heavily treated with a variety of drugs and that 210 nm is far from being a specific wavelength. Overall, 10,7 % of patients could be identified as presenting with a variety of DPD-deficiency status because U was > 16 ng.mL⁻¹, an incidence markedly higher than the one found in previous genotype-based studies³¹. Even if the vast majority of those patients (80%) were considered as being only mild-deficient with U values comprised between 16 and 30 ng.mL⁻¹, this figure is markedly higher than the reported incidence of DPD deficit based upon genotyping *DPYD*³. This discrepancy is not a surprise since genotyping *DPYD* has been repeatedly fingered as being highly specific but with a poor sensitivity, thus possibly under-estimating the actual incidence of DPD deficiency³². Per French recommendations, patients with U > 150 ng.mL⁻¹ should be precluded for any fluoropyrimidine-based therapy. During this one-month screening,

no such patient was detected. For patients with U comprised between 16 and 150 ng.mL⁻¹, in our institute recommendations range from simple warning of possible impaired elimination with cut in dosing left to the oncologist's choice (i.e., for patients with U values between 16 and 30 ng.mL⁻¹) to proposal for cut in dosing by - 25 down to -75%, depending on the level of DPD deficiency (the higher the U value, the more severe the deficiency and the more drastic the cut in dosing) and other clinical covariates such as age or performance status. For instance, here the patient with U = 85 ng.mL⁻¹ was considered as profoundly DPD deficient with several comorbidities and a 75% reduction in 5-FU dosing was subsequently proposed.

CONCLUSION

Upfront detection of DPD deficiency is now a major concern in medical oncology when fluoropyrimidine drugs are scheduled. Here we present a rapid, simple and affordable UPLC-UV method that allows to quantify both U and UH2 as a surrogate for DPD activity. When used in routine practice, this analytical method allows to assay a large number of samples from heavily treated cancer patients as a means to secure treatment. As a conclusion, this UPLC-UV method for U and UH2 joint analysis proved to be a rapid, robust and reliable way to evaluate DPD status as part of routine monitoring of patients scheduled for 5-FU or capecitabine-based therapy.

STUDY HIGHLIGHTS

What is the current knowledge on the topic?

Detecting patients with DPD deficiency is an increasingly critical issue to secure the administration of fluoropyrimidine drugs such as 5-FU or capecitabine.

What question did this study address?

Determining DPD status is challenging. Here we present a simple and rapid UPLC-UV method to determine U and UH2 level in plasma as a surrogate for DPD activity.

What does this study add to our knowledge?

This new method has been developed to be both time- and cost-effective, thus meeting the requirements for large-scale prospective screening. Data from one representative month of routine testing in our institute illustrate the performances of this phenotyping method for routine DPD testing.

How might this change clinical pharmacology or translational science?

This method has been kept as cheap, simple and rapid as possible to allow any laboratory to implement DPD testing as part of routine screening. This could contribute to secure the administration of 5-FU or capecitabine, two major drugs widely prescribed in clinical oncology.

ACKNOWLEDGEMENTS

None

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Clémence Marin, Bénédicte De Victor, Sylvie Quaranta, Caroline Solas, Bruno Lacarelle, and Joseph Ciccolini wrote the manuscript; Clémence Marin, and Joseph Ciccolini designed the research; Clémence Marin, and Renée Ugdonne, performed the research; Clémence MARIN, and Joseph Ciccolini analyzed the data; Anis Krache, Chloé Palmaro, Mathilde Lucas, Valentin Hilaire, and Renée Ugdonne contributed new reagents/analytical tools.

CONFIDENTIAL

REFERENCES

1. Mazzuca, F. *et al.* Pre-treatment evaluation of 5-fluorouracil degradation rate: association of poor and ultra-rapid metabolism with severe toxicity in a colorectal cancer patients cohort. *Oncotarget* **7**, 20612–20620 (2016).
2. Del Re, M. *et al.* Pharmacogenetics and Metabolism from Science to Implementation in Clinical Practice: The Example of Dihydropyrimidine Dehydrogenase. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 2028–2034 (2017).
3. Meulendijks, D., Cats, A., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity - Ready for clinical practice? *Cancer Treat. Rev.* **50**, 23–34 (2016).
4. Launay, M. *et al.* Beating the odds: efficiency and toxicity of dihydropyrimidine dehydrogenase-driven adaptive dosing of 5-FU in patients with digestive cancer. *Br J Clin Pharmacol* **81**, 124–130 (2016).
5. Ciccolini, J., Gross, E., Dahan, L., Lacarelle, B. & Mercier, C. Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin Colorectal Cancer* **9**, 224–228 (2010).
6. van Staveren, M. C., Guchelaar, H. J., van Kuilenburg, A. B. P., Gelderblom, H. & Maring, J. G. Evaluation of predictive tests for screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Pharmacogenomics J.* **13**, 389–395 (2013).
7. Gentile, G. *et al.* Genotype-phenotype correlations in 5-fluorouracil metabolism: a candidate DPYD haplotype to improve toxicity prediction. *Pharmacogenomics J.* **16**, 320–325 (2016).
8. Mattison, L. K. *et al.* The uracil breath test in the assessment of dihydropyrimidine dehydrogenase activity: pharmacokinetic relationship between expired $^{13}\text{C}\text{O}_2$ and plasma [2- ^{13}C]dihydrouracil. *Clin. Cancer Res.* **12**, 549–555 (2006).

9. Lostia, A. M. *et al.* A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 5-Fluorouracil degradation rate by intact peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit* **31**, 482–488 (2009).
10. Ciccolini, J. *et al.* A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. *Ther Drug Monit* **28**, 678–685 (2006).
11. Déporte-Féty, R. *et al.* High-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for quantification of dihydrofluorouracil in human lymphocytes: application to measurement of dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **762**, 203–209 (2001).
12. Pan, W., Li, Y., Feng, Y., Yang, F. & Liu, H. A new sample preparation and separation combination for the precise, accurate, and simultaneous determination of uracil and dihydrouracil in human plasma by reversed-phase HPLC. *J Sep Sci* **40**, 3763–3770 (2017).
13. Haute Autorité de Santé - Des recommandations pour prévenir certaines toxicités sévères des chimiothérapies par fluoropyrimidines. https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2892234/fr/des-recommandations-pour-prevenir-certaines-toxicites-severes-des-chimiotherapies-par-fluoropyrimidines.
14. Etienne-Grimaldi, M.-C. *et al.* New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine. *PLoS ONE* **12**, e0175998 (2017).
15. Meulendijks, D. *et al.* Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity. *Br. J. Cancer* **116**, 1415–1424 (2017).
16. EMEA. Bioanalytical method validation. *European Medicines Agency - Commission* <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation> (2018).
17. Jacobs, B. A. W. *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* **126**, 75–82 (2016).

