

**Université de POITIERS**  
**Faculté de Médecine et de Pharmacie**

**ANNEE : 2018**

**Thèse n°**

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE**  
**DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE**

(Arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement

le 22 janvier 2018 à Poitiers

par Monsieur CAMARA N'fafode

25 août 1973

Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'uracile et du dihydro-uracile dans le plasma par LC-MS/MS pour le phénotypage de la dihydropyrimidine déshydrogénase
---

Composition du jury :

Président : Madame le Professeur RABOUAN Sylvie

Membre : Monsieur le Docteur CONDYLLIS Maxime

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur VENISSE Nicolas

Co-Docteur de thèse : Monsieur le Docteur BINSON Guillaume



**PHARMACIE**

**Professeurs**

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

**Maîtres de Conférences**

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

**AHU**

- BINSON Guillaume

**1 PAST- Maître de Conférences Associé**

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

**Professeur 2<sup>nd</sup> degré**

- DEBAIL Didier

**Maître de Langue - Anglais**

- SIMMONDS Kévin

**Poste d'ATER**

- JUIN Camille

**Poste de Doctorant**

- BERNARD Clément
- DOUMAS Manon

➤ MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

## **Remerciements**

**A Madame RABOUAN Sylvie,**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Sincères remerciements.

**A Monsieur VENISSE Nicolas,**

Qui a encadré et dirigé ce travail de thèse. Merci pour ton encadrement tout au long de cette thèse, tes conseils, tes connaissances, ta disponibilité, ton soutien, ta sympathie et surtout ta confiance. Le chemin de cette thèse n'a pas toujours été facile mais l'aboutissement est là. Trouve ici l'expression de mon estime et de ma sympathie.

**A Monsieur BINSON Guillaume,**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de co-diriger ce travail. Sincères remerciements.

**A Monsieur CONDYLIS Maxime,**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de thèse. Avec toute ma reconnaissance, mille mercis.

**A toute l'équipe du laboratoire de toxicologie-pharmacocinétique,**

Monsieur Bertrand, Jérémy, Guillaume, Laurène, Marie-Paule, Pascal, Elodie, Damien, Steeve pour votre accueil et votre disponibilité.

**A ma famille,**

Moussa, Hadja, Bountouraby, pour m'avoir toujours soutenue et encouragé tout au long de mes études.

## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	5
ABREVIATIONS .....	7
INTRODUCTION.....	8
<b>1 Généralités sur le 5-fu et son métabolisme</b> .....	10
1.1 Les antimétabolites .....	10
1.1.1 Les antifolates.....	10
1.1.2 Les analogues des bases puriques.....	10
1.1.3 Les analogues des bases pyrimidiques .....	12
1.1.3.1 La cytarabine .....	12
1.1.3.2 Les agents déméthylants.....	12
1.1.3.3 La gemcitabine .....	12
1.1.3.4 Fluoropyrimidines .....	13
1.1.3.4.1 Le 5-fluorouracile (5-FU).....	13
1.1.3.4.1.1 Physico-chimie du 5-FU.....	13
1.1.3.4.1.2 Mécanisme d'action du 5-FU .....	14
1.1.3.4.1.3 Pharmacocinétique du 5-FU.....	15
1.1.3.4.1.4 Optimisation du 5-FU.....	17
1.1.3.4.2 La capécitabine.....	18
1.2 Dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) .....	19
1.2.1 Gène de la DPD .....	20
1.2.2 Polymorphisme génétique .....	20
1.2.3 Activité de la DPD.....	21
1.2.3.1 Influence des paramètres physiologiques sur l'activité de la DPD .....	21
1.2.3.2 Seuils critiques d'activité de la DPD.....	22
1.2.4 Cycle nyctéméral et variabilité de la DPD .....	22
1.2.5 Résistance au 5-FU.....	22
1.2.6 DPD et toxicité du 5-FU.....	24
1.3 Dépistage du déficit de la DPD en pratique .....	25
1.3.1 Approches phénotypiques .....	26
1.3.2 Approche génotypique.....	28
1.3.3 Approche épigénétique.....	29
<b>2 MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	30
2.1 Méthode de dosage de l'uracile et du dihydro-uracile .....	30
2.1.1 Principe de LC-MS/MS.....	30
2.2 Réactifs et solvants .....	31
2.3 Chromatographie .....	33

2.4	Matériels divers .....	34
2.5	Préparation des échantillons .....	34
2.6	Procédure d'extraction.....	36
<b>3</b>	<b>VALIDATION DE LA METHODE .....</b>	<b>37</b>
3.1	Linéarité.....	37
3.2	Fidélité.....	37
3.3	Justesse .....	38
3.4	Rendement et effets matrice .....	38
3.5	Limites de quantification (LOQ) et de détection.....	38
3.6	Stabilité.....	39
<b>4</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>40</b>
4.1	Conditions chromatographiques.....	40
4.2	Linéarité.....	42
4.3	Fidélité.....	44
4.4	Justesse .....	45
4.5	Limite de quantification .....	45
4.6	Rendement, effet matrice et efficacité.....	46
4.7	Stabilité.....	47
<b>5</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>52</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>53</b>

## ABREVIATIONS

5-FU : 5-fluorouracile

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

DPD : Dihydropyrimidine déshydrogénase

FDA: Food and Drug Administration

Kb: Kilobases

LAL : Leucémies Aigües Lymphoïdes

LAM : Leucémies Aigües Myéloïdes

LMNH : Lymphomes Malins Non Hodgkiniens

MCO : Médecine Chirurgie Obstétrique

MTX: Méthotrexate

TP: Thymidylate Phosphatase

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TS : Thymidylate Synthétase

## INTRODUCTION

---

Le cancer constitue la deuxième cause de mortalité dans le monde, il a causé 8,8 millions de décès en 2015 (1). On estime à 14,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancer et à 8,2 millions le nombre de décès liés au cancer survenus dans le monde en 2012. On comptait également dans le monde 32,6 millions de personnes vivantes (âgées de plus de 15 ans) chez qui l'on avait diagnostiqué un cancer au cours des cinq années précédentes (2).

Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (avec 1,8 million de cas, soit 13,0% du total), du sein (1,7 million de cas, ou 11,9% du total) et le cancer colorectal (1,4 million de cas, ou 9,7% du total). Les causes les plus fréquentes de décès par cancer étaient les cancers du poumon (1,6 million de décès, 19,4% du total), du foie (0,8 million de décès, 9,1% du total) et de l'estomac (0,7 million de décès, ou 8,8% du total) selon les statistiques de 2012 (2).

En France, 385 000 nouveaux cas de cancers ont été dépistés en 2015 dont 211 000 chez les hommes et 174 000 chez les femmes. Les cancers les plus fréquents chez les hommes sont le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer colorectal et chez la femme le cancer du sein, le cancer colorectal et le cancer du poumon (2).

Le nombre de décès par cancer en France a été estimé en 2015 à environ 150 000 dont 84 000 hommes et 65 000 femmes. Le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme. Les cancers à l'origine des plus grands nombres de décès chez l'homme sont le cancer du poumon, le cancer colorectal et le cancer de la prostate et chez la femme le cancer du sein, le cancer colorectal et le cancer du poumon(3).

En France, près de 6,8 millions d'hospitalisations (séances et séjours) en lien avec le diagnostic, le traitement ou la surveillance d'un cancer (hors activité de radiothérapie en secteur privé libéral) ont été réalisées dans les établissements de Médecine Chirurgie Obstétrique (MCO) en 2015. L'activité de cancérologie représente près d'un quart de l'activité hospitalière globale en court séjour : 48,7% des séances de traitement, 10% des hospitalisations ambulatoires et 13,4% des hospitalisations complètes (3).

Le 5-FU est une molécule très ancienne qui a fait ses débuts en chimiothérapie depuis plus de 50 ans (4) et reste très utilisé dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux d'aujourd'hui. Le 5-FU comme les autres anticancéreux possède un index thérapeutique très étroit. Des risques de toxicités de modérées à graves peuvent être associés à l'administration du 5-FU chez des

patients présentant un déficit d'activité de l'enzyme responsable de son métabolisme, la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) (5). Une étude d'un échantillon de 1 219 patients traités par 5-FU en bolus rapporte 31% de toxicités de grade III-IV et 0,5% de mortalité. En perfusion continue, l'incidence des toxicités de grade III-IV est de 20 à 25%. Ces effets toxiques sont dus à une surexposition au médicament (5).

La clairance d'élimination du 5-FU est en grande majorité sous la dépendance de la DPD qui transforme le 5-FU en dihydro-5-FU inactif. On estime qu'après administration du 5-FU, 90% de la dose sont dégradés au niveau hépatique par la DPD (6).

L'activité DPD est extrêmement variable. Cette variabilité interindividuelle s'explique en partie par des facteurs génétiques. Une diminution importante de l'activité DPD se traduira, chez un patient recevant une dose standard de 5-FU, par un surdosage pouvant entraîner des toxicités, notamment hématologiques et digestives. Les déficits complets en DPD sont relativement rares (0,1 à 0,5% dans la population générale), par contre les déficits partiels sont retrouvés chez 3 à 10% des patients, selon les études publiées sur des populations Caucasiennes (6).

La fréquence de prescription du 5-FU et des fluoropyrimidines, l'utilisation de fortes doses, l'extension des indications et la sévérité des toxicités aiguës dues à des déficits enzymatiques font de leur dépistage une priorité médicale et de santé publique (7).

Deux méthodes, qui peuvent être complémentaires, sont proposées actuellement pour détecter le déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase : le génotypage et le phénotypage.

Cette étude concerne le phénotypage, qui consiste à doser dans le plasma l'uracile et le dihydro-uracile pour la détermination de l'activité de la DPD afin de permettre aux cliniciens de prévenir l'apparition d'éventuelles toxicités liées au traitement par le 5-FU et les fluoropyrimidines. L'uracile et le dihydro-uracile sont respectivement le substrat et le métabolite endogènes de la DPD.

### **Place du 5-FU dans l'arsenal thérapeutique**

Le 5-FU appartient à la classe des antimétabolites de type antipirimidines dont l'action s'effectue essentiellement par l'inhibition de la synthèse de l'ADN.

#### 2.1 Les antimétabolites

Les antimétabolites constituent une famille de molécules antitumorales dont certaines sont très anciennes et datent des débuts de la chimiothérapie, auxquelles se sont jointes récemment des nouvelles molécules innovantes. Leur mécanisme d'action est sous-tendu par le concept d'inhibition de la synthèse des constituants de l'ADN, l'objectif étant d'empêcher la cellule de réaliser sa réplication. Ce sont, d'une part, des analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques, agissant comme leurres car, structurellement semblables aux bases azotées ou aux nucléosides qui conduisent à des acides nucléiques anormaux et, d'autre part, des analogues foliques capables d'inhiber les réactions de synthèse de ces mêmes composants, réactions qui utilisent les coenzymes foliques lors des nombreuses étapes (8).

##### 2.1.1 Les antifolates

Les antifolates sont les plus anciens médicaments de la classe des antimétabolites. Le premier antifolate entré dans la Pharmacopée était l'aminoptérine (2,4-diamino-ptéroylglutamate) qui a apporté les toutes premières rémissions dans les leucémies de l'enfant, rapidement remplacée par l'améthoptérine ou méthotrexate (MTX) (*figure 1*) (9). Plus de 50 ans après la découverte du MTX, cette molécule est toujours prescrite et de nouveaux antifolates sont régulièrement proposés (10).

La synthèse des nouveaux antifolates a cherché à pallier les phénomènes de résistance et de toxicité et a permis de cibler d'autres enzymes du métabolisme folique. Plusieurs molécules ont été récemment mises sur le marché : le raltitrexed (Tomudex®) (*figure 1*), qui cible la thymidylate synthétase (TS) ; le pémétréxed (Alimta®) (*figure 1*), qui cible plusieurs enzymes utilisant des coenzymes foliques et que l'on a appelé à ses débuts le multi-targeted antifolate ; et le pralatrexate (Folotyn®) (*figure 1*) dans le traitement du cancer de la vessie et dans les lymphomes à cellules T réfractaires ou en rechute (11).

##### 2.1.2 Les analogues des bases puriques

Les analogues des bases puriques (adénine, guanine) (*figure 2*) représentent un groupe relativement nouveau de molécules cytotoxiques avec une activité immunosuppressive et

antinéoplasique élevée. Ils sont indiqués dans le traitement des maladies néoplasiques et plus particulièrement dans les tumeurs lymphoïdes et myéloïdes. Cette sous classe est représentée sur le marché des médicaments par les molécules suivantes: fludarabine (Fludara®) (figure 1), la cladribine (Leustatine®) (figure 1), la pentostatine (Nipent®) (figure 1), clofarabine (Evoltra®)(figure 1), la nélarabine (Arranon®)(figure 1) et la forodésine (l'immucilline H®) (figure 1) (12).

La 6-mercaptopurine (Purinéthol®) prescrite dans les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) et leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) de l'enfant, la 6-thioguanine (Lanvis®) indiquée dans le traitement d'entretien des leucémies aiguës myéloïdes et l'azathioprine (Imurel®) utilisée dans la prévention du rejet des greffes sont aussi des analogues structuraux des purines (figure 1)(13).

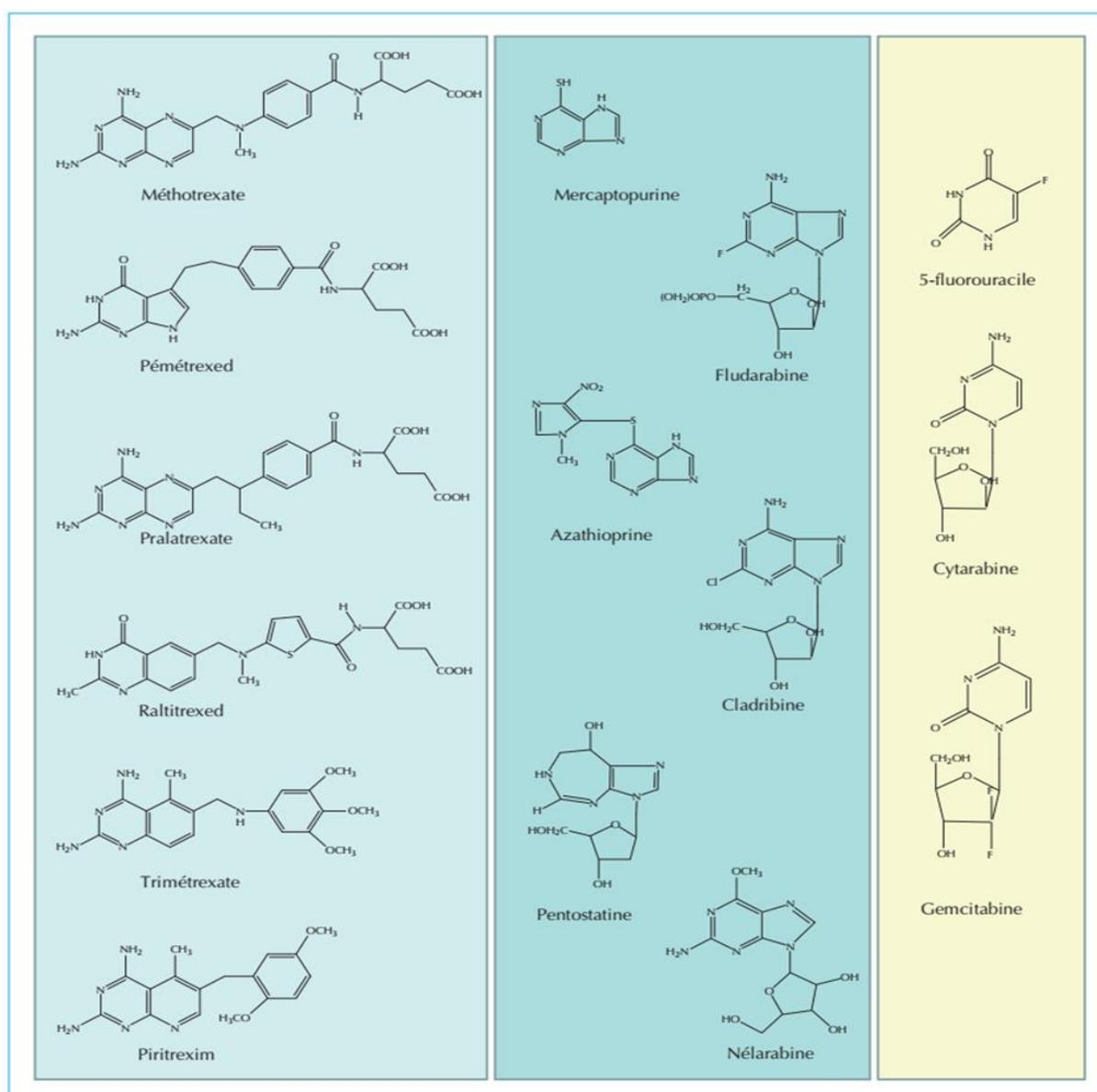
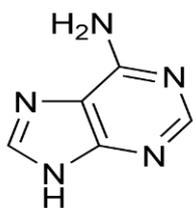
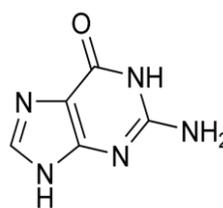


Figure 1 : Structures chimiques des antimétabolites. D'après Lansiaux 2011.



