

**MEMOIRE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 21 juin 2019**  
**Par M LARRUE Romain**

**conformément aux dispositions réglementaires en vigueur**  
**tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**INTERET DU SEQUENCAGE HAUT DEBIT**  
**DANS LA RECHERCHE DE DEFICIT EN**  
**DIHYDROPYRIMIDINE DESHYDROGENASE**

---

**Membres du jury :**

**Président :**

Professeur Jean-Louis CAZIN, Professeur des Universités, Université de Lille

**Assesseur(s) :**

Professeur Franck BROLY, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille

Docteur Nicolas POTTIER, Maître de Conférences Universitaire - Praticien Hospitalier, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille

Docteur Benjamin HENNART, Praticien Hospitalier, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille





## Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

## Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

## Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

## Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie

M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie

Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie
-----	-------	---------	--------------

## ***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**





## **Mes remerciements aux membres de mon jury,**

Au Président du jury,

### **Professeur Jean-Louis CAZIN**

Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille),

Docteur ès Sciences Pharmaceutiques,

Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie Clinique en Cancérologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre Régional de Lutte Contre le Cancer en Hauts de France),

Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens : Conseiller Ordinal élu (section H).

Merci de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse,

Merci de l'intérêt que vous avez porté à mon travail et de votre disponibilité,

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Au Directeur, conseiller de thèse

### **Docteur Benjamin HENNART**

Praticien Hospitalier au Centre de Biologie Pathologie Génétique (CHU Lille)

Merci pour l'honneur que tu me fais d'avoir été le directeur de cette thèse,

Merci pour l'aide précieuse apportée, pour le temps consacré et pour la patience qui a été nécessaire à l'élaboration de cette thèse.

Trouve ici l'expression de ma gratitude et de ma sincère reconnaissance.

Aux Assesseurs

### **Professeur Franck BROLY**

Professeur des Université Praticien Hospitalier, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU Lille.

Merci pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury,

Merci pour l'aide apportée et la confiance dont vous avez fait preuve envers moi,

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Et

### **Docteur Nicolas POTTIER**

Maitre de Conférences Universitaire - Praticien Hospitalier, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU Lille

Merci pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury,

Merci pour les conseils qui me permettent d'avancer et qui ont toujours leurs places,

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.



Je dédie cette thèse ...

*A mon père, à ma mère* qui ont toujours été présents et m'ont permis d'en arriver là,

*A mes frères* pour avoir su me guider et me montrer le chemin,

*Aux gosses* pour l'espoir qu'ils portent,

*A ceux qui ne sont plus là* mais qui ne sont pas oubliés,

*A mes amis* qui sont présents malgré tout,

*A mes co-internes,*

Merci d'avoir été à mes côtés.

Merci pour tous les bons moments passés (et à venir) et d'avoir été là pour les mauvais. Merci de me soutenir et de me donner les raisons d'avancer.

Merci à tous ceux qui ont permis la réalisation de ce travail et tous ceux qui me permettent de continuer.



# Sommaire

I.	Introduction.....	16
1.	Historique .....	16
2.	Domaines d'application .....	16
3.	But de l'étude .....	17
4.	Fluoropyrimidines .....	18
a.	Généralités.....	18
b.	Indications en cancérologie.....	18
c.	Toxicité.....	18
d.	Métabolisme.....	20
e.	Anabolisme .....	21
f.	Catabolisme .....	22
5.	DPD.....	23
a.	Généralités.....	23
b.	Variants génétiques principaux.....	24
c.	Détermination du phénotype .....	28
d.	Dépistage combiné .....	29
6.	Dihydropyrimidinase .....	30
7.	UGT1A1 .....	30
II.	Matériels et méthodes .....	32
1.	Population étudiée.....	32
2.	Phénotypage : valeurs limites.....	32
3.	Génotypage : panel utilisé .....	33
4.	Etudes Statistiques.....	33
5.	Formation des groupes pour les études statistiques .....	34
a.	Comparaisons Uracilémie et Ratio UH2/U .....	35
b.	Odd-Ratios .....	36
6.	Séquençage à haut débit.....	36

a.	Etape pré-analytique .....	36
b.	Séquençage haut débit / NGS.....	36
7.	Analyse des résultats .....	44
a.	Traitement bio-informatique .....	44
b.	Interprétation des données.....	45
8.	Phénotypage .....	48
a.	Etape pré-analytique .....	48
b.	Dosage de l'Uracile et du Dihydrouracile .....	49
III.	Résultats.....	52
1.	Etude des différents sous-groupes.....	52
2.	Mutations considérées comme délétères. ....	53
3.	UGT1A1 .....	54
IV.	Discussion .....	55
1.	Etude des différents sous-groupes.....	55
2.	Comparaison des Odd-Ratios .....	57
3.	Variant notable .....	59
4.	UGT1A1 .....	59
5.	Limites.....	61
a.	Autres causes d'origines génétiques.....	61
b.	Distribution allélique .....	63
c.	Difficulté de prédiction du phénotype .....	63
d.	Coût élevé.....	64
6.	Avantages .....	65
a.	Contraintes pré-analytiques faibles .....	65
b.	Meilleure efficacité de prédiction .....	65
c.	Possibilité d'associer d'autres gènes d'intérêt .....	66
d.	Fiabilité des résultats.....	67
7.	Autres facteurs à prendre en compte .....	67

a.	Délai de rendu de résultat .....	67
b.	Cycle circadien.....	67
8.	Axes d'amélioration .....	68
a.	Création d'une base de données .....	68
b.	Optimisation du coût .....	69
c.	Optimisation de l'analyse .....	70
9.	Conclusion.....	71
V.	Bibliographie.....	73
VI.	Annexes.....	79





# I. Introduction

## 1. Historique

La pharmacogénétique est apparue dans les années 1950 suite à l'observation de réponses interindividuelles différentes à un même médicament. Historiquement les premières descriptions ont été faites sur certains patients de phénotype « acétyleur lent » de l'isoniazide, une molécule anti-tuberculeuse. Bien que les connaissances dans ce domaine fussent encore limitées, notamment en génétique, la transmission mendélienne de ces caractères métaboliques permit de montrer leur origine constitutionnelle et héréditaire. Initialement diagnostiqué grâce à des dosages de médicaments, de leurs métabolites ou bien de certaines protéines, il fallut attendre l'amélioration des techniques biomoléculaires dans les années 80 pour voir l'évolution de la pharmacogénétique. Les responsabilités de certains gènes et de mutations bien précises dans l'apparition de différents phénotypes sont alors découvertes progressivement. Cependant, c'est réellement l'apparition de nouveaux tests génétiques et le séquençage du génome humain dans les années 2000 (et complété jusqu'en 2004) qui permit l'essor de cette discipline. Depuis, l'amélioration des connaissances ainsi que des techniques de séquençage de l'ADN n'ont cessé de s'améliorer en donnant une place grandissante à la pharmacogénétique. En parallèle, certains concepts ont émergé comme la médecine personnalisée, avec pour objectif d'adapter idéalement un traitement et sa posologie pour chaque patient, et notamment en fonction de ses caractéristiques génétiques. L'analyse pharmacogénétique permet alors de répondre à certaines de ces attentes sans toutefois être la solution unique à ces problématiques.

## 2. Domaines d'application

Etant principalement lié au métabolisme des médicaments, le rôle de la pharmacogénétique est transversal et concerne la plupart des spécialités médicales. Malgré tout, son utilisation reste encore trop limitée en routine dans la diminution de certains risques iatrogènes. On peut alors déplorer dans certains cas, une utilisation rétrospective de la pharmacogénétique afin d'expliquer un événement indésirable plutôt qu'une utilisation à but préventif/prospectif. Certaines disciplines sont particulièrement concernées avec l'utilisation des traitements présentant une forte toxicité ou une fenêtre thérapeutique étroite. Ces molécules à risques sont alors des cibles privilégiées pour les tests pharmacogénétiques. En oncologie, la prescription

d'analyses génétiques lors de la mise en place de certaines chimiothérapies est entrée dans la pratique quotidienne, certaines étant même obligatoires pour la délivrance du traitement. Nous pouvons citer notamment les fluoropyrimidines, qui sont le sujet de l'étude, et dont une analyse préalable est nécessaire.

### 3. But de l'étude

L'étude présentée ici concerne l'oncologie et l'analyse pharmacogénétique préalable à une chimiothérapie. Nous nous intéresserons particulièrement à une famille de molécules, les fluoropyrimidines dont le métabolisme est relativement bien connu. Une enzyme, la Dihydropyrimidine Deshydrogenase (DPD), a un rôle majeur dans la dégradation de ces molécules, mais peut présenter un déficit d'activité plus ou moins important. Depuis avril 2019 (suite aux recommandations de décembre 2018 de l'INCa et de la HAS [1] et de la note d'information de la DGOS de mars 2019 [2]), la recherche d'un déficit enzymatique de la DPD est devenue une analyse obligatoire pour la délivrance de certains traitements en France : le 5-FU et la Capécitabine (Xeloda®). Ces documents officiels imposent tout au moins d'avoir la mesure de l'uracilémie avant de délivrer et administrer ces molécules, avec un délai de rendu de résultat de 7 à 10 jours, afin de ne pas retarder la mise en place du traitement.

A l'heure actuelle, plusieurs analyses permettent de connaître le « statut DPD » du patient, chacune ayant des avantages mais aussi certaines limites. Au CHU de Lille cette recherche passe par une approche pharmacogénétique combinée, ayant recours d'une part au dosage de certains composés et d'autre part à des techniques biomoléculaires. La suite de l'étude portera alors sur l'intérêt du séquençage à haut débit du gène *DPYD* dans la recherche de déficit en DPD.

Une première partie regroupera quelques données épidémiologiques concernant l'oncologie et la DPD. Nous verrons les principales voies métaboliques de cette enzyme et quelques données sur le gène *DPYD* codant pour celle-ci. Par la suite, les différentes méthodes et techniques, de génotypage/séquençage et de phénotypage, utilisées au laboratoire du CHU de Lille seront détaillées. Finalement les résultats obtenus, issus d'une cohorte de presque 2500 patients, permettront de discuter des différentes méthodes et de répondre à la problématique initiale.

## 4. Fluoropyrimidines

### a. *Généralités*

La classe médicamenteuse des fluoropyrimidines regroupe 2 molécules principales, le 5-fluorouracile (ou 5-FU), administrable par voie parentérale et sa prodrogue : la capécitabine (carbamate du 5-fluorouracile) administrable par voie orale. Ces fluoropyrimidines sont des molécules médicamenteuses appartenant à la classe des antimétabolites, sous-classe des analogues de pyrimidines. Leur mécanisme d'action est l'inhibition de la synthèse d'ADN avec pour conséquence un effet cytotoxique sur la cellule [3] [4].

### b. *Indications en cancérologie*

Les fluoropyrimidines sont largement utilisées en cancérologie et font partie intégrante des traitements anticancéreux. Le plus souvent un traitement par acide folique y est associé afin d'améliorer leur efficacité. Le spectre d'action de ces molécules est large et concerne les tumeurs solides affectant la sphère colorectale, l'estomac, l'œsophage, le sein ou bien les voies aéro-digestives supérieures. Les fluoropyrimidines sont utilisées dans la moitié des traitements anticancéreux et sont présentes dans 45% des protocoles de chimiothérapies (jusqu'à 88% dans les cancers du sein voire 99% dans les cancers colorectaux). Il est estimé, à l'heure actuelle, que le nombre de patients ayant recours à une fluoropyrimidine est d'environ 80000 par an en France [1].

### c. Toxicité

La toxicité liée au 5-FU est souvent précoce, apparaissant dans les premiers jours après la mise en place du traitement ; elle sera donc dite « aiguë ». Elle sera plus ou moins sévère en fonction des patients ainsi que de leurs capacités à éliminer la molécule.

Les toxicités les plus fréquentes surviennent notamment au niveau des tissus à renouvellement cellulaire rapide, comme les cellules cutanées (sous forme de dermatites, d'érythrodermies palmo-plantaire ou bien d'alopécie), les cellules de la muqueuse de l'appareil digestif (entraînant nausées et vomissements, mucites, ulcérations de la muqueuse oropharyngée, diarrhées) ou les cellules hématopoïétiques (avec neutropénie, thrombopénie, anémie).

Les toxicités sévères liées au traitement peuvent être classées selon différents grades en fonction de la sévérité de l'effet indésirable.

Le tableau suivant (Tableau 1) définit ces événements indésirables selon leurs grades, d'après la classification CTCAE [5] (Common Terminology Criteria for Adverse Events) (version 5.0). Ces données sont des estimations et sont variables selon les études ([1] [6] [7] [8]).

**Tableau 1 : Incidences estimées des toxicités de grade 3 à 5 sous fluoropyrimidines**

Toxicité évaluée	Incidence	Définition
Grade 3 : toxicité globale	10-30%	Effet indésirable sévère ou médicalement significatif, mais sans mise en jeu immédiate du pronostic vital, conduisant à une hospitalisation ou prolongation d'hospitalisation, invalidant et/ou interférant avec les activités élémentaires de la vie quotidienne.
Grade 4 : toxicité sévère	3-5%	Effet indésirable mettant en jeu le pronostic vital et nécessitant une prise en charge en urgence.
Grade 5 : toxicité létale	0,1-1%	Décès lié à l'effet indésirable.

Les incidences des toxicités évaluées dans les différentes études sont variables car dépendent de plusieurs facteurs, notamment liés au patient. Les éléments à prendre en compte sont :

Le type de tumeur : Le 5-FU est largement utilisé dans de nombreux types de cancers, plus ou moins agressifs. La toxicité observée est parfois difficile à distinguer entre les conséquences cliniques liées à la pathologie et l'effet indésirable médicamenteux.

La molécule utilisée (5-FU, Capécitabine) et ses modalités d'administration : bolus ou perfusion continue (5-FU), voie orale (Capécitabine).

La nature de l'évènement indésirable considéré : organe/sphère d'organe touché, grade et délai d'apparition de la toxicité.

Etat clinique du patient et présence de comorbidités : âge, sexe, fonction rénale, état de santé général [9].

Traitement en monothérapie, ou en association avec d'autres molécules anticancéreuses. Les protocoles utilisés étant souvent l'association de plusieurs

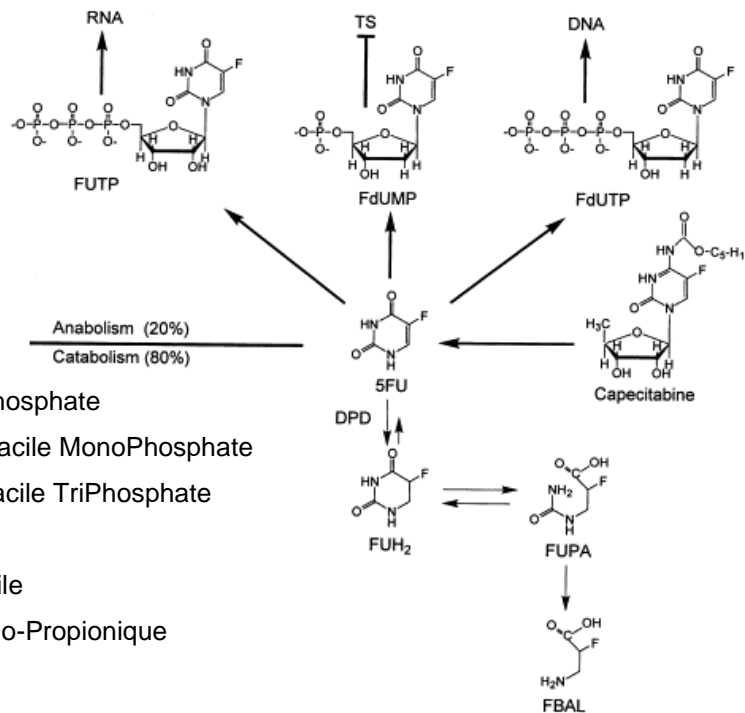
molécules cytotoxiques (exemple de l'association 5-FU, Acide Folinique, Irinotecan et Oxaliplatine dans le protocole FOLFIRINOX), il est donc difficile d'établir la responsabilité d'une toxicité sévère liée spécifiquement aux fluoropyrimidines.

Au final, la toxicité des fluoropyrimidines est relativement complexe à étudier, pouvant être directement liée au patient et son état général de santé. Les symptômes observés peuvent être dus à différentes causes : type et agressivité du cancer, traitements associés,... la responsabilité des fluoropyrimidines peut alors être difficile à affirmer. Cependant, au vu du grand nombre de patients traités, il est évalué que l'apparition d'effets indésirables sévères (grade 3 à 5) toucherait 15 à 40% des patients [6] [7] [8] [10] soit entre 12000 et 32000 patients par an. Les conséquences peuvent aller de l'arrêt du traitement temporaire ou définitif, jusqu'à une hospitalisation plus ou moins longue en vue de traiter les différentes complications, voire même au décès. Quelle que soit la gravité de l'atteinte, cela est responsable dans tous les cas d'une perte de chance pour le patient avec un retard au traitement ou la perte d'un traitement dans l'arsenal thérapeutique. Le nombre estimé de décès dont la cause est directement liée au traitement par fluoropyrimidines est de 0,5 à 1% des patients [1] [6] [8] [11] soit aux alentours de 500 patients par an.

#### *d. Métabolisme*

Les fluoropyrimidines ne sont pas des molécules directement actives mais nécessitant une métabolisation préalable *in vivo*. De plus, la Capécitabine est un précurseur (carbamate de la fluoropyrimidine), qui sera transformé en 5-FU suite à plusieurs étapes enzymatiques. La première étape de métabolisation du 5-FU comporte deux voies principales : une voie anabolique permettant la synthèse de métabolite responsable de l'activité pharmacologique, et une voie catabolique ayant pour but l'élimination du 5-FU.

Les différentes voies d'élimination et de métabolisation en molécules actives sont résumées dans la Figure 1 : Voies métaboliques des Fluoropyrimidines[12] et seront détaillées par la suite.



- FUTP : Fluorouracile TriPhosphate  
 FdUMP : Fluoro desoxyUracile MonoPhosphate  
 FdUTP : Fluoro desoxyUracile TriPhosphate  
 5FU : 5-FluoroUracile  
 FUH<sub>2</sub> : DihydroFluoroUracile  
 FUPA : acide Fluoro-Uréido-Propionique  
 FBAL : α-Fluoro-β-Alanine

Figure 1 : Voies métaboliques des Fluoropyrimidines

#### e. Anabolisme

La voie principale de métabolisation du 5-FU se déroule au niveau intracellulaire, entraînant la formation de 5-FdUMP (5-fluorodésoxyuridine monophosphate). Le 5-FdUMP ainsi synthétisé va alors inhiber la Thymidilate Synthase (TS) en formant un complexe, le 5-FdUMP-TS. La Thymidilate Synthase est une enzyme clé dans la méthylation d'UMP (uracile monophosphate) en TMP (thymidine monophosphate). La TMP étant un désoxyribonucléotide, unité élémentaire composant l'ADN, son rôle est indispensable dans la synthèse *de novo* d'ADN. En parallèle, l'acide folique sera aussi métabolisé pour former le 5,10-méthylène tétrahydrofolate. Le complexe précédemment formé, le 5-FdUMP-TS, va être stabilisé par ce 5,10-méthylène tétrahydrofolate et permettre une inhibition durable de la TS par le 5-FdUMP. C'est pour cela que l'acide folique accompagne le traitement par 5-FU.

Au final, la synthèse endogène de TMP est alors bloquée. L'inhibition de la synthèse *de novo* d'ADN empêche alors la réplication cellulaire et donc responsable de l'effet cytotoxique.

Deux autres voies secondaires métaboliques moins connues et de moindre importance, ont aussi un rôle dans l'efficacité des fluoropyrimidines. En plus du 5-FdUMP, le 5-FU peut aussi être métabolisé en 5-fluorouridine triphosphate (5-FUTP) et en 5-fluorodésoxyuridine triphosphate (5-FdUTP). Le 5-FUTP sera incorporé aux différents ARN (ARN messagers, ARN de transfert et ARN ribosomiaux) interférant

avec leurs maturations. Les étapes de traduction et de transcription vont être alors impactées. Le 5-FdUTP, dont le rôle est plus limité, est assimilé à un désoxyribonucléotide et pourra s'incorporer directement au niveau de l'ADN provoquant sa fragmentation. Ces deux mécanismes d'action sont aussi à l'origine d'un effet cytotoxique complémentaire mais de plus faible importance. La Figure 2 [13] résume ces mécanismes d'actions et les différentes interactions présentes.

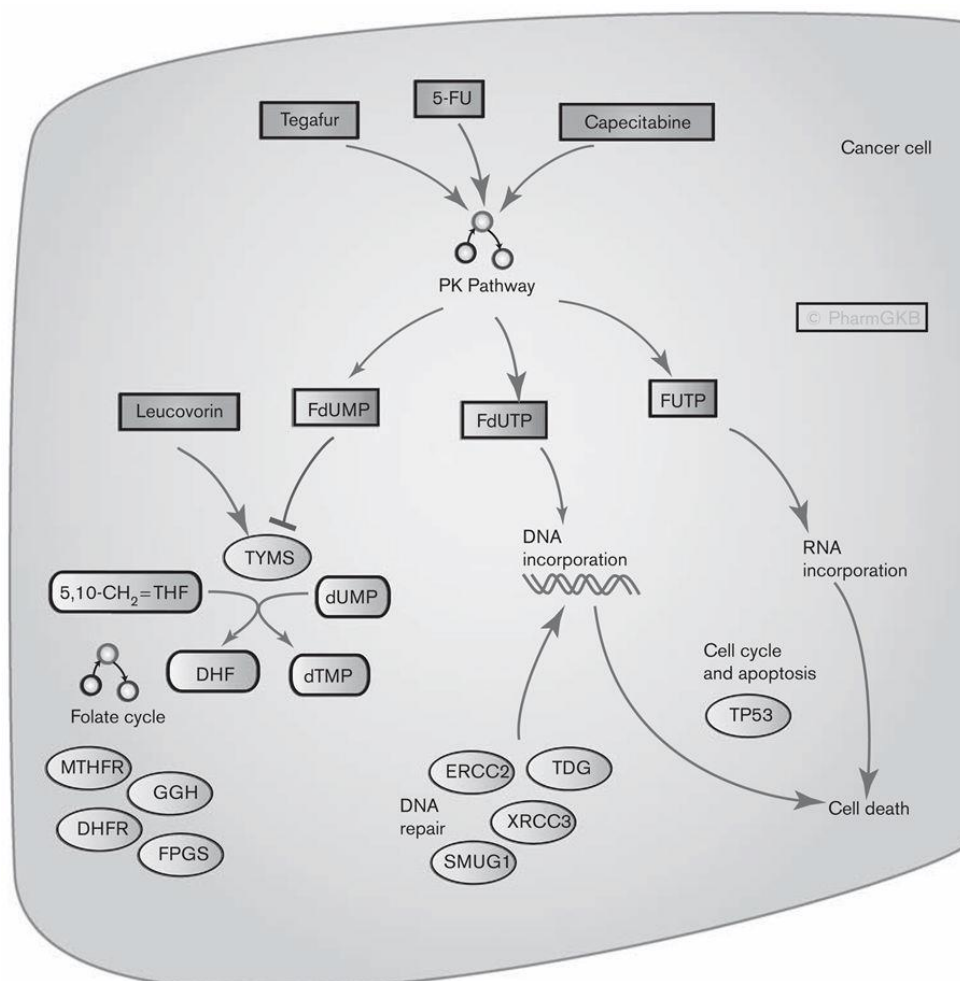


Figure 2 : Voies anaboliques des Fluoropyrimidines [13]

#### f. Catabolisme

La transformation *in vivo* du 5-FU en vue de son élimination sera majoritairement liée à son catabolisme en dérivés inactifs grâce à plusieurs enzymes. La première étape est une étape limitante et fait intervenir la Dihydropyrimidine Deshydrogenase (DPD). Le mécanisme d'action de la DPD sera détaillé par ailleurs.



