

Génotypage de la Dihydropyrimidine déshydrogénase *DPYD* (4 variations pathogéniques)

Évaluation pour la mise à jour du *Répertoire québécois et
système de mesure des procédures de biologie médicale*

Une production de l'Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux (INESSS)

Direction des services de santé et de
l'évaluation des technologies

Le contenu de cette publication a été rédigé et édité par l'INESSS.

Membres de l'équipe projet

Auteure principale

Emmanuelle Tchekanda, Ph. D.

Soutien administratif

Annabelle Suire

Coordonnateur scientifique

Éric Potvin, Ph. D

Directrice

Michèle de Guise, M.D., FRCPC

Équipe de l'édition

Patricia Labelle

Denis Santerre

Hélène St-Hilaire

Sous la coordination de

Renée Latulippe, M.A.

Avec la collaboration de

Josée De Angelis, révision linguistique

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2020

Bibliothèque et Archives Canada, 2020

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF) ISBN 978-2-550-86342-7 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2020

La reproduction totale ou partielle de ce document est autorisée à condition que la source soit mentionnée.

Pour citer ce document : Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS).
Génotypage de la Dihydropyrimidine déshydrogénase *DPYD* (4 variations pathogéniques) Évaluation pour
la mise à jour du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. Rapport
rédigé par E. Tchekanda. Québec, Qc : INESSS; 2020. 22 p.

L'Institut remercie les membres de son personnel qui ont contribué à l'élaboration du présent document.

GÉNOTYPAGE DE LA DIHYDROPYRIMIDINE DÉSHYDROGÉNASE *DPYD* (4 VARIATIONS PATHOGÉNIQUES) (RÉFÉRENCE – 2016.02.001V)

Avis - validité analytique

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : CIUSSS de l'Estrie - Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

M. Guy Fink, Ph. D. n'a pas participé aux délibérations et à la formulation de la recommandation.

2. INTRODUCTION

L'avis se rapportant au génotypage de la mutation DPYD*2A du gène responsable de la synthèse de la dihydropyrimidine déshydrogénase (*DPYD*) a été publié après transmission au ministre de la Santé et des Services sociaux le 17 février 2017.

L'objectif visé était d'évaluer l'utilité d'introduire cette analyse dans le *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*, ci-après nommé *Répertoire*, afin de dépister la mutation DPYD*2A chez des patients atteints de cancer et susceptibles de subir des toxicités graves s'ils reçoivent des fluoropyrimidines en guise de traitement.

L'avis d'évaluation a été soumis au comité scientifique des analyses de biologie médicale de l'INESSS qui a émis la recommandation d'introduire l'analyse au *Répertoire* accompagnée des quatre précisions suivantes :

- Les membres du comité reconnaissent la valeur pronostique et thérapeutique du test au regard des données cliniques publiées et présentées en appui.
- L'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons est nécessaire avant la mise en application du test.
- L'accès rapide aux résultats constitue un enjeu important pour cette analyse.
- L'analyse des autres variantes défectueuses de la *DPYD* devrait être considérée.

Dans l'avis portant sur les meilleures stratégies pour réduire le risque de toxicités sévères causées par une déficience en dihydropyrimidine déshydrogénase, publié en mars 2019, l'INESSS recommande que le génotypage de quatre allèles consensuels de *DPYD* soit intégré dans la planification des traitements à base de fluoropyrimidines [INESSS, 2019]. Le présent avis est produit dans le contexte de la phase II d'une désignation complémentaire du laboratoire demandeur pour le génotypage des variantes génétiques DPYD*2A, c.2846A>T, c.1679T>G et c.1236G>A du gène *DPYD*.

3. RÉSUMÉ DE L'ÉVALUATION PRÉCÉDENTE

Un survol de l'évaluation menée en phase I par l'INESSS est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 Résumé exécutif de l'évaluation de l'utilité clinique en phase I

	Génotypage de la variation DPYD*2 du gène de la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD) par PCR en temps réel
Demandeur original	CHUM
Objectif de l'analyse	L'analyse visait à discriminer les patients susceptibles de développer des toxicités aiguës lors d'un traitement à base de fluoropyrimidines en détectant la présence de la mutation DPYD*2A chez les patients atteints de cancers digestifs, du sein, de la tête ou du cou.
Utilité clinique	Parmi les porteurs de l'allèle DPYD*2A traités à base de fluoropyrimidines, le risque d'expérimenter une toxicité générale grades ≥ 3 a été estimé à au moins 5 fois plus élevé que celui des non-porteurs. La stratification par type de toxicité grades ≥ 3 met en évidence, chez les porteurs de l'allèle DPYD*2A, un risque plus élevé : de toxicité hématologique, de mucites et de diarrhées, équivalent à respectivement 15,8; 7,5; et 5,5 fois plus que celui des non-porteurs. L'incidence d'une toxicité de grades ≥ 3 aux fluoropyrimidines a été réduite de 73 %, dans une cohorte non soumise au génotypage de l'allèle DPYD*2A, à 28 % dans la cohorte ayant été au préalable testée avant le traitement. Par ailleurs, une amélioration de la valeur prédictive positive a été démontrée lorsque les mutations DPYD*2A et 2846A>T sont simultanément recherchées.
Impact budgétaire	Deux scénarios ont été élaborés notamment : 1. Si la détection de la mutation DPYD*2A est effectuée chez tous les patients atteints de cancers colorectal et du sein, les coûts directs liés à l'introduction de cette analyse dans le <i>Répertoire</i> sont estimés à 375 147 \$ pour le total des trois prochaines années. 2. Si la détection est effectuée chez les patients atteints de cancer colorectal, de cancer du sein, et ayant des toxicités aiguës lors d'un traitement à base de fluoropyrimidines, les coûts pourraient varier de 18 758 \$ à 37 515 \$ pour le total des trois premières années.
Positions et orientations d'organismes d'intérêt	Certains des organismes consultés préconisent une réduction de la dose de traitement; la recherche de plusieurs variantes génétiques de <i>DPYD</i> ou une analyse systématique des patients susceptibles de recevoir les fluoropyrimidines serait à envisager.
Enjeux particuliers	Les patients porteurs de l'allèle DPYD*2A sont en moyenne hospitalisés pour une période plus longue pour cause de toxicité (18 jours), alors que ce n'est pas le cas pour les non-porteurs (2,5 jours). Toutefois, l'efficacité du traitement pourrait être altérée.

4. ANALYSE ÉVALUÉE

4.1. Description de la méthode

L'analyse vise à déterminer la présence des variantes génétiques c.1905+1G>A [*2A], c.2846A>T, c.1679T>G et c.1236G>A à transmission autosomique dominante dans l'ADN génomique extrait d'un échantillon de sang du patient atteint de cancer. La détection qualitative de ces mutations s'effectue par une réaction en chaîne par polymérase en temps réel, à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques aux variantes c.1905+1G>A, c.2846A>T, c.1679T>G et c.1236G>A du gène *DPYD*.