Adénine



Guanine

**Figure 2 :** Structures chimiques de l'adénine et de la guanine.

### 2.1.3 Les analogues des bases pyrimidiques

#### 2.1.3.1 La cytarabine

La cytarabine (cytosine-arabinoside, Aracytine®, ara-C) (*figure 1*) est un analogue de la cytosine. Elle constitue le traitement de référence des LAL, LAM (14) et de certains lymphomes (lymphomes malins non hodgkinien, lymphome à grandes cellules, lymphome de Burkitt) depuis de nombreuses années. Elle cible la phase S du cycle cellulaire, après transport actif ou simple diffusion dans les cellules, son métabolite actif l'ara-CTP (arabinofuranosyl-cytosine-triphosphate) s'incorpore dans l'ADN et inhibe ainsi la synthèse des nouveaux fragments de l'ADN (8).

#### 2.1.3.2 Les agents déméthylants

L'azacytidine (Vidaza®) et la décitabine (Dacogen®) sont des analogues pyrimidiques, proches de la cytarabine. Ce sont des agents déméthylants utilisés dans le traitement des syndromes myélodysplasiques (15). Leur mécanisme d'action consiste à s'incorporer dans l'ADN, en inhibant l'ADN méthyltransférase, enzyme chargée de la méthylation de la cytosine des sites CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) entraînant une hypométhylation des promoteurs de certains gènes qui va induire l'apoptose de la cellule (8).

#### 2.1.3.3 La gemcitabine

La gemcitabine (2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine ou Gemzar®) (*figure 1*) fait partie des analogues pyrimidiques qui inhibent à la fois la synthèse de l'ADN et celle des désoxyribonucléotides en bloquant la phase G-S1 du cycle cellulaire. La gemcitabine est une prodrogue qui nécessite une conversion enzymatique pour générer ses anabolites phosphorylés actifs (16). La gemcitabine, comme la cytarabine, subit une cascade de phosphorylations par les désoxycytidine kinases intracellulaires et sa cytotoxicité est provoquée essentiellement par ses métabolites actifs (di et triphosphate). L'incorporation du

métabolite triphosphate dans l'ADN entraîne le rajout d'un nucléotide supplémentaire aux chaînes d'ADN. La gemcitabine est détoxifiée par la cytidine désaminase et les polymorphismes de cette enzyme peuvent être à l'origine de toxicités graves (17).

#### 2.1.3.4 Fluoropyrimidines

Les fluoropyrimidines sont représentées sur le marché de médicaments par le 5-fluorouracile, l'UFT (tégaful-uracile) et la capécitabine, qui sont des molécules très largement utilisées en cancérologie notamment dans les cancers du côlon-rectum, de l'œsophage, de l'estomac, du sein et des voies aérodigestives supérieures (18). Elles sont utilisées en situation conventionnelle, adjuvante et métastatique (19). On estime à deux millions les nouveaux patients qui reçoivent chaque année des traitements anticancéreux à base des fluoropyrimidines dans le monde (20) dont 100 000 en France (6).

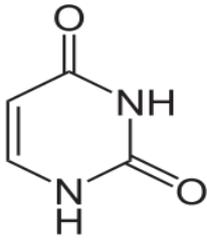
##### 2.1.3.4.1 Le 5-fluorouracile (5-FU)

Synthétisé en 1957 par Charles Heidelberger à l'université du Wisconsin (États-Unis), le 5-FU (*figure 1*) a environ 60 ans (21). C'est une des plus anciennes molécules anticancéreuses, administrée encore à ce jour dans plus de 60% des polychimiothérapies (18). Son mécanisme d'action est complexe.

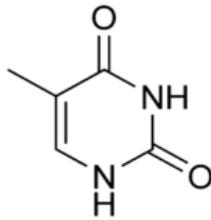
Le 5-FU est prescrit dans les cancers digestifs, les cancers des voies aérodigestives supérieures, les cancers du sein et des ovaires. En plus de son association systématique à l'acide folinique, d'autres associations sont devenues des protocoles de référence pour le traitement des cancers colorectaux notamment les associations 5-FU-acide folinique-oxaliplatine ou irinotécan. Ces associations augmentent la probabilité de réponse tumorale et ont un effet bénéfique sur la survie (22).

##### 2.1.3.4.1.1 Physico-chimie du 5-FU

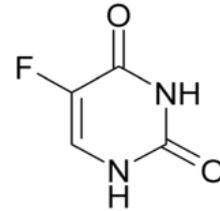
Le 5-FU est une pyrimidine fluorée dont la structure chimique ressemble à la thymine et surtout à l'uracile avec le remplacement de l'hydrogène en position 5 par un atome de fluor (*figure 3*). Ce dernier, confère au 5-FU une liaison carbone-fluor plus stable et une réactivité chimique aux substitutions plus faible. De plus, l'altération de la conformation moléculaire induite par l'atome de fluor est minime. En effet, le rayon de l'atome de fluor (1.35 Å) est similaire à celui de l'hydrogène (1.20 Å) ce qui permet au 5-FU d'être métabolisé par les mêmes enzymes que l'uracile (23).



Uracile



Thymine



5-fluorouracile

**Figure 3 :** Structures de l'uracile, de thymine et du 5-fluorouracile.

#### 2.1.3.4.1.2 Mécanisme d'action du 5-FU

Le 5-FU comme la plupart des agents cytotoxiques a une activité sur les cellules engagées dans le cycle cellulaire ; c'est un agent cycle-dépendant. Bien qu'actif tout au long du cycle, il agit de façon plus marquée durant les phases G1 et S, c'est-à-dire lors de la synthèse de l'ADN (phase S). Le 5-FU est donc aussi phase-dépendant (24).

L'atome de fluor, qui dans le 5-FU remplace un atome d'hydrogène sur le noyau pyrimidine, a un volume voisin de celui de l'hydrogène, mais une réactivité chimique très différente, ce qui entraîne des perturbations métaboliques dans la biosynthèse de l'ADN et de l'ARN (4).

Le 5-FU est transformé en métabolites actifs qui s'incorporent dans la biosynthèse des acides nucléiques et la perturbent. Il est métabolisé notamment :

- a. en 5-fluorodésoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) qui, en formant un complexe ternaire avec l'acide folinique et la thymidylate synthase (TS), bloque la synthèse de thymidine et par là-même la synthèse de l'ADN, ce qui freine la croissance cellulaire. La formation de ce complexe ternaire 5-FdUMP-acide folinique-enzyme explique que l'association d'acide folinique au 5-FU potentialise l'inhibition de la TS par ce dernier.
- b. en FU-monophosphate (FUMP), puis en FU-triphosphate (FUTP), qui, incorporé à la place de l'uracile dans l'ARN, provoque des erreurs de lecture du code génétique (25) (*figure 4*).

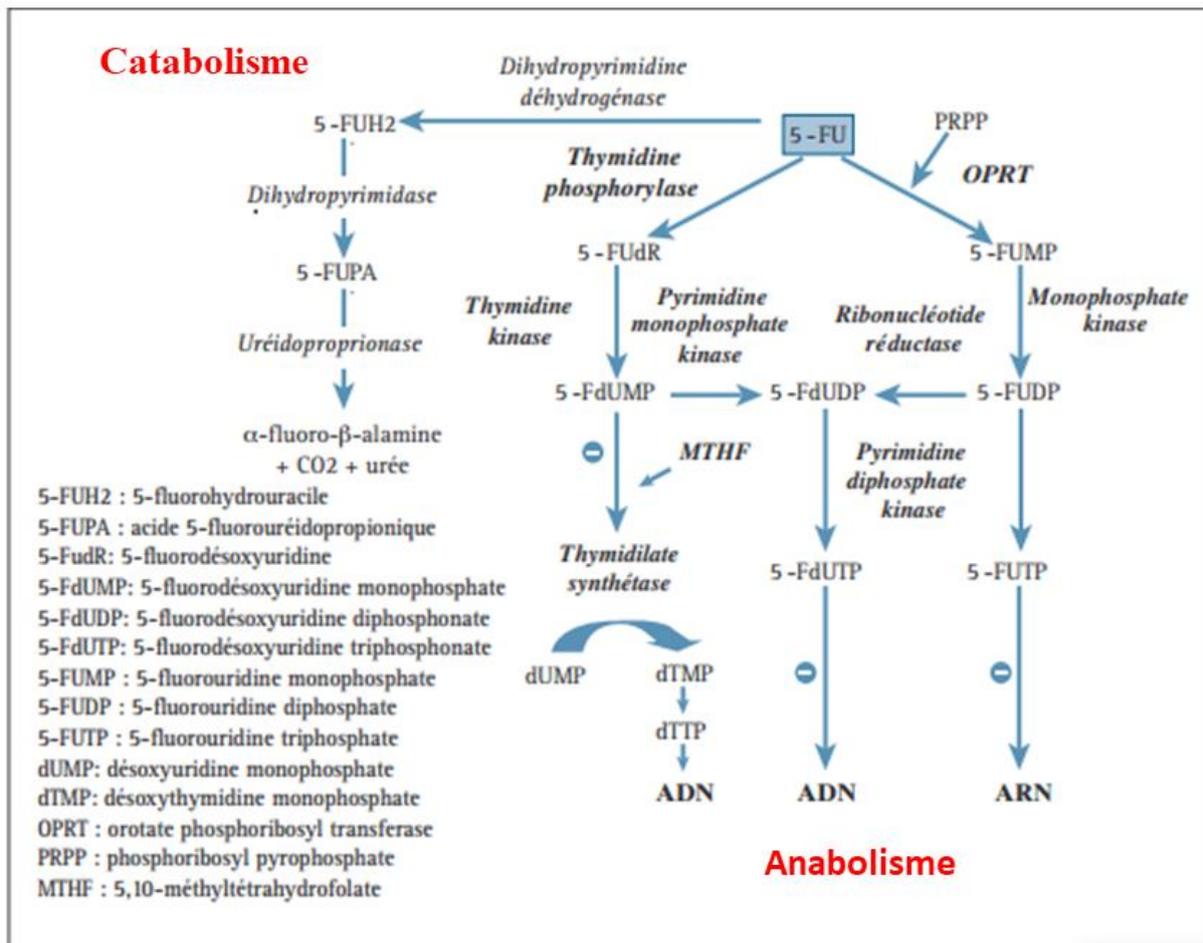


Figure 4 : Voies métaboliques du 5-FU. D'après Lecomte 2008.

#### 2.1.3.4.1.3 Pharmacocinétique du 5-FU

De nombreuses études ont montré que la pharmacocinétique du 5-FU est non linéaire et qu'il existe une variation inter-patient des concentrations à l'équilibre de 15 à 20% (26). Le 5-FU s'administre par voie intraveineuse, il a une demi-vie d'élimination très courte (10 à 15 minutes environ) (27), et est capté préférentiellement par les tissus à croissance et à renouvellement rapides : cellules tumorales, moelle osseuse, muqueuse intestinale. Le 5-FU passe assez bien dans le liquide céphalorachidien. Le 5-FU et ses métabolites sont éliminés dans les urines et, après dégradation, par voie respiratoire sous forme de CO<sub>2</sub> (28).

##### a. Absorption

L'administration orale du 5-FU conduit à une résorption rapide dans l'estomac et le début de l'intestin grêle (29). La biodisponibilité de ce mode d'administration est médiocre et très variable allant de 0 à 80%. La présence de la DPD dans la muqueuse intestinale, associée à

un effet de premier passage hépatique expliqueraient probablement cette mauvaise biodisponibilité (30).

b. Administration intraveineuse en bolus

Administré en bolus, le métabolisme du 5-FU est majoritairement hépatique (95%). Sa demi-vie varie entre 8 et 22 minutes. Son volume de distribution est important (14 à 54 L) et sa clairance (0,5 à 2 L/min) est à peu près équivalente au débit sanguin hépatique (0,8 à 1,5 L/min) (23). La clairance du 5-FU diminue en fonction de l'augmentation des doses en raison du caractère saturable du métabolisme du 5-FU (30).

c. Perfusion continue

Il y a un changement de cinétique par rapport à l'administration en bolus. La clairance est plus élevée que lors d'une perfusion en bolus et peut atteindre jusqu'à 7 L/min. Ces valeurs dépassent le flux hépatique (1,5 L/min) et sont proches du débit cardiaque. Le foie n'est donc probablement pas le seul site de dégradation du 5-FU. La présence de DPD dans de nombreux autres tissus est très en faveur de cette hypothèse (29). Le rythme circadien joue également un rôle important dans la variabilité de la concentration plasmatique du 5-FU administré en perfusion continue (30).

d. Distribution

Le volume de distribution est compris entre 0.1 et 0.4 litre par kilogramme (31). Il n'y a pas de fixation du 5-FU sur la membrane érythrocytaire dans le compartiment sanguin. Les taux intra-érythrocytaires représenteraient le quart des taux plasmatiques. Le taux de fixation aux protéines plasmatiques est relativement faible (environ 10%) (24).

Dans le plasma, la fraction libre du 5-FU pénètre rapidement dans la cellule malgré une faible liposolubilité (coefficient de partage 0.1). En fait, le 5-FU sous sa forme libre non ionisée, forme prépondérante au pH plasmatique, utilise un système de transport saturable de faible affinité et de forte capacité. Toutefois, d'autres substrats entrent en compétition pour ce système de diffusion facilité : l'uridine, l'uracile, l'inosine, l'adénosine et l'hypoxantine. Il n'a pas été rapporté jusqu'à présent dans la littérature de résistance au 5-FU par défaut de captation (24).

Le 5-FU diffuse bien dans les tissus suivants : moelle osseuse, muqueuse intestinale, rein et foie ; par contre dans la peau et les muscles la diffusion est plus faible (32). La distribution du 5-FU au niveau tumoral dépend de la vascularisation. En effet, la vascularisation dépend

non seulement de l'histologie des cellules cancéreuses mais aussi de la taille des tumeurs (la vascularisation est meilleure pour les petites tumeurs). D'autre part, le problème de vascularisation qui limite la chimio-sensibilité peut être pallié par l'adjonction de substances  $\alpha$ -sympathomimétiques afin d'obtenir une distribution plus sélective du 5-FU au niveau du site tumoral et une diminution de sa diffusion systémique (23).

#### e. Métabolisme du 5-FU

Le métabolisme du 5-FU comprend une voie catabolique et trois voies anaboliques d'importance inégale comme il a été décrit plus haut. Seule une petite fraction du 5-FU est anabolisée en dérivés cytotoxiques dans les tissus car la majorité de la molécule (60 à 90%) est catabolisée par la DPD (33). Cette enzyme réduit le 5-FU en 5-fluorodihydrouracile (5-FUH<sub>2</sub>). Le catabolisme s'arrête au 5-FUH<sub>2</sub> dans les lymphocytes et la plupart des tissus. En revanche, au niveau hépatique, une deuxième enzyme intervient, la dihydropyrimidase, qui catabolise le 5-FUH<sub>2</sub> en acide 5-fluorouréido-propionique (5-FUPA). Puis une troisième enzyme, la  $\beta$ -uréidopropionase, transforme le 5-FUPA en  $\alpha$ -fluoro  $\beta$ -alanine (FBAL) et en urée. Le FBAL transformé en fluoroacétate, devient un poison du cycle de Krebs et serait responsable de la toxicité cardiaque et neurologique du 5-FU. Le conjugué FBAL-chénodésoxycholate pourrait quant à lui être à l'origine de la toxicité hépatique qui survient lors de l'administration des fluoropyrimidines (30). (*Figure4*)

#### f. Elimination

L'élimination est essentiellement rénale à hauteur de 80%. L'élimination urinaire sous forme inchangée ne représente que 5 à 15% de la dose administrée. Au niveau des poumons, le catabolisme lymphocytaire du 5-FU produit du CO<sub>2</sub> qui représente 60 à 80% des métabolites (24).

#### 2.1.3.4.1.4 Optimisation du 5-FU

L'association du 5-FU au lévamisole (34) ou à l'acide folinique (35) dans la chimiothérapie adjuvante du cancer de côlon, a permis d'augmenter la survie de certains patients. Des polychimiothérapies comportant du 5-FU ont montré des gains de survie dans les cancers métastatiques du côlon (36), du pancréas (37) et de l'estomac (38).