18. Henricks, L. M. *et al.* Food-effect study on uracil and dihydrouracil plasma levels as marker for dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **84**, 2761–2769 (2018).
19. Chazal, M. *et al.* Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin. Cancer Res.* **2**, 507–510 (1996).
20. Sumi, S., Kidouchi, K., Ohba, S. & Wada, Y. Automated screening system for purine and pyrimidine metabolism disorders using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* **672**, 233–239 (1995).
21. 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.* **769**, 169–176 (2002).
22. 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.* **823**, 98–107 (2005).
23. Kuhara, T. *et al.* Rapid gas chromatographic-mass spectrometric diagnosis of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and dihydropyrimidinase deficiency. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **792**, 107–115 (2003).
24. Carlsson, G., Odin, E., Gustavsson, B. & Wettergren, Y. Pretherapeutic uracil and dihydrouracil levels in saliva of colorectal cancer patients are associated with toxicity during adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **74**, 757–763 (2014).
25. Galarza, A. F. A. *et al.* Endogenous plasma and salivary uracil to dihydrouracil ratios and DPYD genotyping as predictors of severe fluoropyrimidine toxicity in patients with gastrointestinal malignancies. *Clin. Biochem.* **49**, 1221–1226 (2016).

26. Antunes, M. V. *et al.* Determination of Endogenous Concentrations of Uracil and Dihydrouracil in Dried Saliva Spots by LC-MS/MS: Method Development, Validation, and Clinical Application. *Ther Drug Monit* **41**, 383–390 (2019).
27. van Staveren, M. C. *et al.* Evaluation of an oral uracil loading test to identify DPD-deficient patients using a limited sampling strategy. *Br J Clin Pharmacol* **81**, 553–561 (2016).
28. Coudoré, F. *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* **50**, 877–884 (2012).
29. Robertson, J., Barr, R., Shulman, L. N., Forte, G. B. & Magnani, N. Essential medicines for cancer: WHO recommendations and national priorities. *Bull. World Health Organ.* **94**, 735–742 (2016).
30. Pi, C. *et al.* Development of a HPLC method to determine 5-fluorouracil in plasma: application in pharmacokinetics and steady-state concentration monitoring. *Int J Clin Pharmacol Ther* **52**, 1093–1104 (2014).
31. Henricks, L. M. *et al.* DPD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *Lancet Oncol.* **19**, 1459–1467 (2018).
32. Mercier, C. & Ciccolini, J. Profiling dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with cancer undergoing 5-fluorouracil/capecitabine therapy. *Clin Colorectal Cancer* **6**, 288–296 (2006).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Blank BSA chromatograms at 210 nm and 265 nm

Figure 2: DPD testing of one month of routine analysis

Figure 3: Chromatograms of representative partially deficient (PD) and non-deficient (ND) patients at 210 and 265 nm

Figure 4: Uracil distribution among the 234 analyzed patients

Table 1: Results of calibration testing

Table 2: Results of accuracy and precision testing

SUPPLEMENTARY MATERIALS

None

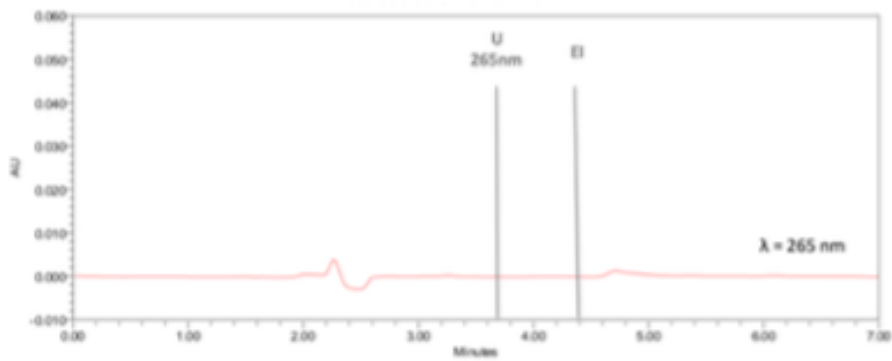
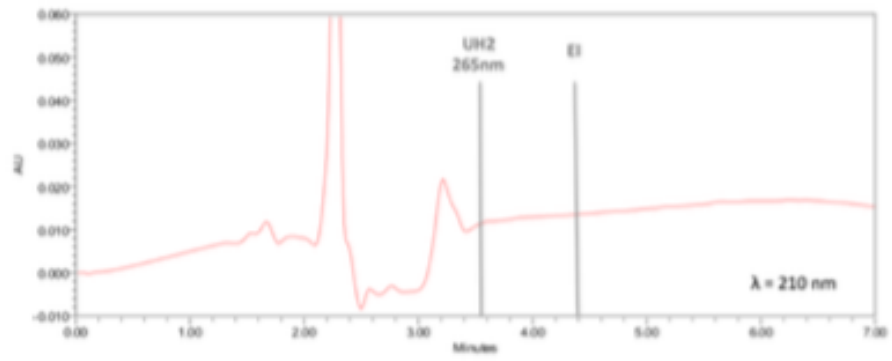
CONFIDENTIEL

CALIBRATION TESTS			
	Calibration level	Nominal value (ng/ml)	Means of deviation percentage (%)
Uracil	1	5	-4.02
	2	10	-10.2
	3	20	0.786
	4	40	-1.66
	5	100	4.00
	6	200	-1.28
	7	500	0.059
Dihydro-Uracil	1	40	0.429
	2	50	-2.03
	3	75	-1.8
	4	100	-1.1
	5	200	1.98
	6	300	0.344
	7	500	-0.338

CONFIDENTIAL

ACCURACY & PRECISION				
		Samples	Bias (%)	Precision (%)
Uracile	Intra-run tests	LLOQ	-6.63	8.59
		QC Low	14.9	1.91
		QC Mid	0.084	13.2
		QC Hight	9.75	9.59
	Inter-run tests	LLOQ	-2.85	10.2
		QC Low	8.15	9.26
		QC Mid	-0.238	10.9
		QC Hight	2.88	13.1
Dihydro-Uracil	Intra-run tests	LLOQ	7.93	12
		QC Low	-7.35	12.4
		QC Mid	-5.01	11.7
		QC Hight	-2.99	13.7
	Inter-run tests	LLOQ	0.429	13.9
		QC Low	-0.779	13.7
		QC Mid	-4.94	10.5
		QC Hight	0.938	4.05