## 5. DPD

### a. Généralités

La Dihydropyrimidine Deshydrogenase, ou DPD, est une enzyme codée par le gène *DPYD*, ayant un rôle dans le catabolisme des bases pyrimidiques (Uracile et Thymidine) et des fluoropyrimidines (5-FU et Capécitabine). Le gène *DPYD* est localisé sur le chromosome 1 (1p21.3) et constitué de 23 exons pour une taille d'environ 950 kilobases. La DPD est formée de 1025 acides aminés pour une masse de 111401 Da [14]. Cette enzyme est présente dans la plupart des tissus, avec cependant une activité maximale dans certains types de cellules, comme les lymphocytes circulants ou les hépatocytes.

L'activité principale de la DPD est une activité endogène permettant le catabolisme de l'uracile. Secondairement, elle possède une activité exogène permettant l'élimination du 5-FU par réduction en 5-fluorodihydrouracile (5-FUH<sub>2</sub>). Dans la plupart des tissus, notamment des lymphocytes, environ 80 à 85% du 5-FU est métabolisé en 5-FUH<sub>2</sub>. Au niveau hépatique, deux enzymes supplémentaires : la dihydropyrimidinase et la β-uréidopropionase, permettent l'élimination du 5-FUH<sub>2</sub> en le catabolisant en 5-fluorouréidopropionique acide (5-FUPA) puis en α-fluoro-β-alanine (FBAL) et en urée.

Au final seul un faible pourcentage de 5-FU administré, environ 15 à 20%, permet un effet pharmacologique, le reste étant métabolisé en dérivés non actifs et éliminés. En pratique, la posologie administrée au patient prend totalement en compte la faible proportion de 5-FU efficace et est ajustée en conséquence. Dans ces conditions, il est donc facile d'imaginer qu'un défaut de son élimination (par exemple, passant de 80 à 60%) entraîne une augmentation drastique de sa concentration et de son accumulation (la dose active passant de 20 à 40%, soit le double de la dose attendue), avec comme conséquences des effets indésirables plus sévères.

L'ensemble des réactions cataboliques conduisant à la dégradation du 5-FU sont donc déterminées par la première étape impliquant la DPD. Cette étape est limitante et les variations d'activité enzymatique auront un impact fort sur l'élimination. Ainsi la mise en place d'un traitement comprenant du 5-FU pourra entraîner un risque de toxicité aiguë augmentée chez les patients ayant une activité enzymatique de la DPD diminuée voire létale dans les cas d'une enzyme totalement déficiente.

La fréquence de ces sujets porteurs de déficit enzymatique peut varier selon l'origine géographique et ethnique. Le déficit est alors plus ou moins sévère en fonction de la



mutation présente chez le patient ou du nombre d'allèles atteints. On pourra alors distinguer :

- Les déficits partiels qui regroupent les mutations totalement délétères hétérozygotes et les mutations partiellement délétères hétérozygotes et homozygotes. Dans ce cas, l'enzyme conserve une activité diminuée et le déficit enzymatique reste partiel. Il est estimé que 3 à 8% de la population Caucasienne est concernée.
- Les déficits complets qui résultent d'une mutation totalement délétère touchant les 2 allèles ou plus rarement un seul allèle mais accompagné d'une délétion ou d'un grand réarrangement du gène sur l'autre allèle. Dans ces deux cas aucune synthèse protéique aboutissant à une enzyme active ne sera présente et conduira à une activité enzymatique quasi nulle. La prévalence des déficits complets est estimée entre 0,01 à 0,05% [7] [15].

#### *b. Variants génétiques principaux*

Le gène *DPYD* codant pour la DPD possède un grand nombre, plus d'une centaine, de variants référencés [16]. Cependant, la plupart d'entre eux sont assez rares et leurs conséquences fonctionnelles sur l'activité enzymatique sont peu documentées. Plusieurs de ces variants plus ou moins fréquents ont pu être associés à un déficit d'activité de la DPD et responsables d'une toxicité sous fluoropyrimidines. En pratique, les variants les plus importants sont :

- NM\_000110.3(DPYD):c.1905+1G>A, IVS14+1G>A, allèle DPYD\*2A
- NM\_000110.3(DPYD):c.1679T>G, p.I560S, allèle DPYD\*13;
- NM\_000110.3(DPYD):c.2846A>T, p.D949V
- Haplotype B3 (ou hapB3).

L'annexe 1 regroupe l'ensemble des allèles de *DPYD* avec leur nomenclature.

Ces variants ont des fréquences et des effets délétères plus ou moins importants, mais sont les plus étudiés car leurs conséquences fonctionnelles ont été prouvées aussi bien *in vitro* [17] qu'*in vivo* [18] [19]. Malgré tout, il est très probable que d'autres variants encore non étudiés ou dont les responsabilités n'ont pas été mises en évidence soient liés à une diminution d'activité de la DPD.

Certaines recommandations concernant le génotypage du gène *DPYD* préconisent alors au minimum la recherche des 3 premiers variants [20] ou des 4 [7] [21], lorsque l'haplotype B3 est pris en compte.

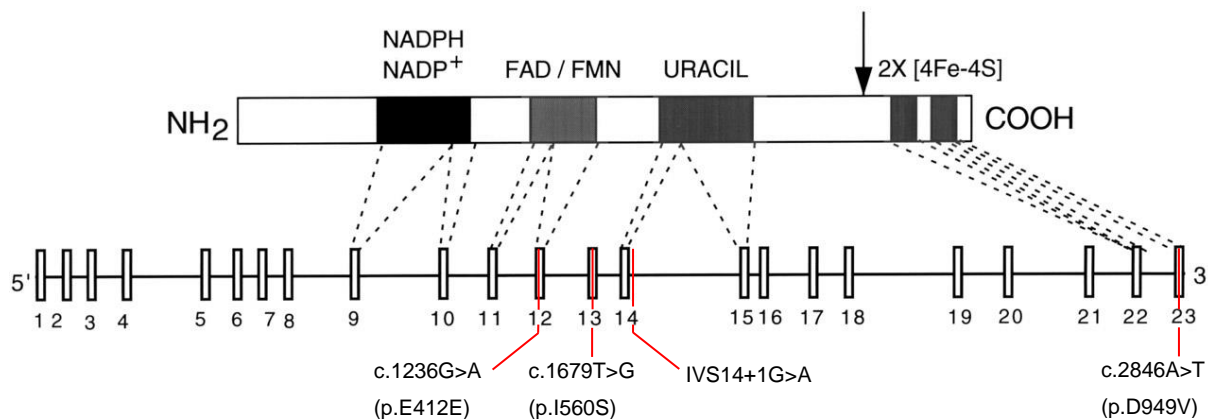


Figure 3 Schéma du gène *DPYD* et des domaines fonctionnels de la protéine.

Sur la Figure 3 [14], le gène *DPYD* (bas) est représenté avec les 4 variants principaux. La protéine (haut) ainsi que ses domaines fonctionnels sont mis en correspondance avec les exons. La zone fléchée indique une zone catalytique sensible.

**c.1905+1G>A** (IVS14+1G>A ; rs3918290 ; allèle *DPYD*\*2A) : ce variant est responsable de la perte de l'exon 14 lors de l'épissage, entraînant la synthèse d'une protéine tronquée. Cet exon code en partie le site de liaison de la DPD aux pyrimidines rendant l'activité catalytique de l'enzyme nulle. En résulte que les patients porteurs de cette mutation à l'état hétérozygote possèdent une activité de la DPD diminuée de 50%, tandis que chez les patients homozygotes la DPD est totalement inactive [11] [22] [23] [24] [25]. Cette mutation entraînant une activité totalement déficitaire de la DPD, le 5-FU n'est quasiment plus éliminé.

**c.2846A>T** (p.D949V ; rs67376798) est une mutation faux-sens, où une Valine remplace un Acide aspartique en position 949, au niveau de l'exon 22. Cette mutation se trouve au niveau du site 4Fe-4S, créant une interférence dans le transport d'électrons affectant alors la liaison de la DPD à certains cofacteurs. Les données de la littérature s'accordent pour estimer la diminution d'activité de la DPD de 20 à 30% chez les patients hétérozygotes [11] [17] [24] [25]. Chez les patients homozygotes, le risque d'effets indésirables mortels liés à un surdosage est augmenté [21].

**c.1679T>G** (p.I560S ; rs55886062 ; allèle *DPYD*\*13) est une mutation faux-sens où une Serine remplace une Isoleucine en position 560 au niveau de l'exon 13. Ce variant est le plus rare des quatre couramment recherchés. De plus, les prédictions de ses conséquences fonctionnelles sont parfois contradictoires avec pour hypothèse qu'une région importante de l'enzyme serait déstabilisée. L'activité serait

diminuée jusqu'à 60 % chez les patients hétérozygotes et de 75 % chez les patients homozygotes [22] [24] [25].

**L'haplotype B3 (HapB3)** correspond à un allèle présentant 5 polymorphismes en déséquilibre de liaison. Cela signifie que la répartition de ces polymorphismes ne suit pas une distribution aléatoire, mais qu'il existe une association préférentielle de ceux-ci sur le même allèle. Parmi eux, une mutation synonyme (c.1236G>A, p.E412E) et quatre se situant dans des régions introniques (c.1129-5923C>G, c.483+18G>A, c.959-51T>G, c.680+139G>A) [26]. Les variants c.1236G>A (variant exonique) et c.1129-5923C>G (variant intronique) sont dits en déséquilibre de liaison complet ; ils sont donc toujours associés [27]. Ainsi la mise en évidence du variant c.1236G>A nous indiquera, dans la totalité des cas, la présence du variant c.1129-5923C>G. Ce dernier est localisé dans l'intron 10 et serait responsable d'un épissage aberrant de *DPYD*, conduisant à une diminution d'activité de 20 à 35 % chez les patients hétérozygotes et jusqu'à 50% chez les patients homozygotes [24] [25] [26] [28].

**Tableau 2 : Fréquences alléliques estimées dans la population caucasienne des 4 variants principaux délétères de *DPYD* [1] [10] [15] [17] [24] [29]**

Variant <i>DPYD</i>	Fréquence allélique	Patient Hétérozygote		Patient Homozygote	
		Fréquence	Activité DPD résiduelle	Fréquence	Activité DPD résiduelle
IVS14+1G> Allèle <i>DPYD</i> *2A	0,80%	1,5%	50%	0,01%	0%
c.2846A>T (p.D949V)	0,60%	1,0%	70-80%	0,004%	50%
Haplotype B3	2,40%	4,6%	65-80%	0,06%	50-80%
c.1679T>G (p.I560S) allèle <i>DPYD</i> *13	0,10%	0,2%	40%	0,0001%	25%

D'autres variants génétiques sont d'intérêt par leur impact supposé sur l'activité de la DPD ou par leur fréquence allélique spécifique à une population.

**c.557A>G (p.Y186C ; rs115232898)** est une mutation faux-sens, où une Cystéine remplace une Tyrosine en position 186, au niveau de l'exon 6. Cette mutation est relativement fréquente (fréquence allélique de 2,3%) et présente quasi uniquement dans les populations d'origine africaine [30] [31]. De plus, plusieurs études tendent à montrer que les patients porteurs hétérozygotes de cette mutation ont une activité

DPD diminuée [30] [31]. La plupart des études étant européennes ou nord-américaines, ce variant est souvent très peu représenté dans les cohortes constituées principalement de patients d'origine caucasienne.

**c.496A>G (p.M166V ; rs2297595)** est une mutation faux-sens, où une Valine remplace une Méthionine en position 166, au niveau de l'exon 6. Cette mutation est relativement fréquente (fréquence allélique de 8.6% dans la population générale, et jusqu'à 17,9% dans la population européenne). Les études concernant ce variant sont discordantes et montrent aussi bien sa présence chez des patients ayant une activité normale de la DPD que chez des patients ayant une activité enzymatique réduite voire ayant présenté une toxicité au 5-FU [32] [33].

Finalement, hormis les 4 variants principaux présentant des preuves fortes dans leur contribution dans la diminution de l'activité enzymatique, il existe un ensemble de mutations dont l'impact sur la DPD n'est pas prouvé voire discordant. Parmi ces mutations, certaines montrent *in vitro* des diminutions d'activité peu importantes voire non significatives avec une fréquence allélique élevée et peuvent alors s'apparenter à des polymorphismes. De plus, la présence d'une mutation à l'état hétérozygote ou homozygote n'aura pas les mêmes conséquences sur l'activité enzymatique. Un effet délétère sur la DPD pourra dans certains cas n'être visible que si la mutation est présente sur les deux allèles. Par ailleurs, si sa fréquence allélique est faible, les patients homozygotes seront rares et la corrélation entre la clinique (avec la survenue ou non d'effets indésirables) et le génotype sera compliquée à établir.

Il est aussi à noter que les études se basent autant sur des résultats obtenus *in vitro* [17], via différentes méthodes non standardisées estimant avec plus ou moins d'incertitude l'activité DPD réelle, que des résultats obtenus *in vivo* étudiant les liens entre les toxicités observées et la présence de mutation(s) [18] [21] [34]. Concernant les études rétrospectives (se basant sur les effets indésirables / la toxicité), la recherche d'une mutation *a priori* ou *a posteriori* peut aussi entraîner un biais dans la représentativité de celles-ci. Une mutation avec une fréquence allélique élevée sera retrouvée dans de nombreux cas de toxicité, sans forcément en être la cause, avec un risque de surinterprétation de son impact réel. Au contraire il sera très difficile d'être statistiquement significatif et d'affirmer la responsabilité d'un variant dans une toxicité si sa fréquence est très faible.

Par ailleurs, de nombreux facteurs étudiés sont souvent très hétérogènes selon les publications et ne permettent que difficilement de réaliser une méta-analyse

cohérente. Les différents types de cancer, l'origine ethnique des cohortes, leur état de santé initial, la gradation des toxicités, la présence d'un seul ou plusieurs variants,... ne sont pas toujours pris en compte et ne permettent pas de conduire à des résultats suffisamment homogènes afin de réaliser une étude statistique viable et d'affirmer l'implication d'une mutation dans un déficit en DPD.

En dernier lieu, l'étude du gène *DPYD* dans le cas de grandes cohortes est souvent restreinte à la recherche des 4 mutations préconisées par une technique ciblée. Il est donc impossible dans ces conditions de mettre en évidence de nouveaux variants si la méthode en elle-même ne les recherchait pas. Pour pallier à cette limitation, une analyse du gène complet est alors nécessaire afin d'améliorer la recherche de mutations, documentées ou non.

### c. Détermination du phénotype

En complément, l'activité de la DPD peut aussi être mesurée de manière plus directe en réalisant un phénotypage. Cette méthode reflètera l'activité fonctionnelle de la DPD en prenant en compte les différents éléments génétiques (variants de *DPYD* non connus, association de plusieurs variants, variants sur d'autres gènes), et non génétiques ayant un impact sur cette activité comme son rythme circadien [35] [36] [37] ou ses variations inter-individuelles.

Plusieurs méthodes ont alors pour but d'établir une corrélation entre l'activité *in vitro* et *in vivo* de la DPD en vue de détecter tout déficit enzymatique et de savoir si le 5-FU sera bien éliminé afin de prévenir une toxicité éventuelle [38].

#### • Mesure de l'activité DPD intra-leucocytaire

Cette méthode est une mesure de l'activité de la DPD dans les cellules mononuclées du sang périphérique. A l'heure actuelle, elle est considérée comme la méthode de référence en étant la plus directe et reflétant au mieux l'activité *in vivo* de la DPD [39]. Il s'agit d'une analyse effectuée par méthode radio-enzymatique dans les cellules mononuclées du sang périphérique. La DPD est en quantité relativement élevée, notamment dans les lymphocytes, et permet d'estimer l'activité au niveau du foie (les cellules hépatiques n'étant que difficilement accessibles).

Cependant cette méthode est loin d'être idéale. En pratique, il s'agit d'une méthode nécessitant l'utilisation de radio-éléments, qui est longue et délicate à mettre en place. De plus les données concernant cette technique sont contradictoires sur sa corrélation avec les paramètres pharmacocinétiques du 5-FU et sur son intérêt à prévenir une toxicité sévère chez les patients porteurs d'un variant délétère [24].

- **Mesure de l'Uracilémie et du ratio UH2/U**

En pratique, le phénotype d'un patient pour la DPD peut être estimé soit par le dosage seul de la concentration en uracile (l'uracilémie), soit en calculant le ratio UH2/U (Dihydrouracile/Uracile); l'uracile étant le substrat naturel de la DPD et l'UH2 (le Dihydrouracile) son métabolite. La méthode de dosage des concentrations de ces deux molécules la plus courante se base sur l'HPLC ou l'UPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) couplée à différents systèmes de détection (spectrométrie de masse, spectrophotométrie UV) [40] [41] [42]. Actuellement plusieurs études, ainsi que les recommandations, considèrent une augmentation des risques de toxicité au-delà d'une certaine uracilémie (16 ng/mL) [11] [43] [44] ou en deçà d'un certain ratio UH2/U (seuil variable selon les études) [18] [45] [46].

Cependant les intervalles de valeur (uracilémie et ratio) pour les patients présentant un phénotype compatibles avec une activité normale et les patients présentant certains variants délétères sont très larges. Certains patients « normaux » auront parfois une uracilémie supérieure à 16 ng/mL alors que des patients à risque de toxicité présenteront des taux inférieurs. Ces variations interindividuelles étant importantes, il sera donc difficile d'évaluer *a priori* le phénotype d'un patient partiellement déficitaire en ne se basant que sur le rapport UH2/U ou l'uracilémie. Cette méthode sera cependant très efficace pour les patients présentant un déficit complet car les valeurs seront très fortement modifiées, ne laissant que peu de place au doute.

#### *d. Dépistage combiné*

Cette méthode consiste à réaliser concomitamment le phénotypage et le génotypage chez un patient. Chacune de ces méthodes prise séparément n'assure pas un dépistage total de tous les patients déficitaires. Un déficit enzymatique d'origine non génétique ne sera pas dépisté par le génotypage seul, et de la même façon, un patient avec certains variants génétiques peut éventuellement présenter un phénotype normal. L'utilisation de façon combinée du génotypage (par recherche des 4 mutations) et du phénotypage n'est pas recommandée [1] car il n'apporte pas significativement une augmentation de spécificité et/ou sensibilité dans le dépistage des déficits en DPD [11]. Le séquençage complet du gène *DPYD* n'est que rarement réalisé et n'est donc pas une méthode étudiée et comparée. Il semble toutefois justifié d'avoir une pratique la plus complète quand cela est possible afin d'éviter un maximum d'évènements indésirables liés à un déficit en DPD.



## 6. Dihydropyrimidinase

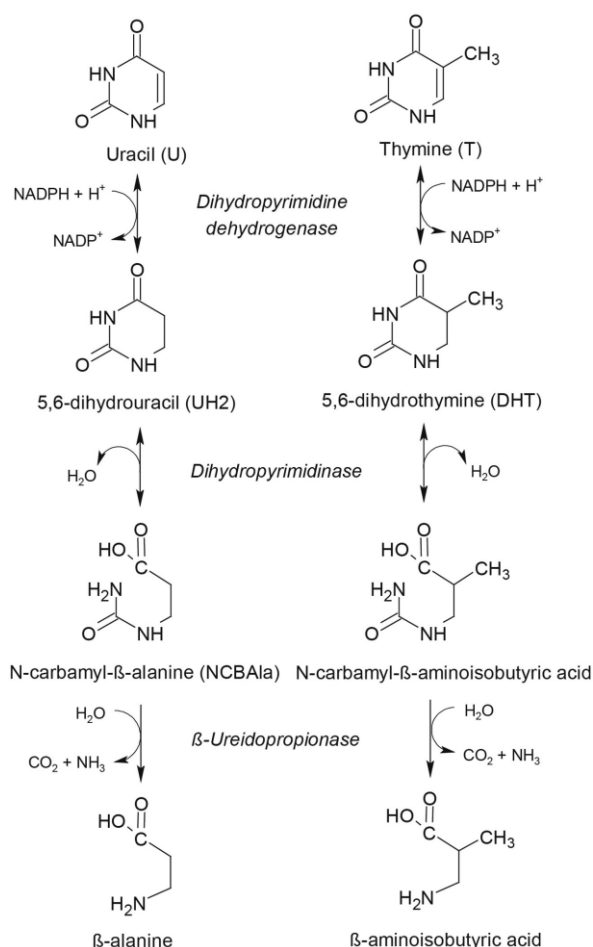


Figure 4 : Voie catabolique de l'uracile

La dihydropyrimidinase est codée par le gène *DPYS*, et intervient à la suite de la DPD en prenant en charge l'uracile endogène et les dérivés inactifs issus de la dégradation du 5-FU (Figure 4 [19]). Cette enzyme est peu étudiée et ses variants génétiques beaucoup moins documentés que la DPD mais son rôle dans l'élimination des dihydropyrimidines ne serait pas négligeable. L'activité de la DPD, en plus d'avoir une activité d'élimination du 5-FU, possède dans certaines conditions une activité inverse menant à sa « rétro-synthèse ».