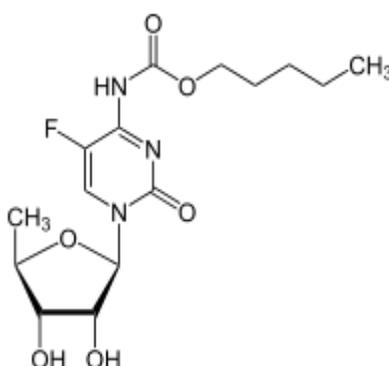
L'association du 5-FU à l'acide folinique ou à d'autres agents cytotoxiques (dérivés du platine, méthotrexate) permet l'augmentation de la dose du 5-FU. Par contre, le gain de survie dans les cancers colorectaux métastatiques reste modeste : la médiane de survie est de 5 mois sans traitement et de 11 mois avec une polychimiothérapie comportant du 5-FU (36). Des

survies de 16 à 19 mois ont été rapportées avec les protocoles associant le 5-FU à l'irinotécan ou à l'oxaliplatine chronomodulé (39).

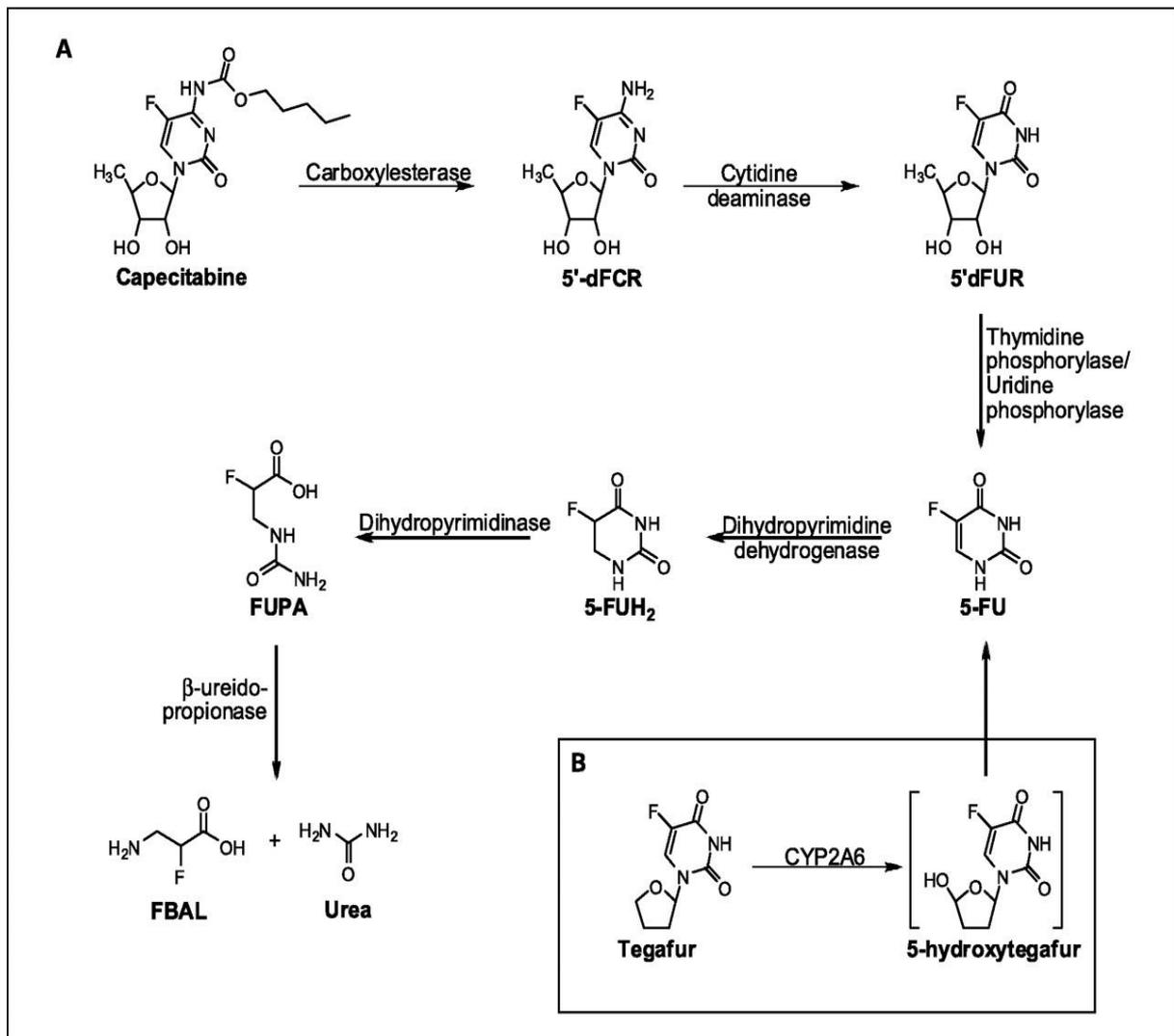
#### 2.1.3.4.2 La capécitabine

La capécitabine (Xéroda®) (*figure 5*) est un analogue pyrimidique oral non cytotoxique. C'est une prodrogue du 5-FU qui est rapidement biotransformée en 5-FU par trois séquences enzymatiques. La capécitabine traverse la barrière intestinale sans être dégradée et est convertie dans le foie par une carboxylestérase en 5'-désoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR) puis en 5'-désoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) par la cytidine désaminase dans le foie et les tissus tumoraux (40). L'étape finale de sa transformation en 5-FU au niveau du tissu tumoral est fait par la thymidine phosphorylase (TP) (40). La capécitabine tend à remplacer le 5-FU dans de nombreuses indications. Son activité clinique est équivalente à celle du 5-FU-leucovorine dans le cancer colorectal (41).

La capécitabine est indiquée : dans le cancer colorectal métastatique en monothérapie de première ligne ; en traitement adjuvant du cancer du côlon ; en première ligne, dans le traitement du cancer gastrique avancé, en association à une chimiothérapie à base de sel de platine ; dans le traitement du cancer du sein localement avancé ou métastatique, en association avec le docétaxel (39).



**Figure 5 :** Structure de la capécitabine.



**Figure 6 :** Les voies d'activations des prodrogues du 5-FU, exemple de la capécitabine et du tegafur.

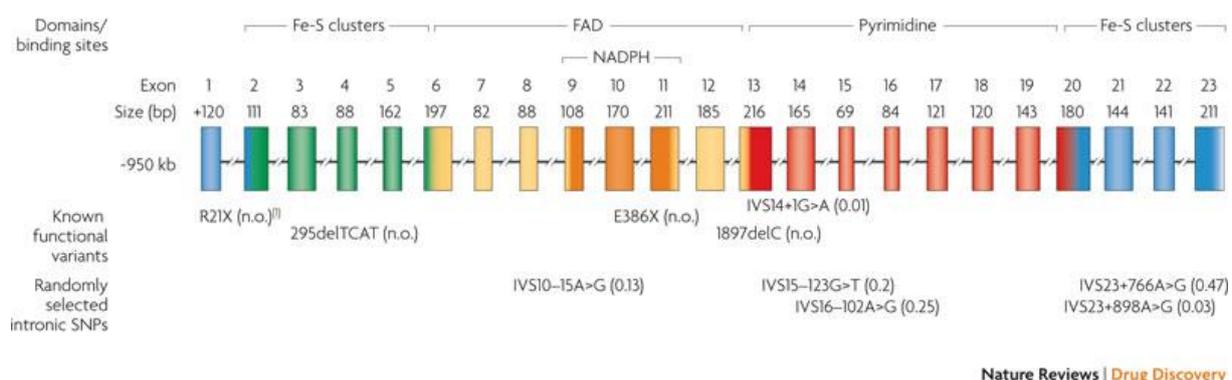
Toutes les prodrogues du 5-FU se transforment en 5-FU au cours de leurs processus de métabolisme. (Figure 6)

## 2.2 Dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD)

La DPD est l'enzyme clé du catabolisme de la famille des fluoropyrimidines. Son rôle est prépondérant sur la pharmacologie clinique du 5-FU. En effet, elle peut influencer la biodisponibilité et la pharmacocinétique, la toxicité et l'efficacité thérapeutique du 5-FU.

### 2.2.1 Gène de la DPD

Le gène humain de la DPD (DPYD) est présent en tant que gène à copie unique sur le chromosome 1p22 (chromosome non sexuel) et se compose de 23 exons. Une carte physique indique que ce gène est composé d'au moins 950 kilobases (kb) de longueur de 3 kb de séquence et une taille moyenne d'environ 43 kb des introns de codage. À ce jour, 32 mutations et polymorphismes ont été identifiés dans le gène de DPD (4). (Figure 7)



**Figure 7 :** Structure du gène de la DPD. D'après Goosaid et al. 2010.

### 2.2.2 Polymorphisme génétique

Le polymorphisme génétique est la variation normale, constitutionnelle (mutation présente dans toutes les cellules de l'organisme) d'un gène dans une population donnée. C'est une mutation stable, permanente, non réversible et différente de la mutation acquise due aux agents mutagènes qu'on retrouve généralement durant la vie des tumeurs. Plusieurs types de mutations de DPYD peuvent être rencontrés, entre autres la mutation portant sur une seule base d'un gène appelée : Single Nucleotide Polymorphism (SNP) qui peut être hétérozygote ou homozygote. L'homozygotie et les délétions se traduisent par des modifications quantitatives de l'expression des gènes impliquant des conséquences cliniques très importantes (42).

Un déficit total en activité DPD reste un événement rare, probablement transmis selon un mode autosomal récessif (43)(44).

Les quatre SNP qui sont le plus souvent impliqués dans le déficit clinique en DPD, et qui ont un impact fonctionnel sur l'activité DPD (20) sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 1** : SNP associés à un déficit à sévère en DPD.

Exon	Nucléotide	Protéine	Référence	NCBI référence SNP	Pourcentage
22	A2846T	D949V	DPYD * 9B	rs67376798	1,8%
Intron 14	IVS14 + 1G> A	Exon 14 sauter	DPYD * 2A	rs3918290	1,2%
13	T1679G	1560S	DPYD * 13	rs55886062	0,3%
4	delTCAT 295-298	Frameshift	DPYD * 7	rs72549309	0,3%

### 2.2.3 Activité de la DPD

L'activité de la DPD est sujette à une grande variabilité inter-individuelle. Environ 3-5% de la population générale présentent un déficit partiel et environ 0,2-0,3% présentent un déficit total (20). Elle est impliquée dans la toxicité du 5-FU : plus l'activité enzymatique est faible, plus la cytotoxicité est importante (45). L'activité de la DPD peut être déterminée dans les cellules mononucléaires du sang périphérique. Elle est dans l'ordre plus élevée dans les monocytes, les lymphocytes, les granulocytes et les plaquettes. Le taux de monocytes étant plus élevé chez les patients atteints de cancer par rapport aux volontaires sains, cela montre bien la corrélation entre l'activité de la DPD et les cellules mononucléaires et pourrait expliquer ainsi la variabilité inter-patient de l'activité DPD (46).

Une étude conduite par l'équipe de Milano mesurant l'activité lymphocytaire de la DPD chez 185 patients, montre que les valeurs moyennes et médianes étaient respectivement de 0,222 et 0,211 nmol/min/mg prot (47).

#### 2.2.3.1 Influence des paramètres physiologiques sur l'activité de la DPD

L'activité lymphocytaire de la DPD chez des patients atteints de cancer n'est pas influencée par l'âge des patients, ni par l'altération des fonctions hépatiques (47). De plus, il n'existe pas de différence d'activité entre les femmes pré-ménopausées et les femmes post-ménopausées. Par contre, l'activité lymphocytaire chez des patients atteints de cancer est en moyenne 15% inférieure chez les femmes que chez les hommes (47), alors que l'évaluation du ratio  $UH_2/U$

chez les sujets sains (48) et chez des patients atteints de cancer (49) ne montrent pas de différence significative de l'activité entre les deux sexes.

Il a été suggéré dans certaines études anciennes que la toxicité du 5-FU se manifestait plus souvent chez la femme que chez l'homme. Ainsi, dans la série de patients décrite par Milano (58), les femmes constituaient 87% des patients déficitaires en DPD avec une toxicité liée au 5-FU (50). Ces données n'ont pas été confirmées depuis (51).

L'activité de la DPD au niveau hépatique chez des sujets sains ne varie pas en fonction de la race (caucasienne et noire africaine) (52). En plus, il n'y a pas de corrélation entre l'état nutritionnel des patients et la clairance du 5-FU (30).

#### 2.2.3.2 Seuils critiques d'activité de la DPD

Il est important de définir un seuil d'activité de la DPD en dessous duquel il faudrait adapter d'emblée la dose du 5-FU administrée aux patients ou changer le 5-FU par un autre cytotoxique. Les observations chez des patients atteints de cancer ont permis de proposer pour l'activité lymphocytaire de la DPD un seuil d'activité à risque situé autour de 0.1 nmol/min/mg prot (47). De même, la valeur seuil définie pour le ratio  $UH_2/U$  plasmatique est de 1.8. Les ratios  $UH_2/U$  supérieurs à 2.25 n'ont montré aucun signe de toxicité (49).

#### 2.2.4 Cycle nyctéméral et variabilité de la DPD

L'administration du 5-FU en perfusion continue a permis d'établir une relation inverse entre la pharmacocinétique du 5-FU et l'activité lymphocytaire de la DPD (53). Cette dernière est plus faible vers 13h00 et plus élevée vers 1h00. De plus, le cycle circadien n'est pas semblable chez tous les patients : 47% des patients ont un pic d'activité de la DPD compris entre 23h00 et 6h00, 35% entre 8h00 et 15h00 et 18% entre 17h00 et 20h00 alors que 59% de l'activité résiduelle de la DPD étaient compris entre 7h00 et 15h00 (54). Ainsi, le cycle nyctéméral contribue aussi à la variabilité inter-individuelle de la DPD.

#### 2.2.5 Résistance au 5-FU

Elle s'exprime au niveau du site d'action par une modification de la concentration du 5-FU et de la durée d'exposition des cellules cancéreuses au 5-FU. En théorie, elle peut se révéler à toutes les étapes de son métabolisme soit depuis le passage transmembranaire jusqu'aux cibles intracellulaires (55). La position de la cellule tumorale dans le cycle cellulaire, et sa

capacité à subir l'apoptose en réponse au traitement médicamenteux, jouent un rôle important dans les mécanismes de sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie (56).

Les causes de résistance sont multiples et peuvent être dues à :

Surexpression de la DPD au niveau des cellules tumorales : in vitro, la sensibilité au 5-FU est inversement corrélée au niveau d'activité de la DPD intracellulaire (45). Une étude chez des patients traités par chimiothérapie du 5-FU a décrit une corrélation entre la faible expression de la DPD intra-tumorale et la bonne réponse au 5-FU ; dans cette même étude, les malades présentant des taux bas d'enzymes majeures de métabolisme du 5-FU (DPD, TP et TS) dans la tumeur avaient une survie significativement plus longue (57).

Altération de l'anabolisme du 5-FU (conversion du nucléoside en nucléotide, conversion du 5-FU en 5-FUMP) : des données contradictoires ont été rapportées pour la thymidine phosphorylase (TP). In vitro, la faible expression de la TP est corrélée à une résistance au 5-FU (58); cependant, une étude clinique a révélé qu'une expression élevée de la TP dans les tumeurs colorectales était associée à une mauvaise réponse au 5-FU (59)

Déplétion en folates : il peut s'agir d'une déplétion dans les cellules tumorales (60), ou d'une déplétion en polyglutamates nécessaires à la stabilisation du complexe 5-FdUMP-TS (61), entraînant ainsi une diminution de l'activité de la folylpolyglutamate synthétase (FPGS) (62).

Amplification génique de la TS : elle augmente la quantité d'enzyme disponible pour assurer la synthèse d'ADN dans la cellule tumorale (63); la diminution de l'affinité de la TS pour le 5-FdUMP (64) provoque aussi un échappement au 5-FU. Plusieurs études ont suggéré que les niveaux d'activité (65) et d'expression (66)(67)(68) de la TS intratumorale étaient des facteurs prédictifs de réponse au 5-FU dans les cancers colorectaux. Une étude in vitro a montré que la variation de la TS semble plus déterminante que celle de la FPGS (69). La possibilité d'une modification du taux d'activité de la TS au cours du traitement n'est pas exclue et pourrait expliquer l'apparition du phénomène de résistance au 5-FU (30).

Amplification de voies de secours indépendantes de la TS : pour la synthèse des pyrimidines (70).

Mutation de la protéine P53 : cette mutation pourrait permettre la poursuite du cycle cellulaire malgré la présence d'anomalies de l'ADN induites par le 5-FU (70).

Lignées cellulaires particulières : deux lignées cellulaires CombiA et CombiB récemment isolées des cellules cancéreuses du colon seraient mises en causes dans les mécanismes de résistance au 5-FU (56).

#### 2.2.6 DPD et toxicité du 5-FU

Les fluoropyrimidines induisent des toxicités graves de grade III-IV chez 10 à 30% des patients et des toxicités létales chez 0,3 à 2% des patients. Il s'agit d'une toxicité dose-dépendante variable en fonction du schéma d'administration (6). Elle touche essentiellement les épithéliums à renouvellement rapide (épithélium digestif et tissu hématopoïétique). Elle se traduit par une diarrhée, une mucite et une myélosuppression modérée dont le nadir se situe aux alentours de 10 jours après l'injection du produit.