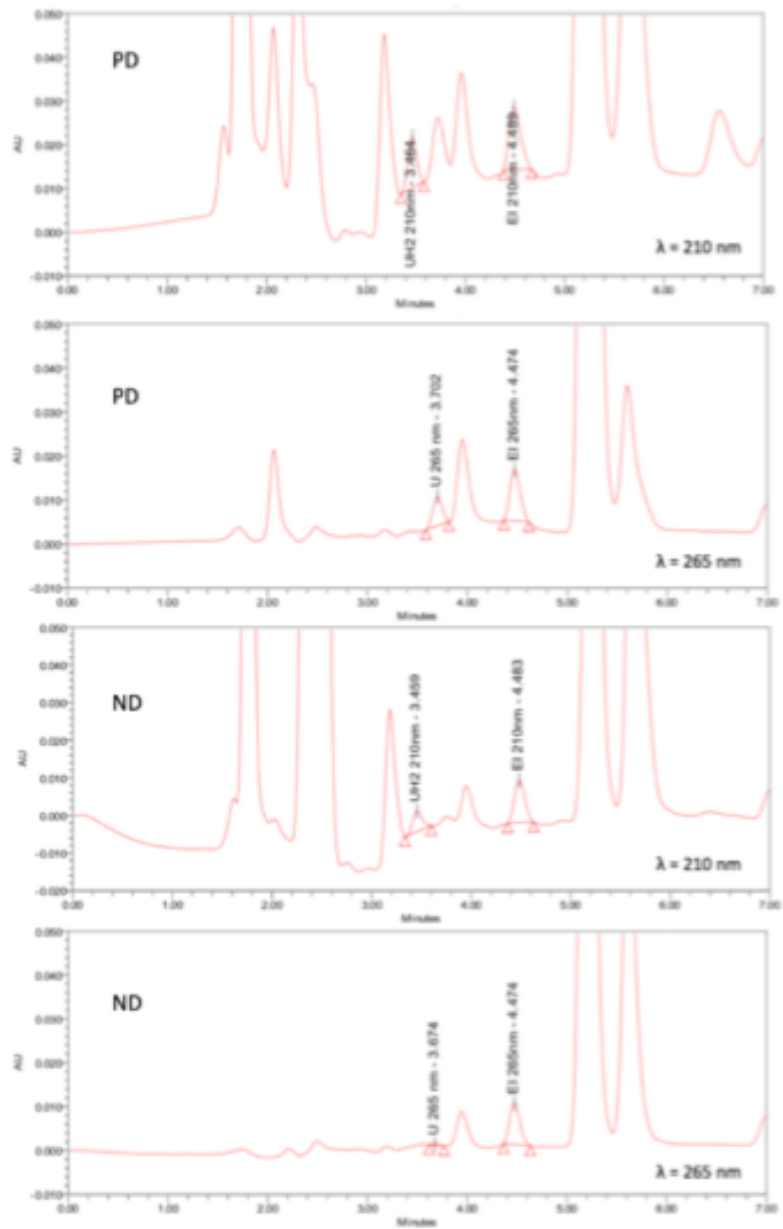
CONFIDENTIAL

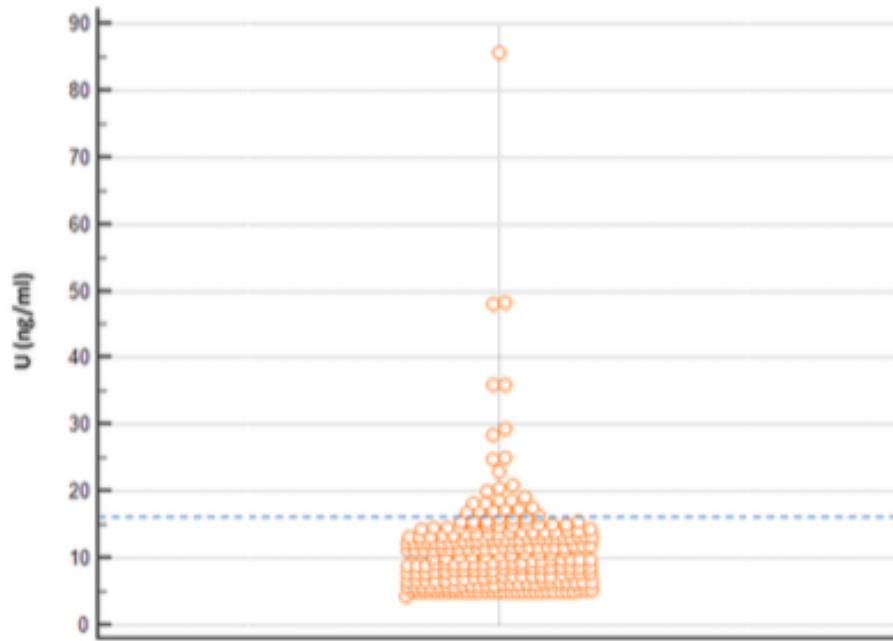


CONFIDENTIAL



CONFIDENTIAL





patients

CONFIDENTIAL

IV. Étude de l'activité de dépistage du déficit en DPD dans le laboratoire de pharmacocinétique et toxicologie CHU Timone

Dans le cadre de l'étude de l'évolution de l'activité du dépistage du déficit en DPD dans le laboratoire de pharmacocinétique et toxicologie du CHU Timone, trois dates sont importantes à retenir :

- Février 2018 : Message d'Alerte Rapide Sanitaire : l'ANSM recommande le dépistage du déficit en DPD avant administration de fluoropyrimidines [43]
- Décembre 2018 : l'HAS et l'INCa recommande le dosage de l'uracilémie comme méthode de dépistage du déficit en DPD [44], [45]
- Avril 2019 : l'ANSM rend obligatoire la recherche du déficit en DPD avant dispensation de fluoropyrimidines [46]

Nous étudierons l'impact de ces recommandations sur l'activité de dépistage en DPD de notre laboratoire dans les sections suivantes. Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel Excel® et la plateforme BioStaTGV® [76].

1. Phénotypage

Le dépistage du déficit en DPD par mesure de l'uracilémie a été mise en place en 2009 au sein de notre laboratoire. Avant les recommandations de février 2018 une moyenne de $28,7 \pm 7,46$ patients par mois était phénotypés. Puis, entre février 2018 et décembre 2018 c'est en moyenne $182,8 \pm 30,0$ patients qui ont été phénotypés par mois. Ensuite, entre les recommandations sur le dépistage du déficit en DPD par mesure de l'uracilémie et l'obligation de réaliser le dépistage ce sont en moyenne $212,8 \pm 11,4$ patients par mois qui ont été phénotypés. Enfin, depuis avril 2019 une moyenne de $363,8 \pm 35,2$ patients a été dépistée par mois. Un graphique représentant le nombre de patient phénotypés par mois depuis la mise en place de l'analyse dans notre laboratoire est présenté dans la Figure 13.

Comme le montre le graphique de la Figure 13, en février 2018 une augmentation significative ($p = 2,50E-8$; t-test unilatéral) de 636 % de l'activité de phénotypage fait suite aux recommandations portant sur le dépistage du déficit en DPD avant l'administration de fluoropyrimidines. Paradoxalement, les recommandations portant sur le dosage de l'uracilémie comme méthode de référence pour le dépistage du déficit en DPD en décembre 2018 n'ont pas impacté l'activité du laboratoire (pas de différence significative entre le nombre mensuel de patients phénotypés avant et après cette date ; $p = 0,081$; t-test bilatéral). En revanche, une nouvelle augmentation significative ($p = 0,014$; t-test unilatéral) de 124 % de l'activité de phénotypage a été observée lors de la parution des recommandations sur l'obligation d'effectuer le dépistage de la DPD avant dispensation de fluoropyrimidines.

2. Génotypage

Le dépistage du déficit en DPD par recherche des variants alléliques du gène *DPYD* a été mis en place en 2014 au sein de notre laboratoire. Les variants alléliques recherchés étaient *DPYD*2A*, *D949V*, et *I560S*, et à partir de 2017 la recherche du variant *HapB3* fut rajoutée.

Avant que l'ASNМ ne recommande le dépistage du déficit en DPD les génotypages au sein de notre laboratoire étaient sporadiques avec en moyenne $0,37 \pm 1,02$ patients génotypés par mois comme nous pouvons le constater dans la Figure 14. Suite à cette recommandation, une augmentation significative ($p = 1,02E-26$; t-test unilatéral) a été constatée ($36,3 \pm 10,95$ patients génotypés par mois en moyenne). Cependant, lors de la recommandation du dépistage par mesure de l'uracilémie une diminution significative ($p = 1,40E-5$; t-test unilatéral) de 61 % de l'activité de génotypage a été constatée avec une moyenne de $14 \pm 4,58$ patients génotypés par mois. Par la suite, lorsque le dépistage est devenu obligatoire avant dispensation des fluoropyrimidines, aucune différence significative ($p = 0,69$; t-test bilatéral) n'a été retrouvée entre le nombre de patients génotypés par mois avant et après avril 2019. Ceci n'a rien de surprenant dans la mesure où ce n'est pas le génotypage qui est recommandé pour dépister le déficit en DPD.

