



UNIVERSITE DE STRASBOURG

ECOLE DOCTORALE MSII

Mathématiques, Sciences de l'Information et de l'Ingénieur

THESE DE DOCTORAT

présentée par

Alessio IMPERIALE

soutenue le 4 Juillet 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Sciences Médicales

Métabolomique par spectroscopie RMN à Haute
Résolution en Rotation à l'Angle Magique (HRMAS)
appliquée à la pathologie tumorale surrénalienne

Thèse dirigée par :	Pr I.-J. NAMER	PU-PH, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg
	Dr K. ELBAYED	MCF, Université de Strasbourg
Rapporteurs :	Pr S. CALDARELLI	PU, Université d'Aix-Marseille III
	Pr G. PONCET	PU-PH, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Université de Lyon
Membres du jury :	Pr H. LEFEBVRE	PU-PH, Centre Hospitalier Universitaire Bois- Guillaume, Université de Rouen
	Dr J.-P. ARMSPACH	IR, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement mes deux directeurs de thèse :

- Monsieur le Professeur Izzie-Jacques Namer, qui m'a permis d'entreprendre ce doctorat en me proposant une thématique nouvelle et scientifiquement excitante. Je vous remercie de m'avoir guidé rigoureusement pour mener à bien ces travaux de recherche avec patience et disponibilité pendant toute la durée de ce doctorat. Votre soutien et votre amitié au quotidien ont été précieux. Je suis fier d'être membre de votre équipe.

- Monsieur le Docteur Karim Elbayed pour son encadrement au côté du Professeur Namer, pour son expertise et son aide dans le domaine de la RMN.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à chacun des membres du jury :

- Messieurs les Professeurs Stefano Caldarelli et Gilles Poncet, qui me font l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs externes. Merci pour vos conseils et vos précieuses critiques constructives pour l'aboutissement de ce travail.

- Monsieur le Professeur Hervé Lefebvre, qui me fait l'honneur de siéger dans le jury de thèse en qualité d'examineur, avec toute son expérience dans le domaine de l'endocrinologie fondamentale et clinique.

- Monsieur le Docteur Jean-Paul Armspach, qui m'a accueilli au sein de l'équipe IMIS du laboratoire de recherche ICube (UMR 7357, Université de Strasbourg/CNRS) et qui a accepté de juger ce travail en qualité d'examineur.

- Monsieur le Professeur Jean-Pierre Bergerat, que je remercie non seulement pour me faire l'honneur de participer à ce jury, mais aussi pour tous ses enseignements et nos échanges quotidiens. Vous resterez toujours pour moi une référence concernant ma formation dans le domaine de l'oncologie.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur François-Marie Moussallieh, sans qui ce travail aurait pu difficilement être réalisé. Merci de m'avoir tant aidé en spectrométrie. Je remercie également le Docteur Martial Piotto (Bruker Biospin), pour les échanges riches et toujours intéressants dans le domaine de la spectroscopie RMN HRMAS.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont pu contribuer à ces travaux, tout particulièrement les Professeurs Bernard Goichot (Service de Médecine Interne,

Diabète et Maladies Métaboliques) et Philippe Bachellier (Service de Chirurgie Viscérale et Transplantation), ainsi que l'équipe du service d'Anatomie Pathologique et le Centre de Ressources Biologiques (CRB) des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

Un remerciement particulier aux différentes équipes médico-chirurgicales des Hôpitaux Universitaires de Marseille avec lesquelles j'ai collaboré pendant la dernière année de cette thèse. Je remercie en particulier le Dr David Taïeb (Service de Médecine Nucléaire, CHU la Timone), collègue médecin nucléaire et expert reconnu dans le domaine de l'imagerie des glandes surrenales. Sa passion « débordante et contagieuse » pour le travail ainsi que son esprit scientifique critique m'ont beaucoup appris. Merci David.

Je remercie également le Professeur Laurent Brunaud (Service de Chirurgie Digestive, Hépatobiliaire et Digestive, CHU Brabois de Nancy) pour sa confiance en me confiant nombreux échantillons tissulaires nécessaires à la finalisation d'une partie de ce travail, laissant augurer de nombreuses collaborations à venir.

Merci à mes anciens et nouveaux collègues thésards de l'Hôpital de Hautepierre, les docteurs Julien Detour, Malika Benhamed, Dora Ben Sellem, Gilles Erb et Stéphanie Battini.