De rares cas de cardiotoxicité ont été relevés notamment en cas de perfusion continue (71). Une impureté contenue dans le solvant, le fluoroacétaldéhyde métabolisé en fluoroacétate, a été impliquée (72). Le remplacement du solvant du 5-FU a permis une diminution de la cardiotoxicité mais ne l'a pas fait disparaître totalement (72).

Une neurotoxicité rare, allant du syndrome cérébelleux jusqu'au coma, a été rapportée, mettant en cause des catabolites du FBAL (fluoroacétate et fluorocitrate) (73). En perfusions continues à haute dose du 5-FU, il survient fréquemment une toxicité neurologique de type encéphalopathie. Elle associe une acidose lactique et une hyperammoniémie due à l'inhibition du cycle de Krebs (74).

Le type d'effets secondaires est influencé par le mode d'administration. En effet, la toxicité hématologique, notamment la neutropénie, est plus fréquemment observée en cas d'administration en bolus et la survenue d'un syndrome mains-pieds est plus fréquent en cas de perfusion continue (75).

Certains malades atteints d'un déficit congénital partiel en DPD peuvent développer des toxicités sévères hématologiques et muqueuses avec parfois une atteinte neurologique pouvant aller jusqu'au coma (76). La toxicité neurologique est liée dans ce cas à une toxicité directe par un des métabolites actifs du 5-FU sur le tissu nerveux (77).

Cependant, à l'exception des cas rares de déficit en DPD, le 5-FU est une molécule relativement bien tolérée, notamment avec le schéma LV5-FU2 (acide L-folinique + 5-FU en

bolus + perfusion continue pendant 48 heures), avec des taux de toxicités sévères (neutropénie, mucite, diarrhée) inférieurs à 5% (49).

Un cas de toxicité au 5-FU, utilisé en topique, a été observé chez un patient de 76 ans atteint d'un carcinome des cellules basales. Après application sur le cuir chevelu de la crème Efudix\* 5% deux fois par jour, pendant une semaine, le patient s'est plaint d'une douleur abdominale, de diarrhées sanglantes, et de nausées. A l'auscultation, il présentait de la fièvre, une stomatite, une œsophagite, un rash cutané alors que le bilan biologique révélait une neutropénie et une thrombocytopénie (78).

### 2.3 Dépistage du déficit de la DPD en pratique

Les techniques de dépistage des patients déficitaires en activité DPD sont classées en deux catégories : phénotypiques et génotypiques. Ces techniques doivent répondre à un certain nombre de critères et contraintes, tels qu'une très bonne sensibilité et une très bonne spécificité, et respecter un délai de rendu de résultats suffisamment court afin de ne pas retarder la mise en route du traitement anticancéreux (19).

La recommandation UNICANCER (union des centres de cancérologie de France) du 16 avril 2016 préconise (6) :

- Le dépistage pré-thérapeutique des déficits en DPD, des patients recevant des fluoropyrimidines à forte dose pour une courte durée et qui sont à risque élevé de développer une toxicité sévère ou qui sont en situation adjuvante.
- Le dépistage multiparamétrique, comportant le phénotypage par la détermination du ratio  $UH_2/U$  dans le plasma et le génotypage par la détection des mutations majeures (2A, D949, et I560S) sur le gène de la DPD (DPYD) pour des raisons de complémentarité (sensibilité et spécificité) des deux approches et la facilité de leur mise en place dans les laboratoires de biologie médicale.
- Une contre-indication des fluoropyrimidines en cas de déficit total, une diminution de la posologie de 25 à 50% en cas de déficit partiel dès la première cure de chimiothérapie et un ajustement progressif de la dose en fonction de la tolérance pour les cures suivantes.

### 2.3.1 Approches phénotypiques

Le phénotypage du déficit en DPD peut être réalisé soit en mesurant l'activité de l'enzyme à partir des cellules mononucléées circulantes, soit par la détermination du ratio  $UH_2/U$  plasmatique avant traitement. Une étude sur 81 malades traités par 5-FU a montré que le ratio pré-thérapeutique de  $UH_2/U$  était corrélé au taux du 5-FU plasmatique, à la clairance du 5-FU et que le seuil du ratio en dessous duquel les effets secondaires apparaissaient était de 1,8 (49).

La technique la plus utilisée en France est la détermination du ratio  $UH_2/U$  plasmatique en raison de sa simplicité par rapport à la mesure de l'activité lymphocytaire de DPD par la technique enzymatique (6). Cette dernière doit être interprétée avec prudence lorsqu'elle est effectuée sur des prélèvements contenant de nombreuses cellules myéloïdes, notamment en période de régénération médullaire (79).

- Méthode de mesure de l'activité enzymatique par technique radio-enzymatique

La méthode de mesure de l'activité enzymatique par technique radio-enzymatique dans les cellules mononucléées du sang périphérique est la première technique qui a été mise en place (80). La mesure se fait principalement dans les lymphocytes sanguins, et elle est étroitement corrélée à l'activité dans le foie. Les lymphocytes du patient sont incubés avec de la thymine ou du 5-FU radioactifs puis on mesure les catabolites par technique HPLC avec un détecteur de radio-isotope. En cas de déficit partiel, l'activité DPD dans les lymphocytes du patient est à peu près égale à la moitié de celle d'une population sans déficit. Cependant, il n'existe pas de corrélation satisfaisante avec la clairance plasmatique du 5-FU (81) contrairement au ratio  $UH_2/U$  plasmatique.

Dans cette approche, la préparation des échantillons et le dosage en lui-même sont difficiles à mettre en œuvre. Cette approche a été longtemps la méthode de référence, mais elle a des applications limitées en diagnostic pré-thérapeutique en raison des contraintes citées plus haut. Elle n'est pas adaptée à un dépistage à grande échelle, comme ce doit être le cas, compte tenu de la large utilisation du 5-FU et des contraintes des cliniciens (19).

- Dosage de pyrimidines dans les urines

L'uracile et la thymine sont des pyrimidines naturelles qui sont présentes dans les urines, leurs concentrations élevées sont à l'origine du terme pyrimidinurie congénitale. Il a été décrit des cas de pyrimidinuries familiales et des déficits complets chez des enfants présentant des

concentrations élevées d'uracile et de thymine dans le sang, l'urine mais aussi le liquide céphalorachidien (44).

L'approche phénotypique par dosage urinaire HPLC de l'uracile ou de la thymidine se montre peu sensible, notamment dans les déficits partiels, et ne détecte que les insuffisances enzymatiques totales. Elle n'est donc pas adaptée à un dépistage pré-thérapeutique (19).

- Uracil Breath Test

Le patient doit ingérer du 2-<sup>13</sup>C-uracile (6 mg/kg). Celui-ci est catabolisé, et cette voie catabolique passant par la DPD conduit à la production de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>. L'air expiré pendant 180 minutes est alors recueilli dans un sac scellé, et le <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> est mesuré dans l'air expiré par spectroscopie infra-rouge (IR) de modèle UBiT-IR300. La technique a été validée chez des patients et des sujets sains (82).

Ce test est non invasif et rapide (peut se faire en 50 minutes) ; le <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> dans l'air expiré est stable 201 jours après le recueil. Cependant, le test requiert du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> qui est cher et surtout un spectroscope IR particulier (UBiT-IR300), spécial pour ce test qui n'est pas disponible dans tous les laboratoires de biologie médicale. Cela oblige à envoyer le prélèvement aux laboratoires qui détiennent ce type de matériel, et le délai pour récupérer les résultats peut amener à retarder le début de la chimiothérapie (19).

- Dose de charge d'uracile par voie orale

Dans cette approche, on administre au patient une dose de charge d'uracile, 500 à 1 000 mg/m<sup>2</sup>, puis est effectuée une pharmacocinétique de l'uracile et de son métabolite UH<sub>2</sub> par HPLC (83). En cas de déficit, les concentrations d'UH<sub>2</sub> doivent être très inférieures à celles d'un sujet sans déficit en DPD. Il requiert une pharmacocinétique complète des deux composés (U et UH<sub>2</sub>), et n'est donc pas très aisé en pratique clinique. Comparativement à l'Uracil Breath Test, l'uracile est moins cher, encore qu'il doive être considéré comme un produit pharmaceutique et relève donc de l'agence du médicament (19).

- Rapport UH<sub>2</sub>/U endogène

Cette approche est basée sur le dosage plasmatique pré-thérapeutique du substrat endogène, l'uracile et de son métabolite et le calcul du rapport dihydro-uracile/uracile (métabolite/substrat endogènes), reflet de l'activité globale de la DPD. Les deux composés sont dosés dans le plasma par HPLC avec barrette de diode ou LC-MS/MS avant traitement. Un rapport bas témoigne d'une diminution du métabolisme et reflète un déficit enzymatique.

La diminution du rapport  $UH_2/U$  a été corrélée de façon significative avec le risque et la gravité des toxicités aux fluoropyrimidines apparaissant lors des premières cures (49). Cette approche nécessite une excellente maîtrise de la technique, mais ne requiert aucune administration de médicament ou de substances chimiques, et les résultats sont rendus dans les huit jours (84).

Une étude rétrospective française sur les toxicités graves chez les patients traités avec 5-FU et capécitabine, a permis d'identifier 71% des toxicités sévères et 80% des toxicités létales en déterminant le rapport  $UH_2/U$  chez ces patients (6).

- Adaptation individuelle de dose

Le simple fait d'administrer une fluoropyrimidine à un patient partiellement ou totalement déficitaire en DPD peut d'emblée induire une toxicité grave, ce qui réduit considérablement le champ d'application de la méthode. Elle n'est pas adaptée à la prévention de toxicité précoce grave mais elle est intéressante en cas de déficit partiel détecté en pré-thérapeutique qui ne contre-indique pas l'administration d'une fluoropyrimidine. Le suivi pharmacocinétique individuel permet d'atteindre une dose optimale n'entraînant pas de toxicité aiguë précoce (85).

### 2.3.2 Approche génotypique

Le but de cette approche est de permettre la détection de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) sur le gène de la DPD lui-même ou son promoteur.

- HPLC dénaturante (DHPLC)

La DHPLC est basée sur la séparation température-dépendante de brins d'ADN contenant des paires de bases misappariées à partir d'une banque de fragments d'ADN amplifiés. Cette technique est très sensible et nécessite un second test pour déterminer précisément la mutation. Elle est longue à mettre en œuvre, chère et n'est pas adaptée à un dépistage de routine (86).

- Pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique de séquençage par synthèse à amplification haut-débit qui permet de produire jusqu'à un million de séquences par run. Elle permet la détection

rapide et totalement automatisée de SNP et de courtes séquences de délétions du gène. Cette méthode est classiquement utilisée pour la détection des SNP (87).

- Restriction fragment-length polymorphism (RFLP)

En RFLP, l'ADN amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR) est hydrolysé en fragments par des enzymes de restriction, ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse, et les derniers fragments obtenus sont séquencés (88). Cette technique n'a pas un débit suffisant, elle n'est donc pas adaptée pour rechercher des SNP dans un temps court (19).

### 2.3.3 Approche épigénétique

La méthylation du promoteur de la DPD réduit la transcription du gène. L'approche épigénétique consiste à rechercher la méthylation du promoteur de la DPD par les techniques de séquençage de Sanger, la DHPLC ou le pyroséquençage. Cette approche n'est pas utilisée à l'heure actuelle dans le dépistage (89).

### 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

#### 3.1 Méthode de dosage de l'uracile et du dihydro-uracile

Le dosage de l'uracile et du dihydro-uracile dans le plasma est réalisé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

##### 3.1.1 Principe de LC-MS/MS

La LC-MS/MS correspond à l'association de deux technologies qui sont la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la spectrométrie de masse (MS). Ces technologies sont couramment utilisées pour la séparation (LC) et l'identification (MS) des substances chimiques dans des milieux complexes.

La chromatographie liquide (LC) est une méthode physique de séparation grâce à laquelle les composés chimiques sont sélectivement distribués entre deux phases non-miscibles : la phase mobile « liquide » parcourant la phase stationnaire « solide ». La rétention d'un composé dans la phase stationnaire dépend de son affinité (polarité, structure chimique...) avec cette dernière.

La spectrométrie de masse permet l'identification des substances chimiques grâce à la mesure du ratio de la masse moléculaire sur la charge électrique ( $m/z$ ) des ions. Le couplage des trois quadripôles pour la spectrométrie de masse (MS/MS ou tandem de spectrométrie de masse) a permis le développement d'une nouvelle génération d'analyseur d'ions beaucoup plus sélective et spécifique pour l'identification et la quantification des substances endogènes et exogènes.

La combinaison des interfaces MS/MS permet d'exploiter la LC-MS/MS en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Le mode MRM est devenu le plus utilisé en raison de sa sensibilité et de sa sélectivité pour la quantification de différentes classes de composés chimiques à l'état de trace en milieu complexe (plasma, urine, salive, eaux polluées, etc.). En outre, des développements significatifs concernant les différentes méthodes d'ionisation ont aussi permis la démocratisation de la LC-MS/MS.

L'efficacité de la technique d'ionisation est directement liée à la sensibilité de la détection des molécules. Les deux types d'ionisation les plus couramment utilisés en analyse LC-MS/MS sont l'ESI (ElectroSpray Ionization) et l'APCI (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization). Elles sont toutes les deux complémentaires et s'adaptent à presque toutes les espèces chimiques (médicaments, fongicides, herbicides, insecticides, toxines, résidus de

produits vétérinaires, dépistage de substances prohibées, enzymes, protéines...) avec des spécificités liées à la polarité de la molécule.

Dans notre étude, le mode d'ionisation choisi est le mode ESI<sup>+</sup> et le mode de scan utilisé est le mode MRM dont le principe est le suivant :

La première étape consiste à sélectionner un ion dans le premier quadripôle (Q1). Cet ion produit des fragments sous l'effet de l'énergie de collision et de l'argon dans la cellule de collision (Q2). Ainsi, seulement un nombre restreint et choisi de fragments provenant de l'ion parent est analysé dans le dernier quadripôle (Q3). Les analyses par MRM permettent d'augmenter considérablement la limite de détection des composés par une sélection spécifique des fragments de l'ion étudié. (Figure 8)

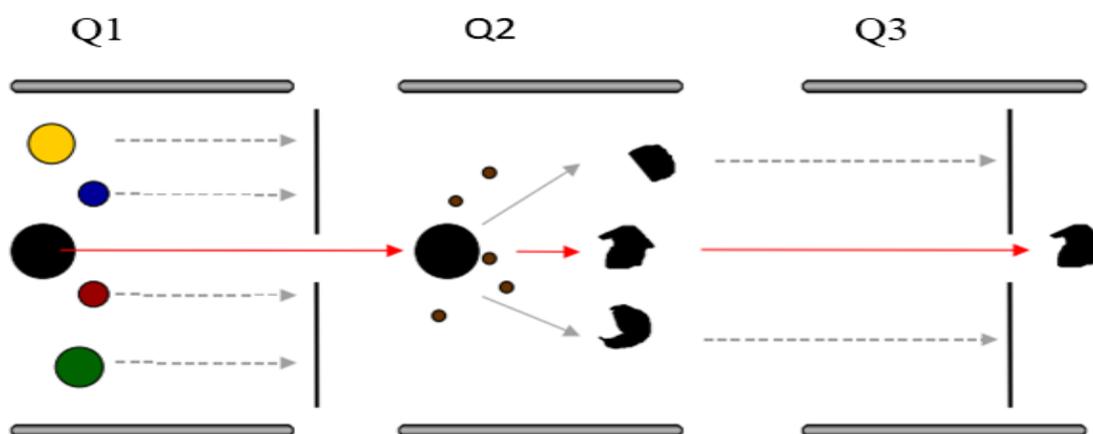


Figure 8 : Principe de l'analyse MRM (d'après Sciex).

### 3.2 Réactifs et solvants

La solution mère d'uracile (U) à 1 mg/mL a été préparée à partir de la poudre d'uracile obtenue chez Sigma<sup>®</sup> (≥ 99% de pureté). Dans une fiole jaugée, il a été dissous 20 mg d'uracile dans 20 mL d'eau ultrapure. Le mélange a été mis dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes afin de faciliter la dissolution.

La solution mère du dihydro-uracile à 1 mg/mL a été préparée à partir de la poudre de 5,6-dihydro-uracile obtenue chez Sigma<sup>®</sup> (≥ 99% de pureté). Dans une fiole jaugée, il a été dissous 20 mg du dihydro-uracile dans 20 mL d'eau ultrapure. Le mélange a été mis dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes afin de faciliter la dissolution.