La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. Le demandeur utilise pour ce faire une sonde TaqMan^{MC} spécifique à la mutation analysée. La technologie TaqMan^{MC} est basée sur l'activité 5'-exonucléase de la Taq polymérase lors de la transcription du brin complémentaire (Figure 1). La sonde contient deux fluorochromes, dont un émetteur et un suppresseur. Lorsqu'ils sont à proximité l'un de l'autre, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur, qui la dissipe sous forme de chaleur au lieu d'émettre la fluorescence. Par la suite, durant l'étape d'hybridation de la PCR, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives et déterminent ainsi la spécificité du produit amplifié. L'étape d'élongation subséquente se caractérise par la synthèse d'un nouveau brin d'ADN catalysée par la Taq polymérase dont l'activité 5'-exonucléase déplace la sonde le long du brin d'ADN à copier qui est hydrolysée pour chaque molécule d'ADN synthétisée. Le fluorochrome est ainsi libéré de l'action du suppresseur et émet de la fluorescence. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité de produit amplifié (amplicons) au cours de la réaction [Poitras et Houde, 2002].

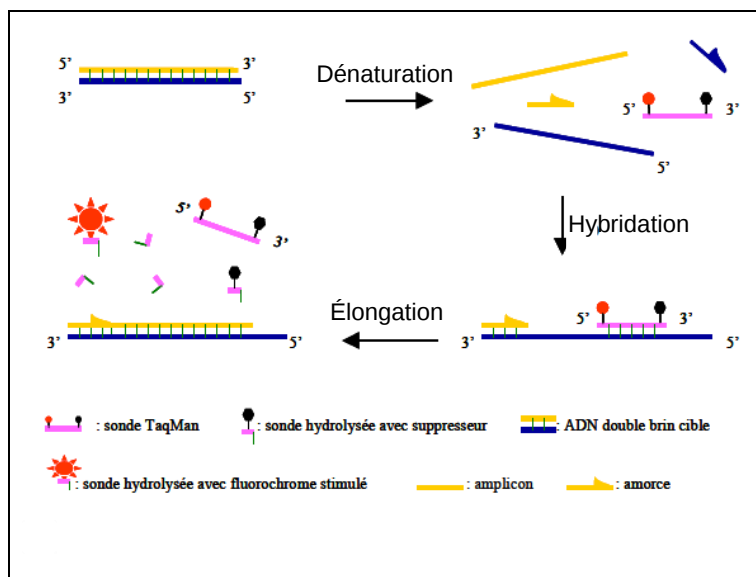


Figure 1 Principe de la technologie TaqMan^{MC} lors d'une PCR en temps réel

Source : adaptée de Poitras et Houde [2002]. La figure est à titre informatif seulement et peut ne pas nécessairement représenter l'approche exacte employée par le laboratoire demandeur.

4.2. Homologation

Il s'agit d'une analyse maison développée par le laboratoire de cytogénétique et biologie moléculaire du CHUS en utilisant un test de génotypage de type TaqMan^{MC}, ThermoFisher Scientific non homologué par Santé Canada ou la FDA.

4.3. Valeur pondérée : 35,63

4.4. Participation à un contrôle de qualité externe

Le laboratoire demandeur participe au programme de contrôles de qualité externe du College of American Pathologists pour *DPYD* (PGX3; trois épreuves pour deux envois par an). La première participation a été réalisée en mai 2019. Selon le demandeur, les résultats générés étaient exactes pour l'analyse de la variation *DPYD**2A sur les échantillons à tester qui étaient tous négatifs. Le test PGX3 comprend les quatre variations *DPYD* recommandées par l'INESSS et constitue donc un test de compétence complet pour le futur.

5. DONNÉES DE VALIDITÉ ANALYTIQUE

5.1. Données fournies par le demandeur

Dans un premier temps, le demandeur a soumis les données de validation analytique relatives à la détection de la mutation de référence *DPYD**2A. Les résultats générés pendant l'analyse des trois autres variantes du gène *DPYD* (*DPYD**2A, c.2846A>T, c.1679T>G et c.1129-5923C>G) ont ensuite été transmis

en incluant les données issues de l'analyse de la variante DPYD*2A. Le demandeur entend donner suite à la première délibération du comité scientifique des analyses de biologie médicale référant aux normes CSA Z 316.8-F18. Toutefois, la validation préexistante a été bonifiée par des expériences supplémentaires à l'aide de contrôles de séquençage disponibles. Le demandeur assure pouvoir mettre en place les éléments manquants de façon prospective et en parallèle au démarrage des activités pour l'ensemble des quatre variations du gène *DPYD*, à condition que cette validation préliminaire soit jugée adéquate par l'INESSS. Le cadre de validation utilisé par le demandeur a été publié par Mattocks et ses collaborateurs [2010].

5.2. Détails généraux de la validation analytique pour les quatre variantes

La réaction de PCR qui a été établie dans le laboratoire du demandeur est la même technologie que celle du laboratoire de Diagnostic Moléculaire du CHUM. Le demandeur utilise l'appareil de PCR en temps réel StepOnePlus (Applied Biosystems), et les génotypes sont attribués en utilisant la méthode AutoCaller^{MC} du StepOne Software (version 2.2.2). Les échantillons d'ADN utilisés pour la validation ont été extraits à partir du sang total (tube EDTA) par le moyen d'un instrument d'extraction régulier (MAGNA Pure, Roche).

Construction des échantillons

Les échantillons d'ADN témoins permettant de détecter les quatre variations du gène *DPYD* ont été construits comme suit :

- Synthèse des oligonucléotides de 345 bases représentant les séquences d'intérêt normales et mutées à analyser par génotypage. L'oligonucléotide à séquence normale et le muté ont été mélangés de façon équimolaire afin de représenter un génotype hétérozygote.
- Dilution des ADN synthétiques (valeurs Ct) égalant l'amplification obtenue avec des ADN génomiques d'origine humaine.
- Contrôles naturels : Un total de 100 échantillons obtenus de différents centres (CHUM, McGill, cohorte d'exomes du CHUS), ont tous été analysés au préalable par séquençage. Aucun double hétérozygote n'a été identifié. La nomenclature de variation est celle basée sur le transcrit NM_000110.3 et est utilisée dans tout le reste du document. La répartition des génotypes au sein des échantillons testés étaient comme suit :
 - a) *c.1905+1G>A* (*DPYD*2A*) : 3 cas hétérozygotes
 - b) *c.2846A>T* : 4 cas hétérozygotes
 - c) *c.1236G>A* (proxy pour *c.1129-5923C>G*) : 4 cas hétérozygotes
 - d) *c.1679T>G* : 2 cas hétérozygotes
 - e) Négatifs pour les quatre variantes : 87 cas

Un ensemble de 100 échantillons ont été testés.