Merci à mon collègue isotopiste et ami, le docteur Cyrille Blondet, un passionné de la langue française, qui a eu la gentillesse et la patience de corriger l'orthographe et la grammaire de ce manuscrit. Je lui souhaite le meilleur pour sa thèse et sa nouvelle vie professionnelle.

Je remercie ma sœur, ma mère et, en particulier, mon père Cosimo, un scientifique non médecin, ouvert et toujours prêt à tous les échanges culturels d'horizons différents. Il a été mon premier maître et c'est lui qui m'a communiqué le plaisir de lire un article scientifique. C'est à lui que je dédie cette thèse, avec toute mon admiration. Grazie di tutto, papà.

A Victoria et Jean-Paul Gallo, mes beaux parents. Merci pour votre aide au quotidien.

A mes deux petites puces, Matilde et Diane. Grâce à vos « insomnies nocturnes », je suis parvenu à rester bien réveillé et à travailler tard dans la nuit.

A ma femme, Delphine, qui m'a toujours écouté, motivé et soutenu. Merci d'avoir aussi supporté et compris mes sautes d'humeur et le temps qui j'ai dédié à ce travail. Avec tout mon amour. Merci.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION (pg. 1)

I. METABOLOMIQUE ET ONCOLOGIE (pg. 4)

1.1. METABOLOMIQUE (pg. 4)

- Métabonomique, métabolomique et système biologique global (pg. 6)
- Spectrométrie RMN à haute résolution (HR) en rotation à l'angle magique (MAS) et les autres méthodes disponibles pour l'étude du métabolome (pg. 8)
- Comparaison entre les différentes techniques de spectrométrie (pg. 12)

1.2. METABOLISME ENERGETIQUE TUMORAL (pg. 14)

- Signature métabolique des cancers (pg. 14)
- Régulateurs du métabolisme cellulaire : (pg. 17)
 - Voie PI3K/Akt (pg. 17)
 - Voie de l'hypoxie (pg. 18)
 - Pyruvate kinase (pg. 19)
 - Oncogène MYC (pg. 19)
 - Gènes suppresseurs de tumeurs (pg. 20)

1.3. METABOLOMIQUE EN ONCOLOGIE : APPLICATIONS (pg. 22)

II. GLANDE SURRENALE (pg. 26)

2.1. GENERALITES SUR LA GLANDE SURRENALE (pg. 26)

- Historique (pg. 26)
- Embryologie (pg. 26)
- Anatomie (pg. 26)
- Histologie et sécrétion hormonale :
 - Corticosurrénale (pg. 28)
 - Médullosurrénale (pg. 31)

2.2. PRINCIPALES TUMEURS DE LA SURRENALE (pg. 32)

- Introduction (pg. 32)
- Adénome corticosurrénalien (pg. 33)
- Corticosurréalome malin (pg. 33) :
 - Données générales (pg. 33)
 - Précocité du diagnostic (pg. 34)
 - Caractérisation moléculaire (pg. 35)
 - Diagnostic de CSM (pg. 37)
 - Pronostic des formes localisées (pg. 37)
 - Traitement des formes localement avancées et métastatiques (pg. 39)
- Phéochromocytome et Paragangliome (pg. 39) :
 - Données générales (pg. 39)

- Hypothèses de tumorigenèse (pg. 41)
- Syndromes héréditaires (pg. 43)
- Dépistage des phéochromocytomes (pg. 47)
- Diagnostic des formes génétiques (pg. 48)
- Importance des dosages hormonaux dans le diagnostic (pg. 49)
- Diagnostic de malignité (pg. 50)
- Traitement des formes métastatiques (pg. 51)
- Neuroblastome (pg. 52) :
 - Données générales (pg. 52)
 - Diagnostic (pg. 53)
 - Pronostic (pg. 53)
 - Régression spontanée (pg. 54)
 - Traitement (pg. 54)

OBJECTIFS (pg. 55)

MATERIELS ET METHODES (pg. 57)

1.1. PHASE PRE-ANALYTIQUE (pg. 58)

- Prélèvements, conservation et préparation des échantillons tissulaires (pg. 58)

1.2. ANALYSE RMN HRMAS (pg. 59)

- Equipement et conditions experimentales (pg. 59)
- Séquences d'impulsion utilisées (pg. 63)
- Prétraitement des spectres (pg. 68)
- Quantification des métabolites (pg. 69)
- Analyse statistique (pg. 73)

RESULTATS ET DISCUSSION (pg. 77)

Profil métabolomique du neuroblastome pédiatrique obtenu par spectroscopie RMN HRMAS (publication n°1, annexe 1) (pg. 78)