La solution mère de chlorure d'uracile (CIU) à 1 mg/mL a été préparée à partir de la poudre de chlorure d'uracile obtenue chez Aldrich (≥ 99% de pureté). Dans une fiole jaugée, il a été

dissous 20 mg de chlorure d'uracile dans 20 mL d'eau ultrapure. Le mélange a été mis dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes afin de faciliter la dissolution. Toutes les solutions mères ont été conservées à la température de -20°C avant l'utilisation, pour une durée maximum de trois mois (90).

Eau ultrapure (UHPLC-MS) : utilisée pour la préparation des solutions a été obtenue chez Carlo Erba®.

Acétonitrile (UHPLC-MS) : utilisé comme solvant a été obtenu chez Carlo Erba®.

Acétate d'éthyle ( $\geq 99,5\%$  de pureté) : utilisé comme solvant a été obtenu chez Merck®.

Propranol-2 (LC-MS) : utilisé comme solvant a été obtenu chez Sigma-Aldrich®.

Sulfate d'ammonium ( $\geq 99\%$  de pureté) : utilisé pour précipiter les protéines plasmatiques a été obtenu chez Carlo Erba®.

Acide acétique glacial ( $\geq 99,99\%$  de pureté) : utilisé pour acidifier les phases a été obtenu chez Sigma-Aldrich®.

Le plasma synthétique a été préparé à partir de la solution d'albumine et de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS = Phosphate Buffered Saline) selon la méthode proposée par Cold Spring Harbor Protocols 2012 (91).

- L'albumine (20%) a été obtenue chez laboratoire français de fractionnement et de biotechnologie (LFB).
- Le PBS a été préparé de la façon suivante : dissoudre dans 800 mL d'eau ultrapure, 8 g de chlorure de sodium ( $\text{NaCl} \geq 99,5\%$  de pureté) obtenu chez Merck, 0,2 g de chlorure de potassium ( $\text{KCl} \geq 99,5\%$  de pureté) obtenu chez Merck, 1,44 g de phosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \geq 99\%$  de pureté) obtenu chez Merck et 0,24 g de phosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \geq 99\%$  de pureté) obtenu chez Merck. Ajuster le pH à 7.4 avec acide chlorhydrique ( $\text{HCl} 37\%$ , dilué à 1 mol/mL). Compléter le volume à 1 litre avec de l'eau ultrapure.

Pour préparer le plasma synthétique, il faut prélever 20 mL d'albumine, puis les transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL et compléter ensuite le volume avec du PBS jusqu'au trait de jauge puis agiter le mélange. Le plasma synthétique préparé a été conservé à -20°C pendant au maximum un mois.

### 3.3 Chromatographie

Chromatographe LC-MS/MS :

Il est composé d'un module de chromatographie à liquide ultra haute performance (Waters Acquity UHPLC) comportant une pompe UPLC (H-Class), un injecteur automatique réfrigéré (Autosampler), un four à colonne et un spectromètre de masse équipé de trois quadripôles (Xevo TQ-S) muni d'une interface d'ionisation ESI, le tout relié à un ordinateur équipé d'un écran pour le traitement des données. L'association de ces technologies permet d'identifier et de quantifier les composés sous forme de traces. Le système LC-MS/MS est installé dans une pièce à température ambiante entre 20 et 25°C.

Conditions chromatographiques :

La séparation des analytes a été réalisée sur une colonne UPLC HSS T3 1,8 µm ; 2,1x100mm de la société Waters. Les phases mobiles sont composées d'un mélange d'eau et de 0,5% (v/v) d'acide acétique (phase A) et d'un mélange d'acétonitrile et de 0,5 % (v/v) d'acide acétique (phase B). Les solvants ont été délivrés à une vitesse de 0,35 ml /minute selon le gradient suivant : 100% de A et 0% de B pendant 3,5 minutes, suivi de 5% de A et 95% de B de 3,5 à 4 minutes et 100% de A de 4 à 6 minutes. Les échantillons ont été maintenus à une température de 8°C dans l'injecteur automatique pendant toute la durée de l'analyse. Le temps d'analyse est donc de 6 minutes par échantillon.

Conditions de spectrométrie de masse :

La température de désolvatation a été maintenue à 500°C. La tension est de 40 volts dans le cône et 250 électron-volts dans le capillaire, les débits de gaz sont respectivement de 850 Litre/heure et 150 Litre/heure pour la désolvatation et pour le cône. L'énergie de collision est de 16 électron-volts pour l'uracile, 12 électron-volts pour le dihydro-uracile, 17 électron-volts pour le chlorure d'uracile. Les transitions (m/z) choisies pour la quantification sont 113 → 70 pour l'uracile, 115 → 98 pour le dihydro-uracile, 147 → 130 pour le chlorure d'uracile et celles choisies pour la confirmation sont 113 → 96 pour l'uracile, 115 → 73 pour le dihydro-uracile, 147 → 104 pour le chlorure d'uracile.

Traitement des données : l'acquisition, le traitement et la quantification des données ont été réalisés par le logiciel MassLynx®4.1.

### 3.4 Matériels divers

Tubes en polypropylène de 20 mL à bouchons vissés.

Tubes en verre de 10 mL.

Bouchons à tubes.

Fioles de 5, 10, 20, 100 mL.

Bain à ultrasons Transsonic 460/H Elma.

Balance Mettler Toledo type XS 204.

Micropipettes Gilson P5000, P1000, P200, P20.

Centrifugeuse thermoréglable Jouan GR412.

Agitateur type Vortex VWR, VX-2500.

Bain-marie à sec avec thermostat et rampe d'évaporation.

Agitateur horizontal Janke et Kunkel HS-501 D.

Cônes en polypropylène On touch-tips adaptés aux pipettes.

Autoclave Air Concept Firlabo.

Vials d'injection en verre de 1.5 mL.

Rampe d'évaporation sous azote + azote N28 (Air Liquide) type Liebisch.

pH mètre BIBBY-HC502.

### 3.5 Préparation des échantillons

Le dosage a été réalisé à partir des solutions mères d'uracile (U), du dihydro-uracile (UH<sub>2</sub>), de chlorure d'uracile (CIU) à 1 mg/mL stockées à -20°C, lesquelles ont servi à la préparation des solutions filles.

Préparation des solutions filles de mélange de U/UH<sub>2</sub> (SF1) et solution fille d'étalon interne (SF1-EI) à 10 µg/mL

Solution fille de mélange de UH<sub>2</sub>/U (SF1) : prélever 100 µL de la solution mère de UH<sub>2</sub> et 100 µL de celle de U et l'introduire dans une fiole jaugée de 10 mL, compléter ensuite le volume avec de l'eau ultrapure jusqu'au trait de jauge puis agiter le mélange.

Solution fille d'étalon interne CIU (SF1-EI) : prélever 100 µL de la solution mère de CIU dans une fiole de 10 mL, compléter ensuite le volume avec de l'eau ultrapure jusqu'au trait de jauge et agiter le mélange.

Préparation des solutions filles du mélange U/UH<sub>2</sub> (SF2) et de l'étalon interne (SF2-EI) à 1,6 µg/mL, (SF3-EI) à 0,08 µg/mL

Solution fille de mélange de UH<sub>2</sub>/U(SF2) : déposer 160 µL de la solution SF1 dans un tube à hémolyse de 5 mL, puis ajouter 840 µL d'eau ultrapure et agiter le mélange.

Solution fille d'étalon interne (SF2-EI) : déposer 160 µL de la solution SF1-EI dans un tube à hémolyse de 5 mL, puis ajouter 840 µL d'eau ultrapure et agiter le mélange.

Solution fille d'étalon interne (SF3-EI) : déposer 100 µL de la solution SF2-EI dans un tube à hémolyse de 5 mL, puis ajouter 1600 µL d'eau ultrapure et agiter le mélange.

Préparation de la gamme de calibration

La gamme comprend 7 points qui sont : T0 ; T0,625 ; T1,25 ; T2,5 ; T5 ; T20 ; T40 ; T60 ng/mL. Dans des tubes à hémolyse, préparer les solutions filles (SF) suivantes : SF2/2, SF2/4, SF2/8, SF2/16, SF2/32, SF2/64, SF2/128, SF2/256 en procédant de la manière suivante :

Pour SF2/2 : diluer 400 µL de SF2 dans 400 µL d'eau ultrapure.

Pour <sup>3</sup>/<sub>4</sub> SF2/2 : diluer 300 µL de SF2/2 dans 100 µL d'eau ultrapure.

Pour SF2/4 : diluer 200 µL de SF2/2 dans 200 µL d'eau ultrapure.

Pour SF2/8 : diluer 200 µL de SF2/4 dans 200 µL d'eau ultrapure.

Ainsi de suite jusqu'à la solution de SF2/256.

Préparation des solutions de contrôle qualité et des contrôles de qualité (CQ)

Préparation de la solution fille SF1-CQ à 10 µg/mL : déposer 100 µL de UH<sub>2</sub> et 100 µL de U dans une fiole jaugée de 10 mL, compléter ensuite le volume avec de l'eau ultrapure jusqu'au trait de jauge puis agiter le mélange.

Préparation de la solution fille SF2-CQ à 0,8 µg/mL : déposer 800 µL de SF1-CQ dans une fiole de 10 mL, compléter ensuite le volume avec de l'eau jusqu'au trait de jauge puis agiter le mélange.

Préparation de la solution fille SF3-CQ à 0,1 µg/mL : déposer 100 µL de SF1-CQ dans une fiole jaugée de 10 mL, compléter ensuite le volume avec de l'eau ultrapure jusqu'au trait de jauge puis agiter le mélange.

Préparation de la solution fille SF4-CQ à 20 ng/mL : déposer 400 µL de SF3-CQ, ajouter 1600 µL d'eau ultrapure puis agiter le mélange.

Préparation du contrôle de qualité haut (CQH) à 40 ng/mL : déposer 1 mL de SF2-CQ dans une fiole jaugée de 20 mL, compléter le volume avec du plasma synthétique jusqu'au trait de jauge puis agiter le mélange.

Préparation du contrôle de qualité moyen (CQM) à 5 ng/mL : déposer 1 mL de SF3-CQ dans une fiole jaugée de 20 mL, compléter le volume avec du plasma synthétique jusqu'au trait de jauge puis agiter le mélange.

Préparation du contrôle de qualité bas (CQB) à 1 ng/mL : déposer 1 mL de SF4-CQ dans une fiole de 20 mL, compléter le volume avec du plasma synthétique jusqu'au trait de jauge puis agiter le mélange.

### 3.6 Procédure d'extraction

Chaque point de la gamme a été surchargé avec 50 µL de solution standard, 25 µL d'étalon interne auquel on a ajouté 500 µL de plasma synthétique et 300 mg de sulfate d'ammonium afin de précipiter les protéines. Pour les contrôles de qualité et les blancs, la surcharge de 50 µL de solution standard a été remplacée par une surcharge de 50 µL d'eau ultrapure.

**Tableau 2 :** *Les dilutions de la gamme de calibration.*

	T60	T40	T20	T5	T2,5	T1,25	T0,625	T0	CQI
SF	50µL ( $\frac{3}{4}$ SF2/2)	50µL (SF2/4)	50µL (SF2/8)	50µL (SF2/32)	50µL (SF2/64)	50µL (SF2/128)	50µL (SF2/256)	50µL (eau)	
SF3 EI	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL
Plasma	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL	500µL	500 µL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	300 mg	300 mg	300 mg	300 mg	300 mg	300 mg	300mg	300mg	300mg

Agiter tous les tubes pendant 1 minute au vortex automatique, ajouter dans chaque tube 2,5 mL de mélange de solvant acétate d'éthyle/isopropanol-2 (85/15 volume/volume), agiter doucement (45 agitations par minute) latéralement pendant 15 minutes, centrifuger pendant 15 minutes à 3500 tours/minute à 4°C, récupérer ensuite 2 mL de surnageant dans des tubes à hémolyse propres, évaporer à sec sous l'azote à 37°C, enfin reprendre les extraits secs avec 100 µL de la phase A, agiter pendant 1 minute. Reprendre la solution dans des vials pour injecter 20 µL dans le système LC-MS/MS.

Le guide de validation en bioanalyse de l'EMA (92) a servi de modèle pour valider la méthode. Les paramètres de linéarité, de stabilité, de précision, de justesse, de limite de quantification, de rendement et de l'effet matrice ont été déterminés pour faire cette validation. La validation a consisté à analyser plusieurs réplicats d'un même échantillon au cours d'une même série et répétition de cette série sur plusieurs jours avec trois niveaux de contrôle. Un pool de 25 valeurs a été constitué pour chaque niveau de contrôle de chaque analyte pour effectuer les calculs, selon la méthode décrite par Peters et al (93) et Krouwer et Rabinowitz (94). Le modèle statistique utilisé pour valider les résultats est basé sur l'estimation de l'écart type intra et inter-série, l'estimation de ces écarts types permettant de calculer la répétabilité et la reproductibilité. L'erreur totale quant à elle est estimée par la racine carrée de la somme des carrés de la répétabilité et de la reproductibilité.

Les valeurs limites sont celles utilisées dans le guide de validation en bioanalyse de l'EMA (92).

### 4.1 Linéarité

C'est la capacité de la méthode analytique à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons lorsqu'un modèle de régression linéaire est utilisé. Le modèle de régression linéaire est pondéré en  $1/x$  (l'inverse de la concentration). La linéarité est évaluée en calculant les résidus, c'est-à-dire l'écart entre les concentrations mesurées par le modèle et les concentrations théoriques exprimées en pourcentage. Les valeurs des résidus ont été calculées par le logiciel MassLynx. L'écart doit être inférieur à +/- 15% pour tous les points de gamme sauf pour le dernier point de gamme pour lequel une limite de +/- 20% est tolérée. La pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de détermination ont aussi été rapportés. L'équation de la droite de régression est représentée par la droite  $y = ax + b$  ( $a$  = pente de la droite et  $b$  = ordonnée à l'origine).

### 4.2 Fidélité

La fidélité d'une méthode est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la

moyenne et elle est généralement représentée par l'écart-type ou par le coefficient de variation (écart-type relatif). Elle inclut l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité.

- La répétabilité : exprime la fidélité évaluée dans des conditions de mesure identiques et dans un court intervalle de temps. Ici, même opérateur, même jour. Elle a été étudiée à trois niveaux de contrôle (haut 40 ng/mL, moyen 5 ng/mL et bas 1 ng/mL) et pour chaque niveau de contrôle cinq répétitions le même jour.

- La reproductibilité : exprime la fidélité évaluée dans des conditions différentes de mesure. Ici, même opérateur, mais à des jours différents. Elle a été étudiée à trois niveaux de contrôle (haut 40 ng/mL, moyen 5 ng/mL et bas 1 ng/mL) et pour chaque niveau de contrôle cinq séries de répétition à des jours différents.

#### 4.3 Justesse

Exprime l'écart de l'accord entre la valeur trouvée et la valeur acceptée soit comme valeur conventionnellement vraie soit comme valeur de référence.

#### 4.4 Rendement et effets matrice

Le rendement (RE) correspond au rapport des aires sous les pics de l'analyte extrait (B) sur le blanc surchargé (A), il est représenté par  $RE (\%) = B/A \times 100$ . L'effet matrice correspond au rapport des aires sous les pics du blanc surchargé (A) sur l'analyte non extrait (C) il est représenté par  $EM (\%) = A/C \times 100$ . L'efficacité (EF) correspond au rapport des aires sous les pics de l'analyte extrait (B) sur l'analyte non extrait (C), il est représenté par  $EF (\%) = B/C \times 100$ . Ces trois paramètres ont été évalués à deux niveaux de concentrations correspondants au niveau moyen (5 ng/mL) et au niveau haut (40 ng/mL) de contrôle qualité.

#### 4.5 Limites de quantification (LOQ) et de détection

La limite de quantification correspond au point bas de la gamme de calibration. Elle est validée en calculant l'écart type de l'ordonnée à l'origine (oo) des droites d'étalonnage selon la formule  $LOQ = 10 \times ET(oo)/\text{moyenne des pentes (95)}$ .

La limite de détection est la plus petite quantité d'analyte qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme valeur exacte. Elle n'a pas été calculée pour cette étude car elle n'est pas utile dans ce contexte.