Détail des essais TaqMan^{MC} (ID ThermoFisher) utilisés pour les quatre variations de *DPYD* :

- *c.1905+1G>A* (*DPYD*2A*) : C_30633851_20
- *c.2846A>T* : C_27530958_10
- *c.1236G>A* (proxy pour *c.1129-5923C>G*) : ANAAHER¹
- *c.1679T>G* : C_11985548_10

Caractéristiques du génotypage des quatre variantes du gène *DPYD*

La sélectivité de l'analyse a été démontrée par une séparation adéquate des trois génotypes pour chacune des quatre mutations, cette illustration inclut le rapport signal/bruit :

- *c.1905+1G>A* (*DPYD*2A*) : G = 5,8 et A = 4,2 – 5,3
- *c.2846A>T* : 12,5 et T = 19 - 20
- *c.1236G>A* : G = 7,0 et A = 6,0 – 6,7
- *c.1679T>G* : T = 16-20 et G =>20

À titre d'exemple, les figures 2 à 5 illustrent les discriminations alléliques des quatre mutations à détecter.

¹ Essai sur mesure ou « custom » développé pour le CHUM par la compagnie ThermoFisher

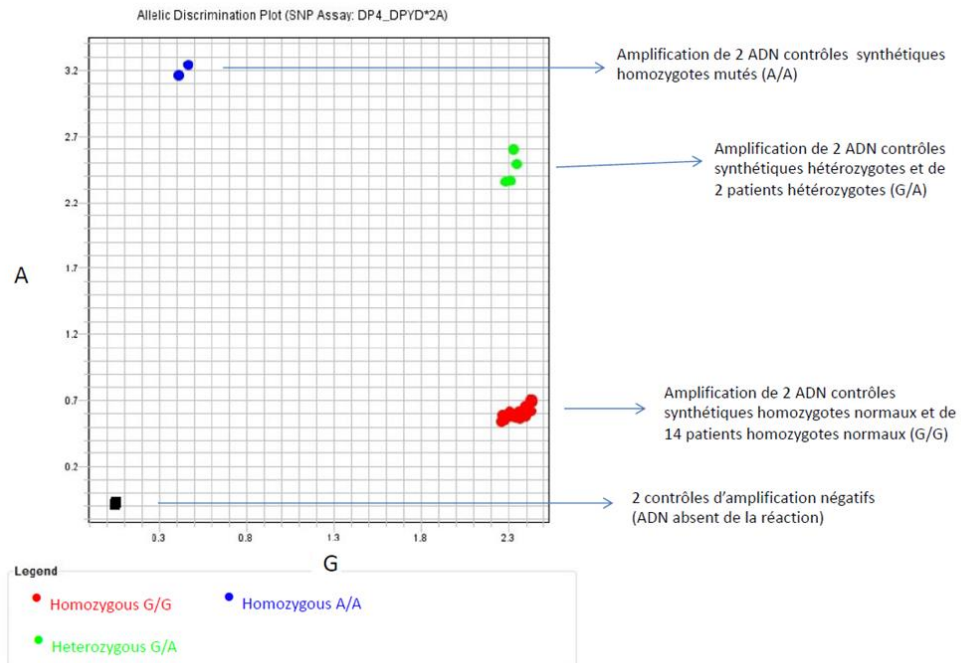


Figure 2 Exemple d'amplification pour l'identification de l'allèle c.1905+1G>A (DPYD*2A)