Caracterisation métabolomique de la glande surrenale normale et pathologique chez l'adulte (publication n°2, annexe 2) (pg. 85)

Rapport succinate/glutamate : un nouveau marqueur spécifique des paragangliomes liés à une mutation SDHx (publication n°3, annexe 3) (pg. 92)

CONCLUSION ET PERSPECTIVES (pg. 97)

REFERENCES (pg. 102)

ANNEXES (pg. 129)

Liste des abréviations

^{123}I -mIBG : ^{123}I -métaiodobenzylguanadine
2-HG : 2-hydroxyglutarate
2-OG : 2-oxyglutarate
ACC : acétyl-CoA carboxylase
ACTH : adrenocorticotropic hormone
AKT : protéine kinase B
AMP : adénosine 5'-monophosphate
AMPK : protéine kinase AMP dépendante
ATP : adénosine triphosphate
BCU : Bruker Cooling Unit
BMS : bulk magnetic susceptibility
Cho : choline
CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CRH : corticotropin-releasing hormone
DHEA : déhydroépiandrostérone
DHEAS : déhydroépiandrostérone sulfate
DOPA : dihydroxyphénylalanine
DS : densité spontanée
ED : énergie d'interaction dipolaire
ERETIC : electronic reference to access in-vivo concentrations
FDG : fluorodeoxyglucose
FH : fumarate hydratase
FID : free induction decay
FIH : asparaginyl-hydroxylase factor inhibiting HIF-1alpha)
GC : gas chromatography
GPCho : glycerphosphocholine
HDL : high density lipoprotein
HIF : hypoxia inducible factor
HMG-Co réductase : hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA réductase
HR : haute résolution
HSQC : heteronuclear single quantum coherence
HVA : acide homovanillique

IDH : isocitrate déshydrogénases
IGF-2 : insuline-like growth factor-2
IHC : immunohistochimie
IRM : imagerie par résonance magnétique
ISCU : iron-sulfur cluster scaffold protein
LC : liquid chromatography
LDL : low density lipoprotein
MALDI : matrix laser desorption ionisation
MAS : magic angle spinning
MS : mass spectroscopy
mTOR : mammalian target of rapamycin
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NEM 2 : néoplasie endocrinienne multiple de type 2
NF1 : Neurofibromatose de type 1
ODD : oxygen dependent degradation
OPLS-DA : orthogonal partial least-squares discriminant analysis
PCA : principal component analysis ou analyse par composante principale
PCho : phosphocholine
PCR : polymerase chain reaction
PCTFE : Polychlorotrifluoroéthylène
PEP : phosphoénol pyruvate
PHD : prolyl hydroxylase domain proteins
PHOSOX : phosphorylation oxydative
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PK : protéine kinase
PK-M2 : iso forme M2 de la pyruvate kinase
PLS-DA : partial least-squares discriminant analysis
PULCON : pulse length based concentration
RMN : résonance magnétique nucléaire
ROS : reactive oxygen species
SA : semaine d'aménorrhée
SDH : succinate déshydrogénase

tCho : choline totale

TDM : tomodensitométrie

TEP : tomographie par émission de positons

TSP : trimethyl-silyl-propionic acid

UQ : ubiquinone réduite (QH₂)

UQ2 : ubiquinone réduit

VEGF : vascular endothelial growth factor

VHL : Von-Hippel Lindau

VMA : acide vanillylmandélique

α -KG : α -kétoglutarate

Liste des figures

Figure 1. Relation entre les différentes « -omiques » (figure issue de Goodacre 2005, modifiée).

Figure 2. Spectromètre RMN HRMAS Bruker Avance III à 500 MHz.

Figure 3. Représentation schématique du principe de la rotation à l'angle magique (figure issue de Alam TM and Jenkins JE. HR-MAS NMR Spectroscopy in Material Science, <http://dx.doi.org/10.5772/48340>).

Figure 4. Comparatif entre RMN et MS pour leur application en métabolomique (figure issue de Robertson 2005, modifiée).

Figure 5. Comparaison des sensibilités et du nombre de métabolites détectés entre la spectroscopie RMN, la GC-MS et la LC-MS.

Figure 6. Représentation schématique de relations existant entre le métabolome, protéome et génome dans les cellules néoplasiques. Grâce à la glycolyse, le glucose est métabolisé en pyruvate, qui fermentera en lactate. Dans les cellules cancéreuses, le flux du pyruvate vers le Cycle de Krebs (TCA) est réduit au profit de la voie des pentoses phosphates (PPP), qui est fortement impliqué dans le processus de prolifération tumorale (figure issue de Vermeersch et al. 2013, modifiée).