En cas de déficit total en dihydropyrimidinase, une hypothèse serait que le 5FUH<sub>2</sub> (métabolite du 5-FU) s'accumulerait en grande quantité. Ces conditions de fortes concentrations en

5FUH<sub>2</sub> peuvent alors conduire à la reformation de 5-FU. Ainsi même si la dihydropyrimidinase n'est que secondaire dans l'élimination du 5-FU, son déficit pourrait être à l'origine d'un surdosage et éventuellement d'une toxicité [47].

## 7. UGT1A1

En plus des gènes *DPYD* et *DPYS*, un troisième gène *UGT1A1* sera partiellement impliqué dans une partie de l'étude présentée ici. Ce gène code pour l'UDP Glucuronyl-Transférase 1A1, une enzyme notamment responsable au niveau hépatique de la conjugaison de la bilirubine à l'acide glucuronique et dont des anomalies sont à l'origine du syndrome de Gilbert et de la maladie de Crigler-Najjar [48] [49], ainsi que de la survenue de certaines toxicités [50]. A noter que de nombreux médicaments sont également métabolisés par l'UGT1A1. L'exemple le plus classique est la survenue d'une toxicité sévère (neutropénie, diarrhée) à l'Irinotecan, un traitement utilisé dans la chimiothérapie du cancer colorectal. L'Irinotecan est notamment indiqué dans ce type de cancer en traitement de

première ligne, notamment dans les protocoles de chimiothérapie FOLFIRINOX (association de 5-FU, d'acide folinique et d'oxaliplatine) ou FOLFIRI (association de 5-FU et d'acide folinique) ou en seconde ligne, en monothérapie, après échec d'un traitement comportant du 5-FU. Les causes de cet échec du 5-FU peuvent être une efficacité insuffisante ou une toxicité nécessitant l'arrêt d'utilisation de cette molécule. Egalement, dans le cadre d'un déficit complet en DPD, l'utilisation de 5-FU est déconseillée et le recours à d'autres chimiothérapies est nécessaire.

Un variant bien connu de ce gène peut être mis en évidence pour dépister une activité UGT1A1 réduite. Il est caractérisé par une anomalie de la région promotrice du gène qui affecte sa transcription. Ce variant d'*UGT1A1*: NM\_000463.2(*UGT1A1*):c.-41\_-40dupTA ou *UGT1A1*\*28 est constitué par la répétition d'un septième motif TA: A(TA)<sub>7</sub>TAA (cf Figure 5 : Analyse Sanger d'un patient homozygote *UGT1A1*\*28/\*28), au sein de la TATAA box qui, normalement, n'en comporte que 6: A(TA)<sub>6</sub>TAA.

Cet allèle *UGT1A1*\*28 à l'état homozygote et le déficit d'activité enzymatique qui en résulte, peuvent être, pour cette raison, à l'origine d'anomalies de réponse à certains médicaments et d'une augmentation des effets indésirables [51] [52].

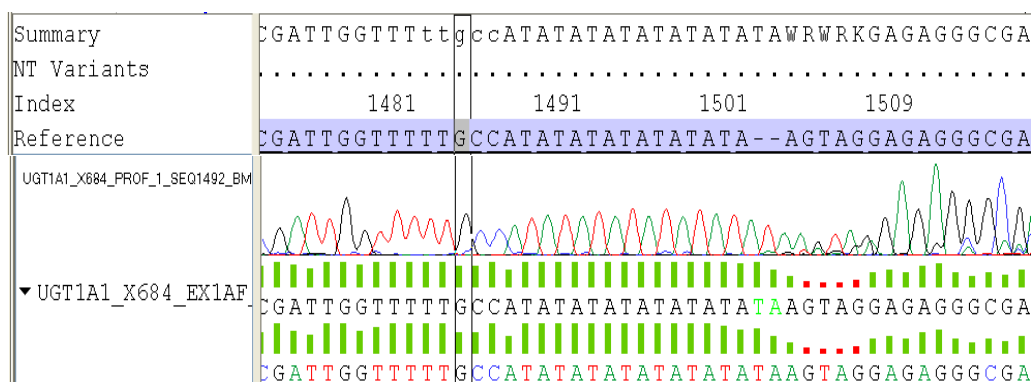


Figure 5 : Analyse Sanger d'un patient homozygote *UGT1A1*\*28/\*28

Sur cet exemple, le patient présente un 7<sup>ème</sup> motif (TA) absent du génome de référence et est homozygote pour cet allèle.



## II. Matériels et méthodes

### 1. Population étudiée

Le séquençage complet du gène *DPYD* a été proposé par le laboratoire de pharmacogénétique du CHU de Lille dès juillet 2017 aux prescripteurs et réalisé de façon systématique lors des demandes de génotypage. Les données collectées regroupent la période de juillet 2017 à janvier 2019. Durant cette période nous ne prendrons en compte que les patients ayant eu une analyse combinée, c'est-à-dire comprenant un génotypage accompagné d'un phénotypage. Les phénotypages et les génotypages prescrits seuls ne seront pas pris en compte car ne permettent pas d'établir de corrélation entre les deux. Par ailleurs il n'est pas possible dans ce cas de réaliser les analyses *a posteriori*. La recherche de déficit en DPD par méthode combinée (phénotypage + séquençage complet du gène *DPYD*) a été réalisée chez tous les patients de notre cohorte. S'agissant d'une analyse génétique, un consentement libre et éclairé a également été signé lors d'une consultation préalable avec un oncologue pour tous les patients inclus dans cette étude (en accord avec l'article 16-10 du code civil, modifié par la loi n°2004-800 du 6 août 2004 - art. 4 JORF 7 août 2004).

L'ensemble de ces patients ont eu recours à une chimiothérapie à base de fluoropyrimidines. Le recrutement a été réalisé dans de nombreux centres de la région Hauts-de-France. Les établissements concernés sont : le Centre Régional de lutte contre le cancer (340 patients), les Centres Hospitaliers Universitaires de Lille et Amiens (241 et 22 patients), les Centres Hospitaliers périphériques de la région (638 patients) et les structures privées (cliniques) spécialisées en oncologie ou radiothérapie (1210 patients). L'ensemble de notre cohorte regroupe 2451 patients.

Pour ces patients, seuls les paramètres relatifs à la recherche de déficit en DPD vont être étudiés. Les données comme le type de cancer, les comorbidités éventuelles ou la fonction rénale ne sont pas connues.

### 2. Phénotypage : valeurs limites

Un patient est donc considéré comme ayant une activité enzymatique normale pour une uracilémie <16 ng/mL ou un ratio >6, partiellement déficitaire pour une uracilémie entre 16 et 150 ng/mL ou un ratio entre 3 et 6, et déficitaire complet pour une uracilémie >150 ng/mL ou un ratio >3 (Tableau 3 [11] [43] [44]).

Tableau 3 Phénotype des patients selon leur uracilémie ou leur ratio UH2/U

	Phénotypage	
	Uracile (ng/mL)	R = UH2/U
Normal	< 16	R > 6
Déficit partiel	16-150	3 < R < 6
Déficit complet	> 150	R < 3

### 3. Génotypage : panel utilisé

Pour le génotypage aucune méthode spécifique n'est imposée par les recommandations émises par GPCO-Uncancer (Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique) et par le RNPGx (Réseau National de Pharmacogénétique) [20]. Cependant la technique devra *a minima* pouvoir détecter les 3 variants principaux cités précédemment (I560S, D949V, DPYD\*2A)[20]. La stratégie développée au sein du secteur de pharmaco-génétique du CHU de Lille est le séquençage complet du gène *DPYD* ainsi que des gènes *DPYS* et *UGT1A1*.

L'analyse réalisée est un panel ciblé permettant le séquençage des gènes :

- *DPYD* (NM\_000110.3)
- *DPYS* (NM\_001385.2)
- *UGT1A1*(NM\_000463.2)

Le séquençage comprend les régions codantes exoniques, ainsi qu'un minimum de 10pb des régions flanquantes (régions introniques à la limite d'un exon).

A noter que plusieurs régions sont difficilement amplifiables entraînant alors une couverture incomplète de celles-ci. Sur le gène *DPYD* l'exon 5 a une couverture proche de 0% et l'exon 8 une couverture de 50%. Les exons 11, 13, 22 et la jonction entre l'exon 14 et l'intron 14 correspondant aux mutations les plus fréquentes sont couverts à 100%.

### 4. Etudes Statistiques

Les résultats statistiques ont été exploités par l'Unité de Méthodologie, Biostatistique et Data Management du CHU de Lille dirigé par le Pr A. DUHAMEL, avec l'aide de M. F. MACHURON.

Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne et l'écart type ou par la médiane et l'intervalle interquartile. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement ainsi que par l'intermédiaire du test de Shapiro-Wilk.

Les variables qualitatives ont été décrites par la fréquence et le pourcentage.

Si les effectifs étaient suffisants, les variables quantitatives ont été comparées entre les groupes par l'intermédiaire de tests paramétriques de Wilcoxon.

L'identification de paramètres génétiques facteurs de risque de déficit (patient déficitaire) a été réalisée par l'intermédiaire de modèles logistiques multivariés.

Le seuil de significativité a été fixé à 0.05. Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary NC, USA).

Pour les études statistiques les patients sont réunis en différents groupes en fonction de la présence de mutations (ou leur absence). L'appartenance à un groupe est donc déterminée par les résultats du génotypage réalisé chez ces patients. La formation des différents groupes est détaillée ensuite.

## 5. Formation des groupes pour les études statistiques

Lors du séquençage de *DPYD*, de nombreuses mutations sont retrouvées. Toutes ces mutations ne sont pas équivalentes concernant leurs fréquences et leurs impacts fonctionnels. Le choix a été fait de regrouper certaines de ces mutations afin de mieux pouvoir les étudier. Les différents groupes sont les suivants :

- WT : patient ne présentant aucune mutation ou présence de polymorphismes bien connus et sans conséquences.

Ce groupe est composé de 813 patients (soit 33,2% de la cohorte)

- M166V : groupe composé de 439 patients (soit 17,9% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.496A>G (rs2297595)
- S534N : groupe composé de 111 patients (soit 4,5% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.1601G>A (rs1801158)
- I543V : groupe composé de 904 patients (soit 36,9% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.1627A>G (rs1801159)
- F632F : groupe composé de 184 patients (soit 7,5% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.1896T>C (rs17376848)
- V732I : groupe composé de 236 patients (soit 9,6% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.2194G>A (rs1801160)
- E412E : groupe composé de 82 patients (soit 3,3% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.1236G>A (rs56038477)
- D949V : groupe composé de 15 patients (soit 0,6% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.2846A>T (rs67376798)

- I560S : groupe composé de 7 patients (soit 0,3% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.1679T>G (rs55886062)
- DPYD\*2A : groupe composé de 10 patients (soit 0,4% de la cohorte) et porteurs de la mutation NM\_000110.3(DPYD):c.1905+1G>A (rs3918290)
- Mutation rare : patients présentant une autre mutation que celles citées auparavant. Cela inclut les mutations faux-sens, les mutations entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré, les insertions/délétions entraînant décalage du cadre de lecture et les mutations touchant un site d'épissage. Leurs conséquences sont prédites comme délétères ou inconnues selon les logiciels de prédictions *in silico*.

Ces mutations ne sont habituellement pas recherchées par le génotypage réalisé par analyse Sanger ou utilisant des sondes TaqMan.

Ce groupe est composé de 54 patients (soit 2,2% de la cohorte).

- Mutation synonyme : Ces mutations synonymes sont causées par la modification d'un nucléotide mais sans modifier la séquence protéique. Leurs conséquences fonctionnelles sont prédites comme nulles ou mineures. Ce groupe comprend aussi les mutations introniques profondes que l'on couvre avec le design utilisé.

Ce groupe est composé de 26 patients (soit 1,1% de la cohorte).

Concernant ces deux derniers groupes de patients il a été choisi de ne pas étudier les mutations individuellement. Il s'agit de mutations rares retrouvées chez très peu de patients et leur étude ne permettrait pas d'obtenir des résultats statistiquement cohérents. Par ailleurs, ces mutations ont été séparées en deux groupes car les conséquences fonctionnelles prédites sont variables. Ainsi les mutations synonymes décrites comme ayant un impact très faible voire nulle sur la protéine vont être séparées des mutations dont les conséquences sont prédites comme délétères.

Les détails de chaque mutation et du phénotypage associé sont regroupés pour le groupe « mutation rare » en annexe 2, et pour le groupe « mutation synonyme » en annexe 3.

#### a. Comparaisons Uracilémie et Ratio UH2/U

Le groupe WT composé de patients sans mutation fait donc office de groupe « témoin ». Les autres groupes composés de patients porteurs d'une mutation seront alors comparés un à un à ce groupe WT. L'objectif est de savoir si l'un des

paramètres : Uracilémie ou Ratio UH2/U présente une différence significative chez un des groupes porteur de mutation.

#### *b. Odd-Ratios*

Pour obtenir les Odd-ratios certains groupes de patients ont été réunis. Dans un premier temps, nous avons étudié le risque d'avoir un phénotype déficitaire chez les patients présentant une mutation délétère connue comparés au reste de la cohorte. Pour cela nous avons réuni les groupes I560S, DPYD\*2A et D949V.

Secondement, cette même étude a été réalisée en comparant les patients présentant une mutation délétère et les patients présentant une mutation rare supposée délétère. Dans ce cas, les groupes I560S, DPYD\*2A, D949V et « Mutation Rare » sont réunis.

### 6. Séquençage à haut débit

#### *a. Etape pré-analytique*

Le séquençage du gène *DPYD* s'effectue à partir de l'ADN des leucocytes sanguins. Le prélèvement requis pour cette analyse est un tube EDTA 5mL sans conditions de transport particulières. La phase pré-analytique du génotypage n'est donc pas une phase critique et n'aura pas d'impact sur les résultats de l'analyse. En effet, une mauvaise qualité du prélèvement ou du matériel génétique récupéré entrainera l'absence de résultats mais ne sera pas responsable de l'apparition d'une erreur dans les résultats de l'analyse.

#### *b. Séquençage haut débit / NGS*

Le séquençage haut débit ou NGS (Next Generation Sequencing) regroupe les technologies de 2<sup>ème</sup> et de 3<sup>ème</sup> génération. La technique se divise en plusieurs étapes intermédiaires, comme la préparation de la librairie, l'amplification, le séquençage et l'analyse bio-informatique des données obtenues. Pour chaque étape, différentes technologies comportant des caractéristiques propres peuvent être utilisées, nécessitant alors une bonne connaissance de celles-ci afin de connaître ses limites lors de l'analyse des résultats.

- **Extraction/type d'échantillon**

L'extraction à partir d'un échantillon sanguin (tube EDTA 5mL) va permettre d'isoler et de récupérer l'ADN présent dans les cellules nucléées. Ceci est réalisé par un automate Chemagic-Star (HAMILTON Robotics®) sur une prise d'échantillon de 1 mL de sang total et va se dérouler en plusieurs étapes :

*Etape 1* : Lyse cellulaire. Dans un premier temps, un tampon de lyse permet de casser les membranes cellulaires et nucléaires afin de libérer l'ADN. Puis la Protéinase K digère les protéines présentes notamment les histones et nucléosomes libérant ainsi l'ADN.

*Etape 2* : Fixation de l'ADN sur billes magnétiques. Cette étape permet de séparer les acides nucléiques des débris cellulaires issus de la lyse précédente. L'ADN présent en solution est fixé à des billes magnétiques recouvertes d'un revêtement spécifique et isolées du reste des éléments cellulaires. La bonne fixation de l'ADN sur les billes est favorisée par la présence d'un tampon de fixation.

*Etape 3* : Lavage de l'ADN. Un dispositif magnétique permet de conserver les billes recouvertes d'ADN au niveau du culot du microtube. Il est possible alors d'éliminer la solution contenant les débris cellulaires. Puis plusieurs lavages successifs utilisant divers tampons et solutions sont réalisés afin d'avoir une pureté maximale de l'ADN.

*Etape 4* : Elution de l'ADN. Après élimination de tous les débris, l'ADN fixé aux billes est élué (par un tampon spécifique: le Tris-HCl). Grâce au même système magnétique, les billes peuvent être isolées du reste de la solution. La différence majeure avec l'étape précédente est la présence de l'ADN en solution qui devra être conservée. Cette dernière est alors riche en ADN purifié, exempte de débris cellulaires ou de protéines. Les billes en culot devront impérativement être éliminées sous peine d'empêcher l'étape de préparation de la librairie de s'effectuer correctement.

Au final le volume obtenu est de 200  $\mu$ L (pour 1mL de sang) à 500 $\mu$ L (pour 3mL de sang), avec une concentration très variable selon les échantillons. Afin d'avoir une quantité homogène d'ADN pour tous les patients, une étape de normalisation est nécessaire avant l'étape de séquençage. Au final, chaque échantillon aura une concentration en ADN de 50 ng/mL.

- **Préparation de la librairie par PCR microfluidique**

Cette première étape permet la génération d'une librairie à partir des échantillons récupérés après l'extraction de l'ADN. Cela consiste dans un premier temps à réaliser une étape de PCR en amplifiant uniquement les régions d'intérêt.

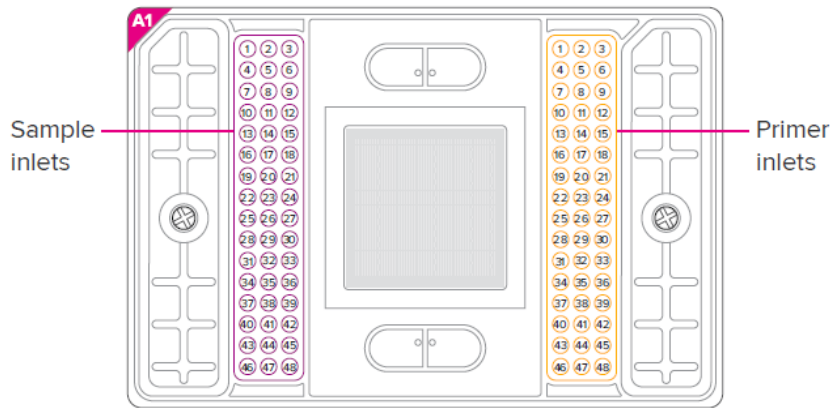


Figure 6 Schéma d'une plaque Fluidigm 48.48 Dynamic Array™

La plaque du fournisseur Fluidigm® (Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ : Figure 6) se compose d'un quadrillage de 48 canaux horizontaux par 48 canaux verticaux, de deux ensembles de 48 puits et de 4 puits pour les tampons et solutions nécessaires à la réaction. D'un côté 48 puits dont chacun recevra l'ADN d'un patient et de l'autre 48 puits recevant le mix PCR composé des amorces, des nucléotides ainsi que des différents tampons et produits nécessaires à la PCR. Chaque puits recevra un couple d'amorces spécifiques d'une seule région d'intérêt. Au centre le quadrillage composé de 48 canaux horizontaux dont chacun est relié à un unique puits patient, et de 48 canaux verticaux chacun relié à un unique puits contenant le mix PCR avec une amorce spécifique. Après distribution des solutions dans les puits correspondant, celles-ci vont, par aspiration, remplir le canal qui leur sont reliés. Lors de cette étape, il est important de vérifier que chaque canal est correctement rempli sur toute sa longueur, car la présence d'une bulle ou d'une bille magnétique (resté suite à la purification) empêchera la distribution de la solution. Au final, à chaque intersection des canaux verticaux et horizontaux un seul puits contenant l'ADN d'un patient et un seul puits contenant le mix PCR avec une amorce spécifique se retrouvent. Avec un système de pression mécanique s'appliquant sur le quadrillage, chaque intersection d'un canal vertical et d'un canal horizontal, va être isolée des autres. Ensuite une étape de PCR comprenant 17 cycles est effectuée sur le thermocycleur FC1Fluidigm. La durée, le nombre et la température de chaque cycle sont issues des recommandations du fournisseur (programme AA48x48 standardv1) (Tableau 4)



Tableau 4 Détails des cycles de PCR programme AA48x48 standardv1

Description	Cycles	Temperature	Temps
Thermal mix	x 1	65 °C	1,080 sec
Hot start	x 1	95 °C	870 sec
	x 1	97 °C	30 sec
PCR	x 17	97 °C	15 sec
		60 °C	90 sec
		68 °C	90 sec
Final extension	x 1	68 °C	180 sec
Hold	x 1	4 °C	Until harvest

Après cette étape de PCR, chaque canal horizontal est alors récupéré ou « récolté » dans le puits patient correspondant. Ce puits regroupera alors l'ensemble des produits PCR d'un unique patient issu des 46 cibles spécifiques amplifiées pour les analyses nous concernant ici. Chaque produit de PCR possède une taille d'environ 200 paires de bases.

L'avantage de cette technique utilisant la technologie Fluidigm est dans un premier temps la capacité de générer une librairie d'un grand nombre de patients pour un nombre de cibles importantes. En effet, le fait de pouvoir isoler chaque intersection de 2 canaux permet au final de réaliser 2304 (48x48) réactions de PCR en une seule fois. De plus la taille des canaux étant relativement faible, le volume nécessaire pour la réaction de PCR est par conséquent peu élevé.

- **Multiplexage**

Le multiplexage est une étape intermédiaire se déroulant en amont du séquençage. Cela consiste à ajouter aux extrémités des brins d'ADN une séquence de quelques nucléotides connus, unique à chaque patient ; on parlera de barcode pour désigner cette séquence. Ce barcode fait alors partie intégrante de la séquence ADN, et lors du séquençage permet d'identifier le patient auquel appartient un read donné.

Toutes les séquences pouvant être distinguées patient par patient, il n'est plus utile de séparer l'ensemble des échantillons. Après le multiplexage, l'ensemble des patients peuvent être regroupés, chacun ayant son propre barcode spécifique. Une autre séquence courte est aussi ajoutée lors de cette étape, un adaptateur, ayant pour rôle de permettre au brin d'ADN de se fixer au support (*flowcell*) lors de l'étape de séquençage.