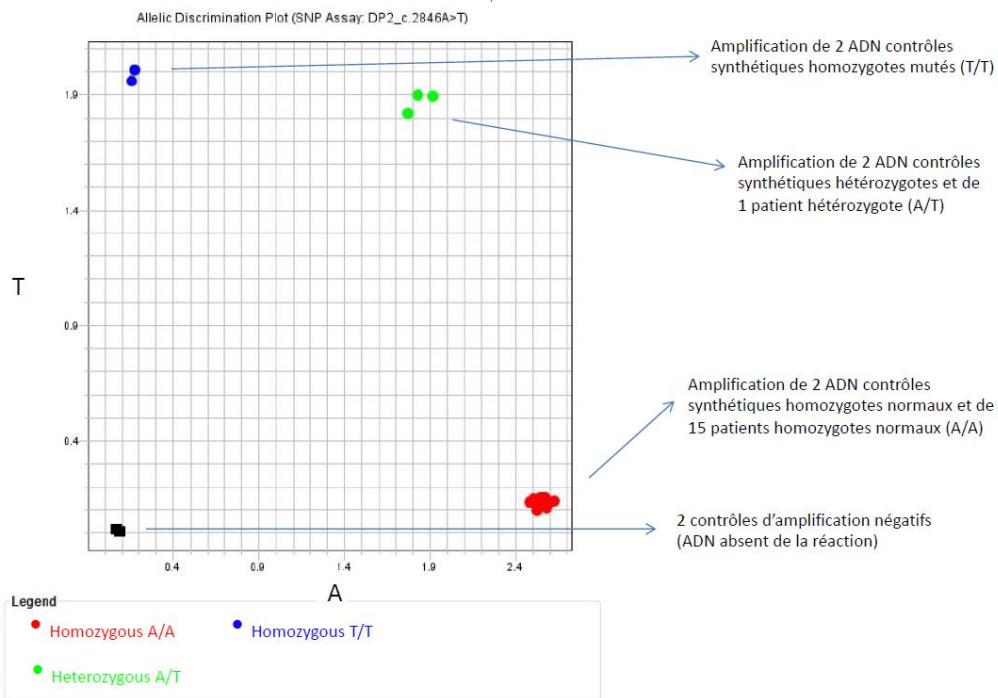


Figure 3 Exemple d'amplification pour l'identification de l'allèle c.2846A > T

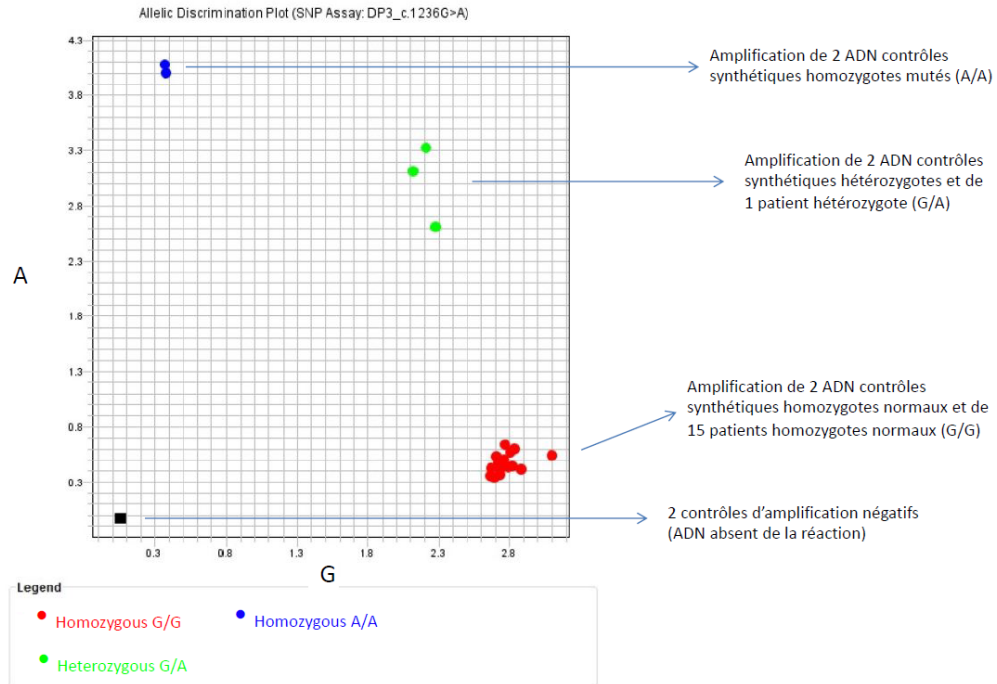


Figure 4 Exemple d'amplification pour l'identification de l'allèle c.1236G>A (proxy pour c.1129-5923C>G)

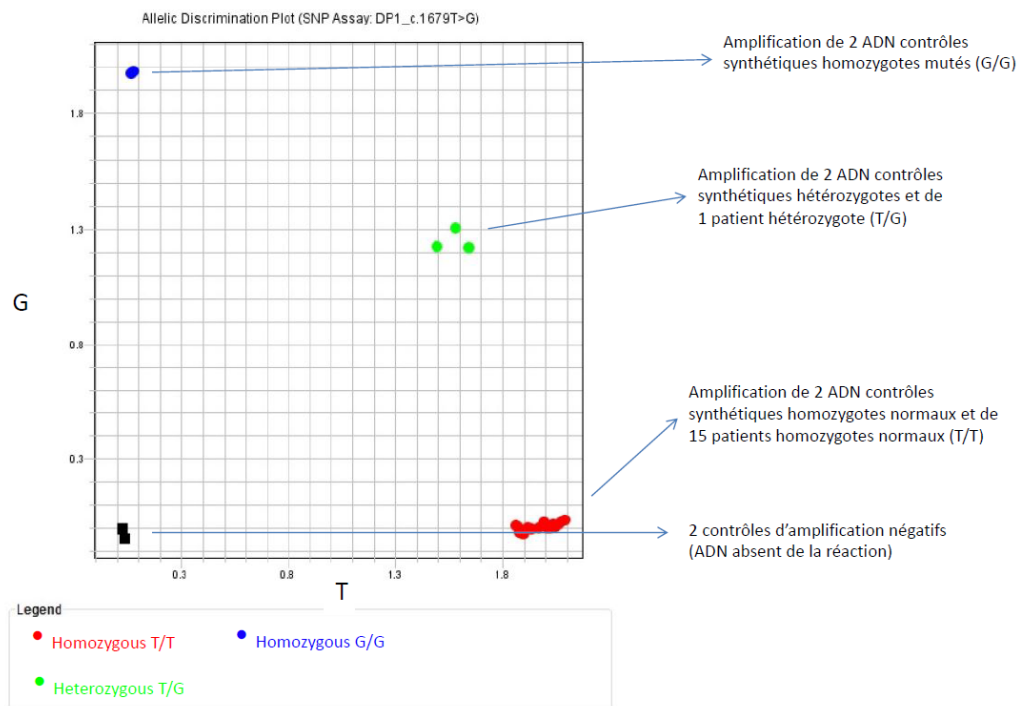


Figure 5 Exemple d'amplification pour l'identification de l'allèle c.1679T>G

La mise sur gel des différents produits d'amplification de la réaction de génotypage a montré une seule bande pour les quatre variations.

Les interférences potentielles au génotypage ont été minimisées en effectuant la détection de l'allèle normal et muté dans le même tube. L'essai TaqMan^{MC} comprend une vérification des amorces d'amplification PCR et la sonde TaqMan^{MC} pour exclure la présence de polymorphismes communs rapportés dans les bases de données publiques. La présence d'un tel polymorphisme pourrait potentiellement entraîner une perte de signal de l'allèle normal ou muté.

La détection de contaminations a été réalisée grâce à l'utilisation de deux « no template control » pour chaque variation testée par plaque.

L'évaluation prospective de la robustesse a été effectuée en utilisant des contrôles internes pour chaque variation testée par plaque : un contrôle synthétique normal, un contrôle synthétique hétérozygote muté, et un contrôle synthétique homozygote muté (fait en duplicata).

5.3. Résultats de la validation analytique

5.3.1. Contrôles positifs et négatifs par séquençage

Le laboratoire demandeur a effectué le génotypage des contrôles positifs et négatifs naturels décrits ci-dessus et séquencés au préalable en sept essais indépendants. Ainsi les paramètres suivants ont été évalués :

1. Sensibilité analytique pour les hétérozygotes

- *c.1905+1G>A* (DPYD*2A) : 3/3 cas détectés
- *c.2846A>T* : 4/4 cas détectés
- *c.1236G>A* : 4/4 cas détectés
- *C.1679T>G* : 2/2 cas détectés

2. Spécificité analytique

Elle s'élève à 100 % (IC95% : ≥ 96 %) pour chacune des quatre variations (incluant les 87 cas négatifs pour les quatre variantes et les négatifs pour la variation d'intérêt mais hétérozygotes pour une des autres variations).