Figure 7. Représentation schématique de l'anatomie des glandes surrenales (figure issue de : Netter FH, Atlas of Human Anatomy, modifiée).

Figure 8. Représentation schématique de l'histologie de la glande surrénale (A : Azan x 12, B : Azan x 20). V : veine médullaire, M : médulla, C : cortex, G : zone glomerulée, F : zone fasciculée, R : zone réticulée (figure issue de Koepfen & Stanton : Berne and Levy Physiology, 6th Edition, modifiée).

Figure 9. Synthèse des hormones corticosurrenales (figure issue de Wikimedia Commons).

Figure 10. Voie synthétique des catecholamines.

Figure 11. Représentation schématique de la topographie lésionnelle des phéochromocytomes et paragangliomes (figure issue de Fauci et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition : <http://www.accessmedicine.com>, modifiée)

Figure 12. Préparation d'un échantillon biologique pour analyse RMN HRAMS. L'échantillon est récupéré du congélateur à -80°C et placé dans un cryostat (-

20°C) (**A**). La biopsie est disséquée (**B**) et introduite dans un insert (**C**). Insert final (**D-E**). Figure issue de Piotto et al. 2013, modifiée.

Figure 13. Equipement servant à la mise en place de l'échantillon, (a) dispositif pour la fermeture du rotor, (b) insert en PCTFE de 30 μ l, (c) rotor en ZrO₂ de 50 μ l, (d) bouchon d'insert en PCTFE, (e) bouchon à ailettes, (f) vis d'insertion et d'extraction de l'insert du rotor, (g) extracteur du bouchon, (h, i) guide pour l'introduction de l'insert et fermeture du rotor

Figure 14. Dispositif général d'un spectromètre. **A.** Un spectromètre RMN est composé : d'un aimant qui génère le champ magnétique, d'une chaîne d'émission qui produit les impulsions RF, d'une bobine qui transmet ces impulsions à l'échantillon et recueille le signal, d'une chaîne de réception qui amplifie ce signal et d'un ordinateur qui gère l'ensemble (d'après S. AKOKA, Université de Nantes). **B.** L'antenne est chargée d'émettre les impulsions RF et de recevoir le signal RMN. C'est un circuit résonant qui transforme la tension v produite par l'échantillon en une tension beaucoup plus importante V ; C_t est la capacité d'un condensateur ajustable dont la valeur doit être réglée pour chaque échantillon pour que la fréquence d'accord coïncide avec la fréquence de Larmor (« tuning ») ; un condensateur variable C_m permet de réaliser l'adaptation d'impédance (« matching ») de la sonde (d'après S. AKOKA, Université de Nantes). **C.** Vue en coupe d'un spectromètre liquide (d'après E. QUIVET, Université de Marseille).

Figure 15. Partie connectique de la sonde HRMAS, (a) canal proton ¹H, (b) canal carbone ¹³C, (c) canal deutérium ²H, (d) réglage de l'angle magique, (e) réglage des antennes RF, (f) chauffage, (g) mesure de la température, (h) gradient (d'après M. Benhamed, Université de Strasbourg, 2012).

Figure 16. A. Représentation schématique du principe de la rotation à l'angle magique, B. Tête de mesure de la sonde RMN HRMAS pour rotor de 4mm, montrant une bobine à l'angle magique (d'après M. Benhamed, Université de Strasbourg, 2012).

Figure 17. Presaturation de l'eau dans la séquence « one pulse » (**A**) et la séquence CPMG (**B**).

Figure 18. Spectre 1D ¹H CPMG d'un phéochromocytome.

Figure 19. Séquence HSQC classique. La valeur de τ est égale à $1/4 J^1\text{H}-^{13}\text{C}$.

Figure 20. Exemple typique d'un spectre 2D ¹H-¹³C HSQC obtenu à partir d'un échantillon de paragangliome abdominal associé à une mutation SDHB et une

accumulation de succinate (rectangle rouge). **A.** Spectre global. **B.** Agrandissement sur le succinate.

Figure 21. Scéma récapitulatif des procédures de segmentation spectrale ou bucketing ou binning. **A.** Segmentation typique (0,01 ppm). **B.** Binning adaptatif. Les rectangles de couleur représentent schématiquement différents métabolites.

Figure 22. Représentation schématique du processus de quantification de l'adrénaline et de la noradrénaline à partir des échantillons du tissu surrénal sain et pathologique de l'adulte.