L'étape de multiplexage est réalisée simultanément à la préparation de la librairie lors de la PCR multifluidique, grâce à la technique « 4 primers ». Cela consiste à réaliser une première amplification avec un couple d'amorce spécifique d'une région d'intérêt. Le premier produit de PCR obtenu sera composé de cette région d'intérêt et d'une séquence « universelle » (Figure 7 [53])

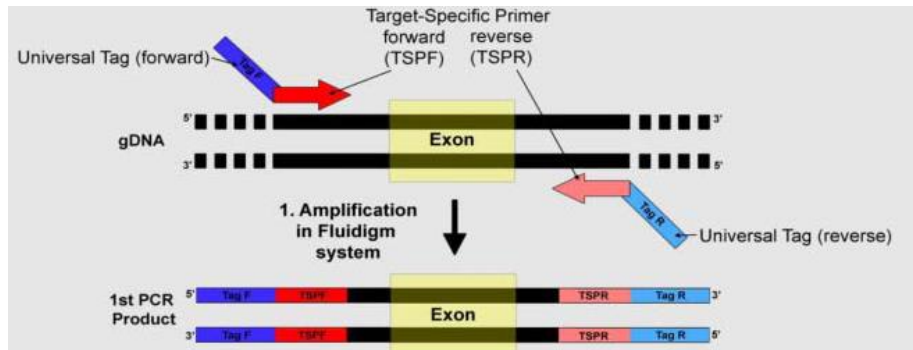


Figure 7 : Première étape d'amplification par la technique « 4 primers »

La deuxième étape d'amplification (Figure 8 [53]) utilisera un 2<sup>ème</sup> couple d'amorces distinctes se fixant sur la séquence universelle permettant l'ajout des séquences nécessaires au séquençage. Le second produit de PCR obtenu, sera composé de la région d'intérêt, de la séquence universelle, ainsi que du barcode spécifique au patient et de la séquence adaptatrice.

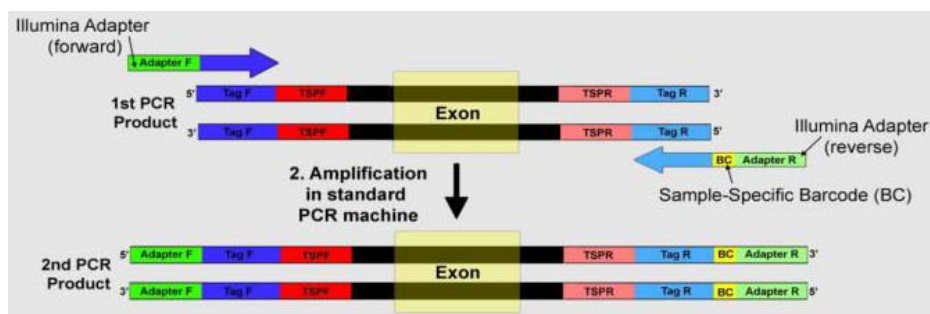


Figure 8 : Seconde étape d'amplification par la technique « 4 primers »

L'ensemble des amorces utilisées lors de cette étape, pour les gènes *DPYD*, *DPYS* et *UGT1A1* a été fourni et façonné par le fournisseur.

Avant de pooler les ADNs, il faut néanmoins s'assurer que pour chaque patient la réaction a bien fonctionné par le dosage de l'ADN par Tape Station D1000 (Agilent technologie). Cette étape est aussi bien quantitative en mesurant la concentration en ADN obtenu, que qualitative en réalisant un spectre de la taille des brins ADN amplifiés. S'en suit une étape de purification identique à la première, grâce à un système de bille magnétique captant l'ADN dans un premier temps permettant d'effectuer plusieurs lavages, puis son élution afin d'avoir une solution pure et concentrée. Cependant aucune étape de lyse n'est nécessaire car aucune cellule n'est présente en solution mais un grand nombre d'éléments issus de la PCR autre

que l'ADN amplifié (nucléotide, amorces, tampons,...) devant être éliminé. Chaque patient aura de plus une quantité d'ADN équivalente introduite dans le pool, afin d'avoir des résultats les plus équilibrés possibles. Finalement le pool ainsi obtenu est dosé, par le Bioanalyseur 1000 (Agilent technologie), pour connaître la quantité précise en ADN, le séquençage nécessitant une concentration relativement précise pour optimiser les résultats.

- **Génération de clusters**

Après les étapes précédentes, le produit obtenu sera un ensemble de brins d'ADN de régions ciblées et amplifiées, issus de l'ensemble des patients, comportant aux extrémités un adaptateur spécifique. La technologie utilisée pour le séquençage de ces amplicons (Illumina®) permet le séquençage à haut débit d'échantillons grâce à la technologie de séquençage par synthèse. Il intègre l'amplification clonale des clusters (groupement d'environ un millier de copies identiques d'une même séquence d'ADN) via une amplification par pontage sur flowcell, puis le séquençage grâce à la méthode du wash and scan que nous allons détailler.

La première étape consiste à générer un ensemble de clusters. Tout d'abord, les produits de PCR obtenus sont répartis sur le support ou flowcell recouvert de primers complémentaires des adaptateurs spécifiques présents aux extrémités des brins d'ADN. Ces brins d'ADN vont être dénaturés pour être sous forme simple brin, et pouvoir alors se fixer via leurs séquences adaptatrices sur la flowcell (Figure 9). Ces brins vont fixer leur deuxième extrémité (donc libre) sur un primer complémentaire formant ainsi un pont sur le support (Figure 10). Une fois le pont formé, le brin va être répliqué grâce aux nucléotides présents et à une polymérase générant ainsi un pont double brin d'ADN (Figure 11).

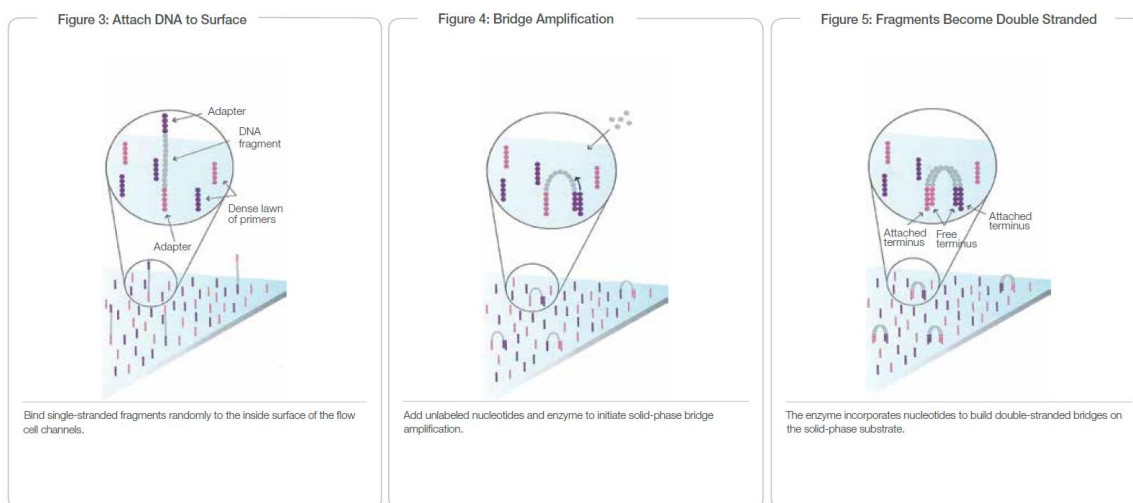


Figure 9

Figure 10

Figure 11

Ces ponts doubles brins vont être dénaturés pour finalement se retrouver sous forme simple brin, avec une extrémité libre (Figure 12). Les étapes précédentes sont ensuite répétées (formation d'un pont, synthèse d'ADN double brin, dénaturation). A chaque étape, le nombre de brins ainsi synthétisés double et conduit à la formation d'un cluster. Il s'agit d'un groupe de brins d'ADN cloné issu d'un brin unique et regroupés au niveau de la flowcell (Figure 13). Cette méthode de *bridge PCR* a l'avantage de pouvoir garder tous ces brins clonés dans un espace très restreint et très dense, localisés à un même endroit de la flowcell. Tous ces clusters ainsi créés sont aléatoirement répartis sur le support, et leur densité est un facteur déterminant dans la qualité du run. Une faible densité sera favorable à une grande qualité de séquençage avec cependant une quantité de données obtenues plus faibles : le run ne sera pas optimisé. Au contraire une densité trop importante conduira à une grande quantité de données à analyser mais de qualité moindre, qui ne seront potentiellement pas exploitables. Une densité de clusters optimale sera le bon compromis entre une quantité de données obtenues assez importante tout en conservant une qualité suffisante. Sur la flowcell utilisée lors du séquençage de *DPYD* la densité recommandée est de 1000-1200 K/mm<sup>2</sup>.

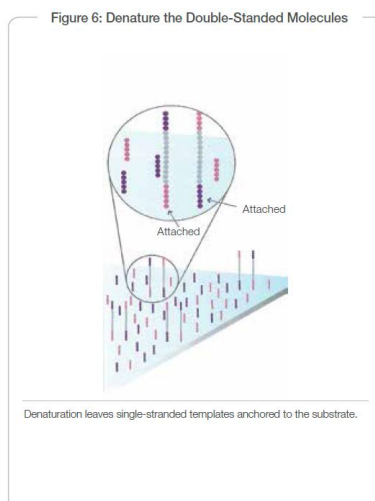


Figure 12

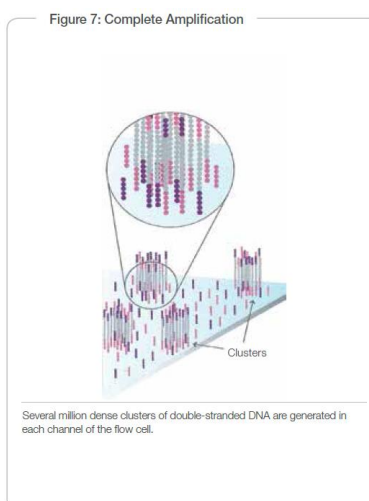


Figure 13

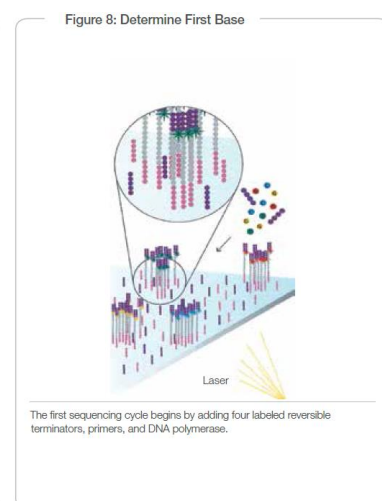


Figure 14

### • Séquençage

La seconde étape sera le séquençage en lui-même. A chaque cycle, un seul nucléotide sera ajouté à chaque brin (Figure 14). Lors de cette étape les nucléotides incorporés seront composés d'une partie terminatrice fluorescente clivable. Le cycle commence par l'ajout au niveau de la flowcell, de primers (complémentaires des

primers présents sur le support et des séquences adaptatrice des brins d'ADN), des 4 nucléotides (A, T, C, G) et d'ADN polymérase. Les primers vont se fixer sur leurs séquences complémentaires puis grâce à la polymérase la première base complémentaire au brin va être ajoutée. Un laser va exciter la partie fluorescente du nucléotide venant d'être ajouté, chaque base ayant une fluorescence différente. Une image est alors prise, permettant de connaître la première base de l'ensemble des clusters (Figure 15). A noter que pour chaque cluster, étant issu d'une amplification clonale, la base intégrée sera identique pour tous les brins donnant alors un signal lumineux unique. Lors de cette étape, la présence d'un groupement terminateur au niveau 3' du nucléotide, empêche la polymérase d'ajouter plusieurs bases à la suite lors d'un même cycle nous assurant l'incorporation séquentielle des nucléotides et de l'origine unique du signal pour chaque cluster.

Le cycle se termine alors par la coupure du groupement terminateur et le lavage de la flowcell. Puis un nouveau cycle peut alors débuter, avec l'ajout de nouveau de nucléotides et d'ADN polymérase. La seconde base complémentaire aux brins présents est alors ajoutée à la suite de la première (Figure 16). S'en suit la phase d'excitation au laser, de capture d'image et de lavage. Les cycles s'enchainent jusqu'au séquençage entier des brins d'ADN (Figure 17). Cette méthode est dite « wash and scan ».

Lors des étapes de scan, la densité en clusters est un paramètre important à prendre en compte. En effet, si la densité est trop importante au sein de la flowcell, le signal fluorescent émis par un cluster pourra interférer avec le signal d'un cluster adjacent entraînant un séquençage de moins bonne qualité.

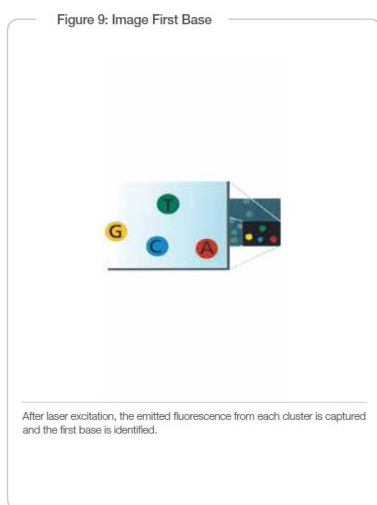


Figure 15

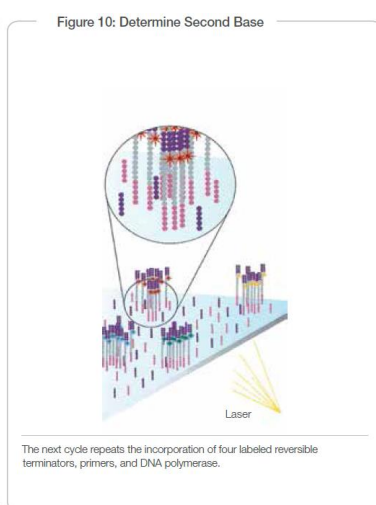


Figure 16

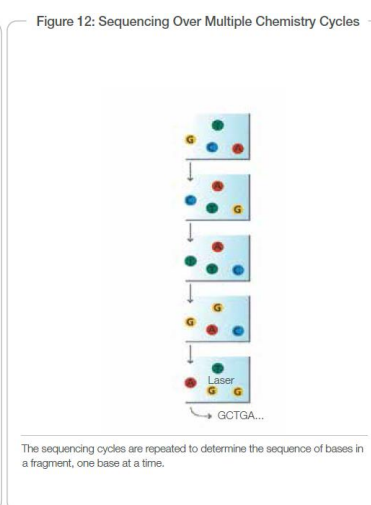


Figure 17

## 7. Analyse des résultats

### a. *Traitement bio-informatique*

Le séquençage génère une grande quantité d'informations qui doivent dans un premier temps être traitées informatiquement afin d'être analysables ; les fichiers bruts en sortie de séquenceur étant inutilisables directement. Pour obtenir des résultats interprétables, il faut alors utiliser un pipeline bioinformatique. Par définition, un pipeline est un ensemble de logiciels fonctionnant en série, chaque logiciel utilisant les résultats du précédent afin de pouvoir exécuter la tâche suivante. Ainsi un certain nombre de fichiers intermédiaires vont être créés tout au long de l'analyse bio-informatique. Ce pipeline est indispensable pour traiter la grande quantité d'informations suite au séquençage, mais il est toutefois nécessaire de bien connaître le fonctionnement de chaque logiciel afin de garder un esprit critique sur les résultats et les erreurs potentielles pouvant en être issues.

#### Fichier FASTQ/FASTA

Les premières données obtenues sont regroupées dans un fichier « FASTQ ». Il s'agit d'un fichier regroupant les informations concernant les séquences des fragments ADN, appelées reads. Composé de 4 lignes, chacune apporte des informations, comme la séquence nucléotidique brute ou bien le score de qualité de chaque base.

#### Fichier SAM/BAM

Par la suite les séquences du fichier FASTQ vont être alignées par rapport à un génome de référence, on obtiendra alors un fichier SAM (Sequence Alignment/Map format) ou BAM (version compressée du fichier SAM mais nécessitant un index afin d'être exploité). Le génome de référence utilisé est le GRCh37/hg19. Ce génome ne correspond pas à celui d'un seul individu, mais représente l'assemblage de différents donneurs pour former un génome « moyen ». Chaque individu aura donc de nombreuses différences significatives avec ce génome. Chaque séquence ADN doit avoir une localisation optimale, cependant une certaine souplesse est nécessaire. Par définition, un certain nombre de bases seront différentes du génome de référence mais cela ne doit pas empêcher l'alignement de toute la séquence. Des informations sur la qualité d'alignement sont alors présentes pour chaque read. Les fichiers BAM permettent aussi de pouvoir visualiser l'ensemble des reads via un logiciel de visualisation (e.g. IGV). A cette étape il est alors possible de voir les différences avec le génome de référence pour tous les patients, mais il serait

laborieux de regarder l'ensemble des reads un par un pour chaque cible, pour chaque patient, de nombreuses variations étant des polymorphismes ou non délétères.

### Fichier VCF

Les fichiers VCF ou Variant Caller File sont issus des fichiers BAM suite, là aussi, à un traitement par un logiciel d'analyse. Chaque base différente du génome de référence sera alors référencée accompagnée d'un certain nombre d'informations, comme sa position chromosomique et génomique, son Score de qualité, le nombre de reads concernés,... Ces fichiers VCF sont les fichiers les plus complets obtenus et sont alors utilisés dans l'interprétation des données.

La première étape est le démultiplexage. Chaque read alors séquencé aura à ses extrémités les séquences ayant été multiplexées auparavant : le barcode, et la séquence adaptatrice. Le barcode permet d'attribuer chaque read à un patient spécifique. Celles-ci seront « éliminées » informatiquement et ne seront pas présent en compte lors des autres étapes d'analyses informatiques.

L'alignement des reads sur la séquence génomique humaine de référence (NCBI build GRCh37/Hg19) a été réalisé à l'aide des logiciels d'analyse SeqPilot JSI (version 4.1.2 à 4.4.0) et MiSeqReporter (version 2.4.6 à 2.5.1).

Les logiciels d'annotations utilisés sont Illumina Variant Studio (version 3.0.12) et SeqPilot JSI (version 4.1.2 à 4.4.0).

#### *b. Interprétation des données*

Afin d'exploiter au mieux les données récupérées suite au séquençage et au traitement bio-informatique, un certain nombre de paramètres, comme la qualité, la couverture, ou la profondeur, doivent être pris en compte.

La qualité d'un read est déterminée par la probabilité que chaque base séquencée soit une erreur. Une séquence de mauvaise qualité impliquera que les bases la composant ont un grand risque d'être dues à une erreur de séquençage. Pour évaluer cela un score de qualité est calculé : Le *Phred score*.

Ce score est noté Q et correspond à :  $Q = -10 \log_{10} P$  (avec P : probabilité d'erreur)

Pour un *Phred score* Q=10 : il y a 1 chance sur 10 que l'identification d'une base soit incorrecte, pour Q=20 : 1 chance sur 100, pour Q=30 : 1 chance sur 1000,...

La couverture correspond au pourcentage d'une région cible à avoir été séquencée. Si chaque base de cette région a été séquencée au moins une fois, sa couverture sera de 100%. Si un certain nombre de bases n'ont pas été séquencées, sa



couverture sera <100%. Certaines limites d'interprétation peuvent alors être liées à la couverture incomplète d'une région. Il paraît évident qu'on ne sera pas en mesure de détecter et de mettre en évidence certaines mutations si celles-ci n'est pas couvertes.

La profondeur est aussi un paramètre indispensable dans l'interprétation des résultats finaux. Il s'agit du nombre de reads couvrant une position nucléotidique donnée. Si le séquençage n'a permis de générer qu'un seul read couvrant une base donnée, sa profondeur sera de 1X. Le séquençage haut débit permet d'obtenir des profondeurs importantes (une même base pouvant être retrouvée sur plusieurs centaines de reads). Un variant présent sur un grand nombre de reads (*i.e.* une forte profondeur) aura été séquencé de manière indépendante de multiples fois et sera vraisemblable. Afin de diminuer la probabilité d'erreur d'interprétation, il est préférable d'avoir une grande profondeur. Elle permet aussi d'apprécier la distribution allélique d'une mutation. Ainsi une certaine base retrouvée sur 50% des reads sera présente chez les patients hétérozygotes (Figure 19) et sur 100% des reads chez les patients homozygotes.

Au final il est important d'appliquer un certain nombre de filtres et de fixer certaines valeurs limites afin d'éliminer les séquences comportant un grand nombre d'erreurs de séquençage, tout en conservant un grand nombre de reads sur une région cible la plus longue possible. Une bonne interprétation sera possible uniquement en cas de résultats fiables et analysables. Lors de l'analyse de nos résultats un certain nombre de filtres sont appliqués afin de conserver uniquement les données analysables. Le score de qualité minimum est fixé à Q30 (probabilité d'erreur inférieure à 1 sur 1000 pour chaque base). Pour la profondeur, un minimum de 30X est accepté. En dessous de 30 reads pour une région donnée, il sera difficile de juger correctement la crédibilité d'une mutation ou de son absence. En pratique la profondeur varie entre 300X et 1000X selon les régions et les patients. De plus, la couverture doit être suffisante sur l'ensemble du gène afin de ne pas rendre un résultat faussement négatif. Il paraît évident qu'on ne sera pas en mesure de déterminer la présence d'une mutation si la région concernée n'est pas couverte. Dans ces conditions rendre un résultat concluant à l'absence de mutation dans une région non couverte serait tout à fait inexact. Enfin, s'il existe un doute concernant une mutation, les données peuvent être analysées et interprétées grâce à un logiciel de visualisation et éventuellement vérifiées par une nouvelle analyse.





## 8. Phénotypage

Le phénotypage peut être interprété selon deux méthodes. La première consiste à déterminer l'uracilémie plasmatique seule dans un échantillon plasmatique du patient. La deuxième est le dosage plasmatique de l'uracile et de la DihydroUracile (UH2) en vue d'établir un ratio UH2/U. Ce ratio a pour fonction de mettre en évidence la capacité de métabolisation de l'uracile par la DPD. La technique utilisée au CHU de Lille permet de doser simultanément l'Uracile et l'UH2 [40]. Ainsi le phénotype rendu est à la fois basé sur l'uracilémie et sur le ratio UH2/U avec pour avantage d'améliorer la sensibilité et de détecter un maximum de patients ayant un déficit enzymatique.

### a. *Etape pré-analytique*

L'étape pré-analytique est pour le phénotypage l'étape la plus critique. Après le prélèvement du patient, la DPD continue de métaboliser l'uracile puis se dégrade rapidement. Dans le même temps, la lyse de cellules nucléées libère des acides nucléiques. La détermination de l'activité enzymatique de la DPD dépend en partie de sa conservation ainsi que du délai entre le prélèvement et l'analyse.