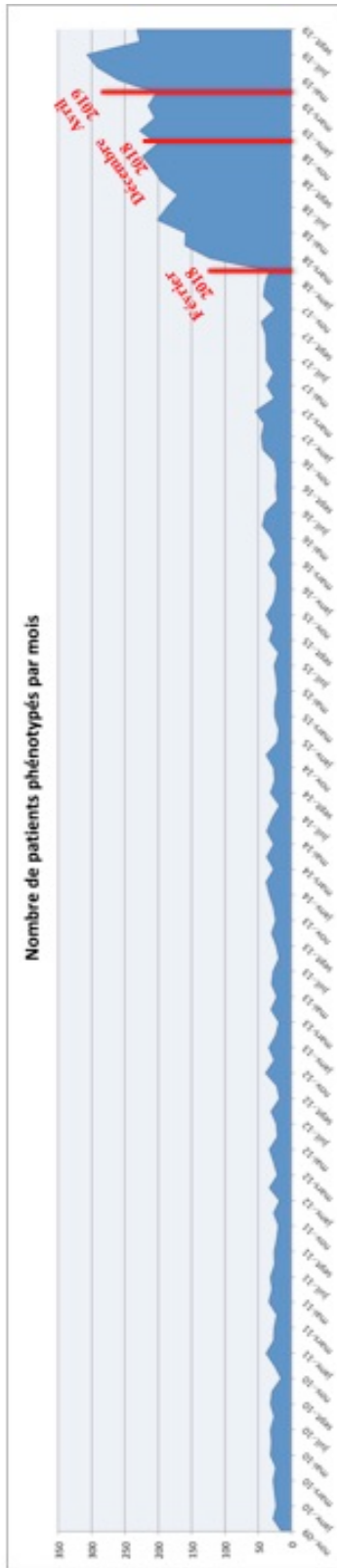


Figure 13 : Évolution du nombre de patients phénotypés par mois au sein du laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie du CHU Timone.



Figure 14 : Évolution du nombre de patients génotypés par mois au sein du laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie du CHU Timone

CONCLUSION

Ces travaux ont donc permis de mettre au point une technique de dosage de l'uracilémie absolument indispensable pour le dépistage du déficit en DPD. Cette méthode répond à de nombreuses exigences, qu'elles soient réglementaires (normes ISO 15189) ou pratiques (temps d'analyse, simplicité, coût de mise en place, automatisation). De plus, les récentes recommandations sur la recherche de déficit en DPD avant dispensation de fluoro-pyrimidines ont clairement eu un impact sur l'activité des laboratoires dosant l'uracilémie. Dans un contexte légal où le dosage de l'uracilémie est devenu systématique avant dispensation de fluoropyrimidines, et où 60 000 patients reçoivent une chimiothérapie contenant une fluoropyrimidines par an, il était inenvisageable de ne pas se pencher sur une méthode de dosage de l'uracilémie pouvant être implantée aisément dans tout laboratoire le désirant, et c'est ce que ce travail a permis.

Cependant, le 5-FU étant un médicament peu onéreux et stable, il est particulièrement prescrit chez les patients présentant un cancer dans les pays du tiers-monde. Dans ce contexte même une analyse UPLC-UV, considérée comme peu coûteuse en Europe, devient difficilement envisageable. Le prochain défi sera certainement de développer une technique permettant d'effectuer la recherche de déficit en DPD en tenant compte des exigences inhérentes à ces pays.

Bibliographie

- [1] INCa, “Les cancers en France en 2015.” .
- [2] R. Duschinsky, E. Pleven, and C. Heidelberger, “THE SYNTHESIS OF 5-FLUOROPYRIMIDINES,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 79, no. 16, pp. 4559–4560, Aug. 1957.
- [3] “WHO Model List of Essential Medicines 20th Edition.pdf.” .
- [4] “Résumé des caractéristiques du produit - FLUOROURACILE PFIZER 50 mg/ml, solution à diluer pour perfusion - Base de données publique des médicaments.” [Online]. Available: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=64590923&typedoc=R>. [Accessed: 09-Oct-2019].
- [5] H. A. Ingraham, B. Y. Tseng, and M. Goulian, “Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 21, no. 1, pp. 211–216, Jan. 1982.
- [6] J. Ciccolini *et al.*, “Transmission of apoptosis in human colorectal tumor cells exposed to capecitabine, Xeloda, is mediated via Fas,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 1, no. 11, pp. 923–927, Sep. 2002.
- [7] M.-A. Barrat-Petit, C. Naulin-Ifi, P. Mahler, and G. Milano, “[Dihydropyrimidine deshydrogenase (DPD): rhythm and consequences],” *Pathol. Biol.*, vol. 53, no. 5, pp. 261–264, Jun. 2005.
- [8] Z. Karjoo, X. Chen, and A. Hatefi, “Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 99, no. Pt A, pp. 113–128, Apr. 2016.
- [9] A. T. Nies, T. Magdy, M. Schwab, and U. M. Zanger, “Role of ABC transporters in fluoropyrimidine-based chemotherapy response,” *Adv. Cancer Res.*, vol. 125, pp. 217–243, 2015.
- [10] M. Tsalic, G. Bar-Sela, A. Beny, B. Visel, and N. Haim, “Severe toxicity related to the 5-fluorouracil/leucovorin combination (the Mayo Clinic regimen): a prospective study in colorectal cancer patients,” *Am. J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 1, pp. 103–106, Feb. 2003.
- [11] J. Latchman, A. Guastella, and C. Tofthagen, “5-Fluorouracil toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme: implications for practice,” *Clin J Oncol Nurs*, vol. 18, no. 5, pp. 581–585, Oct. 2014.
- [12] P. Alter, M. Herzum, M. Soufi, J. R. Schaefer, and B. Maisch, “Cardiotoxicity of 5-