Figure 23. Spectres 1D ^1H CPMG HRMAS représentatifs des trois solutions différentes de catécholamines : **(A)** adrénaline (5,46 mmol/l), **(B)** noradrénaline (5,90 mmol/l), et **(C)** mélange (1/1, v/v) d'adrénaline (2,23 mmol/l) et noradrénaline (2,95 mmol/l).

Figure 24. Représentation schématique des 3 principales étapes du processus d'analyse métabolomique : (1) Identification du profil métabolique à partir des spectres des échantillons tissulaires, (2) attribution des métabolites aux signaux spectraux, (3) quantification des métabolites et validation du modèle (figure issue de Spratlin et al. 2009).

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste de principaux métabolites détectés et quantifiés à partir de spectres RMN HRMAS 1D CPMG obtenus analysant des échantillons solides de la glande surrénale et ses principales formes tumorales (d'après Imperiale et al. Endoc-Relat Canc. 2013).

Tableau 2. Résultats de la quantification des catecholamines par RMN HRMAS à partir de solutions standard d'adrénaline seule, de noradrénaline seule et d'un mélange d'adrénaline et noradrénaline (1/1, v/v). Les valeurs sont exprimées en moyenne et écart type.

INTRODUCTION

Le terme métabolomique est assez récent et désigne l'analyse d'un ensemble de métabolites (métabolome) présents dans un milieu biologique. Il s'agit de petites molécules qui sont produites par les protéines et qui, ensemble, prennent part aux réactions biochimiques vitales de la cellule. Dans l'organisation biologique classique, la métabolomique est l'étape finale, la résultante, de l'effet des gènes (et celui de l'environnement auquel on peut attacher les médicaments) assurant le fonctionnement cellulaire (métabolisme cellulaire).

La métabolomique est un sous-ensemble des « -omiques » génomique, transcriptomique et protéomique. Le but général de la métabolomique est d'identifier, de mesurer et d'interpréter la concentration, l'activité et les flux complexes des métabolites responsables d'un comportement biologique. Ainsi, grâce à la surveillance des variations métaboliques d'un système biologique, on peut imaginer déterminer la fonction de gènes inconnus.

L'approche par la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) permet non seulement la différenciation entre le tissu normal et tumoral, mais aussi d'explorer la réalité métabolique tissulaire. Le développement technologique des dernières années a permis la mise au point et la commercialisation de spectromètres RMN à haute résolution (HR) utilisant la technologie « MAS » (Magic Angle Spinning ou rotation à l'angle magique) avec un gain important en résolution spectrale permettant la caractérisation métabolique tissulaire à partir d'échantillons de tissu intact. Les premières études en métabolomique sur le cancer ont visé à comparer la lésion tumorale avec le tissu sain de même origine anatomique et embryologique avec l'objectif de discriminer les deux populations. Dans ce domaine, de nombreux travaux ont été entrepris afin de caractériser et quantifier des biomarqueurs métabolomiques potentiellement utiles pour la détection et/ou l'évaluation de l'efficacité de traitements, à partir de cultures cellulaires, de modèles précliniques animaux et d'échantillons tumoraux humains.

La glande surrénale est un organe pair, localisé dans le rétropéritoine au niveau de la partie supéro-médiale des pôles supérieurs des reins. Les surrénales renferment en leur sein deux tissus différents concernant leurs origine: la corticosurrénale et la médullosurrénale. Chacun de ces tissus peut être l'origine d'une néoplasie, bénigne ou maligne. Les principales tumeurs qui se développent aux dépens du cortex sont les adénomes cortico-surréaliens et les corticosurrénales malins. En revanche, la médullosurrénale pourra développer

des tumeurs endocrines pures ou phéochromocytomes et des tumeurs nerveuses pures ou neuroblastomes. Il s'agit de formes tumorales avec un comportement biologique différent, souvent très agressives, avec une évolution rapide et une survie limitée malgré les différents traitements disponibles. La caractérisation anatomo-pathologique est indispensable mais demeure non exhaustive, particulièrement au plan pronostique. Pour cette raison, différentes approches de la maladie ont été proposées, impliquant notamment les investigations génétiques qui ont contribué de façon importante à la compréhension de la pathologie tumorale.