Pour les services de soins internes au CHU, un tube EDTA 5 mL est requis avec un acheminement immédiat et dans la glace au laboratoire. Pour les prélèvements effectués en laboratoire extérieur au CHU de Lille, une centrifugation à 4°C dans les 30 minutes est exigée avec une congélation à -20°C d'1,5 mL de plasma au minimum. Toute anomalie lors de la phase pré-analytique pourra entraîner un résultat inexact lors de la mesure d'activité de la DPD.

Concernant les échantillons issus de services internes au CHU de Lille et du Centre Oscar Lambret, leur acheminement par transport pneumatique permet un transport rapide ne dépassant pas quelques minutes. Le délai requis est *a priori* respecté, en supposant que les bonnes pratiques soient respectées entre le prélèvement et l'envoi de l'échantillon. Pour les envois provenant de centres périphériques, la mise en place des conditions d'envoi est plus délicate. Dans les cas où ces conditions ne peuvent pas être respectées, certains patients, issus de CH ou de centres privés agréés, ont la possibilité de se faire prélever en LABM de ville permettant alors une garantie sur le bon respect de la phase pré-analytique.

Au final l'ensemble des professionnels prescrivant un phénotypage de la DPD semble être attentif au bon respect de conservation et d'acheminement des

échantillons et seules quelques non-conformités sporadiques ont été mises en évidence jusqu'à présent.

#### *b. Dosage de l'Uracile et du Dihydrouracile*

Le dosage plasmatique de l'uracile ainsi que de l'UH2 est réalisé par UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) couplé à un détecteur MS/MS lors de la même analyse. L'avantage principal est de pouvoir obtenir conjointement l'uracilémie ainsi que le ratio UH2/U qui sont les deux méthodes pour interpréter un phénotypage de la DPD. Les recommandations de la HAS pour le phénotypage se basent sur le dosage de l'uracile uniquement. Il s'agit là d'exigences minimales et la possibilité de prendre en compte le ratio en complément n'est pas exclue. Le choix au CHU de Lille est donc de dépister les déficits en DPD par l'uracilémie et le ratio UH2/U, dans le but d'augmenter la sensibilité du phénotypage.

Matériel utilisé : Xevo TQD - Waters

- **UPLC**

L'UPLC est une technique de chromatographie permettant la séparation de différents constituants organiques selon leurs polarités en utilisant un débit de phase mobile donnée avec un gradient de solvant optimisé. Le principe est identique à la technique d'HPLC classique. La principale différence est l'utilisation d'une phase stationnaire composée de particules de diamètre inférieur à 2 µm. Les avantages sont un temps d'analyse plus court grâce à une colonne plus courte ainsi que d'une moindre consommation de solvant et d'échantillon biologique. De plus, avec un diamètre plus petit des particules constituant la colonne, les variations de débit n'ont que très peu d'impact sur son efficacité. En contrepartie, la pression nécessaire pour l'utilisation de ces colonnes UPLC est beaucoup plus importante (1000 Bars alors que la limite pour HPLC est de 500 bars).

Les caractéristiques de la chromatographie sont [40]:

Colonne : ACQUITY UPLC® BHE C18 Waters 1,8 µm 2,1 x 150 mm + préfiltre.

Température du four: 40°C

Temps d'analyse : 5 minutes

Volume d'injection : 25 µL

## • Spectrométrie de masse

Après séparation des composés par la chromatographie en phase liquide, la détection se fait grâce à un spectromètre de masse TQD (Triple Quadripôle Detector) par deux transitions MRM (Multiple Reaction Monitoring) spécifiques (Tableau 5). Le spectromètre de masse est dit en tandem (MS/MS).

Un spectromètre de masse est composé par (Figure 20 de gauche à droite):

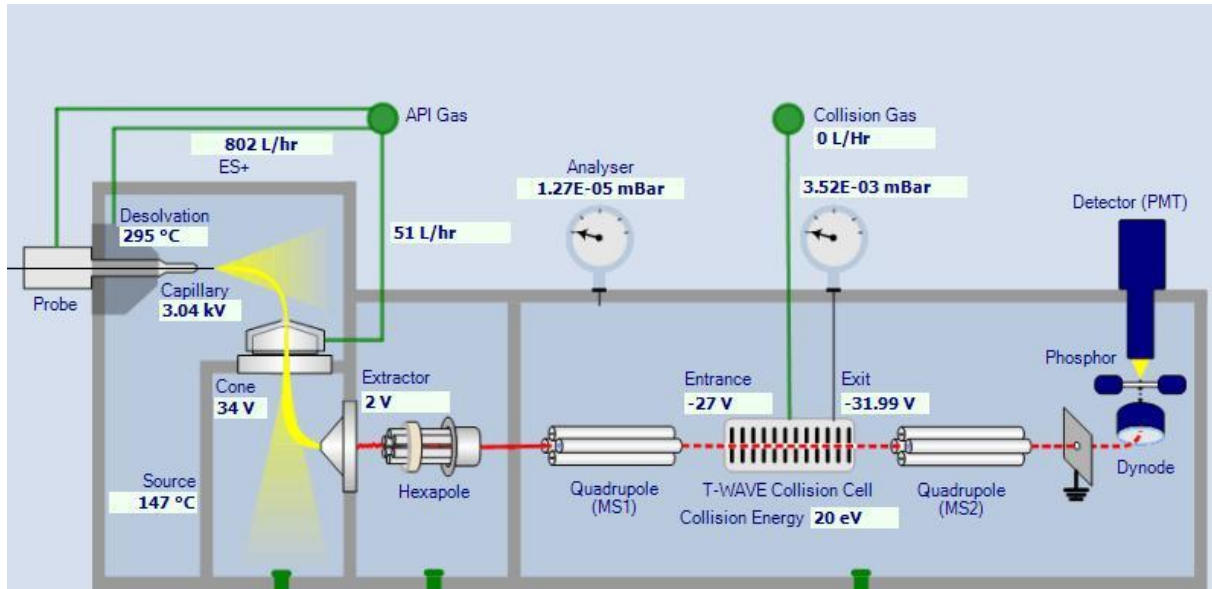


Figure 20 : Détail d'un spectromètre de masse

Le système d'introduction de l'échantillon : comme son nom l'indique il s'agit du système permettant l'introduction de l'échantillon dans le spectromètre. Dans notre cas, il va être couplé au système d'UPLC précédemment décrit afin de « sélectionner » les composés d'intérêt.

La source d'ionisation : elle consiste à vaporiser l'échantillon ainsi qu'à l'ioniser. Différents types de source existent dont l'utilisation diffère en fonction du type d'analyse ; dans notre cas : la quantification précise d'un composé. Pour cela nous utilisons une source ESI (ElectroSpray Ionisation). Les composés sont introduits sous forme de gouttelettes et ionisés pour former un ensemble d'ions présentant une masse et une charge spécifique. Les rapports masse/charge ( $m/z$ ) des différents ions et le spectre obtenu sont alors caractéristique de chaque composé.

L'analyseur : il permet de séparer les différents ions créés précédemment en fonction du rapport  $m/z$ . Concernant notre analyse, l'analyseur utilisé est un triple quadripôle. Il s'agit d'un système composé de deux analyseurs quadripolaires placés en série, séparés par un troisième plus court faisant fonction de cellule de collision (le plus souvent remplie de gaz inerte). Différents modes peuvent être utilisés dans cette

configuration. Dans notre cas le mode MRM sera privilégié. Ici, après l'ionisation du composé initial le premier analyseur va sélectionner l'ion voulu, dit « ion parent » en fonction de son rapport m/z. Celui-ci passe alors dans la cellule de collision et se fragmente produisant un nouvel ion dont les caractéristiques sont connues. Par la suite, le deuxième analyseur va être focalisé sur cet ion et le sélectionner précisément, grâce là aussi au rapport m/z. Ainsi il y a une double sélection du composé initial et des ions produits améliorant alors la sensibilité de détection et limitant les interférences (haute spécificité).

Détection/traitement de signal : Les ions obtenus vont finalement rencontrer un détecteur ayant pour rôle la conversion d'un courant ionique en courant électrique. Les composés étant injectés en très faible quantité, les signaux initialement obtenus sont de très faible intensité et nécessitent alors une étape d'amplification. Ce signal une fois amplifié subira un traitement informatique et nous donnera un « spectre de masse » qui pourra être analysé.

Au final cette méthode de spectrométrie de masse en tandem MS/MS en mode MRM, a pour avantage principal de permettre la quantification de manière spécifique de composés relativement similaires. Dans notre cas cela est idéal car permet le dosage précis de l'uracile et l'UH2 qui sont des molécules proches.

Les paramètres de détection utilisés sont issus d'une méthode validée [40] et ont pour caractéristiques :

Capillaire réglé à 2kV en ES+

Température de désolvatation de la source : 400°C

Débits d'azote : 800 L/h (pour la source) et 50L/h (pour le cône)

Transitions de quantification et de qualification : Tableau 5

**Tableau 5 : Paramètres de détection de l'uracile et du DihydroUracile et de l'étalon interne (BrU) en Spectrométrie de Masse**

Molécules	Tr (min)	Transition de quantification				Transition de qualification			
		T <sub>cône</sub> (V)	Transition	E <sub>col</sub> (V)	Dwell (s)	T <sub>cône</sub> (V)	Transition	E <sub>col</sub> (V)	Dwell (s)
<b>U - Uracile</b>	1,48	30	112,9>70	13	0,05	30	112,9>96	15	0,05
<b>UH2 - DihydroUracile</b>	1,49	30	115>73	10	0,05	30	115>55	17	0,05
<b>5-Bromo-Uracile</b>	2,1	30	191>117	25	0,05	30	191>174	20	0,05

### III. Résultats

La recherche d'un déficit enzymatique de la DPD peut alors être réalisée soit par le génotypage (prédiction d'impact sur l'activité), soit par le phénotypage (estimation de l'activité enzymatique). Comme vu précédemment, le phénotypage peut être interprété par l'uracilémie ou le ratio UH2/uracilémie. En pratique la détermination du Ratio UH2/U et de l'uracilémie sont réalisées au CHU de Lille afin de diagnostiquer l'ensemble des patients ayant un déficit enzymatique. Pour cela il a été défini qu'un seul des deux paramètres, uracilémie ou ratio UH2/U, est nécessaire pour caractériser un patient comme déficitaire ou partiellement déficitaire.

#### 1. Etude des différents sous-groupes

L'uracilémie et le ratio UH2/U ont été comparés entre les différents groupes de patients porteurs des mutations I543V, F632F, V732I et les patients WT afin de connaître l'impact éventuel de ces mutations sur le phénotype (Tableau 6) :

**Tableau 6 Comparaison du ratio UH2/U et de l'uracilémie des groupes F632F, V732I, I543V au groupe WT**

	Paramètres	Groupes			
		WT	F632F	V732I	I543V
<b>Ratio</b>	Effectif	813	184	236	904
	Moyenne +/- Ecart Type	17.9 ± 9.6	18.4 ± 8.0	15.4 ± 6.8	17.8 ± 8.2
	Minimum-Maximum	3.3   99.2	6.2   49.7	4.1   47.0	3.3   62.9
	Médiane (Q1;Q3)	15.9 (11.6 ; 21.8)	16.5 (12.7 ; 23.7)	14.5 (10.6 ; 18.7)	16.4 (11.9 ; 22.1)
	p-value		0,16	<0.001	0,62
<b>Uracilémie</b>	Effectif	813	184	236	903
	Moyenne +/- Ecart Type	7,2 ± 5,8	7,5 ± 4,9	8.5 ± 6.5	7.3 ± 5.4
	Minimum ; Maximum	0,5 ; 73,3	0,9 ; 42,2	0,8   45,0	0,5   88,6
	Médiane (Q1;Q3)	5.8 (3.8 ; 9.0)	7.2 (4.4 ; 9.2)	7.3 (4.5 ; 10.5)	6.3 (3.9 ; 9.3)
	p-value		0,031	<0.001	0,18

Par ailleurs les mutations M166V et S534N ont été retrouvées dans plusieurs cas rétrospectifs de toxicité. L'uracilémie et le ratio UH2/U de ces groupes ont été comparés aux autres groupes dont les mutations ne sont pas décrites comme délétères (Tableau 7) :

Tableau 7 : Comparaison du ratio UH2/U et de l'uracilémie des groupes M166V et S534N au groupe sans mutations décrites comme délétères.

	Paramètres	Mutation non délétère	Groupes	
			M166V	S534N
<b>Ratio</b>	Effectif	1839	439	111
	Moyenne +/- Ecart Type	17,8 ± 8,8	16.0 ± 7.2	16.4 ± 6.3
	Minimum-Maximum	3.3   99.2	2.8   45.9	5,9   47,5
	Médiane (Q1;Q3)	16.0 (11.7 ; 21.9)	14.7 (10.7 ; 19.7)	16,0 (12,0 ; 19,8)
	p-value		<0.001	0,44
<b>Uracilémie</b>	Effectif	813	439	111
	Moyenne +/- Ecart Type	7,3 ± 5,7	7,6 ± 5,0	7,6 ± 5,0
	Minimum ; Maximum	0,5 ; 88,6	0.6 ; 44.8	1,2   33,5
	Médiane (Q1;Q3)	6.2 (3.9 ; 9.2)	6,7 (4.4 ; 9.5)	6.6 (4.2 ; 6,3)
	p-value		0,052	0,33

Les patients du groupe porteur de la mutation E412E sont décrits avec un risque de toxicité augmenté. L'uracilémie et le ratio UH2/U de ce groupe ont été comparés aux patients WT (Tableau 8):

Tableau 8 Comparaison du ratio UH2/U et de l'uracilémie du groupe E412E au groupe WT

	Paramètres	Groupes	
		WT	E412E
<b>Ratio</b>	Effectif	813	82
	Moyenne +/- Ecart Type	17.9 ± 9.6	17.8 ± 8.2
	Minimum-Maximum	3.3   99.2	5.0   64.2
	Médiane (Q1;Q3)	15.9 (11.6 ; 21.8)	14.2 (11.2 ; 18.2)
	p-value		0,063
<b>Uracilémie</b>	Effectif	813	82
	Moyenne +/- Ecart Type	7,2 ± 5,8	7.9 ± 4.3
	Minimum ; Maximum	0,5 ; 73,3	1.5   21.7
	Médiane (Q1;Q3)	5.8 (3.8 ; 9.0)	7.3 (4.5 ; 10.4)
	p-value		0,017

## 2. Mutations considérées comme délétères.

La première partie des résultats porte sur les mutations habituellement recherchées par le génotypage : I560S, DPYD\*2A, D949V et le groupe de patients porteurs de mutations rares.

L'objectif de cette analyse est de répondre à la question : Les porteurs de ces mutations ont-ils un risque significativement supérieur de présenter un phénotype déficitaire par rapport au groupe Non muté ?

Pour cela, les calculs des Odd-Ratios sont calculés afin de savoir s'il existe une augmentation du risque d'avoir un phénotype déficitaire existe quand une de ces mutations délétères est présente. Le Tableau 9 regroupe les Odd-Ratios des patients des groupes I560S, DPYD\*2A et D949V avec l'ensemble des autres patients de la

cohorte comme référence. Le Tableau 10 est réalisé par une méthode identique, mais les groupes étudiés sont les groupes I560S, DPYD\*2A, D949V et « Mutation Rare », avec le reste des autres patients de la cohorte comme référence. Dans les deux cas, l'Odd-Ratio obtenu estime le risque relatif d'avoir un phénotype déficitaire chez ces différents groupes comparé au reste des autres patients :

**Tableau 9 : Odd-Ratios (estimation et intervalle de confiance) des groupes I560S, DPYD\*2A et D949V**

Mutation	Odd-Ratio			Activité DPD *
	Estimation	Intervalle de Confiance (95%)		
I560S	7.219	1.387	37.571	25%
DPYD*2A	18.047	5.158	63.142	≈ 0%
D949V	4.512	1.257	16.190	50%

**Tableau 10 : Odd-Ratios (estimation et intervalle de confiance) des groupes I560S, DPYD\*2A, D949V et « Mutation Rare »**

Mutation	Odd-Ratio			Activité DPD *
	Estimation	Intervalle de Confiance (95%)		
I560S	7.656	1.470	39.874	25%
DPYD*2A	19.140	5.465	67.029	≈ 0%
D949V	4.203	1.145	15.430	50%
Mutation Rare	4.191	2.051	8.564	<i>a priori</i> diminuée ou non connue

\* activité prédite de la DPD pour un seul allèle présentant la mutation (mutation hétérozygote)

A noter que la différence entre les Odd-Ratios pour les 3 variants communs est causée par la présence dans la cohorte de patients de référence dans le premier cas, des mutations rares qui présentent un risque supérieur d'avoir un phénotype déficitaire.

### 3. UGT1A1

Dans notre étude, sur les 2451 patients ayant eu une analyse combinée, donc avec un génotypage comprenant le séquençage du gène *UGT1A1*, 209 sont homozygotes pour l'haplotype \*28/\*28 soit 8.51% des patients. Ceux-ci vont avoir une métabolisation diminuée de l'Irinotecan et tout comme les déficits en DPD, un risque accru de développer une toxicité lors du traitement anti-cancéreux.





## IV. Discussion

### 1. Etude des différents sous-groupes

Les différents sous-groupes de patients porteurs de mutations décrites comme non délétères ont été comparés au groupe de patients sans mutation.

Pour les résultats suivants une p-value <0.05 sera considérée comme significative.

Le groupe I543V ne montre aucune différence avec le groupe WT. Il s'agit d'un polymorphisme très courant (avec une fréquence allélique de 20% dans la population générale) et plusieurs études ont déjà montré le caractère bénin de cette mutation [22] [54] [55]. L'absence de différence avec le groupe WT est donc en accord avec cela.

Le groupe V732I a une uracilémie légèrement plus élevée que le groupe WT ainsi qu'une diminution du ratio. L'uracilémie augmente en moyenne de 1,3 et le ratio diminue de 2,5 pour ce groupe (p-value <0,001 pour les deux valeurs). Les études sur ce variant montrent aussi bien une activité *in vitro* de la DPD non diminuée [22], sans augmentation du risque d'effets indésirables liés au 5-FU [17] [27] [56] alors qu'un risque augmenté de toxicité est parfois retrouvé [32] [57]. Même si ces données ne sont pas suffisantes pour affirmer son caractère délétère, elles montrent toutefois qu'elles pourraient avoir une influence sur l'activité de la DPD. Des études ciblées sur les patients homozygotes et sur les toxicités associées seraient envisageables afin d'évaluer l'augmentation de l'uracilémie et s'il est d'intérêt de rechercher cette mutation en routine.

Concernant le groupe E412E, plusieurs études [18] [34] indiquent que les patients porteurs de cette mutation présentent un risque de développer une toxicité et préconisent une diminution de posologie de 5-FU de l'ordre de -25% voire -50%. Nos résultats montrent une légère augmentation de l'uracilémie (+0.7) et un ratio non statistiquement différent du groupe WT. L'impact de cette mutation sur le phénotype reste donc minime et un déficit en DPD, s'il existe, ne sera quasiment jamais mis en évidence par la mesure de l'activité seule. Car même si la valeur moyenne d'uracilémie est significativement plus élevée par rapport au groupe Témoin (WT), celle-ci reste bien en deçà de la valeur seuil de 16 ng/mL. Notre étude ne permet pas de connaître les conséquences cliniques liées à cette mutation ni de confirmer ou infirmer les résultats des études concernant ce sujet, mais les résultats obtenus permettent de considérer le phénotypage comme n'étant pas une méthode satisfaisante pour mettre les patients porteurs de cette mutation en évidence.

Pour les groupes M166V et S534N, rappelons qu'ils ont été étudiés séparément car plusieurs cas rétrospectifs de toxicités ont été rapportés chez des patients porteurs de ces mutations. Ces deux groupes ont chacun été comparés aux groupes WT, I543V, F632F, V732I, qui ne sont pas des mutations recherchées lors du génotypage (par recherche de SNPs). Pour les patients porteurs de la mutation c.496A>G (groupe M166V) la présence de cette mutation chez des patients présentant des toxicités a pu être mise en évidence dans certaines études [32] [54]. Nos résultats indiquent une légère diminution du ratio pour le groupe M166V (-1,3 avec une p-value <0,001) comparé au reste des patients. Il est aussi possible de faire une analogie avec le groupe E412E (Haplotype B3), qui malgré l'absence de conséquences sur le phénotype est montré comme responsable d'événements indésirables dans plusieurs études. Finalement malgré une diminution du ratio UH2/U relativement faible, il ne peut être exclu que cette mutation soit à l'origine de toxicités.

Le groupe S534N ne montre aucune différence significative pour l'uracilémie et le ratio UH2/U par rapport aux autres patients de notre cohorte. Les études sur ce variant sont discordantes, montrant parfois une augmentation de l'activité [22] et aucun lien avec un risque de toxicité [18], ou parfois une présence significativement augmentée chez les patients présentant une toxicité [58]. Dans notre cas la présence de cette mutation ne semble pas avoir d'impact sur l'activité enzymatique.

Un autre facteur nécessiterait une étude complémentaire concernant les patients porteurs de plusieurs mutations. Comme nous l'avons vu, certaines mutations tendent à modifier sensiblement le phénotypage. Il serait alors intéressant de savoir si l'association de plusieurs mutations considérées individuellement comme bénignes peut conduire à une modification plus importante de l'enzyme et entraîner une augmentation du risque de toxicité.

Finalement l'étude de ces différents groupes ne montre que très peu de variations du ratio et de l'uracilémie comparé au patients WT. Rappelons par ailleurs que les seuils pour l'uracilémie et le ratio sont issus d'analyses statistiques et que ces valeurs peuvent être variables selon les études, et probablement selon les laboratoires.

## 2. Comparaison des Odd-Ratios

Rappelons que les Odd-Ratios ont été calculés pour les groupes présentant les mutations de *DPYD* suivantes : c.1905+1G>A (IVS14+1G>A), c.1679T>G (p.I560S), c.2846A>T, (p.D949V) toutes trois délétères, ainsi que pour le groupe des mutations rares regroupant les mutations faux-sens, gain d'un codon stop et au niveau d'un site d'épissage, dont les conséquences fonctionnelles sont prédites délétères ou non connues.