- fluorouracil,” *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, vol. 4, no. 1, pp. 1–5, Jan. 2006.
- [13] M. F. Sorrentino, J. Kim, A. E. Foderaro, and A. G. Truesdell, “5-fluorouracil induced cardiotoxicity: review of the literature,” *Cardiol J*, vol. 19, no. 5, pp. 453–458, 2012.
- [14] A. Polk, M. Vaage-Nilsen, K. Vistisen, and D. L. Nielsen, “Cardiotoxicity in cancer patients treated with 5-fluorouracil or capecitabine: a systematic review of incidence, manifestations and predisposing factors,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 39, no. 8, pp. 974–984, Dec. 2013.
- [15] K. A. Kwon *et al.*, “A case of 5-fluorouracil induced encephalopathy,” *Cancer Res Treat*, vol. 42, no. 2, pp. 118–120, Jun. 2010.
- [16] H. J. Yi, K. S. Hong, N. Moon, S. S. Chung, R.-A. Lee, and K. H. Kim, “Acute hyperammonemic encephalopathy after 5-fluorouracil based chemotherapy,” *Ann Surg Treat Res*, vol. 90, no. 3, pp. 179–182, Mar. 2016.
- [17] W. Y. Cheung, R. A. Fralick, and S. Cheng, “The confused cancer patient: a case of 5-fluorouracil-induced encephalopathy,” *Curr Oncol*, vol. 15, no. 5, pp. 234–236, Oct. 2008.
- [18] B. F. Werbrouck, W. J. Pauwels, and J. L. De Bleecker, “A case of 5-fluorouracil-induced peripheral neuropathy,” *Clin Toxicol (Phila)*, vol. 46, no. 3, pp. 264–266, Mar. 2008.
- [19] F. Desmoulin, V. Gilard, M. Malet-Martino, and R. Martino, “Metabolism of capecitabine, an oral fluorouracil prodrug: (19)F NMR studies in animal models and human urine,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 30, no. 11, pp. 1221–1229, Nov. 2002.
- [20] S. W. Lam, H. J. Guchelaar, and E. Boven, “The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 50, pp. 9–22, Nov. 2016.
- [21] “Résumé des caractéristiques du produit - CAPECITABINE MYLAN 500 mg, comprimé pelliculé - Base de données publique des médicaments.” [Online]. Available: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=60044987&typedoc=R>. [Accessed: 11-Oct-2019].
- [22] “Prescribing Information - Vistogard.pdf.” .
- [23] D. J. Cada, U. Mbogu, R. J. Bindler, and D. E. Baker, “Uridine Triacetate,” *Hosp Pharm*, vol. 51, no. 6, pp. 484–488, Jun. 2016.
- [24] A. Gnoni *et al.*, “Pharmacokinetic and metabolism determinants of fluoropyrimidines and oxaliplatin activity in treatment of colorectal patients,” *Curr. Drug Metab.*, vol. 12, no. 10, pp. 918–931, Dec. 2011.
- [25] A. Lee, H. Ezzeldin, J. Fourie, and R. Diasio, “Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: impact of pharmacogenetics on 5-fluorouracil therapy,” *Clin Adv Hematol Oncol*,

vol. 2, no. 8, pp. 527–532, Aug. 2004.

[26] L. K. Mattison, R. Soong, and R. B. Diasio, “Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil pharmacogenetics and pharmacogenomics,”

Pharmacogenomics, vol. 3, no. 4, pp. 485–492, Jul. 2002.

[27] A. B. P. van Kuilenburg, “Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil,” *Eur. J. Cancer*, vol. 40, no. 7, pp. 939–950, May 2004.

[28] G. Bocci *et al.*, “A pharmacokinetic-based test to prevent severe 5-fluorouracil toxicity,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 80, no. 4, pp. 384–395, Oct. 2006.

[29] B. E. Harris, R. Song, S. J. Soong, and R. B. Diasio, “Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion,” *Cancer Res.*, vol. 50, no. 1, pp. 197–201, Jan. 1990.

[30] H. Jiang, J. Lu, and J. Ji, “Circadian rhythm of dihydrouracil/uracil ratios in biological fluids: a potential biomarker for dihydropyrimidine dehydrogenase levels,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 141, no. 4, pp. 616–623, Feb. 2004.

[31] F. N. Naguib, S. J. Soong, and M. H. el Kouni, “Circadian rhythm of orotate phosphoribosyltransferase, pyrimidine nucleoside phosphorylases and dihydrouracil dehydrogenase in mouse liver. Possible relevance to chemotherapy with 5-fluoropyrimidines,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 45, no. 3, pp. 667–673, Feb. 1993.

[32] R. Zhang, Z. Lu, T. Liu, S. J. Soong, and R. B. Diasio, “Relationship between circadian-dependent toxicity of 5-fluorodeoxyuridine and circadian rhythms of pyrimidine enzymes: possible relevance to fluoropyrimidine chemotherapy,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 12, pp. 2816–2822, Jun. 1993.

[33] B. A. W. Jacobs *et al.*, “Pronounced between-subject and circadian variability in thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme activity in human volunteers,” *Br J Clin Pharmacol*, vol. 82, no. 3, pp. 706–716, 2016.

[34] K. Abolmaali *et al.*, “Circadian variation in intestinal dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) expression: a potential mechanism for benefits of 5FU chrono-chemotherapy,” *Surgery*, vol. 146, no. 2, pp. 269–273, Aug. 2009.

[35] M. Boisdron-Celle, A. Morel, and E. Gamelin, “[Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and toxicity to fluoropyrimidine],” *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 68, no. 1, pp. 27–32, Feb. 2010.

[36] X.-Q. Liu, M. Zhuang, Z. Wang, and R. M. Huber, “Correlation between

dihydropyrimidine dehydrogenase and efficacy and toxicity of fluoropyrimidine drugs,” *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, vol. 18, no. 18, pp. 2772–2776, 2014.

[37] C. G. Yang *et al.*, “DPD-based adaptive dosing of 5-FU in patients with head and neck cancer: impact on treatment efficacy and toxicity,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 67, no. 1, pp. 49–56, Jan. 2011.

[38] M. Launay *et al.*, “Beating the odds: efficacy and toxicity of dihydropyrimidine dehydrogenase-driven adaptive dosing of 5-FU in patients with digestive cancer,” *Br J Clin Pharmacol*, vol. 81, no. 1, pp. 124–130, Jan. 2016.

[39] “Question n°2878 - Assemblée nationale.” [Online]. Available: <http://questions.assemblee-nationale.fr/q15/15-2878QE.htm>. [Accessed: 13-Oct-2019].

[40] “Question n°4942 - Assemblée nationale.” [Online]. Available: <http://questions.assemblee-nationale.fr/q15/15-4942QE.htm>. [Accessed: 13-Oct-2019].

[41] “Question n°9017 - Assemblée nationale.” [Online]. Available: <http://questions.assemblee-nationale.fr/q15/15-9017QE.htm>. [Accessed: 13-Oct-2019].

[42] “Question n°9862 - Assemblée nationale.” [Online]. Available: <http://questions.assemblee-nationale.fr/q15/15-9862QE.htm>. [Accessed: 13-Oct-2019].

[43] ANSM, “Prévention des effets indésirables graves liés à un déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) lors de traitement par fluoropyrimidines (5-fluorouracile et capécitabine) - Point d’information actualisé au 28 février 2018 - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.” [Online]. Available: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Prevention-des-effets-indesirables-graves-lies-a-un-deficit-en-dihydropyrimidine-deshydrogenase-DPD-lors-de-traitement-par-fluoropyrimidines-5-fluorouracile-et-capecitabine-Point-d-information-actualise-au-28-fevrier-2018>. [Accessed: 18-Feb-2019].

[44] M.-A. Loriot *et al.*, “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,” *Bulletin du Cancer*, vol. 105, no. 4, pp. 397–407, Apr. 2018.

[45] “Des recommandations pour prévenir certaines toxicités sévères des chimiothérapies par fluoropyrimidines,” *Haute Autorité de Santé*. [Online]. Available: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2892234/fr/des-recommandations-pour-prevenir-certaines-toxicites-severes-des-chimiotherapies-par-fluoropyrimidines. [Accessed: 13-Oct-2019].

[46] “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.” [Online]. Available: <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>. [Accessed: 13-Oct-2019].

[47] C. A. T. C. Lunenburg *et al.*, “Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time,” *Eur. J. Cancer*, vol. 54, pp. 40–48, Feb. 2016.

[48] S. M. Offer, C. C. Fossum, N. J. Wegner, A. J. Stuflesser, G. L. Butterfield, and R. B. Diasio, “Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 9, pp. 2545–2554, May 2014.