- *c.1905+1G>A* (DPYD*2A) : Soit 97 cas négatifs au génotypage sur 97 cas négatifs au séquençage
- *c.2846A>T* : Soit 96 cas négatifs au génotypage sur 96 cas négatifs au séquençage
- *c.1236G>A* : Soit 96 cas négatifs au génotypage sur 96 cas négatifs au séquençage
- *C.1679T>G* : Soit 98 cas négatifs au génotypage sur 98 cas négatifs au séquençage

3. Exactitude

Pour chacune des quatre variations, elle a été évaluée à 100 % (IC95% : ≥ 97%) :

- *c.1905+1G>A* (DPYD*2A) : 100/100 génotypes
- *c.2846A>T* : 100/100 génotypes

- *c.1236G>A* : 100/100 génotypes
- *C.1679T>G* : 100/100 génotypes

La dispersion des génotypes de la cohorte de validation pour chaque variation est présentée dans la figure 6. Chaque diagramme correspondant à une mutation de *DPYD* inclut les contrôles synthétiques, ainsi que :

- *c.1905+1G>A* (*DPYD*2A*) : 3 hétérozygotes et 97 normaux
- *c.2846A>T* : 4 hétérozygotes et 96 normaux
- *c.1236G>A* : 4 hétérozygotes et 96 normaux
- *C.1679T>G* : 2 hétérozygotes et 98 normaux

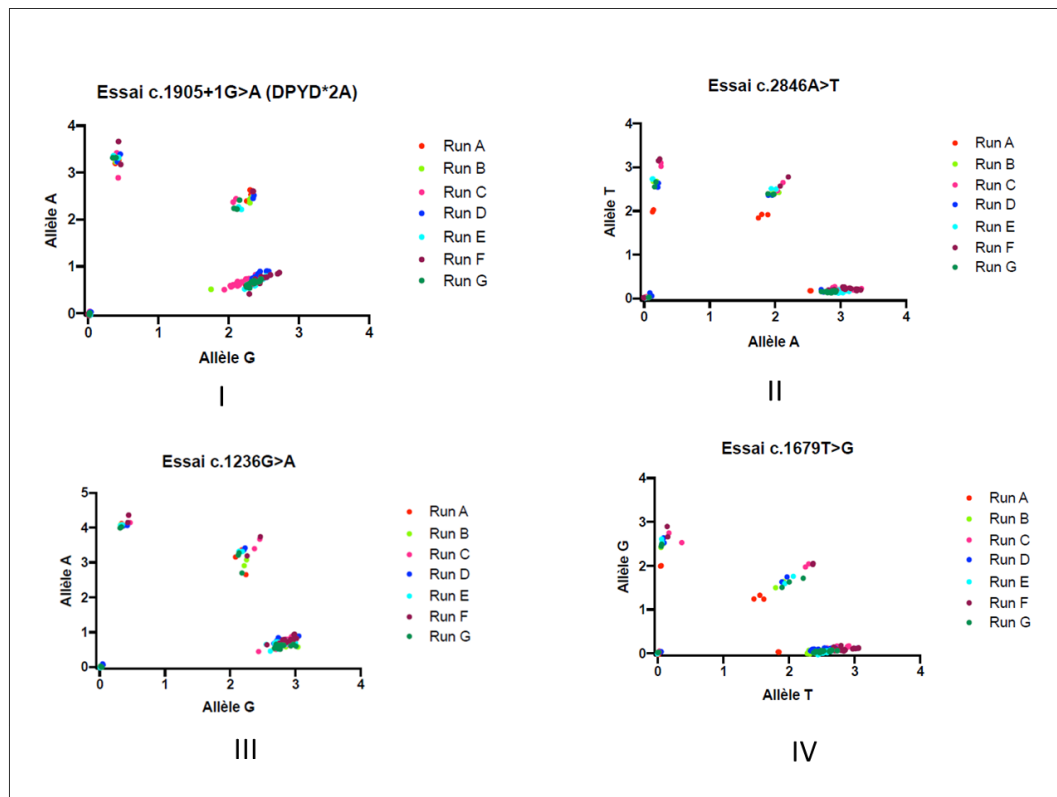


Figure 6 Dispersion des génotypes des 100 échantillons de la cohorte de validation ciblant les quatre variations à détecter.

Ces 100 échantillons ont préalablement été séquencés pour obtenir le génotype de chaque SNP. Chaque diagramme montre également les génotypes des contrôles synthétiques faits en duplicata pour chacun des 7 essais indépendants effectués (Run A à G) :
 I : 97 échantillons normaux et trois échantillons hétérozygotes ont été génotypés.
 II : 96 échantillons normaux et 4 échantillons hétérozygotes ont été génotypés.
 III : 96 échantillons normaux et 4 échantillons hétérozygotes ont été génotypés.
 IV : 98 échantillons normaux et 2 échantillons hétérozygotes ont été génotypés.

4. Robustesse

Un génotype a été obtenu pour chacun des 100 échantillons testés, et ce, pour chaque variation testée, soit 100 % (IC95% : ≥ 97 %).

5.3.2. Génomage d'un échantillonnage de patients à l'aveugle (rétrospectif)

Un total de 64 patients a été génomé à l'aveugle, en rétrospectif, sur 4 essais indépendants. Étant donné que la validation ait historiquement été effectuée en deux temps, les patients ont été génomés dans un premier temps pour le c.1905+1G>A (*2A), puis dans un second temps pour les 4 variations à la fois. Les résultats suivants ont été obtenus :

Génomés

Au total, 60 cas étaient normaux, deux cas hétérozygotes confirmés par séquençage Sanger, dont l'un pour la mutation c.1236G>A, et l'autre pour c.2846A>T. Deux cas hétérozygotes c.1905+1G>A (*2A) connus et confirmés par séquençage.

Robustesse

Aucun échec d'amplification ou d'analyse n'a été rapporté parmi les 64 échantillons testés pour les quatre variations. Cela permet de réévaluer l'intervalle de confiance 95 % à $\geq 98\%$, en se basant sur un total de 164 échantillons (contrôles séquencés au préalable et cas rétrospectifs), et ce, pour chacune des 4 variations.

Répétabilité (inter-essai)

Un total de 16 individus ont été génomés pour les 4 variations sur trois jours séparés, dont un essai sur un appareil différent (les deux appareils *real time* PCR StepOnePlus du laboratoire ont été testés). Ces échantillons comprenaient les trois cas hétérozygotes (un cas de chacun des génotypes c.1236G>A, c.1679T>G et c.2846A>T) et pour deux cas hétérozygotes (c.1905+1G>A (*2A)). Aucune discordance de génotype n'a été rapportée. De plus, aucun échec des contrôles synthétiques dupliqués (homozygote normal, hétérozygote et homozygote mutés) n'a été enregistré sur l'ensemble des quatre essais indépendants réalisés et pour chacune des quatre variations.

Répliquabilité (intra-essai)

La répliquabilité n'a pas été évaluée à ce jour, à l'exception des contrôles synthétiques qui sont détectés en duplicata pour chaque essai. À ces quatre essais ont été ajoutés les sept essais des contrôles naturels décrits plus haut, qui résultent en 11 duplicatas pour chacun des trois contrôles. Le demandeur ne prévoit pas d'évaluer la répliquabilité.

Reproductibilité (inter-laboratoire)

La reproductibilité n'a été jusqu'alors évaluée que pour la mutation de référence c.1905+1G>A (*2A). Le demandeur a génomé 41 cas analysés précédemment par le laboratoire du CHUM, utilisant la même technologie de génomage. Pour ces patients, un spécimen sanguin était disponible dans le laboratoire. Les résultats suivants ont été obtenus :

Génotype : 39 cas homozygotes normaux, 2 cas hétérozygotes (confirmé postérieurement par séquençage), et aucun cas homozygote muté disponible pour analyse compte tenu de la rareté de ce génotype. Une concordance de 100 % avec les résultats du CHUM a été rapportée pour les 41 individus testés, avec intervalle de confiance 95 % à $\geq 93\%$.