Les résultats obtenus par l'analyse statistique mettent en évidence pour ces différents groupes un Odd-ratio supérieur à 1. Cela correspond à une augmentation du risque de présenter un phénotype déficitaire chez ces patients par rapport aux groupes WT et mutations bénignes. Même si le phénotype ne reste qu'une approximation de l'activité de la DPD d'un patient, cette analyse est la seule préconisée par les recommandations de la HAS et de la DGOS à l'heure actuelle [1] [2] . Ainsi, même si le phénotypage peut présenter certains biais, notamment au niveau pré-analytique, et entraîner des faux positifs (patients faussement déficitaires), ce phénotypage a été défini par les recommandations nationales comme la méthode de référence utilisée pour le dépistage du déficit en DPD.

Concernant les groupes de patients portant les mutations décrites comme délétères (IVS14+1G>A, p.I560S, p.D949V), les résultats (Tableau 9) montrent un risque augmenté d'avoir un phénotype déficitaire, ce qui est en accord avec les données de la littérature[18] [34]. Par ailleurs, on observe aussi que la valeur de l'odd-ratio est cohérente avec la diminution de l'activité de la DPD. Une diminution de cette activité causée par la présence d'un variant délétère entraîne une augmentation du risque d'avoir un phénotype déficitaire.

Pour le groupe réunissant l'ensemble des mutations rares *a priori* délétères ou de conséquences inconnues, l'analyse montre un Odd-Ratio augmenté (Tableau 10). Cet Odd-Ratio, ainsi que la valeur minimale de l'intervalle de confiance, sont supérieur à 1 et montrent qu'il existe une augmentation du risque de présenter un phénotype déficitaire dans ce groupe de patients. Nous pouvons par ailleurs rapprocher cet Odd-Ratio de celui du groupe de patients porteurs de la mutation p.D949V, les deux valeurs étant relativement proches. Toutefois avec ces données nous ne pouvons pas affirmer que toutes les mutations rares retrouvées dans ce groupe sont responsables d'un déficit partiel en DPD. Ces mutations ont été regroupées et sont très hétérogènes. Certains types de mutations sont plus à risque d'engendrer une protéine anormale, tout comme un changement d'acide aminé sur

certaines sites catalytiques sont plus à même de réduire l'activité enzymatique de la DPD. Cependant si l'on considère que toutes les mutations ne sont pas à risque d'être à l'origine d'un déficit en DPD, il est aussi possible que certaines mutations aient des conséquences beaucoup plus importantes sur l'activité enzymatique (présence de variants délétères par nature). Des travaux de recherche supplémentaires sur l'étude fonctionnelle de chaque variant devraient être réalisés. La mise en place d'étude de mutagenèse dirigée permettrait par exemple de connaître les conséquences de ces mutations sur l'activité enzymatique de la DPD.

A noter que 32 patients (soit 1,31% de l'ensemble des patients) sont porteurs d'une des mutations IVS14+1G>A, p.I560S ou p.D949V diminuant l'activité de la DPD. Ces trois mutations sont habituellement les plus couramment recherchées par les techniques habituelles de génotypage (par technique Sanger ou sondes TaqMan). Le groupe présentant une mutation rare *a priori* délétère se compose de 54 patients (soit 2,20% de l'ensemble des patients). Les mutations présentes chez ces patients ont pu être mises en évidence grâce au séquençage complet du gène *DPYD*. Ainsi, même si ces mutations restent rares prises séparément, leur nombre important ne permet pas de les négliger. Ce groupe de 54 patients représente alors 62,8% des 86 patients portant une mutation délétère ou *a priori* délétère, avec un risque augmenté d'avoir un phénotype déficitaire.

Ainsi avec les données obtenues il apparaît qu'un nombre non négligeable de patients présentent une mutation rare et que, parmi eux, le risque d'avoir un phénotype déficitaire est largement augmenté. Le risque pour ces patients de développer une toxicité au 5-FU (en cas d'administration d'une dose pleine) est alors proche des patients porteurs de la mutation D949V, qui elle, est systématiquement recherchée lors d'un génotypage. Le génotypage réalisé par la technique TaqMan recherche les 4 mutations les plus courantes et ne permet alors pas de mettre en évidence la majorité des mutations du gène *DPYD*, alors même que ces patients sont à risque de développer une toxicité. Les informations apportées par cette méthode sont partielles et ne sont pas suffisantes pour dépister la majorité des patients porteurs d'anomalies génétiques du gène *DPYD* pouvant être à l'origine de déficits partiels en DPD. Dans ces conditions le génotypage réalisé par cette technique ne montre que peu de preuves de son intérêt vis-à-vis du phénotypage [11] [44].

### 3. Variant notable

Une mutation, parmi toutes celles retrouvées, paraît intéressante et nécessiterait une étude plus large. La mutation NM\_000110.3(DPYD) c.2872A>G (p.Lys958Glu) est retrouvée chez 4 patients de notre cohorte dont 3 présentant une uracilémie au-dessus du seuil de 16 ng/mL avec une moyenne de 31,85 ng/mL. Elle est proche au niveau protéique de la mutation délétère NM\_000110.3(DPYD):c.2846A>T (p.Asp949Val) et se situe au niveau d'un site catalytique 4Fe-4S. De plus les logiciels de prédictions (PolyPhen, MutationTaster, SIFT) la classe comme probablement délétère. Par ailleurs, l'étude des conséquences fonctionnelles montre que cette mutation présente une activité *in vitro* DPD nulle [17]. Tous ces éléments sont donc concordants et mènent à penser que cette mutation a un impact sur l'activité enzymatique (50% de l'activité globale). Les patients seraient donc fortement à risque de développer une toxicité si aucune adaptation posologique n'est réalisée. Le nombre de patients portant cette mutation dans notre cohorte est faible et les étudier séparément n'apporterait pas de résultats statistiquement pertinents. Quatre patients de notre cohorte présentent cette mutation (soit 0,16%) alors que sa fréquence allélique est estimée à  $4 \times 10^{-5}$  dans la population caucasienne. Des études complémentaires à plus grande échelle sont nécessaires concernant cette mutation mais son implication dans un déficit en DPD, et par extension à un risque augmenté de toxicité au 5-FU, est fortement probable.

### 4. UGT1A1

Le séquençage d'*UGT1A1*, réalisé en parallèle lors du séquençage NGS, nous apporte aussi certaines informations. Sur notre cohorte, 8,5% des patients sont homozygotes *UGT1A1*\*28/\*28. Ces patients vont avoir un métabolisme de l'Irinotecan diminué et sont à risque de développer une toxicité [59]. Comme cité précédemment, l'utilisation de l'Irinotecan est très courante et le plus souvent en association avec le 5-FU. Les toxicités engendrées par ces molécules, avec ou sans déficit enzymatique associé, présentent de nombreux effets indésirables communs. Dans ces conditions, il est donc difficile lorsque ces deux molécules sont conjointement prescrites d'évaluer la part de toxicité imputable à l'une ou l'autre molécule. Il est d'ailleurs considéré que les toxicités liées à l'Irinotecan sont souvent sous-estimées [1]. Ce pourcentage relativement élevé, nous indique que ce déficit d'activité est loin d'être négligeable et touche un nombre important de patients. Il est alors possible d'imaginer qu'une partie de ces toxicités dont la cause est incertaine

soit imputée aux fluoropyrimidines alors même qu'elles pourraient être en fait attribuées à l'Irinotécan chez les patients porteurs d'un génotype \*28/\*28. De plus, tout comme les toxicités causées par les dihydropyrimidines, elles peuvent être facilement évitables en ajustant la posologie à la mise en place du traitement (Figure 21 [60]).

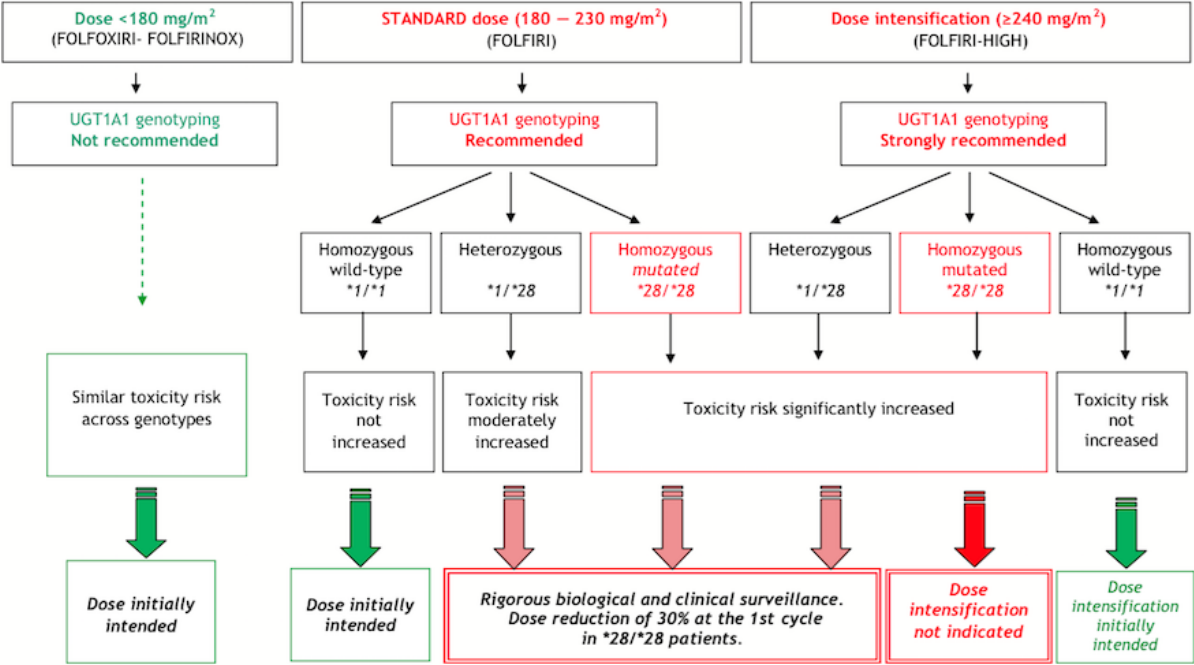


Figure 1 Decision tree for UGT1A1 genotyping depending on initially intended irinotecan dose.

Figure 21 Arbre décisionnelle de génotypage UGT1A1 en fonction des doses d'Irinotecan

## 5. Limites

Le séquençage du gène *DPYD* a toutefois certaines limites et ne peut à lui seul mettre en évidence tous les patients avec une activité enzymatique déficitaire. D'autres facteurs comme l'âge, la fonction rénale ou l'Indice de Masse Corporelle sont liés à un risque augmenté de toxicité [9]. Il est admis que 50 à 75% [61] [62] des toxicités aux fluoropyrimidines sont liées à un déficit en DPD. Ces chiffres élevés impliquent qu'il est donc loin d'être aberrant de rechercher directement la cause génétique chez ces patients afin de dépister la présence possible d'une mutation entraînant un déficit enzymatique. Les résultats portant sur notre cohorte montrent que la présence d'une mutation rare (aux possibles conséquences sur l'activité enzymatique) sur le gène *DPYD* est de 2,2%. Celles-ci ne sont pas recherchées en routine des laboratoires de pharmacogénétique en France ou éventuellement *a posteriori* en cas de toxicité. Si l'on prend en compte les variants recherchés habituellement (haplotype B3 compris), notre cohorte présente 6,7% de patients avec un risque de toxicité augmentée. Même si cela concerne une faible proportion de patient, elle n'est pas négligeable et doit être mise en parallèle avec le grand nombre de patients qui vont se voir prescrire une chimiothérapie à base de fluoropyrimidines. Avec 80000 patients chaque année ayant recours aux fluoropyrimidines plus de 5000 d'entre eux vont être porteurs d'une mutation sur *DPYD*. Par ailleurs 1800 de ces patients sont porteurs d'une mutation rare que seul le séquençage peut mettre en évidence. Il reste cependant un nombre important de patients dont la toxicité ne sera pas expliquée par une cause génétique (variations interindividuelles) ou ne touchant pas le gène *DPYD*. Le NGS ne permet donc pas de dépister, en l'état actuel des techniques et connaissances, tous les patients à risque de toxicité aux fluoropyrimidines. Il est donc important de garder un œil averti sur les limites de cette technique.

### *a. Autres causes d'origines génétiques*

- **Mutations introniques**

En effet concernant le génotypage, même si le séquençage haut débit du gène *DPYD* couvre beaucoup mieux le gène, l'analyse effectuée ne porte que sur les séquences exoniques du gène et les régions flanquantes (+/- 10 bases au minimum). La majorité des séquences introniques n'étant pas couvertes, de nombreuses mutations ne seront donc pas recherchées. Cela doit toutefois être mis en perspective, car la plupart des mutations introniques (hors site d'épissage) sont peu



étudiées et leurs conséquences fonctionnelles rarement mises en évidence. Leur impact sur les protéines et sur l'activité enzymatique de celles-ci est donc supposé modéré. Cependant, l'étude de l'haplotype B3 [28] présentant une mutation intronique profonde c.1129-5923C>G causerait l'apparition d'un site cryptique d'épissage et de l'apparition d'un codon Stop prématuré à l'origine d'une diminution d'activité de la DPD.

- **MicroARN / MIR27A**

Un autre mécanisme pouvant être à l'origine d'un déficit en DPD est la présence d'une mutation particulière (rs895819) présente sur le gène MIR27A codant un microARN : Mir-27-a. Les microARN sont des séquences courtes d'ARN simple brin ayant un rôle dans la régulation de la transcription des gènes. Nous concernant, plusieurs études [18] [63] [64] ont montré que les patients porteurs de cette mutation sur le microARN ont une augmentation des risques de toxicité lorsqu'associée à une autre mutation. Actuellement cette mutation n'est pas recherchée, mais il serait possible d'imaginer qu'elle soit à l'origine de discordances concernant l'augmentation des risques de toxicités pour une même mutation ou concernant le manque de corrélation entre génotypage et phénotypage, comme dans le cas de l'haplotype B3.

- **Anomalies de structures**

Egalement, l'analyse informatique des résultats, ne permet pas de pouvoir mettre en évidence les anomalies de structures du gène et les grands réarrangements. Les anomalies hétérozygotes comme l'absence d'un ou plusieurs exons nécessitent des analyses complémentaires qui ne sont pas réalisées en routine. Toutefois, même si ces anomalies de structures ont déjà été décrites [65], elles restent très rares et plusieurs études rétrospectives sur des patients ayant présenté une toxicité aux fluoropyrimidines sont discordantes [66] [67] [68].

- **Hyperméthylation du promoteur**

Un dernier mécanisme, la méthylation du promoteur du gène *DPYD*, n'a pas la possibilité d'être mis en évidence par le séquençage réalisé en routine. Il s'agit d'une altération épigénétique conduisant à la modification de la transcription du gène. Cependant ce phénomène reste mineur et son impact sur la baisse d'activité de la DPD et la survenue d'une toxicité présente des résultats discordants [66] [69] [70].



### *b. Distribution allélique*

Chez les patients porteurs de plusieurs mutations, le séquençage ne permettra pas de connaître leur distribution allélique. Dans le cas où 2 mutations délétères sont retrouvées il ne sera pas possible dans la majorité des cas de savoir si elles sont portées par le même allèle. Cela doit être pris en compte, car si les deux allèles sont porteurs d'une mutation délétère nous pouvons nous attendre à une activité enzymatique fortement diminuée voire nulle. Si un seul allèle présente les deux mutations, l'autre allèle aura une activité normale et l'activité enzymatique globale ne sera pas inférieure à 50% en théorie. Pour connaître cette distribution allélique, des analyses complémentaires sont alors nécessaires. La réalisation d'un phénotypage peut nous permettre de connaître l'activité DPD, et *a minima* de confirmer ou non un déficit complet. L'étude de ségrégation familiale peut aussi être réalisée afin de connaître l'origine parentale des deux allèles. Si les deux parents sont porteurs des mêmes mutations, chaque allèle transmis sera porteur d'une mutation. Si un seul parent est porteur des deux mutations, un allèle sans mutation aura été transmis.

### *c. Difficulté de prédiction du phénotype*

Par ailleurs, la finalité du génotypage, quelle que soit sa technique, reste de savoir si un patient est à risque de développer une toxicité lors de sa première cure de chimiothérapie. Le séquençage permet de mettre en évidence de nombreux variants rares mais à défaut d'études complémentaires concernant leurs conséquences fonctionnelles, ces variants sont souvent classés en variants de signification indéterminée d'après les critères ACMG [71] (American College of Medical Genetics and Genomics). De plus s'agissant de variants rares pour la plupart, ils sont souvent très peu étudiés et rarement cités dans des publications scientifiques. Cela est aussi dû au fait que le génotypage réalisé en routine et dans la plupart des études n'est pas un séquençage du gène complet mais se contente d'étudier les variants les plus fréquents. De ce fait, il apparaît comme étant compliqué d'améliorer les connaissances concernant ces variants dont les conséquences cliniques et biologiques restent à prouver. L'amélioration des connaissances sur ces mutations passerait alors par la création d'une base de données commune nationale avec la mise en parallèle des mutations avec leurs conséquences sur le phénotypage et sur la clinique. Cet axe d'amélioration fait notamment partie des perspectives possibles citées dans le rapport de la HAS [1].

Leur découverte ne permet alors pas de connaître la tolérance *a priori* du patient au 5-FU et d'avoir des recommandations posologiques totalement adaptées. Dans ces cas il est alors préférable d'être prudent et de mettre une dose réduite ou *a minima* d'avoir une surveillance accrue du patient afin de déceler les premiers signes de toxicité. Il est préférable pour le patient d'avoir une augmentation de dose progressive au cours du traitement en fonction de sa tolérance, plutôt que de développer une toxicité entraînant des effets indésirables nombreux, potentiellement graves et entraînant un arrêt temporaire de la chimiothérapie (et donc une perte de chance).

#### *d. Coût élevé*

Rappelons aussi que cette analyse est réalisée en routine et concerne un grand nombre de patients : plus de 2000 séquençages ont été réalisés en 2018. De ce fait les contraintes économiques comprenant les coûts et remboursements sont aussi à prendre en compte. Malgré l'amélioration des techniques d'analyses génétiques et la diminution de leurs coûts ces dernières années, le séquençage à haut débit reste une analyse onéreuse. Cela est d'autant plus marqué si la comparaison est faite avec le phénotypage réalisé par des techniques plus classiques. En pratique la facturation de ces deux analyses présente un rapport de l'ordre de 1 à 20. De plus, le séquençage est actuellement classé comme un acte innovant hors nomenclature et le remboursement de cette analyse n'est pas assuré à 100%. Beaucoup de prescripteurs dépendant de structures privées ne peuvent pas assumer le coût élevé de cette analyse et la prescrire de façon systématique. A l'heure actuelle le coût de cette analyse est un des principaux freins au développement de cette technique.

## 6. Avantages

### *a. Contraintes pré-analytiques faibles*

Tout d'abord, le génotypage a l'avantage de ne présenter que peu de contraintes au niveau pré-analytique. Contrairement au phénotypage où le traitement rapide de l'échantillon et le transport rapide à -20°C est demandé au risque de ne pas assurer la qualité des résultats, le génotypage ne nécessite aucune condition particulière. La plupart des prescriptions ne sont pas issues du CHU de Lille (ou du Centre Oscar Lambret, dont les envois sont assurés par transport pneumatique) et peuvent parfois concerner des patients situés hors de la région Hauts-de-France. Dans ce contexte les faibles contraintes pré-analytiques, tout en gardant une fiabilité dans les résultats, est loin d'être négligeable. Cela n'oblige pas à mettre en place une logistique particulière en plus de celle déjà présente et ne serait en aucun cas un frein à l'augmentation des prescriptions de ce type d'analyse.

A noter qu'il s'agit d'une analyse génétique et que le consentement éclairé du patient est indispensable. Cela reste inhérent à ce type d'analyse, quelle que soit la technique de génotypage. Les prescripteurs sont cependant habitués et informés de la nécessité du consentement. L'information du patient est réalisée lors des consultations préalables au début du traitement et n'entraîne pas de retard à la mise en place de la chimiothérapie.

### *b. Meilleure efficacité de prédiction*

Un avantage du séquençage haut débit est l'obtention de résultats beaucoup plus complets sur l'ensemble des mutations concernant *DPYD*. Alors que les recommandations émises par GPCO-Unicancer (Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique) et par le RNPGx (Réseau National de Pharmacogénétique) en avril 2016 [20] imposaient au génotypage de rechercher au minimum les 3 mutations principales, le séquençage complet permet d'appréhender l'ensemble des mutations du gène. Les résultats que nous avons obtenus sur notre cohorte nous montrent que la majorité des mutations présentes chez les patients ne sont pas uniquement retrouvées sur ces positions et ne sont donc habituellement pas recherchées. Et, au-delà de savoir si le patient est porteur ou non de certaines mutations, le but de l'analyse reste de connaître l'activité enzymatique de la DPD en vue de diminuer les toxicités que pourraient présenter les patients à pleine dose de fluoropyrimidines. Dans le cas de la présence d'un variant clairement délétère ou prédit comme tel, une

adaptation posologique à la mise en place du traitement est recommandée, avec adaptation par la suite en fonction de la tolérance à cette première cure. Il apparaît donc que le séquençage du gène entier apporte une information plus exhaustive sur le statut génétique du patient et permet de mieux prévoir sa tolérance au traitement. Cette analyse beaucoup plus complète est donc plus cohérente pour répondre à cette problématique que la recherche ponctuelle de certaines mutations. Le dernier rapport de la HAS [1] place d'ailleurs le séquençage complet de *DPYD* comme un axe d'amélioration à envisager concernant le génotypage. Le choix de réaliser le séquençage paraît donc tout à fait justifié et le faire depuis 2017 est donc relativement novateur.

### *c. Possibilité d'associer d'autres gènes d'intérêt*

De plus le séquençage peut être étendu afin d'associer, en plus de *DPYD*, plusieurs autres gènes d'intérêt. Il est donc possible grâce à une seule analyse d'apporter une information sur la tolérance du patient vis-à-vis de plusieurs traitements avant même qu'ils ne soient prescrits. Dans notre cas, les gènes *DPYD* et *UGT1A1* sont séquencés lors de la même analyse. Le surcoût est négligeable et permet d'apporter une information complémentaire au prescripteur. *UGT1A1* en particulier permet d'anticiper d'éventuels effets indésirables à l'Irinotecan chez les patients porteurs de l'allèle \*28 et permet au prescripteur d'adapter la posologie.