Jusqu'à présent, la place de la métabolomique dans le domaine des pathologies tumorales surrenales a été extrêmement limitée et quasi systématiquement appliquée à des modèles cellulaires expérimentaux utilisant la spectroscopie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse ou liquide. Les résultats obtenus sont encourageants et incitent à poursuivre dans cette direction. Bien que sa sensibilité soit plus faible que celle de la spectroscopie de masse, la spectroscopie RMN HRMAS reste une technique robuste qui permet l'analyse de nombreux échantillons dans un temps relativement court et d'obtenir des spectres aussi bien résolus que la RMN liquide à partir de faibles quantités de matériel biologique. En outre, il s'agit d'une technique non destructrice du tissu biologique ; ceci a pour avantage l'utilisation potentielle du même échantillon pour d'autres analyses. Pour ces raisons, nous avons décidé d'aborder l'étude de la surrenale sous l'angle métabolomique en analysant des échantillons solides tumoraux par spectroscopie RMN HRMAS, afin de caractériser le métabolome de la surrenale normale et de ses principales formes tumorales primitives. Nous restons persuadé que l'amélioration de la compréhension des voies métaboliques moléculaires permettra d'améliorer le diagnostic de ces tumeurs et d'envisager un ciblage diagnostique ou thérapeutique plus spécifique.

L'implantation du premier Spectromètre HRMAS dans un milieu hospitalier au sein des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, sur le site de HautePierre, a représenté une occasion unique d'exploiter les potentialités de cette technique pour décrypter les mécanismes physiopathologiques tumoraux intimes. Le projet de recherche a été stimulant et enrichissant et a permis d'associer les mondes scientifique et technologique à la réalité clinique, créant ainsi d'étroites et multiples liaisons interdisciplinaires grâce à un langage commun : la recherche.

I. METABOLOMIQUE ET ONCOLOGIE

1.1. METABOLOMIQUE

La métabolomique, qui a pour objectif l'étude du métabolome, suit l'apparition de la génomique ou transcriptomique, qui consiste en l'étude des modifications dans l'expression des gènes, puis de la protéomique, qui implique l'étude de la synthèse protéique et des voies de signalisation cellulaire. Le métabolome est définie comme l'ensemble des molécules de masse molaire inférieure à 1 kDa produites par les cellules. Le métabolome offre une vision globale sur les mécanismes biochimiques impliqués dans la détermination du phénotype métabolique cellulaire (Gary et al. 2012). Les métabolites sont les intermédiaires et les produits finaux du métabolisme qui est décrit comme l'ensemble des réactions chimiques, dans un organisme vivant, faisant intervenir des réactions de dégradation de la matière organique (catabolisme) ou des processus de synthèse des composants de la cellule (anabolisme).

Le nombre de métabolites présents dans le corps humain n'est, à l'heure actuelle, pas encore déterminé. Cependant, il est généralement admis que ce nombre est inférieur aux nombres de gènes (environ 20000), de facteurs de transcription (environ 30000) et de protéines (plus de 100000), étant estimé entre 3500 et 10000 (Wishart et al. 2007).

Pendant longtemps a persisté l'idée d'un flux unidirectionnel de l'information depuis le gène jusqu'à la protéine. Cette vision de la biologie cellulaire semble maintenant désuète du fait de l'existence de nombreuses rétroactions (**figure 1**). Aujourd'hui, la métabolomique apparaît non seulement complémentaire à d'autres -omiques mais aussi comme l'approche reflétant au mieux les phénotypes cellulaire et tissulaire. En effet, les flux métaboliques sont non seulement régulés par l'expression des gènes mais également par les processus post-transcriptionnels.

La métabolomique peut être utilisée à la fois pour mettre en évidence des divergences en terme de profile métabolique entre au moins deux populations différentes ou pour étudier et comprendre la structure et la régulation des voies métaboliques, leur connectivité, ainsi que le contrôle des concentrations cellulaires

et des flux métaboliques. L'identification des biomarqueurs, suite au « profilage » métabolomique, mènera à la recherche de la signification biologique spécifique. Consécutivement, une fois les événements métaboliques pour un système biologique donné identifiés et compris, l'étape logique suivante consistera à se demander comment le système répondra à des stimulations externes. Bien que les deux approches diffèrent en mettant l'accent l'une sur l'explication du « mécanisme » et l'autre sur la « prédiction » d'une réponse, l'objectif final reste la meilleure compréhension des circuits de régulation cellulaire. On parlera donc de « profilage métabolique global » ou « global metabolic fingerprinting » en visant la capacité à distinguer différents états métaboliques et prédire l'évolution d'un état biologique donné. Cette approche souvent est utilisée en bio-ingénierie ou en pharmacologie. Finalement, les deux objectifs majeurs de la métabolomique (déterminer les différences métaboliques entre systèmes biologiques et comprendre le contrôle métabolique du système étudié), sont complémentaires et interdépendants.