Surveillance de la performance du test

- Tests réalisés depuis l'application de l'analyse

Depuis la disponibilité du test pour la variation *c.1905+1G>A* (*2A) d'octobre 2018 à août 2019, 678 patients ont été analysés sur 98 essais indépendants. Sur chaque essai, les contrôles synthétiques normaux, hétérozygotes et homozygotes mutés ont été faits en duplicata. Par ailleurs, aucun échec de génotypage n'a été rapporté. Les trois clusters d'allèles distincts ont été représentés sur l'ensemble des essais. En 98 essais indépendants, les contrôles homozygotes normaux, hétérozygotes et homozygotes mutés ont été correctement génotypés. Globalement, la robustesse des contrôles d'ADN synthétique et la robustesse de l'essai dans le temps sur les ADN patients ont été confirmées. Les neuf cas détectés positifs (hétérozygotes) ont tous été confirmés par séquençage.

- Exemples de faux négatifs

Un cas de toxicité sévère avec génotypage négatif a été rapporté par un clinicien, le séquençage du gène complet s'est toutefois avéré négatif. En outre, le nouveau rapport pour les quatre variations comprend une note avisant le prescripteur de prévenir le laboratoire si une toxicité sévère est notée. De plus, une note de service sera également envoyée à ce sujet.

- Mesure du temps de réponse

Au total, 99 % des 678 patients analysés (671/678) ont un temps-réponse inférieur à 10 jours entre le prélèvement et la production de rapport, comme c'est exigé par le MSSS. Cinq cas analysés durant la période de Noël 2018 ont eu un temps de réponse supérieur à 10 jours (11 à 15 jours), en raison d'un effectif du personnel réduit durant cette période. Ces observations seront portées à l'attention de la biologie médicale et des ressources humaines du CHUS pour prendre les mesures nécessaires pour corriger cette situation. Par ailleurs, deux cas provenant d'hôpitaux externes ont eu des temps de réponse supérieurs à 10 jours en raison d'un décalage de 8 jours entre le prélèvement et la réception de l'échantillon par le laboratoire du demandeur.

Le temps de réponse moyen pour l'ensemble des cas testés était de 4,5 jours et de 5,4 jours pour les cas provenant de l'extérieur de l'hôpital du demandeur.

Rapports

Des exemples de rapports ont été fournis par le demandeur dans l'Annexe A. Ceux-ci comprennent un rapport négatif pour l'ensemble des quatre variations et quatre rapports positifs pour la présence d'une des quatre variations à l'état hétérozygote.

6. RÉSUMÉ DE LA DÉLIBÉRATION

Pour ce dossier, le MSSS a demandé au CSABM d'évaluer rapidement les données de validation analytique. Les communications électroniques effectuées entre les membres du CSABM, dont l'expertise leur permet d'apprécier ce type de données, ont servi à élaborer les constats présentés ici ainsi que la recommandation finale.

Validation analytique et robustesse de la technologie

Les membres du CSABM sont en accord sur le fait que le TaqMan^{MC} est une procédure répandue en laboratoire clinique et sera réalisée dans un laboratoire dont l'expertise est reconnue en diagnostic moléculaire. Le rapport de validation analytique actuellement présenté a été jugé bon, compte tenu de la rareté des échantillons naturels.

Les quelques points suivants restent à être documentés :

- calculer un intervalle de confiance pour la sensibilité analytique;
- déterminer la fidélité intermédiaire (réplicabilité);
- développer une stratégie pour se prémunir, détecter ou prévenir le drop-out allélique.

Besoin de santé non comblé

L'INESSS a récemment reconnu la pertinence clinique de tester 4 variations pathogéniques du gène *DPYD* dans le contexte d'une évaluation du risque de toxicité aiguë aux fluoropyrimidines. Les experts du comité rappellent que cette recommandation engendre un contexte de pratique où les prescripteurs sont fortement incités à tester leurs patients avant de donner la chimiothérapie. Du point de vue du décideur, cette situation crée également un sentiment d'urgence d'implantation puisque ce test n'en remplace aucun autre.

Certains experts sont préoccupés par la balance des risques encourus par le patient entre la non-conformité d'un point de vue analytique et les conséquences cliniques de retarder l'accès au test. En effet, le délai d'implantation du service généré par la complétion de la validation analytique retarde l'accès au test pour des patients dont seulement une minorité pourrait souffrir d'une erreur diagnostique attribuable à la mise en évidence d'une fausse variation pathogénique ou à un faux négatif.

Disponibilité des échantillons

Tous les membres du comité s'entendent sur le fait qu'il semble difficile de se procurer des échantillons positifs. Dans ce contexte, l'utilisation d'échantillons artificiels est nécessaire à court terme lorsqu'il y a rareté d'échantillons naturels porteurs de certains génotypes. Toutefois, il apparaît raisonnable de penser que dans un avenir plus ou moins rapproché, le dépistage systématique avant un

traitement aux fluoropyrimidines permettra de recueillir des échantillons humains homozygotes mutés qui serviront de témoins positifs.

Précaution sur les limites inhérentes à la couverture du test

Une dernière préoccupation concernant la couverture mutationnelle du test émerge des discussions. Effectivement, le test proposé ne permet pas d'évaluer le risque des personnes originaires de l'Asie de l'Est et une mutation pathogénique majeure propre aux personnes d'origine africaine n'est pas incluse. On rappelle aussi que même avec ce test, 30 à 50 % des toxicités ne sont pas couvertes puisque les mécanismes qui mènent à la toxicité aiguë des fluoropyrimidines sont multiples (microARN, modifications post-transcriptionnelles, etc.). Le rapport devra indiquer que malgré un résultat négatif pour ces 4 variations pathogéniques, un risque résiduel de développer une toxicité sévère aux fluoropyrimidines demeure présent.

7. RECOMMANDATION DE L'INESSS

GÉNOTYPAGE DE LA DIHYDROPYRIMIDINE DÉSHYDROGÉNASE *DPYD* (4 VARIATIONS PATHOGÉNIQUES)

La recommandation de l'INESSS

Considérant qu'il s'agit d'une demande de désignation complémentaire pour une analyse dont l'utilité clinique a déjà été reconnue, les données de validation analytique ont été jugées, selon la norme CSA Z 316.8-F18 :

- ☐ Complètes
- ☒ Incomplètes

Précisions accompagnant la recommandation

- L'INESSS recommande au laboratoire demandeur de compléter les points suivants :
 - calculer un intervalle de confiance pour la sensibilité analytique;
 - déterminer la fidélité intermédiaire (réplicabilité);
 - développer une stratégie pour se prémunir, détecter ou prévenir le drop-out allélique.
- Toutefois, l'INESSS considère que les données sont suffisamment étayées pour que le service soit offert immédiatement et ne demandera pas à revoir ce dossier.
- Le rapport devra indiquer que malgré un résultat négatif pour ces 4 variations, un risque de toxicité sévère aux fluoropyrimidines demeure.
- Il est très important de noter que le test ne reflète pas la diversité ethnique du Québec et doit être utilisé avec précaution.