[49] H. Zhang, Y. Li, H. Zhang, and X. Jin, “DPYD*5 gene mutation contributes to the reduced DPYD enzyme activity and chemotherapeutic toxicity of 5-FU: results from genotyping study on 75 gastric carcinoma and colon carcinoma patients,” *Med. Oncol.*, vol. 24, no. 2, pp. 251–258, 2007.

[50] M. W. Saif, H. Ezzeldin, K. Vance, S. Sellers, and R. B. Diasio, “DPYD*2A mutation: the most common mutation associated with DPD deficiency,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 60, no. 4, pp. 503–507, Sep. 2007.

[51] U. Amstutz, T. K. Froehlich, and C. R. Largiadèr, “Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity,” *Pharmacogenomics*, vol. 12, no. 9, pp. 1321–1336, Sep. 2011.

[52] A. Uzunkoy, F. Dilmeç, A. Ozgonul, A. B. P. van Kuilenburg, and F. Akkafa, “Investigation of IVS14+ 1G > A polymorphism of DPYD gene in a group of Turkish patients with colorectal cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 27, no. 6B, pp. 3899–3902, Dec. 2007.

[53] K. Seck *et al.*, “Analysis of the DPYD gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in a cohort of Caucasian individuals,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 16, pp. 5886–5892, Aug. 2005.

[54] A. Ofverholm, E. Arkblad, S. Skrtic, P. Albertsson, E. Shubbar, and C. Enerbäck, “Two cases of 5-fluorouracil toxicity linked with gene variants in the DPYD gene,” *Clin. Biochem.*, vol. 43, no. 3, pp. 331–334, Feb. 2010.

[55] R. Ben Fredj *et al.*, “Mutational spectrum of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) in the Tunisian population,” *C. R. Biol.*, vol. 330, no. 10, pp. 764–769, Oct. 2007.

[56] A. M. Lee *et al.*, “DPYD variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147),” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 106, no. 12, Dec. 2014.

- [57] M. W. Saif, “Dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) polymorphism among Caucasian and non-Caucasian patients with 5-FU- and capecitabine-related toxicity using full sequencing of DPYD,” *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 10, no. 2, pp. 89–92, Apr. 2013.
- [58] Z. Kleibl *et al.*, “Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy,” *Neoplasma*, vol. 56, no. 4, pp. 303–316, 2009.
- [59] D. Rosmarin *et al.*, “Genetic markers of toxicity from capecitabine and other fluorouracil-based regimens: investigation in the QUASAR2 study, systematic review, and meta-analysis,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, no. 10, pp. 1031–1039, Apr. 2014.
- [60] S. Terrazzino, S. Cargnin, M. Del Re, R. Danesi, P. L. Canonico, and A. A. Genazzani, “DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis,” *Pharmacogenomics*, vol. 14, no. 11, pp. 1255–1272, Aug. 2013.
- [61] D. Meulendijks *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.*, vol. 16, no. 16, pp. 1639–1650, Dec. 2015.
- [62] A. Takabayashi *et al.*, “Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and mRNA expression in advanced gastric cancer analyzed in relation to effectiveness of preoperative 5-fluorouracil-based chemotherapy,” *Int. J. Oncol.*, vol. 17, no. 5, pp. 889–895, Nov. 2000.
- [63] Z. Lu, R. Zhang, and R. B. Diasio, “Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 22, pp. 5433–5438, Nov. 1993.
- [64] M. W. Saif, L. Mattison, T. Carollo, H. Ezzeldin, and R. B. Diasio, “Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in an Indian population,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 58, no. 3, pp. 396–401, Sep. 2006.
- [65] G. Milano and M. C. Etienne, “Potential importance of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in cancer chemotherapy,” *Pharmacogenetics*, vol. 4, no. 6, pp. 301–306, Dec. 1994.
- [66] G. Milano and M. C. Etienne, “Individualizing therapy with 5-fluorouracil related to dihydropyrimidine dehydrogenase: theory and limits,” *Ther Drug Monit*, vol. 18, no. 4, pp. 335–340, Aug. 1996.

- [67] M. C. van Staveren *et al.*, “Evaluation of an oral uracil loading test to identify DPD-deficient patients using a limited sampling strategy,” *Br J Clin Pharmacol*, vol. 81, no. 3, pp. 553–561, Mar. 2016.
- [68] A. F. A. Galarza *et al.*, “Endogenous plasma and salivary uracil to dihydrouracil ratios and DPYD genotyping as predictors of severe fluoropyrimidine toxicity in patients with gastrointestinal malignancies,” *Clin. Biochem.*, vol. 49, no. 16–17, pp. 1221–1226, Nov. 2016.
- [69] J. Ciccolini *et al.*, “A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy,” *Ther Drug Monit*, vol. 28, no. 5, pp. 678–685, Oct. 2006.
- [70] F. Coudoré *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*, vol. 50, no. 10, pp. 877–884, Dec. 2012.
- [71] R. Déporte-Féty *et al.*, “High-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for quantification of dihydrofluorouracil in human lymphocytes: application to measurement of dihydropyrimidine dehydrogenase activity,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 762, no. 2, pp. 203–209, Oct. 2001.
- [72] E. Gamelin *et al.*, “Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: A potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-FU dosage,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 17, no. 4, p. 1105, Apr. 1999.
- [73] M. B. Garg, J. C. Sevester, J. A. Sakoff, and S. P. Ackland, “Simple liquid chromatographic method for the determination of uracil and dihydrouracil plasma levels: a potential pretreatment predictor of 5-fluorouracil toxicity,” *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 774, no. 2, pp. 223–230, Jul. 2002.
- [74] G. F. Cunha-Junior *et al.*, “(13)C-uracil breath test to predict 5-fluorouracil toxicity in gastrointestinal cancer patients,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 72, no. 6, pp. 1273–1282, Dec. 2013.
- [75] EMEA, “Bioanalytical method validation,” *European Medicines Agency - Commission*, 17-Sep-2018. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. [Accessed: 19-Feb-2019].
- [76] “BiostaTGV - Statistiques en ligne.” [Online]. Available: <https://biostatgv.sentiweb.fr/>. [Accessed: 18-Oct-2019].

Listes des Annexes

- 1) Poster présenté aux Rencontres Convergences Santé et Hôpital en Septembre 2019 à Marseille
- 2) Procédure de phénotypage de la DPD actuellement mise en œuvre au sein du Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie – CHU Timone -APHM

Annexes



Méthode alternative pour le phénotypage de la DPD (DihydroPyrimidine Déshydrogénase) chez les patients traités par pyrimidines



Clémence Marin¹, Anis Krache, Chloé Palmaro¹, Mathilde Lucas¹, Valentin Hilaire¹, Renée Ugdonne¹, Bénédicte De Victor¹, Sylvie Quaranta¹, Caroline Solas¹, Bruno Lacarelle¹, Joseph Ciccolini¹

¹: Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie, CHU Timone – APHM, Bâtiment F 264 rue saint pierre, 13005 Marseille.