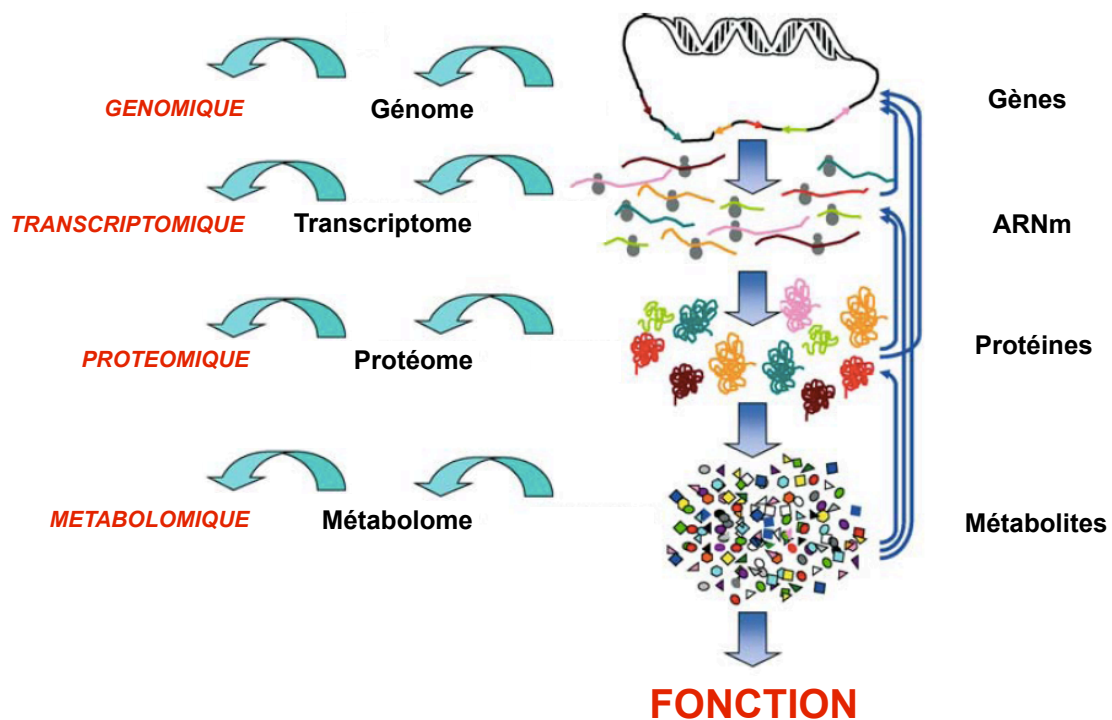


Figure 1. Relation entre les différentes « -omiques » (figure issue de Goodacre 2005, modifiée).

Métabonomique, métabolomique et système biologique global

Depuis les années 1990, on assiste à une révolution dans les techniques et les approches utilisées en biologie moléculaire notamment à partir du décodage du génome humain. En conséquence, en recherche biomédicale, l'accent a été mis sur la détermination simultanée des changements d'expression génique, en utilisant principalement la technologie de micro-array (Baldi et al. 2002). A cette approche a été donnée le nom de transcriptomique. De la même façon, on a assisté au développement massif des techniques visant l'étude systématique de l'expression protéique cellulaire ou tissulaire, intégrée dans le terme de « protéomique ».

Aujourd'hui, il existe de très nombreuses « -omiques » différents, dont la plupart probablement ne survivront pas en raison de leur application très étroite : beaucoup de ces termes servent uniquement à décrire une méthode qui a déjà un nom tout à fait valable. Maintenant, dans un monde dominé par la biologie des systèmes, il est nécessaire d'intégrer les sciences « -omiques » plutôt que de continuer à « diluer » la biologie moléculaire en créant de sous-omiques aussi diversifiées que spécialisées.

Pendant les années 1980 avant l'élaboration des différentes approches « -omiques », l'analyse simultanée de la multitude de métabolites présents dans les fluides biologiques avait été réalisée en grande partie en utilisant la spectroscopie RMN ^1H (Nicholson et al. 1989). L'idée de déterminer simultanément de multiples analytes était alors lancée, créant le concept de métabonomique, même si ce terme n'existait pas encore. Ces données extrêmement complexes seront ensuite interprétées à l'aide de tests statistiques multivariés (Gartland et al. 1990, Gartland et al. 1991) pour classer les échantillons en fonction de leur statut biologique. Il semble maintenant clair que la métabonomique englobe le profilage systématique, complet et simultané de plusieurs niveaux métaboliques ainsi que leurs variations temporelles causées par des facteurs tels que l'alimentation, le mode de vie, l'environnement, la génétique et des effets pharmacologiques, dans l'organisme considéré dans sa globalité. Ces résultats ont été obtenus à partir des études basées sur les fluides et les tissus biologiques en utilisant des techniques de chimiométrie (Nicholson et al. 1999, Nicholson et al. 2002). Une approche