ANNEXE A

EXEMPLES DE RAPPORTS

Exemple de rapport 1 : Normal

TEST EFFECTUÉ: Génotypage de 4 variants du gène DPYD :

1. c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G)
2. c.1679T>G (DPYD*13)
3. c.1905+1G>A (DPYD*2A)
4. c.2846A>T

RÉSULTAT : NORMAL – Absence des variants DPYD testés

INTERPRÉTATION :

Les variants DPYD testés n'ont PAS été détectés. Ce résultat exclut les génotypes les plus fréquemment associés à une déficience sévère en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD) dans la population d'origine dite caucasienne. Le traitement standard est recommandé.

Il est à noter que d'autres variants rares associés à une déficience sévère en dihydropyrimidine déshydrogénase ont été rapportés, et que d'autres facteurs de risque génétique existent (Amstutz et al. 2017, PMID: 29152729). De ce fait, il demeure un risque résiduel de développer une toxicité sévère aux fluoropyrimidines, malgré un résultat normal à ce test.

IMPORTANT : Si une toxicité sévère se produit, svp veuillez contacter le laboratoire de génétique moléculaire du CHUS (819-346-1110 poste 16828) pour discuter avec le généticien de la possibilité d'effectuer des tests additionnels pour la recherche de variations rares dans le gène DPYD. Ces tests ne sont pas disponibles sur une base courante, et s'associe à des délais significativement plus long compte tenu des méthodes employées. Toutefois, ces tests pourraient permettre d'éviter des toxicités similaires chez les apparentés et possiblement optimiser le traitement du patient.

LIMITATIONS :

Ce test détecte uniquement les variants DPYD c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G), c.1679T>G, c.1905+1G>A et c.2846A>T. Ces quatre variants expliquent au moins 20% des toxicités sévères associées aux traitements à base de fluoropyrimidine (INESSS). Comme pour tout test moléculaire reposant sur une amplification PCR, nous ne pouvons exclure qu'une délétion ou mutation au niveau de la séquence de liaison des amorces de PCR pourrait compromettre l'amplification d'un des allèles (allele dropout) et influencer l'analyse finale.

MÉTHODE :

L'identification des variants DPYD est effectuée par génotypage de type TaqMan. Une réaction de PCR dans laquelle deux sondes TaqMan spécifiques pour l'un ou l'autre des allèles possibles est effectuée. L'identité des allèles est déterminée par la mesure de l'intensité relative de chacun des fluorochromes à la fin de la réaction d'amplification à l'aide d'un instrument de PCR en temps réel.

Exemple de rapport 2 : DPYD*2A, hétérozygote

TEST EFFECTUÉ: Génotypage de 4 variants du gène DPYD :

1. c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G)
2. c.1679T>G (DPYD*13)
3. c.1905+1G>A (DPYD*2A)
4. c.2846A>T

RÉSULTAT : ANORMAL - Présence du variant c.1905+1G>A (DPYD*2A) à l'état hétérozygote

INTERPRÉTATION :

La présence du variant c.1905+1G>A (DPYD*2A) à l'état hétérozygote prédispose à une toxicité sévère associée aux traitements de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine.

Une réduction de la dose initiale de 50% est conseillée. L'ajustement posologique initial dépend aussi d'autres éléments, incluant le protocole de chimiothérapie et les caractéristiques du patient. Lors des cycles subséquents, la dose initiale recommandée doit être réajustée en fonction de la tolérance de chaque patient dans le but d'atteindre l'exposition maximale sécuritaire et d'optimiser l'efficacité du traitement. (INESSS : Traitements à base de fluoropyrimidines, 2019. ISBN 978-2-550-83345-1).

LIMITATIONS :

Ce test détecte uniquement les variants DPYD c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G), c.1679T>G, c.1905+1G>A et c.2846A>T. Ces quatre variants expliquent au moins 20% des toxicités sévères associées aux traitements à base de fluoropyrimidine (INESSS). Il est à noter que d'autres variants rares associés à une déficience sévère en dihydropyrimidine déshydrogénase ont été rapportés et que d'autres facteurs de risque génétique (et non génétique) existent (Amstutz et al. 2017, PMID: 29152729). Ceci pourrait contribuer à une susceptibilité accrue à la toxicité aux fluoropyrimidines. Comme pour tout test moléculaire reposant sur une amplification PCR, nous ne pouvons exclure qu'une délétion ou mutation au niveau de la séquence de liaison des amorces de PCR pourrait compromettre l'amplification d'un des allèles (allele dropout) et influencer l'analyse finale.

MÉTHODE :

L'identification des variants DPYD est effectuée par génotypage de type TaqMan. Une réaction de PCR dans laquelle deux sondes TaqMan spécifiques pour l'un ou l'autre des allèles possibles est effectuée. L'identité des allèles est déterminée par la mesure de l'intensité relative de chacun des fluorochromes à la fin de la réaction d'amplification à l'aide d'un instrument de PCR en temps réel.

Exemple de rapport 3: c.1236G>A, hétérozygote

TEST EFFECTUÉ: Génotypage de 4 variants du gène DPYD :

1. c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G)
2. c.1679T>G (DPYD*13)
3. c.1905+1G>A (DPYD*2A)
4. c.2846A>T

RÉSULTAT : ANORMAL - Présence du variant c.1236G>A à l'état hétérozygote

INTERPRÉTATION :

La présence du variant c.1236G>A à l'état hétérozygote prédispose à une toxicité sévère associée aux traitements de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine.

Une réduction de la dose initiale de 25-50% est conseillée. Les circonstances individuelles de chaque patient devraient être considérées pour déterminer si une approche prudente (réduction de 50%) ou une approche visant à optimiser l'efficacité malgré un risque de toxicité potentiellement plus élevé (réduction de 25%) est préférable. Lors des cycles subséquents, la dose initiale recommandée doit être réajustée en fonction de la tolérance de chaque patient dans le but d'atteindre l'exposition maximale sécuritaire et d'optimiser l'efficacité du traitement (INESSS : Traitements à base de fluoropyrimidines, 2019. ISBN 978-2-550-83345-1).