Ces informations sont transmises avec les résultats de la recherche en déficit en DPD et permettent d'anticiper la mise en place éventuelle du traitement de 2<sup>e</sup> intention. Ces données pharmacogénétiques étant en amont de toute prescription, il est donc indispensable d'avoir un dialogue clinico-biologique afin de sensibiliser et d'informer les cliniciens sur la valeur ajoutée de ces résultats et sur l'impact bénéfique que cela peut avoir sur les patients. De plus, il est largement possible d'améliorer ces analyses en fonction des connaissances dans ce domaine. Certains gènes d'intérêt peuvent être facilement ajoutés à la technique de séquençage sans apporter de contraintes techniques. A l'heure actuelle plusieurs sociétés de biologie moléculaire (par exemple : applied biosystems ou SOPHiA GENETICS proposent des panels de gènes, intégrant notamment le gène *DPYD*. L'utilisation de kits commerciaux « prêt-a-l'emploi » peut alors être un facteur permettant l'amélioration de l'accessibilité de la pharmacogénétique dans les laboratoires d'analyses.

#### *d. Fiabilité des résultats*

Le séquençage permet d'obtenir un résultat fiable ne permettant que très peu de place au doute. L'analyse génétique basée sur l'ADN du patient, les résultats seront reproductibles n'étant aucunement influencés par des facteurs extérieurs.

Concernant le phénotypage, les laboratoires d'analyses utilisent différentes techniques de dosage (notamment le détecteur soit MS/MS soit en UV/BD). Il est alors possible que les résultats diffèrent d'un laboratoire à un autre. Pour les patients ayant une activité proche des valeurs limites, le statut déficitaire ou non de la DPD peut alors être accompagné d'une incertitude. Pour pallier à cela, une évaluation externe de la qualité (EEQ) de l'uracilémie a été commercialisée au niveau national à partir de 2018.

### 7. Autres facteurs à prendre en compte

#### *a. Délai de rendu de résultat*

A l'heure actuelle, les recommandations de la HAS [1], préconisent un rendu de résultats dans les 10 jours. Pour le séquençage *DPYD* les analyses sont réalisées par série de 48 patients et permettent en moyenne de respecter ces contraintes au CHU de Lille.

#### *b. Cycle circadien*

La chronobiologie a pour fondement l'étude des variations biologiques qui se déroulent tout au long de la journée. Ainsi il a été montré que l'activité de la DPD suivait un rythme circadien (sur 24 heures) et qu'il en résultait des variations dans l'efficacité des traitements et de leurs toxicités [35] [36] [37]. Le phénotypage étant basé sur l'efficacité de cette enzyme, il est donc possible de penser que les résultats obtenus vont dépendre de l'heure de prélèvement du patient. Ainsi pour un même patient cette influence permettrait à tort de le considérer comme partiellement déficitaire ou non avec pour conséquences une perte de chance en cas de sous-dosage ou un risque de toxicité en cas de surdosage. Au contraire le séquençage ne se base que sur l'ADN du patient et n'est aucunement influencé par ces facteurs endogènes. Cela est potentiellement un inconvénient, car ce rythme circadien montre un réel impact sur l'efficacité du traitement et n'est pas pris en compte par le génotypage. Cependant le phénotypage ne prend également pas en compte ce rythme alors qu'influencé par celui-ci. Pour le génotypage, cela peut aussi être

considéré comme un avantage. Les résultats génétiques sont perdurables et ne seront en aucun cas dépendant de ces facteurs variables. Les résultats d'un génotypage seront toujours identiques et accompagneront le patient tout au long de sa vie sans avoir besoin de refaire cette analyse.

## 8. Axes d'amélioration

En ayant connaissance des limitations et inconvénients du séquençage mais aussi de ses avantages, il est alors possible de proposer un certain nombre d'axes d'amélioration de cette analyse.

### *a. Création d'une base de données*

Comme cité précédemment, la présence de variants connus ou non mais dont les conséquences fonctionnelles ne sont pas connues est fréquente. Le séquençage d'un grand nombre de patients à plus grande échelle serait donc indispensable pour améliorer nos connaissances. Un retour d'expérience systématique des biologistes et des cliniciens sur les conséquences de certaines mutations pourrait être largement bénéfique. La mise en place d'une base de données clinico-biologiques nationale paraît donc être la suite logique. La « démocratisation » du séquençage serait une réelle avancée sur ce sujet en permettant la collecte de nombreuses données et l'amélioration de nos connaissances sur les mutations rares. De plus cette création d'une base de données fait partie des axes d'amélioration proposé par la HAS sur le dépistage des déficits en DPD dans son rapport datant de décembre 2018 [1]. Cette analyse étant réalisée en routine depuis 2017 au sein du CHU de Lille, ces améliorations futures ont largement été anticipées. Cependant même si environ 3000 patients ont déjà pu bénéficier du séquençage du gène *DPYD*, le grand nombre de variants différents et leurs fréquences alléliques faibles nécessitent l'étude d'un plus grand nombre de patients et la participation d'autres centres au niveau national.

De plus cette utilisation de la pharmacogénétique, notamment concernant les déficits en DPD, a très bien été acceptée par l'ensemble des oncologues, radiothérapeutes et des autres professionnels de santé impliqués dans la prescription de chimiothérapie. Pour la plupart, ces analyses font partie de leurs pratiques quotidiennes et sont primordiales dans les informations que cela leur apporte.

Actuellement peu d'études [17] [72] sont réalisées sur les variants rares de *DPYD* ce qui ne permet pas d'approfondir les connaissances que partiellement. De plus même si ces mutations sont souvent liées à une toxicité (avec une étude rétrospective)

leurs conséquences fonctionnelles sont souvent difficiles à affirmer. Dans ce cas le niveau de preuves est souvent insuffisant pour mettre en place de nouvelles recommandations.

#### *b. Optimisation du coût*

Concernant le coût de cette analyse, il s'agit en effet d'un axe majeur à améliorer. Plusieurs solutions seraient notamment envisageables afin de permettre une prescription plus systématique de cette analyse. Dans un premier temps, une solution au niveau national en améliorant le remboursement serait un réel moteur à la généralisation du séquençage. Cette analyse dépend à l'heure actuelle de la nomenclature RIHN et ne permet pas d'avoir un remboursement complet ni de savoir lors de la prescription de cette analyse quel sera son coût final ôtant alors toute visibilité à court et moyen terme. De plus la déclaration de chaque analyse doit être faite par les établissements prescripteurs en vue de la valorisation du NGS réalisé, ajoutant, en plus du coût, des contraintes administratives. Cette amélioration de la prise en charge du séquençage ne pourra être favorisée que par une politique de santé publique au niveau national, mais l'apport d'un certain nombre d'éléments montrant l'intérêt du séquençage dans la prise en charge des patients pourrait y contribuer.

Par ailleurs une étude médico-économique plus globale serait nécessaire afin de connaître le bénéfice réel sur la prescription de cette analyse. En effet, en cas de toxicité sévère déclarée par le patient, un surcoût important d'hospitalisation peut être engendré. Les événements indésirables de grade 3 ou 4 nécessitent une prise en charge particulière du patient, éventuellement dans un service spécialisé (réanimation) et ce pour une période pouvant être relativement longue. Le coût d'un séquençage systématique doit alors être mis en perspective et comparé au coût généré par la prise en charge de ces patients. De plus, chez ces patients, il existe une réelle perte de chance liée à un arrêt temporaire ou définitif du traitement par fluoropyrimidines ou par le remplacement de celles-ci par une molécule moins efficace. Notre étude montre que plus de 2% des patients sont porteurs d'une mutation dont les conséquences fonctionnelles ne sont pas connues mais pouvant entraîner une diminution d'activité de la DPD. Ces patients sont susceptibles de faire une toxicité au 5-FU, avec les conséquences qui en découlent, et seul le séquençage complet du gène permet de les dépister. Le surcoût de l'analyse, tout ou en partie compensé par la diminution de soins complémentaires, ainsi que les



bénéfices apportés aux patients et aux prescripteurs doivent alors être considérés d'une manière globale en prenant l'aspect pluridisciplinaire des répercussions, afin d'établir une politique de santé claire et appropriée.

### *c. Optimisation de l'analyse*

Enfin un autre axe d'amélioration possible serait d'augmenter le nombre de gènes étudiés. Un panel plus étendu et comprenant d'autres gènes d'intérêt, notamment liés à la pharmacogénétique est envisageable. L'adaptation posologique ne concernerait plus seulement les fluoropyrimidines et l'irinotecan, mais de nombreuses autres cibles pouvant dépasser le cadre de l'oncologie et des traitements utilisés en chimiothérapie. Ainsi grâce à une étude génétique plus large, les risques de toxicités iatrogènes liées à différents traitements pourraient être connus à l'avance et ainsi évités. Là aussi un dialogue clinico-biologique est indispensable afin d'informer au mieux l'ensemble des cliniciens impliqués dans la prise en charge du patient. Ainsi en plus de connaître la tolérance à plusieurs molécules utilisées en chimiothérapie, des informations pharmacogénétiques complémentaires seraient accessibles. Par exemple, le métabolisme des curares pourrait être connu et permettre au médecin-anesthésiste de connaître à l'avance la réponse du patient à ces molécules. Dans le cadre de l'oncologie, les opérations ayant recours à une anesthésie générale sont courantes et une adaptation thérapeutique adaptée/personnalisée pourrait être possible. Cette information, disponible avant même la mise en place du traitement serait alors un outil idéal dans la prévention des risques iatrogènes. Par ailleurs, vu l'aspect novateur de cette vision largement en amont de tout événement indésirable, un panel pharmacogénétique plus large pourrait alors montrer son intérêt. Sa mise en place dans une pratique de routine ne serait que bénéfique pour les patients en diminuant les événements indésirables, pour les cliniciens avec une approche plus personnalisée du traitement, mais aussi au niveau collectif avec une diminution des coûts de prise en charge supplémentaire.



## 9. Conclusion

L'ensemble des résultats de cette étude portant sur 2451 patients permet d'apporter plusieurs éléments de réponse à la problématique initiale. Le séquençage complet du gène *DPYD* a pu montrer que les mutations de faible fréquence allélique, prises dans leur ensemble, sont relativement fréquentes. De plus, même si des études fonctionnelles seraient indispensables pour l'affirmer, leur impact ne semble pas être négligeable. Dans ces conditions, le génotypage ciblé sur les quelques mutations principales ne permet alors de n'apporter qu'une réponse partielle, et loin d'être suffisante pour affirmer une absence de risque de toxicité d'origine génétique.

Cependant, même si le séquençage du gène *DPYD* reste à l'heure actuelle l'analyse la plus complète pour détecter une origine génétique à un déficit enzymatique, elle ne doit pas être considérée comme suffisante. Les toxicités déclarées par les patients sont souvent multifactorielles et peuvent avoir différentes origines. De nombreux paramètres sont à considérer, comme l'état de santé du patient, sa fonction rénale, son âge ou d'autres causes environnementales. Dans ce cas, les apports du phénotypage seront nécessaires. Ainsi, il ne semble alors pas cohérent de mettre en opposition le génotypage et le phénotypage. Ces deux techniques sont complémentaires, et l'analyse combinée paraît être la plus performante pour dépister le maximum de patients présentant un déficit, qu'il soit complet ou partiel. Un déficit complet sera forcément retrouvé au phénotypage quel que soit son origine, génétique ou non. D'autre part les déficits partiels ont souvent un impact limité sur le phénotype malgré un risque de toxicité augmenté s'il existe une cause génétique. Dans ce cas le génotypage reste nécessaire même si la recherche ponctuelle des quelques mutations recommandées est très incomplète.

Les recommandations à l'heure actuelle prennent d'ailleurs bien en compte ces notions. Leur objectif primordial est d'éviter les décès liés aux toxicités et passe alors par la recherche de déficits enzymatiques complets. Il apparaît en effet que le phénotypage est l'analyse la plus adaptée dans ce cas et est donc, à juste titre, devenu obligatoire avant la prescription des fluoropyrimidines [2]. Toutefois les déficits partiels sont les plus nombreux et une analyse pharmacogénétique complète via le séquençage haut débit semble justifiée concernant ces patients. Seules les questions économiques restent un frein majeur au développement de cette technique, même si elles restent discutables et qu'une analyse médico-économique plus globale serait nécessaire afin d'y répondre.

Au final, le dépistage des déficits en DPD est une question complexe avec un réel enjeu de santé publique. Récemment plusieurs cas de décès liés au 5-FU ont été la source d'articles dans des journaux non scientifiques destinés au grand public [73] [74] favorisant la sensibilisation de l'opinion sur ces questions. Les cancers traités par les fluoropyrimidines sont parmi les plus fréquents et le nombre de patients ayant recours à ces molécules de première ligne est donc relativement important. Les événements indésirables peuvent être potentiellement graves et conduire au décès. Cela est d'autant plus regrettable que dans de nombreux cas, cela peut être évitable par une adaptation du traitement. Dans ce contexte, où une attitude préventive doit être privilégiée, le recours à la pharmacogénétique est donc particulièrement indiqué. Le séquençage haut débit dans la recherche de déficit en DPD présente un réel intérêt dans une utilisation conjointe au phénotypage afin de maximiser les chances de dépistage des patients à risque de toxicité aux fluoropyrimidines.

En pratique les analyses pharmacogénétiques s'intègrent parfaitement dans la prise en charge du patient avec la possibilité d'avoir une approche pluridisciplinaire complète. De nombreux prescripteurs y ont recours au quotidien et elles prennent une place de plus en plus importante en fournissant des réponses là où d'autres méthodes atteignent leurs limites. A l'heure actuelle la pharmacogénétique est une discipline en constante évolution et l'utilisation du séquençage haut débit est un moyen prometteur d'améliorer les connaissances en ce domaine et d'optimiser la prise en charge des patients.

## V. Bibliographie

- [1] Recherche d'un déficit en dihydropyrimidine deshydrogenase visant a prevenir certaines toxicites severes survenant sous traitement comportant des fluoropyrimidines. Rapport HAS-INCa. dec2018.
- [2] Note d'information n°DGS /PP2/DGOS/PF2/PF4 du 19 mars 2019 relative à la nécessité de mesurer l'uracilémie, chez les patients dont l'activité en DPD n'est pas connue, avant tout traitement par des fluoropyrimidines (5 FU, Capecitabine) ». .
- [3] Résumé des Caractéristiques du Produit. [En ligne]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0206151.htm>.
- [4] T. Aparicio, M. Ducreux, et S. Chaussade, « 5-fluorouracile : données sur le métabolisme et place actuelle dans le traitement des cancers digestifs », p. 10, 2019.
- [5] Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), p. 155, 2017.
- [6] C. A. T. C. Lunenburg *et al.*, « Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time », *European Journal of Cancer*, vol. 54, p. 40-48, févr. 2016.
- [7] M.-A. Lorient *et al.*, « Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) et sécurisation des chimiothérapies à base de fluoropyrimidines : mise au point et recommandations nationales du GPCO-Uncancer et du RNPGx », *Bulletin du Cancer*, vol. 105, n° 4, p. 397-407, avr. 2018.
- [8] M. Launay *et al.*, « Beating the odds: efficacy and toxicity of dihydropyrimidine dehydrogenase-driven adaptive dosing of 5-FU in patients with digestive cancer: Adaptive dosing of 5-FU in cancer patients with DPD deficiency », *Br J Clin Pharmacol*, vol. 81, n° 1, p. 124-130, janv. 2016.
- [9] D. Meulendijks *et al.*, « Renal function, body surface area, and age are associated with risk of early-onset fluoropyrimidine-associated toxicity in patients treated with capecitabine-based anticancer regimens in daily clinical care », *European Journal of Cancer*, vol. 54, p. 120-130, févr. 2016.
- [10] U. Amstutz *et al.*, « Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update », *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, p. 210-216, 2018.
- [11] M. Boisdron-Celle *et al.*, « 5-Fluorouracil-related severe toxicity: A comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency », *Cancer Letters*, vol. 249, n° 2, p. 271-282, mai 2007.
- [12] A. B. P. van Kuilenburg, « Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil », *European Journal of Cancer*, vol. 40, n° 7, p. 939-950, mai 2004.
- [13] C. F. Thorn, S. Marsh, M. W. Carrillo, H. L. McLeod, T. E. Klein, et R. B. Altman, « PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways », *Pharmacogenet Genomics*, vol. 21, n° 4, p. 237-242, avr. 2011.
- [14] X. Wei *et al.*, « Characterization of the Human Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene », *Genomics*, vol. 51, n° 3, p. 391-400, août 1998.
- [15] M. Boisdron-Celle *et al.*, « Prevention of 5-fluorouracil-induced early severe toxicity by pre-therapeutic dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency

- screening: Assessment of a multiparametric approach », *Seminars in Oncology*, vol. 44, n° 1, p. 13-23, févr. 2017.
- [16] *Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP)*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. .
- [17] S. M. Offer, C. C. Fossum, N. J. Wegner, A. J. Stuflesser, G. L. Butterfield, et R. B. Diasio, « Comparative Functional Analysis of DPYD Variants of Potential Clinical Relevance to Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity », *Cancer Research*, vol. 74, n° 9, p. 2545-2554, mai 2014.
- [18] D. Meulendijks *et al.*, « Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data », *The Lancet Oncology*, vol. 16, n° 16, p. 1639-1650, déc. 2015.
- [19] A. B. P. van Kuilenburg *et al.*, « Phenotypic and clinical implications of variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1862, n° 4, p. 754-762, avr. 2016.
- [20] Dépistage du déficit en dihydropyrimidinedehydrogénase (DPD) et sécurisation des chimiothérapies à base de 5FU (fluorouracile®) ou de capécitabine (Xéloda®). GPCO-Unicancer RNPgX.
- [21] L. M. Henricks *et al.*, « DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis », *The Lancet Oncology*, vol. 19, n° 11, p. 1459-1467, nov. 2018.
- [22] S. M. Offer, N. J. Wegner, C. Fossum, K. Wang, et R. B. Diasio, « Phenotypic Profiling of DPYD Variations Relevant to 5-Fluorouracil Sensitivity Using Real-time Cellular Analysis and In Vitro Measurement of Enzyme Activity », *Cancer Res*, vol. 73, n° 6, p. 1958-1968, mars 2013.
- [23] K. E. Caudle *et al.*, « Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing », *Clin Pharmacol Ther*, vol. 94, n° 6, p. 640-645, déc. 2013.
- [24] D. Meulendijks, A. Cats, J. H. Beijnen, et J. H. M. Schellens, « Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity – Ready for clinical practice? », *Cancer Treatment Reviews*, vol. 50, p. 23-34, nov. 2016.
- [25] L. M. Henricks *et al.*, « Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the DPYD gene activity score », *Pharmacogenomics*, vol. 16, n° 11, p. 1275-1284, juill. 2015.
- [26] A. B. P. van Kuilenburg *et al.*, « Intragenic deletions and a deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity », *Hum Genet*, vol. 128, n° 5, p. 529-538, nov. 2010.
- [27] U. Amstutz, S. Farese, S. Aebi, et C. R. Largiadèr, « Dihydropyrimidine dehydrogenase gene variation and severe 5-fluorouracil toxicity: a haplotype assessment », *Pharmacogenomics*, vol. 10, n° 6, p. 931-944, juin 2009.
- [28] D. Meulendijks *et al.*, « Patients homozygous for DPYD c.1129-5923C>G/haplotype B3 have partial DPD deficiency and require a dose reduction when treated with fluoropyrimidines », *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 78, n° 4, p. 875-880, oct. 2016.
- [29] M. J. Deenen *et al.*, « Upfront Genotyping of DPYD\*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis », *JCO*, vol. 34, n° 3, p. 227-234, nov. 2015.

- [30] S. M. Offer, A. M. Lee, L. K. Mattison, C. Fossum, N. J. Wegner, et R. B. Diasio, « A DPYD Variant (Y186C) in Individuals of African Ancestry Is Associated With Reduced DPD Enzyme Activity », *Clin Pharmacol Ther*, vol. 94, n° 1, p. 158-166, juill. 2013.
- [31] M. W. Saif, A. M. Lee, S. M. Offer, K. McConnell, V. Relias, et R. B. Diasio, « A DPYD Variant (Y186C) Specific to Individuals of African Descent in a Patient With Life-Threatening 5-FU Toxic Effects: Potential for an Individualized Medicine Approach », *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 89, n° 1, p. 131-136, janv. 2014.
- [32] Z. Kleibl *et al.*, « Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy », *neo*, vol. 56, n° 4, p. 303-316, 2009.
- [33] M. R. Johnson, K. Wang, et R. B. Diasio, « Profound Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency Resulting from a Novel Compound Heterozygote Genotype », *Clin Cancer Res*, vol. 8, n° 3, p. 768-774, mars 2002.
- [34] S. Terrazzino, S. Cargnin, M. Del Re, R. Danesi, P. L. Canonico, et A. A. Genazzani, « DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis », *Pharmacogenomics*, vol. 14, n° 11, p. 1255-1272, août 2013.
- [35] M.-A. Barrat-Petit, C. Naulin-Ifi, P. Mahler, et G. Milano, « Dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD): rythme et conséquences », *Pathologie Biologie*, vol. 53, n° 5, p. 261-264, juin 2005.
- [36] B. E. Harris, R. Song, S. Soong, et R. B. Diasio, « Relationship between Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity and Plasma 5-Fluorouracil Levels with Evidence for Circadian Variation of Enzyme Activity and Plasma Drug Levels in Cancer Patients Receiving 5-Fluorouracil by Protracted Continuous Infusion », *Cancer Res*, vol. 50, n° 1, p. 197-201, janv. 1990.
- [37] K. Abolmaali *et al.*, « Circadian variation in intestinal dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) expression: A potential mechanism for benefits of 5FU chrono-chemotherapy », *Surgery*, vol. 146, n° 2, p. 269-273, août 2009.
- [38] R. A. Fleming *et al.*, « Correlation between Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in Peripheral Mononuclear Cells and Systemic Clearance of Fluorouracil in Cancer Patients », *Cancer Res*, vol. 52, n° 10, p. 2899-2902, mai 1992.
- [39] M. Chazal, M. C. Etienne, N. Renée, A. Bourgeon, H. Richelme, et G. Milano, « Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. », *Clin Cancer Res*, vol. 2, n° 3, p. 507-510, mars 1996.
- [40] F. Coudoré *et al.*, « Validation of an Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Method for Quantifying Uracil and 5,6-Dihydrouracil in Human Plasma », *J Chromatogr Sci*, vol. 50, n° 10, p. 877-884, nov. 2012.
- [41] J. Ciccolini, C. Mercier, M.-F. Blachon, R. Favre, A. Durand, et B. Lacarelle, « A simple and rapid high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for 5-fluorouracil (5-FU) assay in plasma and possible detection of patients with impaired dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity », *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, vol. 29, n° 4, p. 307-315, 2004.
- [42] B. A. W. Jacobs *et al.*, « Development and validation of a rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for determination of uracil and dihydrouracil in human plasma », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 126, p. 75-82, juill. 2016.