MÉTHODES DE DÉTERMINATION DU STATUT DPD

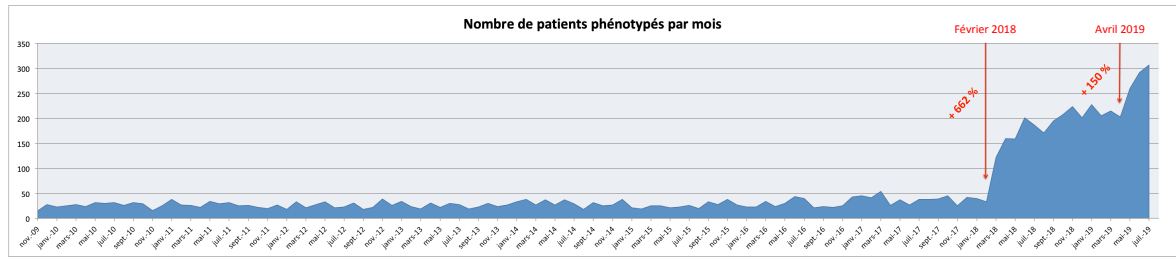
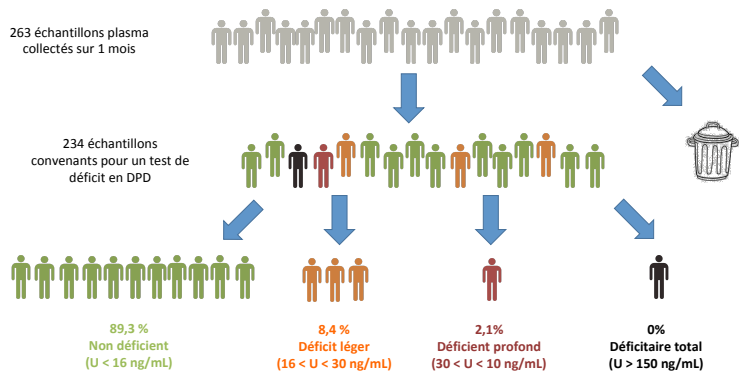
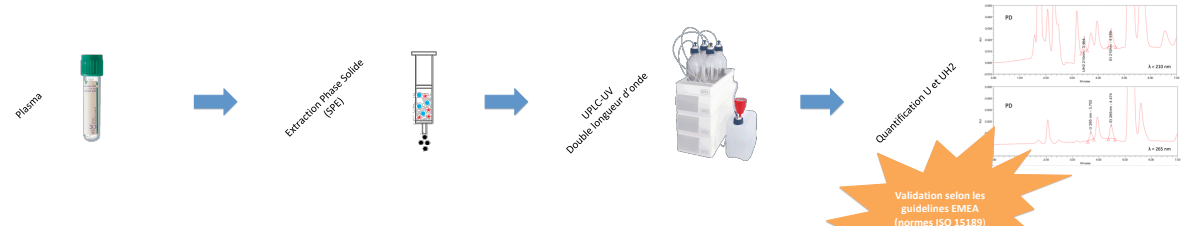
Génotypage : Recherche des variants alléliques sur le gène DYPD

Phénotypage :

- mesure de l'activité enzymatique
- uracilémie
- ratio UH2/U (dihydro-uracile / uracile)



STATUT DPD	
U < 16 ng/mL	Non déficitaire
16 < U < 30 ng/mL	Déficitaire partiel
U > 30 ng/mL	Déficitaire total



* : conformément aux recommandations du Groupe de Pharmacologie clinique Oncologie – Unicancer et le Réseau National de Pharmacogénétique Hospitalière.

AP-HM LBM Service de Pharmacocinétique et de Toxicologie Pr. B. LACARELLE CHU TIMONE	05ANAP06M145A
Phenotypage DPD par UPLC	
Date d'application: 2019-04-08 Version : 13	Rédaction : MARIN Clémence Validation : CICCOLINI Joseph Approbation : DEVICTOR Bénédicte

<input type="checkbox"/> Modification majeure (surlignée en jaune)	<input checked="" type="checkbox"/> Revue complète de la procédure
<input type="checkbox"/> Modification minimale ne remettant pas en cause le processus	
<input type="checkbox"/> Suppression du § :	

Cette procédure décrit **le dosage par UPLC-UV** des taux physiologiques d'uracile (U) et de dihydrouracile (UH2) afin d'établir un **ratio UH2 /U** interprétable comme le **phénotype DPD** de patients atteints de cancer et recevant une chimiothérapie incluant une fluoropyrimidine (5-FU, capécitabine).

1. L' ECHANTILLON

Nature de l'échantillon : Plasma (tube Vacutainer-bouchon vert foncé : héparinate de Lithium). Une matrice de type plasma issue de tubes EDTA, sec, citrate de sodium ou gélosés (bouchons rouge, verts clair, bleus, violets) est acceptée mais les résultats seront alors rendus recontrôlés sur tube héparinate de lithium.

Conservation :

- *Avant analyse* : les tubes de plasma sont conservés dans **deux tubes secondaires** au congélateur **CVIII** (pièce 30) à **-80°C**.
- Les culots sanguins (tubes primaires) sont conservés dans une boîte dédiée et stockés à 6°C (R27 pièce 3) en cas de demande d'expertise génétique ultérieure.
- *Après analyse* : les tubes dosés sont archivés 2 mois dans le congélateur **CVIII** à **-80°C** dans des boîtes dédiées à cet effet.

2. REACTIFS

Conservation: 3 mois à 4°C, sauf pour la solution de BSA (1 mois).

- **Tampon de formate d'ammonium 10mM**: dissolution de 0,63g de formate d'ammonium (CHO₂NH₄) qsp 100mL d'eau Milli-Q®. Le pH est ajusté à 5,1 avec l'acide formique dilué au 1/1000.
- **Tampon phosphate 10 mM**: dissolution de 136 mg de KH₂PO₄ dans 100 mL d'eau milli-Q®. Le pH est ajusté à 2 par ajout d'acide phosphorique à 85%.
- **Solution de BSA**: 4g de BSA MP Biomedical (lot testé) (stockage R29) dans 50 mL d'eau Milli-Q®. (Conservation : 1 mois)
- **Phase Mobile**: Tampon KH₂PO₄ à 5mM obtenu *extemporanément* par dissolution de 0,68g de KH₂PO₄ dans 1000 mL d'eau Milli-Q® plus 3 mL de TEA. Le pH est ajusté à 3 par ajout d'acide phosphorique à 85%.
- **Phase de rinçage**: eau milli-Q® en voie C et acétonitrile en voie B
- **Purge**: mélange 90/10 (ACN/Eau Milli-Q)
- **Wash**: Mélange 10/90 (Eau Milli-Q/ACN)
- **Seal wash**: mélange 80/20 (Eau Milli-Q/ACN)

NB : Le pH des solutions tampon sera vérifié avant chaque manipulation.

3. OPÉRATIONS DE CONTRÔLE

3.1. SOLUTIONS STANDARDS

!! La quantité de standard à peser peut varier en fonction du lot : cf ordinateur pièce 31

- **SM de U à 500 µg/mL**: 5 mg de poudre d'uracile (*conservée dans l'armoire A3, pièce 27*) dans une fiole jaugée qsp 10 mL d'eau Milli-Q®.
- **SM de UH2 à 500 µg/mL**: 5 mg de poudre de dihydrouracile (*conservée dans l'armoire A3, pièce 27*) dans une fiole jaugée qsp 10 mL d'eau Milli-Q®.
- **SM de 5-FU à 1000 µg/mL (Etalon interne)**: 10 mg de poudre de 5-FU (*conservée dans l'armoire A3, pièce 27*) dans une fiole jaugée qsp 10 mL d'eau Milli-Q®.