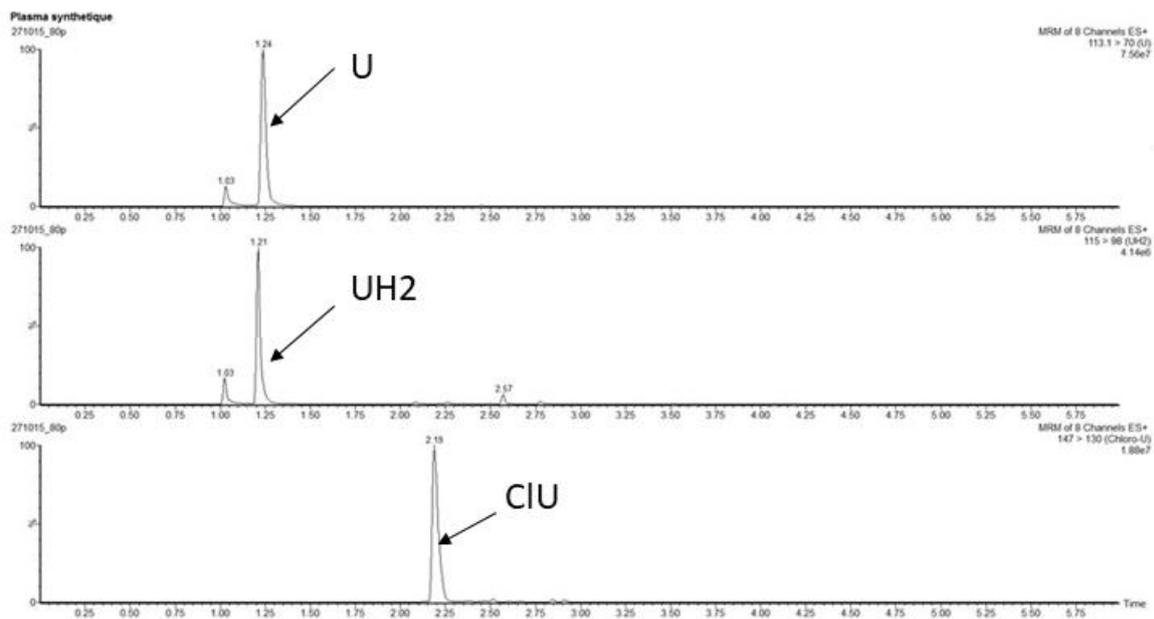
#### 4.6 Stabilité

L'étude de stabilité n'a pas été réalisée car la stabilité a déjà été étudiée par d'autres (90).

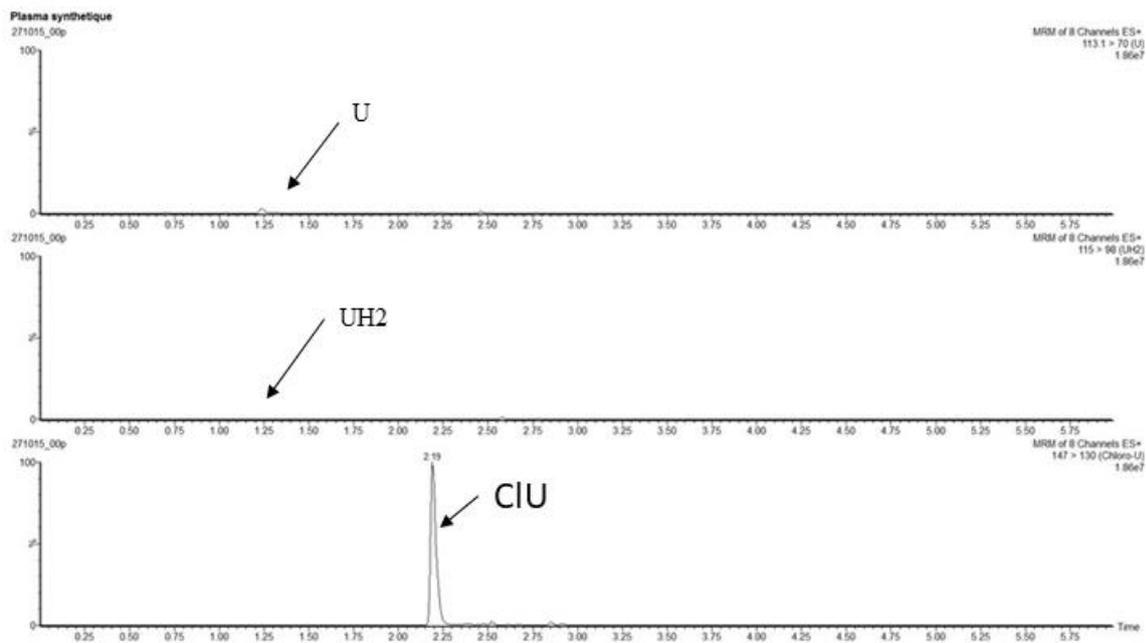
## 5 RESULTATS

### 5.1 Conditions chromatographiques

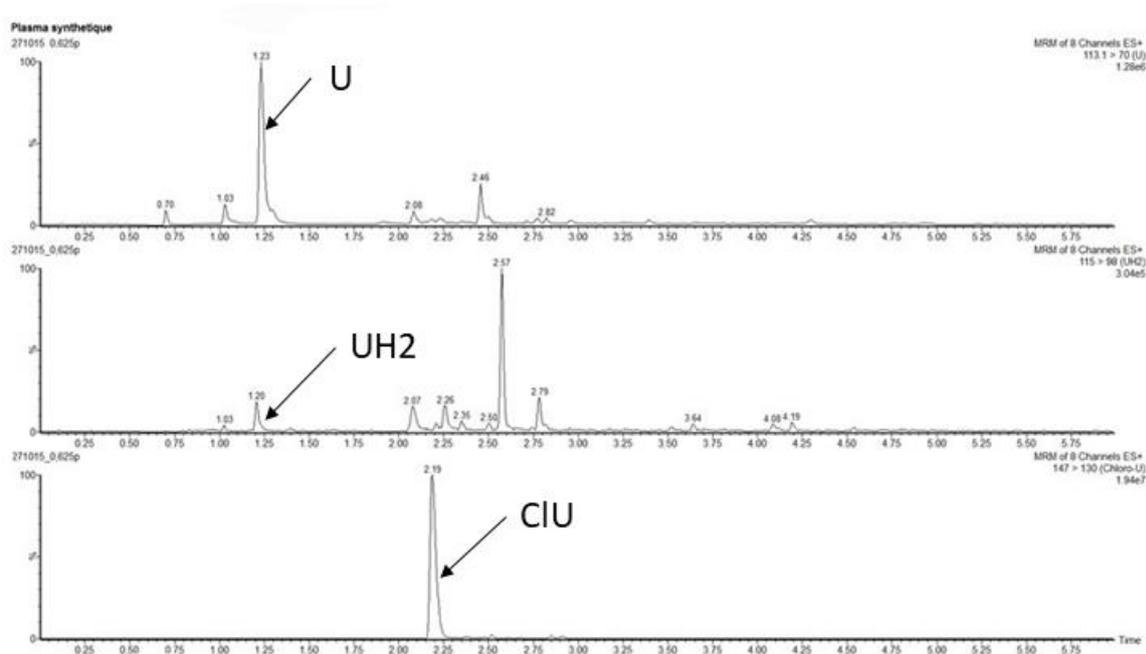
Les conditions chromatographiques développées pour cette méthode ont permis de séparer les différents analytes et l'étalon interne. Les temps de rétention du dihydro-uracile, de l'uracile et de l'étalon interne sont respectivement de 1,21 ; 1,24 et 2,19 (voir figure 9). Le chromatogramme correspondant à un blanc montre l'absence de signal au temps de rétention du dihydro-uracile et de l'uracile (voir figure 10). Le rapport signal sur bruit obtenu à la limite de quantification montre que la réponse de l'appareil est suffisante à cette concentration et doit permettre d'obtenir la sensibilité nécessaire (voir figure 11).



**Figure 9 :** Chromatogramme correspondant au point le plus haut de la gamme. Seules les transitions de quantification sont représentées



**Figure 10 :** Chromatogramme correspondant à l'analyse d'un blanc. Seules les transitions de quantification sont représentées.



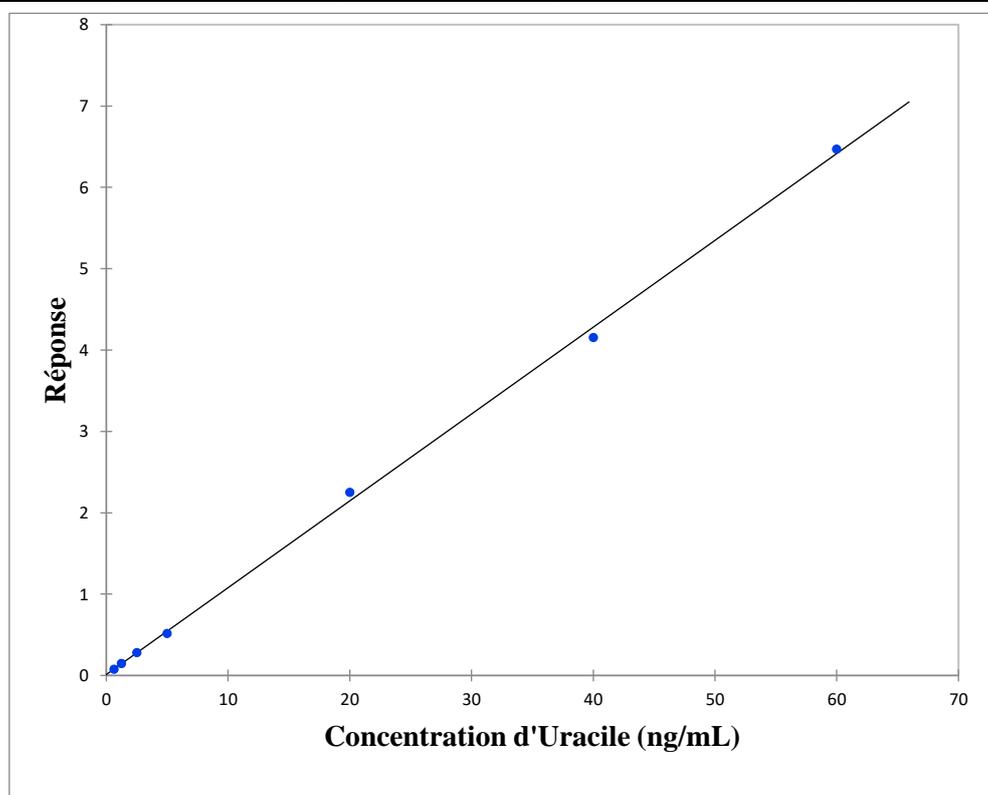
**Figure 11 :** Chromatogramme correspondant au point le plus bas de la gamme. Seules les transitions de quantification sont représentées.

## 5.2 Linéarité

La linéarité des courbes de calibration a été démontrée pour les deux analytes pour les concentrations de 0,625 à 60 ng/mL car les résidus exprimés en pourcentage ne dépassent pas +/- 15% dans tous cas (tableau 2 et 3).

**Tableau 3 :** Exemple de résultats de la courbe de calibration de l'uracile. ASC : aire sous la courbe.

	Concentration théorique (ng/mL)	Réponse (ASC U/ ASC EI)	Concentration calculée par le modèle (ng/mL)	Résidus %
Uracile	0,625	0,076	0,62	-0,7
	1,25	0,146	1,27	1,8
	2,5	0,280	2,53	1,4
	5	0,517	4,75	-5,0
	20	2,251	20,98	4,9
	40	4,153	38,78	-3,1
	60	6,469	60,45	0,7

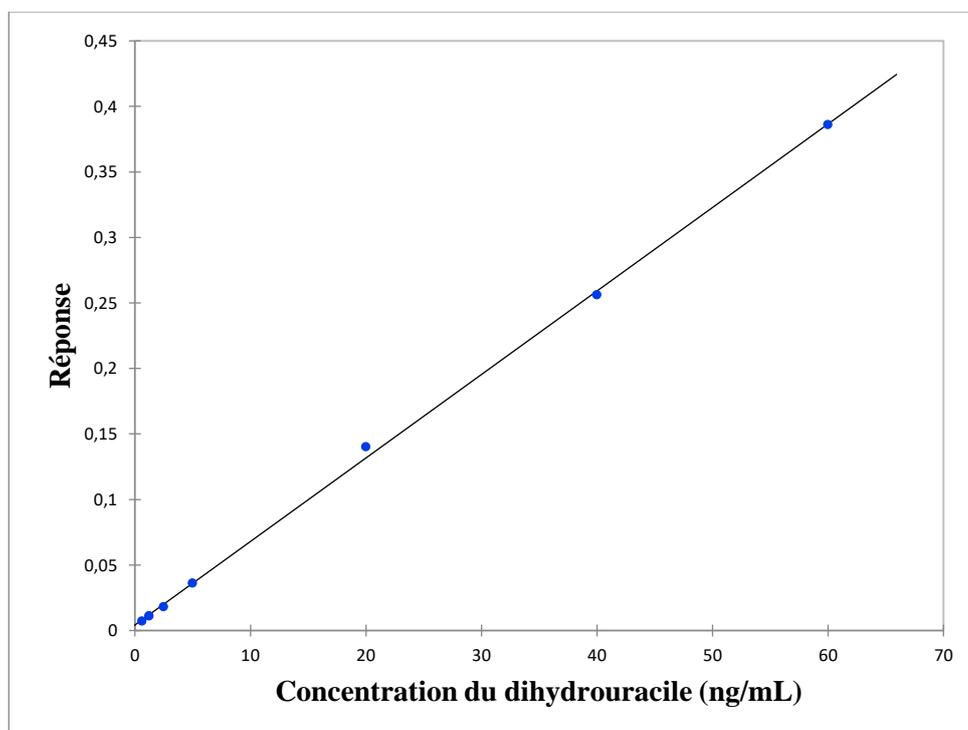


**Figure 12 :** Exemple de courbe de calibration de l'uracile.

La figure 12 montre la droite de calibration pour l'uracile avec  $y = 0,10686x + 0,00962$ , le coefficient de corrélation  $r = 0,999551$  et le coefficient de détermination  $r^2 = 0,999102$  qui reflète l'adéquation du modèle de régression linéaire pour décrire la relation entre la concentration et la réponse.

**Tableau 4 :** Exemple de résultats de la courbe de calibration du dihydro-uracile. ASC : aire sous la courbe.

	Concentration théorique (ng/mL)	Réponse (ASC U/ASC EI)	Concentration calculée par le modèle (ng/mL)	Résidus %
Dihydro-uracile	0,625	0,007	0,60	-3,6
	1,25	0,011	1,27	1,9
	2,5	0,018	2,36	-5,4
	5	0,036	5,17	3,4
	20	0,140	21,32	6,6
	40	0,256	39,24	-1,9
	60	0,386	59,40	-1,0



**Figure 13 :** Exemple de courbe de calibration du dihydro-uracile.

La figure 13 montre la droite de calibration du dihydro-uracile avec  $y = 0,0064x + 0,00297$ , le coefficient de corrélation  $r = 0,999462$  et le coefficient de détermination  $r^2 = 0,998924$ .

### 5.3 Fidélité

L'étude de répétabilité et de reproductibilité a été réalisée à trois niveaux de contrôle de qualité interne sur cinq séries de répétition, chaque série comportant cinq répétitions donnant un total de 25 essais. Les résultats de cette étude sont reportés dans les tableaux 5, 6 et 7

**Tableau 5 :** Résultats de répétabilité et de reproductibilité du contrôle haut pour l'uracile et dihydro-uracile ( $n=25$ ), valeur du contrôle haut=40 ng/mL.

	Uracile 40 ng/mL	Dihydro-uracile 40 ng/mL
Répétabilité CV	4,2%	3,8%
Reproductibilité CV	4,6%	4,1%
<b>Total CV</b>	<b>6,2%</b>	<b>5,5%</b>

Tous les coefficients de variation (CV) sont inférieurs à 15%, par conséquent le test de répétabilité et de reproductibilité du contrôle haut est validé.

**Tableau 6 :** Résultats de répétabilité et de reproductibilité du contrôle moyen pour l'uracile et dihydro-uracile ( $n=25$ ), valeur du contrôle moyen = 5 ng/mL.

	Uracile 5 ng/mL	Dihydro-uracile 5 ng/mL
Répétabilité CV	4,2%	7,5%
Reproductibilité CV	6,3%	2,5%
<b>Total CV</b>	<b>7,6%</b>	<b>7,9%</b>

Tous les CV sont inférieurs à 15%, par conséquent le test de répétabilité et de reproductibilité du contrôle moyen est validé.

**Tableau 7 :** Résultats de répétabilité et de reproductibilité du contrôle bas pour l'uracile et dihydro-uracile (n=25), valeur du contrôle moyen = 1 ng/mL.

	Uracile 1 ng/mL	Dihydro-uracile 1 ng/mL
Répétabilité CV	9,6%	9,9%
Reproductibilité CV	1,9%	2,8%
<b>Total CV</b>	<b>9,8%</b>	<b>10,3%</b>

Tous les CV sont intérieurs à 20%, par conséquent le test de répétabilité et de reproductibilité du contrôle bas est validé.

#### 5.4 Justesse

L'étude de justesse a été réalisée sur les mêmes données que l'étude de répétabilité et de reproductibilité et ses résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 8 :** Résultats de justesse de l'uracile et du dihydro-uracile aux trois niveaux de contrôle de qualité (haut= 40 ng/mL, moyen= 5ng/mL, bas= 1ng/mL), n=25

Biais en %	Uracile	Dihydro-uracile
Contrôle haut	7,7%	2,7%
Contrôle moyen	-1,8%	1,4%
Contrôle bas	1,2%	-0,6%

Les biais des contrôles haut, moyen et bas sont strictement inférieurs à 15%, par conséquent le test de justesse est validé.