- [43] D. Meulendijks *et al.*, « Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity », *Br J Cancer*, vol. 116, n° 11, p. 1415-1424, mai 2017.
- [44] M.-C. Etienne-Grimaldi *et al.*, « New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine », *PLoS ONE*, vol. 12, n° 5, p. e0175998, mai 2017.
- [45] E. Gamelin *et al.*, « Correlation Between Uracil and Dihydrouracil Plasma Ratio, Fluorouracil (5-FU) Pharmacokinetic Parameters, and Tolerance in Patients With Advanced Colorectal Cancer: A Potential Interest for Predicting 5-FU Toxicity and Determining Optimal 5-FU Dosage », *JCO*, vol. 17, n° 4, p. 1105-1105, avr. 1999.
- [46] R. Déporte, M. Amiard, A. Moreau, C. Charbonnel, et L. Campion, « High-performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydrouracil/uracil ratio in plasma », *Journal of Chromatography B*, vol. 834, n° 1-2, p. 170-177, avr. 2006.
- [47] A. B. P. van Kuilenburg *et al.*, « Dihydropyrimidinase Deficiency and Severe 5-Fluorouracil Toxicity », *Clin Cancer Res*, vol. 9, n° 12, p. 4363-4367, oct. 2003.
- [48] A. Kadakol, S. S. Ghosh, B. S. Sappal, G. Sharma, J. R. Chowdhury, et N. R. Chowdhury, « Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: Correlation of genotype to phenotype », *Human Mutation*, vol. 16, n° 4, p. 297-306, 2000.
- [49] G. Canu, A. Minucci, C. Zuppi, et E. Capoluongo, « Gilbert and Crigler Najjar syndromes: An update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database », *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 50, n° 4, p. 273-280, avr. 2013.
- [50] M.-C. Etienne-Grimaldi *et al.*, « UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice », *Fundamental & Clinical Pharmacology*, vol. 29, n° 3, p. 219-237, 2015.
- [51] J. M. Hoskins, R. M. Goldberg, P. Qu, J. G. Ibrahim, et H. L. McLeod, « UGT1A1\*28 Genotype and Irinotecan-Induced Neutropenia: Dose Matters », *J Natl Cancer Inst*, vol. 99, n° 17, p. 1290-1295, sept. 2007.
- [52] L. Iyer *et al.*, « UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity », *The Pharmacogenomics Journal*, vol. 2, n° 1, p. 43, janv. 2002.
- [53] J. Halbritter *et al.*, « High-throughput mutation analysis in patients with a nephronophthisis-associated ciliopathy applying multiplexed barcoded array-based PCR amplification and next-generation sequencing », *J Med Genet*, vol. 49, n° 12, p. 756-767, déc. 2012.
- [54] A. B. P. van Kuilenburg *et al.*, « Clinical Implications of Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Deficiency in Patients with Severe 5-Fluorouracil-associated Toxicity: Identification of New Mutations in the DPD Gene », *Clin Cancer Res*, vol. 6, n° 12, p. 4705-4712, déc. 2000.
- [55] E. S. R. Collie-Duguid, M. C. Etienne, G. Milano, et H. L. McLeod, « Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients », *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 10, n° 3, p. 217, avr. 2000.
- [56] E. Gross *et al.*, « Strong Association of a Common Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene Polymorphism with Fluoropyrimidine-Related Toxicity in Cancer Patients », *PLoS ONE*, vol. 3, n° 12, p. e4003, déc. 2008.

- [57] V. Boige *et al.*, « DPYD Genotyping to Predict Adverse Events Following Treatment With Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients With Stage III Colon Cancer: A Secondary Analysis of the PETACC-8 Randomized Clinical Trial », *JAMA Oncol*, vol. 2, n° 5, p. 655-662, mai 2016.
- [58] A. Loganayagam *et al.*, « Pharmacogenetic variants in the *DPYD*, *TYMS*, *CDA* and *MTHFR* genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity », *British Journal of Cancer*, vol. 108, n° 12, p. 2505-2515, juin 2013.
- [59] Y. Ando *et al.*, « Polymorphisms of UDP-Glucuronosyltransferase Gene and Irinotecan Toxicity: A Pharmacogenetic Analysis », *Cancer Res*, vol. 60, n° 24, p. 6921-6926, déc. 2000.
- [60] F. Thomas *et al.*, « Pharmacogenetics-based personalized therapy: levels of evidence and recommendations from the French national network of pharmacogenetics (RNPGx) ».
- [61] A. Morel *et al.*, « Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance », *Mol Cancer Ther*, vol. 5, n° 11, p. 2895-2904, nov. 2006.
- [62] J. Ciccolini, E. Gross, L. Dahan, B. Lacarelle, et C. Mercier, « Routine Dihydropyrimidine Dehydrogenase Testing for Anticipating 5-Fluorouracil-Related Severe Toxicities: Hype or Hope? », *Clinical Colorectal Cancer*, vol. 9, n° 4, p. 224-228, oct. 2010.
- [63] D. Meulendijks *et al.*, « Rs895819 in MIR27A improves the predictive value of DPYD variants to identify patients at risk of severe fluoropyrimidine-associated toxicity », *International Journal of Cancer*, vol. 138, n° 11, p. 2752-2761, 2016.
- [64] U. Amstutz, S. M. Offer, J. Sistonen, M. Joerger, R. B. Diasio, et C. R. Largiadèr, « Polymorphisms in MIR27A Associated with Early-Onset Toxicity in Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy », *Clin Cancer Res*, vol. 21, n° 9, p. 2038-2044, mai 2015.
- [65] A. B. P. van Kuilenburg *et al.*, « Analysis of severely affected patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency reveals large intragenic rearrangements of DPYD and a de novo interstitial deletion del(1)(p13.3p21.3) », *Hum Genet*, vol. 125, n° 5, p. 581-590, juin 2009.
- [66] J. Savva-Bordalo *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*, vol. 10, n° 1, p. 470, sept. 2010.
- [67] I. Ticha, P. Kleiblova, J. Fidlerova, J. Novotny, P. Pohlreich, et Z. Kleibl, « Lack of large intragenic rearrangements in dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) gene in fluoropyrimidine-treated patients with high-grade toxicity », *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 64, n° 3, p. 615-618, juill. 2009.
- [68] A. B. P. van Kuilenburg *et al.*, « Severe fluoropyrimidine toxicity due to novel and rare DPYD missense mutations, deletion and genomic amplification affecting DPD activity and mRNA splicing », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1863, n° 3, p. 721-730, mars 2017.
- [69] H. H. Ezzeldin, A. M. Lee, L. K. Mattison, et R. B. Diasio, « Methylation of the DPYD Promoter: An Alternative Mechanism for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency in Cancer Patients », *Clin Cancer Res*, vol. 11, n° 24, p. 8699-8705, déc. 2005.
- [70] J. Yu et H. L. McLeod, « Methylation of the DPYD Promoter and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency », *Clin Cancer Res*, vol. 12, n° 12, p. 3864-3864, juin 2006.

- [71]; On behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee *et al.*, « Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology », *Genet Med*, vol. 17, n° 5, p. 405-423, mai 2015.
- [72] K. Seck *et al.*, « Analysis of the DPYD Gene Implicated in 5-Fluorouracil Catabolism in a Cohort of Caucasian Individuals », *Clin Cancer Res*, vol. 11, n° 16, p. 5886-5892, août 2005.
- [73] C. Daclin, « Chimiothérapie 5-FU: quand le traitement tue », *LExpress.fr*, 04-janv-2019. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.lexpress.fr/actualite/societe/sante/chimiotherapie-5-fu-quand-le-traitement-tue\\_2055790.html](https://www.lexpress.fr/actualite/societe/sante/chimiotherapie-5-fu-quand-le-traitement-tue_2055790.html).
- [74] C. Thibert, « Un test de toxicité désormais obligatoire avant une chimiothérapie au 5-FU », 30-avr-2019. [En ligne]. Disponible sur: <http://sante.lefigaro.fr/article/un-test-de-toxicite-desormais-obligatoire-avant-une-chimiotherapie-au-5-fu/>.
- [75] H. L. McLeod *et al.*, « Nomenclature for human DPYD alleles. », *Pharmacogenetics*, vol. 8, n° 6, p. 455-459, déc. 1998.
- [76] L. K. Mattison, M. R. Johnson, et R. B. Diasio, « A comparative analysis of translated dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA; conservation of functional domains and relevance to genetic polymorphisms », *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 12, n° 2, p. 133, mars 2002.



## **VI. Annexes**

Allèles DPYD :			*1	*2A	*2B	*3	*4	*5	*6	*7	*8	*9A	*9B	*10	*11	*12	*13
Changement nucléotidique	Conséquence sur la protéine	Référence															
1905+1G>A	n/a	rs3918290	C	T	T												
62G>A	R21Q	rs80081766	C													T	
85T>C	C29R	rs1801265	A									G	G				
295_298delTCAT	F100fs*	rs72549309	ATGA							del							
703C>T	R235W	rs1801266	G								A						
1003G>T	V335L	rs72549306	C												A		
1156G>T	E386X	rs78060119	C													A	
1601G>A	S534N	rs1801158	C				T										
1627A>G	I543V	rs1801159	T		C			C									
1679T>G	I560S	rs55886062	A														C
1898delC	P633fs*	rs72549303	G			delG											
2194G>A	V732I	rs1801160	C						T								
2657G>A	R886H	rs1801267	C										T				
c.2846A>T	D949V	rs67376798	T														
2983G>T	V995F	rs1801268	C											A			

\*fs : framshift (décalage du cadre de lecture)

**Annexe 1** : Nomenclature des allèles de DPYD (issue des nomenclatures de McLeod et al [75] (allèles \*1 à \*10), de Mattison et al [76] (allèles \*11 et \*12) et Johnson et al [33] (allèle \*13))



**Mutations rares *a priori* délétères retrouvées sur le gène *DPYD* (NM\_000110.3)**

Mutation <i>DPYD</i>	Patients porteurs	Patients déficitaires	UH2/U (moyenne)	Uracilémié (moyenne)	Référence de la mutation	Conséquences sur la protéine	Transcrit ADNc	Conséquences fonctionnelles	Fréquences alléliques
F59Ter	1	1	13,80	18,00	Non référencée	p.Phe59Ter	c.168_175dup	stop_gained	0,00E+00
D96H	1	0	40,30	1,30	rs773159364	p.Asp96His	c.286G>C	missense_variant	3,98E-06
Haplotype *7	4	1	12,65	10,50	rs539032572	p.Phe100Serfs*15	c.299_302delTCAT	frameshift_variant	9,91E-05
c.321+1	1	0	11,30	7,10	rs746368304	Saut d'exon	c.321+1G>A	splice_donor_variant	1,77E-05
M182K	1	0	13,40	12,20	rs754785410	p.Met182Lys	c.545T>A	missense_variant	4,60E-05
Y186C	1	0	20,10	7,20	rs115232898	p.Tyr186Cys	c.557A>G	missense_variant	2,07E-03
R208Q	1	0	15,70	12,70	rs376073289	p.Arg208Gln	c.623G>A	missense_variant	1,77E-05
R208L	1	0	9,50	15,00	rs376073289	p.Arg208Leu	c.623G>T	missense_variant	1,99E-05
P232T	1	0	6,70	9,00	rs913834317	p.Pro232Thr	c.694C>A	missense_variant	0,00E+00
N242I	1	0	22,90	1,60	Non référencée	p.Asn242Ile	c.725A>T	missense_variant	0,00E+00
K259E	1	1	5,30	51,00	rs45589337	p.Lys259Glu	c.775A>G	missense_variant	6,08E-03
G282R	1	0	16,60	5,30	Non référencée	p.Gly282Arg	c.844G>A	missense_variant	0,00E+00
A292P	1	0	8,80	22,00	Non référencée	p.Ala292Pro	c.874G>C	missense_variant	0,00E+00
A319V	1	1	5,25	8,30	Non référencée	p.Ala319Val	c.956C>T	missense_variant	0,00E+00
R358H	2	0	13,05	6,10	rs573299212	p.Arg358His	c.1073G>A	missense_variant	1,59E-05
R371Kfs5	1	0	14,00	10,00	Non référencée	p.Arg371Lysfs*5	c.1109dupT	frameshift_variant	0,00E+00
R371K	1	0	13,10	5,10	Non référencée	p.Arg371Lys	c.1112G>A	missense_variant	0,00E+00
M406I	4	0	14,41	5,30	rs61622928	p.Met406Ile	c.1218G>A	missense_variant	6,74E-03
V427A	1	1	3,30	22,90	rs200693895	p.Val427Ala	c.1280T>C	missense_variant	7,96E-05
A450V	1	0	18,70	1,70	rs72975710	p.Ala450Val	c.1349C>T	missense_variant	2,56E-04
c.1525-4GT	1	0	15,20	10,80	rs776943635	intronique	c.1525-4G>T	splice_region_variant	4,09E-06
G539R	1	0	13,40	9,10	rs142619737	p.Gly539Arg	c.1615G>C	missense_variant	8,15E-06
G567E	1	0	25,50	4,30	rs1188134745	p.Gly567Glu	c.1700G>A	missense_variant	3,99E-06
T584I	1	0	8,30	14,40	Non référencée	p.Thr584Ile	c.1751C>T	missense_variant	0,00E+00
R592Q	1	0	7,50	2,10	rs138616379	p.Arg592Gln	c.1775G>A	missense_variant	1,63E-05

M599I	1	0	8,00	2,80	rs767376585	p.Met599Ile	c.1797G>C	missense_variant	3,98E-06
I610V	1	0	25,80	5,50	Non référencée	p.Ile610Val	c.1828A>G	missense_variant	0,00E+00
I610M	1	0	15,30	4,70	Non référencée	p.Ile610Met	c.1830T>G	missense_variant	0,00E+00
K616Q	1	0	6,60	1,50	rs368146607	p.Lys616Gln	c.1846A>C	missense_variant	3,18E-05
N635K	1	0	17,60	8,00	rs3918289	p.Asn635Lys	c.1905C>G	missense_variant	1,59E-05
W650Ter	1	0	6,30	11,90	Non référencée	p.Trp650Ter	c.1950G>A	stop_gained	0,00E+00
T711S	1	0	23,40	2,90	Non référencée	p.Thr711Ser	c.2132C>G	missense_variant	0,00E+00
A721V	4	0	13,23	6,33	rs1371836676	p.Ala721Val	c.2162C>T	missense_variant	3,99E-06
c.2180-3T>C	1	0	15,70	9,10	rs74104343	intronique	c.2180-3T>C	splice_region_variant	5,10E-04
G764R	1	1	5,90	14,40	Non référencée	p.Gly764Arg	c.2290G>C	missense_variant	0,00E+00
T768K	1	0	11,92	7,80	rs56005131	p.Thr768Lys	c.2303C>A	missense_variant	1,95E-04
T856I	1	0	18,30	10,80	rs752228747	p.Thr856Ile	c.2567C>T	missense_variant	1,13E-04
S878R	1	0	10,90	8,40	rs919596571	p.Ser878Arg	c.2634T>G	missense_variant	1,20E-05
K958E	4	3	10,18	31,85	rs141044036	p.Lys958Glu	c.2872A>G	missense_variant	1,99E-05
P1023T	2	0	14,29	5,40	rs749122978	p.Pro1023Thr	c.3069G>A	missense_variant	1,77E-05

**Annexe 2** : Mutations rares *a priori* délétères retrouvées sur le gène *DPYD* (NM\_000110.3) et leur phénotypage associé

missense\_variant : mutation faux-sens

splice\_region\_variant : mutation au niveau d'un site d'épissage

stop\_gained : Mutation entraînant l'apparition d'un codon Stop prématuré

frameshift\_variant : mutation entraînant le décalage du cadre de lecture

Mutations <i>a priori</i> bénignes retrouvées sur le gène <i>DPYD</i> (NM_000110.3)									
Mutation <i>DPYD</i>	Patients porteurs	Patients déficitaires	UH2/U (moyenne)	Uracilémie (moyenne)	Référence de la mutation	Conséquences sur la protéine	Transcrit ADNc	Conséquences fonctionnelles	Fréquences alléliques
P197P	1	0	47,70	3,00	rs758927521	p.Pro197Pro	c.591T>C	synonymous_variant	3,98E-06
S204S	2	0	15,35	7,35	rs768519000	p.Ser204Ser	c.612C>G	synonymous_variant	3,98E-06
G284G	1	0	17,00	4,90	Non référencée	p.Gly284Gly	c.852T>G	synonymous_variant	0,00E+00
L310L	1	0	15,20	3,60	Non référencée	p.Leu310Leu	c.930G>A	synonymous_variant	0,00E+00
A323A	1	0	17,50	6,80	Non référencée	p.Ala323Ala	c.969C>T	synonymous_variant	0,00E+00
P329P	1	0	22,40	9,70	Non référencée	p.Pro329Pro	c.987A>G	synonymous_variant	0,00E+00
F363F	1	0	9,80	5,60	rs764173823	p.Phe363Phe	c.1089C>T	synonymous_variant	2,39E-05
A380A	2	0	16,85	6,10	rs150759598	p.Ala380Ala	c.1140T>C	synonymous_variant	4,61E-05
L442L	1	0	17,50	0,80	rs750632457	p.Leu442Leu	c.1326G>A	synonymous_variant	3,98E-06
N457N	4	0	14,08	8,75	rs57918000	p.Asn457Asn	c.1371C>T	synonymous_variant	2,39E-03
V490V	1	0	17,80	4,60	Non référencée	p.Val490Val	c.1470G>T	synonymous_variant	0,00E+00
A538A	1	0	31,20	2,40	rs760853559	p.Ala538Ala	c.1614C>T	synonymous_variant	5,68E-05
G539G	1	0	9,70	6,90	rs762029458	p.Gly539Gly	c.1617A>G	synonymous_variant	2,00E-05
R562R	1	0	21,40	1,43	rs761869860	p.Arg562Arg	c.1684A>C	synonymous_variant	1,60E-05
c.1905+10A>C	1	0	29,70	6,60	Non référencée	intronique	c.1905+10A>C	splice_region_variant	0,00E+00
V691V	2	0	9,00	9,75	rs1170908470	p.Val691Val	c.2073G>A	synonymous_variant	3,19E-05
c.2179+29G>A	1	0	11,40	4,40	rs138637410	intronique	c.2179+29G>A	splice_region_variant	1,36E-03
P752P	1	0	8,10	9,00	rs751746604	p.Pro752Pro	c.2256A>G	synonymous_variant	1,20E-05
L785L	1	0	23,00	7,30	Non référencée	p.Leu785Leu	c.2355G>A	synonymous_variant	0,00E+00
T962T	1	0	30,70	3,30	rs368617815	p.Thr962Thr	c.2886C>T	synonymous_variant	6,02E-05
c.2908-22T>C	1	0	13,07	1,50	rs749736621	intronique	c.2908-22T>C	intron_variant	7,08E-06

**Annexe 3** : Mutations *a priori* bénignes retrouvées sur le gène *DPYD* (NM\_000110.3) et le phénotypage associé

synonymous\_variant : mutation synonyme

intron\_variant : mutation intronique









Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2018/2019

**Nom : LARRUE**  
**Prénom : Romain**

**Titre de la thèse : INTERET DU SEQUENCAGE HAUT DEBIT DANS LA RECHERCHE DE DEFICIT EN DIHYDROPYRIMIDINE DESHYDROGENASE**

**Mots-clés : Pharmacogénétique, Oncologie, Fluoropyrimidine, Dihydropyrimidine deshydrogénase, Séquençage haut débit**

---

**Résumé :** La mise en place d'une chimiothérapie par fluoropyrimidine concerne 80000 patients par an en France et impose de connaître le statut de la dihydropyrimidine deshydrogénase (DPD), enzyme intervenant dans le métabolisme, afin de limiter les toxicités parfois létales. Le phénotypage est l'analyse recommandée mais l'utilisation de la pharmacogénétique par séquençage haut débit permet également de dépister un certain nombre de patients présentant un déficit enzymatique.

Les travaux présentés se basent sur une étude statistique rétrospective d'une cohorte composée de 2451 patients recrutés dans la région Hauts-de-France de juillet 2017 à janvier 2019 ayant eu recours à un traitement par fluoropyrimidine dont l'analyse combinée (phénotypage et génotypage) a été réalisée au CHU de Lille. Le génotypage a été réalisé par séquençage haut débit du gène *DPYD* et le phénotypage par UPLC-MS/MS afin d'obtenir l'Uracilémie et le Ratio UH2/U.

Les résultats obtenus montrent que certaines mutations fréquentes sont liées à une variation significative des paramètres du phénotypage. Au contraire les patients présentant l'haplotype B3, considérés comme ayant une augmentation des risques de déclarer une toxicité, ne présentent aucune variation des paramètres phénotypiques. De plus, un nombre important de patients (2,2% de la cohorte étudiée) présentent une mutation rare délétère par nature que seul le séquençage haut débit peut mettre en évidence. Ces patients ont par ailleurs un risque augmenté d'avoir un déficit partiel en se basant sur le phénotypage de la DPD.

L'utilisation du séquençage haut débit en routine est une analyse complémentaire pour la recherche de déficit en DPD d'origine génétique là où le phénotypage s'avère parfois plus incertain. Les mutations rares sont courantes et au vu du nombre de patients concernés il paraît alors cohérent d'y avoir recours afin d'améliorer la recherche de déficit en DPD et de diminuer les risques de toxicités parfois graves.

---

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur Jean-Louis CAZIN, Professeur des Universités, Université de Lille

**Assesseur(s) :** Professeur Franck BROLY, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille

Docteur Nicolas POTTIER, Maître de Conférences Universitaire - Praticien Hospitalier, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille

Docteur Benjamin HENNART, Praticien Hospitalier, Centre de Biologie Pathologie Génétique, CHU de Lille