Les SM (U+UH2) et la SM (5-FU, E.I) sont conservés **1 an** dans le **C15 à -35°C**.

Des dilutions en cascades au 1/10^{ème} des SM de U + UH2 et 5-FU sont réalisés le jour du dosage : 100 µL de SM + 900 µL d'eau milli-Q®.

Injection des solutions pures

50 µL de la SM U à 50 µg/mL + 50 µL de la SM UH2 à 50 µg/mL + 10 µL d'EI à 100 µg/mL

→ injection 5 µL

3.2. OBTENTION DES DROITES D'ETALONNAGE (Tube à hémolyse)

• Gamme d'étalonnage

	Blanc	Blanc EI	A	B	C	D	E	F	G	CQ	Patient
Conc. U (ng/mL)			5	10	20	40	100	200	500		
Conc. UH2 (ng/mL)			40	50	75	100	200	300	500		
BSA, µl	500	500	410	350	405	360	380	450	400		
Plasma, µl											500
CQ, µL										500	
SM U 0,05, µL			50	100							
SM U 0,5, µL					20	40	100				
SM U 5, µL								20	50		
SM UH2 0,5, µL			40	50	75	100					
SM UH2 5, µL							20	30	50		
EI à 10 µg/mL, µL		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

3.3. CONTROLES DE QUALITE (extemporanés)

Fabriqués à partir de la SM CQ de U et de la SM CQ de UH2 à 500 µg/mL (conservation 1 an, C15 à -35°C)

- **COB : 10 ng/mL de U + 50 ng/mL de UH2** : 10 µl de la SMCQ de U à 0.5 µg/mL + 50 µL de la SMCQ de UH2 à 0.5 µg/mL + 440 µL de BSA
- **COM : 40 ng/mL de U + 100 ng/mL de UH2** : 40 µl de la SMCQ U à 0.5 µg/mL + 100 µL de la SMCQ UH2 à 0.5 µg/mL + 360 µL de BSA
- **COH : 200 ng/mL de U + 300 ng/mL de UH2** : 20 µl de la SMCQ U à 5 µg/mL + 30 µl de la SMCQ UH2 à 5 µg/mL + 450 µL de BSA

Les CQs sont préparés de façon extemporanée le jour de la manipulation.

4. METHODOLOGIE

4.1. APPAREIL ET CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

- Appareil: ce dosage est réalisé sur la chaîne **UPLC-HCLASS** du secteur HPLC. Procédure substitutive sur HPLC, cf. 05ANAP06M145A en cas de panne.
- Colonne: **Acquity UPLC HSST3 1.8 μ , 2.1 \times 150 mm(Waters).**

Longueur d'onde UV	Débit	Volume injection	Run Time total	Temps de rétention moyens
λ : 210 nm	0,2 mL/min	10 μ L	12min	- UH2 : 3,5 min ; - U : 3,7 min - EI : 4,5 min
λ : 265 nm	0,2 mL/min	10 μ L	12min	- U : 3,5 min - EI : 4,5 min

Attention ! En raison des fortes concentrations présentes dans la SP, un léger décalage des temps de rétention est systématiquement observé entre les SP et les essais (Temps de Rétention allongé pour la SP).

Méthode Instrument « DPD DOUBLE DETECTION »

- Température colonne : 30°C
- Température échantillon : 15°C
- Gradient :

Temps	Voie A Tampon KH ₂ PO ₄ (%)	Voie B Acétonitrile (%)	Débit (mL/min)
0	100	0	0.2
3.5	100	0	0.2
5	83	17	0.2
8	83	17	0.2
8.1	100	0	0.2
12	100	0	0.2

4.2. PROCEDURE D'EXTRACTION : SOLIDE/LIQUIDE

- Ajouter dans chaque tube 500 µL de tampon phosphate 10 mM pH 2
- Vortexer manuellement 30 secondes
- Centrifuger 5 minutes (3 000 rpm 4°C)
- Pendant ce temps : conditionner les colonnes d'extraction (Atoll CX100-Interchim) par rajout de 1 mL de méthanol suivi de 1 mL d'eau Milli-Q®. Entre chaque ajout appliquer 1 minute de vide.
- Récupérer le surnageant (environ 1 mL) et l'ajouter sur les colonnes préalablement conditionnés (gravité)- Au bout de 60 secondes, déclencher la pompe et appliquer une minute de vide
- Rajouter 1 mL de tampon formate d'ammonium – appliquer 1 minute de vide
- Eliminer les produits de rinçage
- Mettre de nouveaux tubes de 5 ml dans le portoir de la cuve d'extraction
- Eluer avec 500 µL de méthanol – Au bout de 60 secondes appliquer 1 minute de vide.
- Récupérer l'éluat et évaporer sous azote au bloc chauffant (45°C)
- Reprendre par 100 µL de phase mobile
- Centrifuger 5 minutes à 15 000 rpm
- Transférer en micro-vials et injecter 10 µL

5. INTERPRETATION TECHNIQUE DE L'ANALYSE

Le calcul est réalisé sur le logiciel « Empower » (05GRMP02M149.2A)

- Dilution de la prise d'essai et réinjection pour une conc. > 500 ng/mL.
- Non détectable, si aucun pic visible ou si conc. < 5 ng/mL pour l'uracile et < 40 ng/mL pour l'UH2 (= limite de quantification)

Glossaire

Anabolisme : L'anabolisme fait référence à toutes les réactions métaboliques qui construisent ou assemblent des molécules plus complexes à partir de molécules simples. Ce sont des réactions de synthèse.

Biothérapie : Traitements issus de la biotechnologie. Ils permettent de cibler très précisément et spécifiquement une molécule ou une cellule clef intervenant dans le processus de la maladie.

Catabolisme : Ensemble des réactions de dégradation moléculaire de l'organisme. Il est le contraire des réactions de l'anabolisme. Ce sont des réactions thermodynamiquement favorables.

Chimiothérapie adjuvante : Traitement destiné à augmenter ou stimuler les effets positifs d'une autre forme de traitement, comme la chirurgie ou la radiothérapie.

Clairance : Volume sanguin ou plasmatique totalement épuré d'un médicament par unité de temps. Elle peut être totale ou rapporté à un organe (clairance rénale, ou hépatique).

Demie-vie : Temps mis par un médicament pour voir sa concentration sanguine ou plasmatique divisée par deux.

Épissage : Mécanisme de maturation de l'ARN qui permet à un ARN transcrit à partir d'un gène (ARN pré-messager), de se débarrasser de séquences non-codantes (introns), pour donner un ARN messager, qui sera ensuite traduit en protéine dans le cytoplasme de la cellule. Il a lieu dans le noyau des cellules.

Exon : Séquences codantes présentes dans l'ARNm final.

Intron : Séquences non-codantes présentes dans l'ARN pré-messager.

Mortalité : Nombre de décès survenus au sein d'une population durant une période de temps déterminé.

Pro-drug : Aussi appelé pro-médicament, est une substance pharmacologiquement inactive qui une fois administrée est métabolisé in vivo en un métabolite actif.

Résolution (Rs) : Mesure quantitative de l'aptitude d'une colonne à séparer deux analytes A et B. Une $R_s > 1,5$ atteste d'une résolution complète de A et B. Une $R_s < 0,75$ montre une mauvaise séparation de A et B.

SERMENT DE GALIEN

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

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser les connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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