LIMITATIONS :

Ce test détecte uniquement les variants DPYD c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G), c.1679T>G, c.1905+1G>A et c.2846A>T. Ces quatre variants expliquent au moins 20% des toxicités sévères associées aux traitements à base de fluoropyrimidine (INESSS). Il est à noter que d'autres variants rares associés à une déficience sévère en dihydropyrimidine déshydrogénase ont été rapportés et que d'autres facteurs de risque génétique (et non génétique) existent (Amstutz et al. 2017, PMID: 29152729). Ceci pourrait contribuer à une susceptibilité accrue à la toxicité aux fluoropyrimidines. Comme pour tout test moléculaire reposant sur une amplification PCR, nous ne pouvons exclure qu'une délétion ou mutation au niveau de la séquence de liaison des amorces de PCR pourrait compromettre l'amplification d'un des allèles (allele dropout) et influencer l'analyse finale.

MÉTHODE :

L'identification des variants DPYD est effectuée par génotypage de type TaqMan. Une réaction de PCR dans laquelle deux sondes TaqMan spécifiques pour l'un ou l'autre des allèles possibles est effectuée. L'identité des allèles est déterminée par la mesure de l'intensité relative de chacun des fluorochromes à la fin de la réaction d'amplification à l'aide d'un instrument de PCR en temps réel.

Exemple de rapport 4: c.1679T>G, hétérozygote

TEST EFFECTUÉ: Génotypage de 4 variants du gène DPYD :

1. c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G)
2. c.1679T>G (DPYD*13)
3. c.1905+1G>A (DPYD*2A)
4. c.2846A>T

RÉSULTAT : ANORMAL - Présence du variant c.1679T>G (DPYD*13) à l'état hétérozygote

INTERPRÉTATION :

La présence du variant c.1679T>G (DPYD*13) à l'état hétérozygote prédispose à une toxicité sévère associée aux traitements de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine.

Une réduction de la dose initiale de 50% est conseillée. L'ajustement posologique initial dépend aussi d'autres éléments, incluant le protocole de chimiothérapie et les caractéristiques du patient. Lors des cycles subséquents, la dose initiale recommandée doit être réajustée en fonction de la tolérance de chaque patient dans le but d'atteindre l'exposition maximale sécuritaire et d'optimiser l'efficacité du traitement (INESSS : Traitements à base de fluoropyrimidines, 2019. ISBN 978-2-550-83345-1).

LIMITATIONS :

Ce test détecte uniquement les variants DPYD c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G), c.1679T>G, c.1905+1G>A et c.2846A>T. Ces quatre variants expliquent au moins 20% des toxicités sévères associées aux traitements à base de fluoropyrimidine (INESSS). Il est à noter que d'autres variants rares associés à une déficience sévère en dihydropyrimidine déshydrogénase ont été rapportés et que d'autres facteurs de risque génétique (et non génétique) existent (Amstutz et al. 2017, PMID: 29152729). Ceci pourrait contribuer à une susceptibilité accrue à la toxicité aux fluoropyrimidines. Comme pour tout test moléculaire reposant sur une amplification PCR, nous ne pouvons exclure qu'une délétion ou mutation au niveau de la séquence de liaison des amorces de PCR pourrait compromettre l'amplification d'un des allèles (allele dropout) et influencer l'analyse finale.

MÉTHODE :

L'identification des variants DPYD est effectuée par génotypage de type TaqMan. Une réaction de PCR dans laquelle deux sondes TaqMan spécifiques pour l'un ou l'autre des allèles possibles est effectuée. L'identité des allèles est déterminée par la mesure de l'intensité relative de chacun des fluorochromes à la fin de la réaction d'amplification à l'aide d'un instrument de PCR en temps réel.

Exemple de rapport 5: c.2846A>T, hétérozygote

TEST EFFECTUÉ: Génotypage de 4 variants du gène DPYD :

1. c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G)
2. c.1679T>G (DPYD*13)
3. c.1905+1G>A (DPYD*2A)
4. c.2846A>T

RÉSULTAT : ANORMAL - Présence du variant c.2846A>T à l'état hétérozygote

INTERPRÉTATION :

La présence du variant c.2846A>T à l'état hétérozygote prédispose à une toxicité sévère associée aux traitements de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine.

Une réduction de la dose initiale de 25-50% est conseillée. Les circonstances individuelles de chaque patient devraient être considérées pour déterminer si une approche prudente (réduction de 50%) ou une approche visant à optimiser l'efficacité malgré un risque de toxicité potentiellement plus élevé (réduction de 25%) est préférable. Lors des cycles subséquents, la dose initiale recommandée doit être réajustée en fonction de la tolérance de chaque patient dans le but d'atteindre l'exposition maximale sécuritaire et d'optimiser l'efficacité du traitement (INESSS : Traitements à base de fluoropyrimidines, 2019. ISBN 978-2-550-83345-1).

LIMITATIONS :

Ce test détecte uniquement les variants DPYD c.1236G>A (proxy de c.1129-5923C>G), c.1679T>G, c.1905+1G>A et c.2846A>T. Ces quatre variants expliquent au moins 20% des toxicités sévères associées aux traitements à base de fluoropyrimidine (INESSS). Il est à noter que d'autres variants rares associés à une déficience sévère en dihydropyrimidine déshydrogénase ont été rapportés et que d'autres facteurs de risque génétique (et non génétique) existent (Amstutz et al. 2017, PMID: 29152729). Ceci pourrait contribuer à une susceptibilité accrue à la toxicité aux fluoropyrimidines. Comme pour tout test moléculaire reposant sur une amplification PCR, nous ne pouvons exclure qu'une délétion ou mutation au niveau de la séquence de liaison des amorces de PCR pourrait compromettre l'amplification d'un des allèles (allele dropout) et influencer l'analyse finale.

MÉTHODE :

L'identification des variants DPYD est effectuée par génotypage de type TaqMan. Une réaction de PCR dans laquelle deux sondes TaqMan spécifiques pour l'un ou l'autre des allèles possibles est effectuée. L'identité des allèles est déterminée par la mesure de l'intensité relative de chacun des fluorochromes à la fin de la réaction d'amplification à l'aide d'un instrument de PCR en temps réel.

RÉFÉRENCES

- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Traitements à base de fluoropyrimidines : meilleures stratégies pour réduire le risque de toxicités sévères causées par une déficience en dihydropyrimidine déshydrogénase. Rapport rédigé par Mélanie Béland. Québec, Qc : INESSS; 2019. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Rapports/Oncologie/INESSS_DPYD_Traitements.pdf.
- Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. Eur J Hum Genet 2010;18(12):1276-88.
- Poitras E et Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology 2002;2(2):2-11.

*Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux*

Québec 

Siège social

2535, boulevard Laurier, 5^e étage
Québec (Québec) G1V 4M3
418 643-1339

Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12^e étage, bureau 1200
Montréal (Québec) H3A 2S9
514 873-2563

inesss.qc.ca