#### 5.5 Limite de quantification

La limite de quantification a été calculée à partir de l'écart-type de l'ordonnée à l'origine de 10 droites d'étalonnage. Elle est de 0,330 ng/mL pour l'uracile et 0,035 ng/mL pour le dihydro-uracile. Elle est bien inférieure au point le plus bas de la gamme.

### 5.6 Rendement, effet matrice et efficacité

L'étude du rendement a été réalisée sur l'uracile et le dihydro-uracile à deux niveaux de contrôle qualité (le moyen 5 ng/mL et le haut 40 ng/mL) avec pour chaque niveau de contrôle trois répétitions de l'analyte extrait, trois répétitions de blancs surchargés après extraction et trois répétitions de l'analyte chargé non extrait. Les résultats de cette étude sont reportés dans les tableaux 9 à 12.

**Tableau 9 :** Résultats de rendement, effet matrice et efficacité du contrôle moyen de l'uracile.

	Rendement	Effet matrice	Efficacité
Contrôle moyen	60,4%	110,5	66,8%
5 ng/mL	60,3%	103,7	64,5%
	ND	106,9	ND
<b>Moyenne</b>	<b>60,4%</b>	<b>107,1</b>	<b>65,7%</b>

ND : données non disponibles suite problème analytique.

**Tableau 10 :** Résultats de rendement, effet matrice et efficacité du contrôle haut de l'uracile.

	Rendement	Effet matrice	Efficacité
Contrôle haut	56,9%	77,2	44,0%
40 ng/mL	58,6%	76,9	45,0%
	64,0%	73,8	47,3%
<b>Moyenne</b>	<b>59,8%</b>	<b>76,0</b>	<b>45,4%</b>

**Tableau 11 :** Résultats de rendement, effet matrice et efficacité du contrôle moyen du dihydro-uracile.

	Rendement	Effet matrice	Efficacité
Contrôle moyen	57,1%	77,4	44,1%
5 ng/mL	59,0%	79,9	49,0%
	ND	83,1	ND
<b>Moyenne</b>	<b>58,0%</b>	<b>80,1</b>	<b>46,6%</b>

ND : données non disponibles suite problème analytique.

**Tableau 12 :** Résultats de rendement, effet matrice et efficacité du contrôle haut du dihydro-uracile.

	Rendement	Effet matrice	Efficacité
Contrôle haut 40 ng/mL	57,4%	68,6%	39,3%
	54,7%	72,0%	39,3%
	60,3%	67,8%	40,9%
<b>Moyenne</b>	<b>57,4%</b>	<b>69,4%</b>	<b>39,8%</b>

Les valeurs du rendement dépassent 50%, cela montre un recouvrement de plus de la moitié des analytes après extraction. Les effets matrices sont faibles (<31%) en moyenne.

### 5.7 Stabilité

Selon Coudoré et al (90), les solutions stocks d'uracile et du dihydro-uracile sont restées stables à -20°C pendant trois mois.

Les contrôles internes préparés dans le plasma synthétique sont stables au moins 6 heures à température ambiante et au moins 30 jours à -20°C.

Toutefois, dans les échantillons biologiques, les concentrations d'uracile et du dihydro-uracile augmentent avec le temps à température ambiante et à 4°C :10 à 27% en moyenne au bout de deux heures de stockage avec de grandes variations.

Pour la prise en charge des échantillons, il est donc recommandé que le sang soit centrifugé à +4°C et le plasma immédiatement congelé à -20°C (90).

## 6 DISCUSSION

---

L'objectif de ce travail était de développer et de valider une méthode de dosage de l'uracile et du dihydro-uracile dans le plasma par LC-MS/MS afin de déterminer l'activité de l'enzyme DPD. Le ratio du métabolite dihydro-uracile sur l'uracile est le reflet de l'activité de cette enzyme impliquée dans le métabolisme du 5-FU.

En complément des méthodes génotypiques pour la détermination de l'activité de la dihydropyrimidine déshydrogénase, plusieurs méthodes de phénotypage ont été déjà développées et proposées.

La méthode radio-enzymatique de mesure de l'activité dans les lymphocytes est la technique historique. Toutefois, elle n'est pas adaptée à un dépistage de routine notamment en raison de l'utilisation de radio-éléments et de la nécessité d'utiliser un détecteur de radio-isotopes. Par ailleurs, la corrélation avec la clairance plasmatique du 5-FU n'est pas satisfaisante (19).

Le dosage des pyrimidines dans l'urine est peu sensible quant à la détection des déficits partiels et ne peut détecter que les déficits totaux (19).

L'Uracil Breath Test est rapide, non invasif mais requiert l'utilisation de  $^{13}\text{CO}_2$  qui est cher et du matériel spécifique non disponible dans tous les laboratoires (19).

L'administration d'une dose-test d'uracile par voie orale est en cours de validation. Elle requiert une étude pharmacocinétique complète de U et  $\text{UH}_2$ , ce qui n'est pas facile à mettre en œuvre en routine (19).

La méthode consistant à mesurer le rapport plasmatique  $\text{UH}_2/\text{U}$  est plus facilement utilisable en routine, car elle ne nécessite pas d'administrer de substance et ne nécessite pas plusieurs prélèvements. Les dosages des analytes peuvent être réalisés avec du matériel de laboratoire courant (HPLC couplée à un détecteur barrettes de diodes). Le rendu des résultats peut se faire au maximum dans les 8 jours (1) ce qui ne retarde pas le début de la chimiothérapie.

La plupart des méthodes décrites dans la littérature pour mesurer le rapport  $\text{UH}_2/\text{U}$  reposent sur la chromatographie liquide couplée à un détecteur UV simple ou barrette de diodes (96). Ce mode de détection peut parfois manquer de spécificité et de sensibilité. C'est pourquoi nous avons choisi de développer notre méthode de dosage par LC-MS/MS. Toutefois, un détecteur de masse de haute sensibilité est nécessaire : les premiers essais réalisés sur un spectromètre de masse moins sensible (API 3200 Qtrap) n'ont pas permis d'atteindre la sensibilité requise pour cette analyse en raison du manque de signal pour les analytes. La LC-

MS/MS a montré une bonne sensibilité pour ce dosage en détectant des concentrations jusqu'à 0,625 ng/mL et une rapidité de temps d'analyse avec 6 minutes par échantillon. Elle requiert toutefois une maîtrise de la technique proposée.

Pour l'étalonnage interne nous avons utilisé des analogues structuraux de l'uracile et du dihydro-uracile. Sur le spectromètre XEVO, les essais ont commencé par l'utilisation de bromo-uracile comme étalon interne mais le signal n'était pas suffisant, il a donc été remplacé par le chloro-uracile. A l'époque, aucuns analogues deutérés n'étaient disponibles au laboratoire. Initialement le pic de l'étalon interne était dédoublé. Sa concentration a été diluée 20 fois ramenant sa concentration de 1,6 µg/mL à 0,08 µg/mL, permettant d'améliorer considérablement la forme des pics.

Pour la chromatographie, des colonnes HILIC et BEHC18 ont été testées mais les signaux obtenus n'étaient pas aussi intenses que ceux obtenus avec la colonne HSS T3. La colonne HSS T3 est particulièrement adaptée pour l'analyse des composés polaires, en particulier elle est compatible avec des phases mobiles comportant un fort pourcentage de phase aqueuse. Les colonnes HILIC auraient pu être adaptées à l'analyse de ces composés mais elles nécessitaient un rinçage poussé de tout le système pour obtenir des temps de rétention reproductibles. Ce rinçage était difficile à mettre en œuvre en routine. Le gradient de phase mobile utilisé pour cette méthode comprend un plateau de 3.5 min avec 100 % de phase aqueuse pour l'élution de ces analytes très polaires, suivi d'une augmentation rapide jusqu'à 100% de phase organique afin d'éluer toutes les autres impuretés retenues sur la colonne à la fin de l'analyse chromatographique.

Cette méthode de dosage a été validée selon les guides de validation en vigueur pour la bioanalyse (92) comprenant les paramètres habituels de validation qui sont : la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la justesse, la détermination des limites de la méthode et les effets matrices. Le calcul de la précision inter et intra-day a été fait selon la méthode décrite par Peters et al (93) et les calculs proposés par Krouwer et al (94). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de gagner du temps. En effet, l'analyse de cinq séries cinq jours différents est suffisante pour estimer les deux niveaux de précision. Les paramètres de validation obtenus sont conformes aux recommandations habituelles de l'EMA (92).

Toutefois, il faut noter que la matrice utilisée pour préparer la gamme de calibration n'est pas du plasma mais une matrice synthétique censée lui ressembler. Ce choix a été effectué en raison de la présence basale endogène des deux analytes dans le plasma humain. En conséquence, il est probable que les effets matrices soient différents de ceux qui seraient

mesurés avec du plasma humain. En présence de composés endogènes, plusieurs solutions sont possibles pour préparer la gamme de calibration et les contrôles de qualité internes :

Elimination du composé endogène de la matrice d'intérêt à l'aide de charbon actif, action d'enzymes ou traitement physique. Par exemple le chauffage du plasma à 37°C pendant plusieurs heures permet d'éliminer les catécholamines présentes dans cette matrice (97). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle modifie la composition de la matrice qui n'est alors plus strictement identique à la matrice étudiée.

Utilisation pour préparer les standards de calibration et les contrôles de qualité internes d'analogues deutérés des analytes. Cette solution peut paraître séduisante, toutefois les analogues deutérés correspondant, ici uracile et dihydro-uracile marqués au deutérium, ne sont pas toujours aisément disponibles. Par ailleurs, cette approche n'est possible qu'en spectrométrie de masse. De plus, il n'est pas certain que l'ionisation de ces composés deutérés soit strictement identique à celle des analytes correspondant non deutérés. Cette dernière approche a notamment déjà été utilisée pour l'analyse du bisphénol A dans le sang et l'urine (98).

La méthode des ajouts dosés n'est pas utilisable en routine car une gamme de concentration doit être réalisée pour chaque patient.

Nous avons plutôt choisi d'utiliser une matrice synthétique. Un substitut de plasma a été préparé en utilisant une solution ionique isotonique au plasma et surchargée avec de l'albumine humaine afin d'obtenir une composition proche de celle du plasma. Cette méthode a permis d'obtenir des blancs exempts d'analytes et des courbes de calibration avec un intercept négligeable. Par ailleurs, avec cette matrice les effets de suppression d'ions sont faibles voire nuls (inférieurs à 31%). La validation rigoureuse de cette approche nécessiterait en plus, d'inclure dans chaque série des contrôles de qualité préparés dans le plasma humain dont la concentration finale prend en compte la contamination basale. C'est ce que propose la FDA dans son document de travail de 2013 toujours pas validé à ce jour (99).

L'expérimentation permettant d'estimer les effets matrices inclus aussi le calcul des rendements d'extraction. Un rendement suffisant (plus de 50%) a été obtenu par l'extraction liquide-liquide des analytes en utilisant un mélange de solvant 85/15 (volume/volume) d'acétate d'éthyle et d'isopropanol-2. La déprotéinisation par l'acétonitrile utilisée en première intention lors du développement n'a pas donné de résultats satisfaisants en raison d'effets matrices importants. L'acétonitrile a ensuite été remplacé par le sulfate d'ammonium

pour précipiter les protéines, combiné à une extraction liquide-liquide. Celle-ci a été efficace bien qu'elle allonge la procédure d'extraction notamment en raison de la pesée du sulfate d'ammonium qui a aussi l'avantage d'avoir un moindre coût.

La gamme de calibration était initialement composée de 9 points (T0,625; T1,25 ; T2,5 ; T5 ; T10 ; T20 ; T40 ; T80 ; T160 ng/mL). Les points hauts de la gamme T80 et T160 ont été supprimés car la gamme n'était pas linéaire dans sa partie haute, probablement en raison d'un phénomène de saturation du signal à ces concentrations élevées. Ils ont été remplacés par un point T60 sans que cela n'altère la droite de régression. Les valeurs de justesse et de précision aux trois niveaux de contrôles démontrent que la méthode est suffisamment robuste. La limite de quantification est suffisamment basse pour mesurer les concentrations habituellement rencontrées chez l'Homme (90).

## 7 CONCLUSION

---

La méthode de dosage de l'uracile et du dihydro-uracile dans le plasma par LC-MS/MS pour le phénotypage de la dihydropyrimidine déshydrogénase a été validée. Cette méthode de dosage peut bien être appliquée dans un laboratoire hospitalier en vue du suivi pré-thérapeutique des patients atteints de cancers et susceptibles d'être mis sous le traitement par les fluoropyrimidines. Il permet non seulement une adaptation de leur traitement en fonction de risque de toxicités mais aussi évite les lourdes conséquences liées à la toxicité des fluoropyrimidines. Il reste toutefois à tester la méthode dans les conditions réelles de routine du laboratoire et à réaliser une comparaison avec un autre laboratoire.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. OMS | Cancer. WHO. Principaux faits sur le cancer dans le monde, ses causes, ses facteurs de risque, les traitements existants et sur les recommandations de l’OMS. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>
2. Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Lyon : International Agency for Research on Cancer/World Health Organization ; 2014.
3. Les cancers en France en 2016 : l’essentiel des faits et chiffres - Actualités | Institut National Du Cancer. Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/Les-cancers-en-France-en-2016-l-essentiel-des-faits-et-chiffres>
4. van Kuilenburg ABP, Meinsma R, van Gennip AH. Pyrimidine Degradation Defects and Severe 5-Fluorouracil Toxicity. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 31 déc 2004 ;23(8-9) :1371-5.
5. Boisdron-Celle M, Morel A, Milano G, Gamelin E. Dérivés fluoropyrimidiques et déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase. Lett Cancérologue. 2008 ;17(8) :412–414.
6. Ciccolini J, Etienne M-C, Loriot M-A. [guidelines\\_gpccancer\\_dpd\\_et\\_fluoropyrimidines.pdf](#). In 2016. Disponible sur : [www.unicancer.fr/sites/.../guidelines\\_gpco-unicancer\\_dpd\\_et\\_fluoropyrimidines.pdf](http://www.unicancer.fr/sites/.../guidelines_gpco-unicancer_dpd_et_fluoropyrimidines.pdf)
7. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Morel A. Dépistage des patients déficitaires en dihydropyrimidine déshydrogénase avant traitement par fluoropyrimidines. Thérapie. 2007 ;62(2) :99–103.
8. Lansiaux A. Les antimétabolites. Bull Cancer (Paris). 2011 ;98(11) :1263–1274.
9. Bertino JR. Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. J Clin Oncol. 1 janv 1993 ;11(1) :5-14.
10. Walling J. From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. Invest New Drugs. janv 2006;24(1):37-77.
11. Galvani E, Peters GJ, Giovannetti E. Thymidylate synthase inhibitors for non-small cell lung cancer. Expert Opin Investig Drugs. 2011 ;20(10) :1343–1356.

12. Robak T, Lech-Maranda E, Korycka A, Robak E. Purine nucleoside analogs as immunosuppressive and antineoplastic agents : mechanism of action and clinical activity. *Curr Med Chem*. 2006 ;13(26) :3165–3189.
13. Gehan EA, Freireich EJ. The 6-MP versus placebo clinical trial in acute leukemia. *Clin Trials*. 2011 ;8(3) :288–297.
14. Villela L, Bolaños-Meade J. Acute myeloid leukaemia : optimal management and recent developments. *Drugs*. 20 août 2011 ;71(12) :1537-50.
15. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes : 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2011 ;86(6) :490–498.
16. Lokiec F, Lansiaux A. Gemcitabine : from preclinic to clinic passing by pharmacokinetics. *Bull Cancer (Paris)*. 2007 ;94 Spec No Actualites : S85-89.
17. Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, André N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing—time for a change? *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 ;8(7) :439–444.
18. Boisdron-Celle M, Morel A, Gamelin E. Déficits en dihydropyrimidine déshydrogénase et toxicité aux fluoropyrimidines. In : *Annales de biologie clinique*. p. 27–32. Disponible sur :[http://www.jle.com/fr/revues/abc/edocs/deficits\\_en\\_dihydropyrimidine\\_deshydrogenase\\_et\\_toxicite\\_aux\\_fluoropyrimidines\\_283541/article.phtml](http://www.jle.com/fr/revues/abc/edocs/deficits_en_dihydropyrimidine_deshydrogenase_et_toxicite_aux_fluoropyrimidines_283541/article.phtml)
19. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Morel A. La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD). *Oncologie*. févr 2014;16(2-3):96-102.
20. Boisdron-Celle M, Capitain O, Faroux R, Borg C, Metges JP, Galais MP, et al. Prevention of 5-fluorouracil-induced early severe toxicity by pre-therapeutic dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency screening : Assessment of a multiparametric approach. *Semin Oncol*. févr 2017;44(1):13-23.
21. Heidelberger C. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*. Mars 1957 ;179(4561) :663-6.
22. Davies JM, Goldberg RM. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Semin Oncol*. Août 2011 ;38(4) :552-60.

23. Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet.* avr 1989;16(4):215-37.
24. Seigle-Ferrand B. Dosage du dihydro-uracile et uracile plasmatique par chromatographie liquide haute performance : toxicité du 5-fluorouracile. Thèse d'exercice. Châtenay-Malabry, Hauts-de-Seine, France : Université de Paris-Sud. Faculté de pharmacie ; 2002.
25. Antinéoplasiques analogues des bases pyrimidiniques. *Pharmacorama.* 2016. Disponible sur : <http://www.pharmacorama.com/pharmacologie/mdicaments-acides-nucliques-protines/antineoplasiques-analogues-bases-pyrimidiniques/>
26. Boisdron-Celle M, Guérin-Meyer V, Capitain O. 5-fluorouracile : MSI, pharmacocinétique, DPD, TYMS et MTHFR. In : *Médecine personnalisée en cancérologie digestive.* Springer Paris ; 2013. p. 75–92. Disponible sur : <http://www.unitheque.com/UploadFile/DocumentPDF/M/E/WYKG-9782817804262.pdf>
27. Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil : a rational approach to improving therapeutic outcomes. *J Clin Oncol.* 2009 ;101(22) :1543–1552.
28. Antinéoplasiques analogues des bases pyrimidiniques. *Pharmacorama.* 2016. Disponible sur : <http://www.pharmacorama.com/pharmacologie/mdicaments-acides-nucliques-protines/antineoplasiques-analogues-bases-pyrimidiniques/>
29. Naguib FNM, Kouni MH el, Cha S. Enzymes of Uracil Catabolism in Normal and Neoplastic Human Tissues. *Cancer Res.* 1 nov 1985 ;45(11 Part 1) :5405-12.
30. Aparicio T, Ducreux M, Chaussade S. 5-fluorouracile : données sur le métabolisme et place actuelle dans le traitement des cancers digestifs. 2008 ; Disponible sur : <http://www.em-consulte.com/en/article/98905>
31. Fraile RJ, Baker LH, Buroker TR, Horwitz J, Vaitkevicius VK. Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil Administered Orally, by Rapid Intravenous and by Slow Infusion. *Cancer Res.* 1 juill 1980 ;40(7) :2223-8.
32. Chabner BA. *Pharmacological Principles of Cancer Treatment.* Philadelphia : W.B. Saunders Company ; 1982. 183-212 p.

33. Heggie GD, Sommadossi J-P, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and Its Metabolites in Plasma, Urine, and Bile. *Cancer Res.* 15 avr 1987 ;47(8) :2203-6.
34. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med.* 1990 ;322(6) :352–358.
35. Marsoni S. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. *Lancet.* 1995 ;345(8955) :939–944.
36. Scheithauer W, Rosen H, Kornek G-V, Sebesta C, Depisch D. Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *BMJ.* 1993 ;306(6880) :752–755.
37. Palmer KR, Kerr M, Knowles G, Cull A, Carter DC, Leonard RCF. Chemotherapy prolongs survival in inoperable pancreatic carcinoma. *Br J Surg.* 1994 ;81(6) :882–885.
38. Murad AM, Santiago FF, Petroianu A, Rocha PR, Rodrigues MA, Rausch M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer.* 1993 ;72(1) :37–41.
39. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* Août 2000 ;18(16) :2938-47.
40. Lecomte T. Le 5-FU oral. *Post-U FMC HGE.* 2008 ;113–22.
41. Hirsch BR, Zafar SY. Capecitabine in the management of colorectal cancer. *Cancer Manag Res.* 2011 ;3 :79–89.
42. Astier A. Apports récents de la pharmacogénomique dans le traitement des cancers colorectaux. *Ann Pharm Fr.* juill 2010 ;68(4) :233-53.
43. Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest.* 1988 ;81(1) :47.

44. Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, O'Dea RF, Ramnaraine ML, Mirkin BL. Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *N Engl J Med.* 1985 ;313(4) :245–249.
45. Beck A, Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Renee N, et al. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer.* 1994 ;30(10) :1517–1522.
46. Kuilenburg ABPV, Lenthe H van, Blom MJ, Mul EPJ, Gennip AHV. Profound variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human blood cells: major implications for the detection of partly deficient patients. *Br J Cancer.* févr 1999;79(3-4):620-6.
47. Etienne MC, Milano G, Renee N, Lagrange JL, Dassonville O, Thyss A, et al. Etude de population de la dihydropyrimidine deshydrogenase chez des sujets cancéreux. *Bull Cancer (Paris).* 1995 ;82(9) :705–710.
48. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. 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.* 1993 ;53(22) :5433–5438.
49. Gamelin E, Boisdron-Celle M, Guerin-Meyer V, Delva R, Lortholary A, Genevieve F, 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.* 1999 ;17(4) :1105–1105.
50. Milano G, Etienne M-C. Potential importance of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in cancer chemotherapy. *Pharmacogenet Genomics.* 1994 ;4(6) :301–306.
51. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 ;94(6) :640–645.

52. Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Population characteristics of hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity, a key metabolic enzyme in 5-fluorouracil chemotherapy. *Clin Pharmacol Ther.* 1995 ;58(5) :512–522.
53. Harris BE, Song R, Soong S, Diasio RB. 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.* 1990 ;50(1) :197–201.
54. Grem JL, Yee LK, Venzon DJ, Takimoto CH, Allegra CJ. Inter-and intraindividual variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997 ;40(2) :117–125.
55. Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and resistance to 5-fluorouracil. In : *Marrow protection*. Karger Publishers ; 1999. p. 115–123. Disponible sur : <http://www.karger.com/Article/Abstract/61992>
56. De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL, Stokke T. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Mol Cancer.* 18 mai 2006 ;5 :20.
57. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res.* 2000 ;6(4) :1322–1327.
58. Schwartz EL, Baptiste N, Wadler S, Makower D. Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil. *J Biol Chem.* 1995 ;270(32) :19073–19077.
59. Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, et al. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res.* 1998 ;4(10) :2371–2376.

60. Meenan J, O'Hallinan E, Scott J, Weir DG. Epithelial cell folate depletion occurs in neoplastic but not adjacent normal colon mucosa. *Gastroenterology*. 1997 ;112(4) :1163–1168.
61. Berger SH, Hakala MT. Relationship of dUMP and free FdUMP pools to inhibition of thymidylate synthase by 5-fluorouracil. *Mol Pharmacol*. 1984 ;25(2) :303–309.
62. Chazal M, Cheradame S, Formento J-L, Francoual M, Formento P, Etienne M-C, et al. Decreased folylpolyglutamate synthetase activity in tumors resistant to fluorouracil-folinic acid treatment : clinical data. *Clin Cancer Res*. 1997 ;3(4) :553–557.
63. Berger SH, Jenh CH, Johnson LF, Berger FG. Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. *Mol Pharmacol*. 1985 ;28(5) :461–467.
64. Houghton JA, Houghton PJ. 5-Halogenated pyrimidines and their nucleosides. In : *Antitumor Drug Resistance*. Springer ; 1984. p. 515–549. Disponible sur : [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-69490-5\\_19](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-69490-5_19)
65. Peters GJ, Van der Wilt CL, Van Groeningen CJ, Smid K, Meijer S, Pinedo HM. Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients : implications for treatment with fluorouracil. *J Clin Oncol*. 1994 ;12(10) :2035–2042.
66. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J J Clin Oncol*. oct 1997;15(10):3223-9.
67. Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, et al. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol*. 1994 ;12(12) :2640–2647.
68. Davies MM, Johnston PG, Kaur S, Allen-Mersh TG. Colorectal liver metastasis thymidylate synthase staining correlates with response to hepatic arterial floxuridine. *Clin Cancer Res*. 1999 ;5(2) :325–328.

69. Triest B van, Pinedo HM, Hensbergen Y van, Smid K, Telleman F, Schoenmakers PS, et al. Thymidylate Synthase Level as the Main Predictive Parameter for Sensitivity to 5-Fluorouracil, but not for Folate-based Thymidylate Synthase Inhibitors, in 13 Nonselected Colon Cancer Cell Lines. *Clin Cancer Res.* 1 mars 1999 ;5(3) :643-54.
70. Kinsella AR, Smith D, Pickard M. Resistance to chemotherapeutic antimetabolites : a function of salvage pathway involvement and cellular response to DNA damage. *Br J Cancer.* 1997 ;75(7) :935.
71. De Forni M, Bugat R, Sorbette F, Delay M, Bachaud JM, Chevreau C. Cardiotoxicité du 5-fluorouracile perfusion intraveineuse continue : étude clinique, prévention, physiopathologie. A propos d'une série de 13 cas. *Bull Cancer (Paris).* 1990 ;77(5) :429–438.
72. Lemaire L, Malet-Martino MC, Longo S, Martino R, de Forni M, Carton M. Fluoroacetaldehyde as cardiotoxic impurity in fluorouracil (Roche). *Lancet* 2 mars 1991 ;337(8740) :560.
73. Koenig H, Patel A. Biochemical Basis for Fluorouracil Neurotoxicity : The Role of Krebs Cycle Inhibition by Fluoroacetate. *Arch Neurol.* 1 août 1970 ;23(2) :155-60.
74. Yeh KH, Cheng AL. High-dose 5-fluorouracil infusional therapy is associated with hyperammonaemia, lactic acidosis and encephalopathy. *Br J Cancer.* 1997 ;75(3) :464-5.
75. Meta-Analysis Group In Cancer, Lévy E, Piedbois P, Buyse M, Pignon JP, Rougier P, et al. Toxicity of fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer : effect of administration schedule and prognostic factors. *J Clin Oncol.* nov 1998;16(11):3537-41.
76. Lemaire L, Malet-Martino MC, Longo S, Martino R, de Forni M, Carton M. Fluoroacetaldehyde as cardiotoxic impurity in fluorouracil (Roche). *Lancet* 2 mars 1991 ;337(8740) :560.
77. Stéphan F, Etienne MC, Wallays C, Milano G, Clergue F. Depressed hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil-related toxicities. *Am J Med.* déc 1995;99(6):685-8.

78. Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB, Diasio RB. Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res.* 1999 ;5(8) :2006–2011.
79. Van Kuilenburg AB, Van Lenthe H, Tromp A, Veltman PC, Van Gennip AH. Pitfalls in the diagnosis of patients with a partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin Chem.* janv 2000;46(1):9-17.
80. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renée N, et al. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* nov 1994 ;12(11):2248-53.
81. Johnson MR, Yan J, Shao L, Albin N, Diasio RB. Semi-automated radioassay for determination of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity. Screening cancer patients for DPD deficiency, a condition associated with 5-fluorouracil toxicity. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 29 août 1997 ;696(2) :183-91.
82. Mattison LK, Ezzeldin H, Carpenter M, Modak A, Johnson MR, Diasio RB. Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency by using a novel 2-13C-uracil breath test. *Clin Cancer Res.* 2004 ;10(8) :2652–2658.
83. van Staveren MC, Theeuwes-Oonk B, Guchelaar HJ, van Kuilenburg AB, Maring JG. Pharmacokinetics of orally administered uracil in healthy volunteers and in DPD-deficient patients, a possible tool for screening of DPD deficiency. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 ;68(6) :1611–1617.
84. Zhou ZW, Wang GQ, Wan DS, Lu ZH, Chen YB, Li S, et al. The dihydrouracil/uracil ratios in plasma and toxicities of 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer patients. *Chemotherapy.* 2007 ;53(2) :127–131.
85. Gamelin E, Delva R, Jacob J, Merrouche Y, Raoul JL, Pezet D, et al. Individual Fluorouracil Dose Adjustment Based on Pharmacokinetic Follow-Up Compared With Conventional Dosage : Results of a Multicenter Randomized Trial of Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 1 mai 2008 ;26(13) :2099-105.

86. Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM. Mutational analysis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test*. 2003 ;7(2) :97–105.
87. Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Soulie P, Craipeau MC, Traore S, et al. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther*. 2006 ;5(11) :2895–2904.
88. Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zoetekouw L, Van Gennip AH. Increased risk of grade IV neutropenia after administration of 5-fluorouracil due to a dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency : High prevalence of the IVS14+ 1g> a mutation. *Int J Cancer*. 2002 ;101(3) :253–258.
89. Savva-Bordalo J, Ramalho-Carvalho J, Pinheiro M, Costa VL, Rodrigues Â, Dias PC, et al. Promoter methylation and large intragenic rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. *BMC Cancer*. 2010 ;10(1) :1.
90. Coudore F, Roche D, Lefeuvre S, Faussot D, Billaud EM, Loriot M-A, 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*. 1 nov 2012 ;50(10) :877-84.
91. Chazotte B. Labeling Golgi with Fluorescent Ceramides. *Cold Spring Harb Protoc*. août 2012;2012(8):pdb.prot070599.
92. Agence européenne des médicaments -. Guideline on bioanalytical method validation. juill 2011. Report No. : EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2\*\*. Disponible sur : [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document\\_detail.jsp?webContentId=WC500109686%26mid=WC0b01ac058009a3dc](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500109686%26mid=WC0b01ac058009a3dc)
93. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int*. janv 2007;165(2-3):216-24.
94. Krouwer JS, Rabinowitz R. How to improve estimates of imprecision. *Clin Chem*. 1984 ;30(2) :290–292.

95. Validation des procédures analytiques : texte et méthodologie : ICH. 1994. Disponible sur : <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
96. Švobaitė R. Phénotypage et génotypage de l'activité de la dihydropyrimidine déshydrogénase chez des patients atteints de tumeurs solides avec métastases : Pharmacocinétique de la capécitabine [Internet]. Université de Montpellier I. UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques (1968-2014) ; 2009. Disponible sur : <http://www.theses.fr/2009MON13513>
97. van de Merbel NC. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *Trends Anal Chem.* nov 2008;27(10):924-33.
98. Markham D, Waechter J, Budinsky R, Gries W, Beyer D, Snyder S, et al. Development of a Method for the Determination of Total Bisphenol A at Trace Levels in Human Blood and Urine and Elucidation of Factors Influencing Method Accuracy and Sensitivity. *J Anal Toxicol.* mai 2014 ;38(4) :194-203.
99. Editors Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Septembre 2013. Disponible sur : <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf>

## SERMENT DE GALIEN



Je jure, en présence des maîtres de la faculté 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, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

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

## Résumé

### **Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'uracile (U) et du dihydro-uracile (UH<sub>2</sub>) dans le plasma par LC-MS/MS pour le phénotypage de la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD).**

Le cancer est l'une des causes majeures de mortalité et de morbidité dans le monde. Des millions d'hospitalisation par an de long et de court terme sont liées au cancer en France. Les fluoropyrimidines (5-FU et ses analogues) sont des molécules qui sont utilisées dans de nombreux protocoles de chimiothérapie. Le 5-FU administré en monothérapie ou en association dans des situations conventionnelles, adjuvantes ou métastatiques peut souvent induire des toxicités chez les patients atteints de cancer recevant cette chimiothérapie. Ces toxicités sont liées à un déficit de l'activité de la DPD, enzyme responsable de la dégradation du 5-FU. Un phénotypage de la DPD, en dosant dans le plasma son substrat endogène l'uracile (U) et le métabolite formé correspondant, le dihydro-uracile (UH<sub>2</sub>) permet de déterminer l'activité de l'enzyme. La méthode de dosage proposée ici permet le suivi pré-thérapeutique des patients recevant des traitements à base des fluoropyrimidines. Le dosage de l'U et du UH<sub>2</sub> dans le plasma par LC-MS/MS a été développé pour quantifier le ratio UH<sub>2</sub>/U en utilisant le Chloro-uracile (CIU) comme étalon interne. Les analytes ont été extraits par extraction liquide-liquide en utilisant un mélange d'acétate d'éthyle et d'isopropanol. La séparation UHPLC a été réalisée sur une colonne HSS T3 1.8 µm parcourue par un mélange de deux phases mobiles liquides A (eau avec 0,5% d'acide acétique) et de B (acétonitrile avec 0,5% d'acide acétique). Les transitions (m/z) de quantification étaient 113 → 70 pour U, 115 → 98 pour le UH<sub>2</sub>, 147 → 130 pour CIU. Le temps d'analyse par échantillon est de 6 minutes. La méthode est linéaire pour des concentrations allant de 0,625 à 60 ng/mL pour les deux analytes. La précision est bonne puisque les coefficients de variation sont inférieurs à 8% pour les niveaux haut et moyen de contrôle de qualité et intérieurs à 11% pour le niveau bas de contrôle de qualité. Les biais de la justesse sont tous inférieurs à 8% pour les trois niveaux de contrôle de qualité. La méthode de dosage de l'U et du UH<sub>2</sub> dans le plasma par LC-MS/MS a été validée, elle peut à présent être testée dans les conditions réelles de routine de laboratoire.

#### **Mots clés :**

5-FU, Uracile, dihydro-uracile, DPD, phénotypage, fluoropyrimidines, LC-MS/MS