parallèle, principalement développée en botanique et utilisant des techniques de spectrométrie de masse, a conduit à la création et à la définition du terme « métabolomique » (Fiehn 2002). Les termes métabolomique et métabonomique sont donc des néologismes datant de la fin des années 1990 et proposés pour la première fois en 1998 et 1999, respectivement dans deux publications de Oliver et al. (1998) et Nicholson et al. (1999). La définition du terme métabolomique est: « *le profil systématique des métabolites et des voies métaboliques dans les organismes entiers par l'étude des bio-fluides et des tissus* » (Lindon et al. 2003). En revanche, la métabonomique est définie comme « l'analyse quantitative des modifications du métabolisme général des organismes résultant de perturbations d'origine pathologique, génétique, nutritionnelle, hormonale ou toxique » (Nicholson et al. 2002). La distinction entre ces deux termes reste cependant assez floue et ils sont souvent synonymes l'un de l'autre.

A l'heure actuelle, on constate une confrontation croissante à des défis biologiques inédits, comme de nouveaux agents infectieux, la résistance aux antibiotiques, l'augmentation des cas de cancer et des maladies neurodégénératives, la résistance à l'insuline ou l'obésité. Toutes ces situations impliquent des interactions entre gènes et facteurs environnementaux. Afin d'améliorer la compréhension des mécanismes pathogéniques sous-jacents, des plates-formes d'analyse avancées ont été déployées à la recherche de nouvelles informations moléculaires, complémentaires des données génomiques et transcriptomiques modernes. De plus, la croissance d'un large éventail d'« -omiques » a permis de détailler les multiples caractéristiques des systèmes biologiques complexes à différents niveaux d'organisation biomoléculaire, partant de la cellule jusqu'à l'organisme dans sa totalité. Une utilisation correcte des développements en génomique associée à une connaissance avancée de la physiologie et du métabolisme servira au développement d'une médecine personnalisée (théranostique). Cependant, ces technologies génèrent une quantité massive de données qui restent difficiles à modéliser de façon robuste en vue d'un modèle prédictif de maladie.

En outre, les variables environnementales et le mode de vie influencent massivement tous les niveaux d'organisation biomoléculaire, avec répercussion potentielle sur le fonctionnement des gènes, la synthèse des protéines ainsi que les métabolites produits, au plan quantitatif. Ces influences doivent être intégrées

dans l'analyse de la variabilité inter-échantillon et interindividuelle pour l'interprétation correcte des données « -omiques ». La question d'une analyse multifactorielle complexe a été formellement abordée au début des années 2000 (Nicholson et al. 2003), et a souligné la nécessité de disposer de nouvelles approches pour mesurer et modéliser les processus métaboliques dans les divers compartiments du système biologique global, incluant les interactions entre différents types cellulaires et le génome, tous reliés par des processus métaboliques distincts (Nicholson et al. 2004). Il est également important de pouvoir évaluer la réponse temporelle du système biologique à une perturbation externe responsable d'effets organiques multiples (Holmes et al. 1992), en particulier quand les systèmes intéressés sont caractérisés par une activité métabolique distincte. Pour ces raisons, la définition de « Global Systems Biology » a été proposée pour intégrer les informations biologiques multifactorielles (Nicholson et al. 2003) afin de mieux comprendre les interactions gène-environnement. Cependant, la mesure et la modélisation de l'ensemble de ces diverses informations représentent un important défi en terme de modélisation analytique et bioinformatique.

Spectrométrie RMN à haute résolution (HR) en rotation à l'angle magique (MAS) et les autres méthodes disponibles pour l'étude du métabolome

L'acquisition des données métabolomiques à partir des échantillons biologiques complexes peut être obtenue à partir de plusieurs méthodes de spectroscopie. Les technologies couramment utilisées pour l'analyse métabolomique incluent la spectroscopie de masse (Mass Spectroscopy - MS), souvent couplée à la chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography - GC) ou liquide (Liquid Chromatography - LC), et la Spectroscopie RMN.

L'utilisation extensive de la MS lors des premières investigations, notamment en botanique et en microbiologie, trouve une origine dans son importante sensibilité de détection comparativement à d'autres techniques. La MS permet l'identification des substances chimiques en fonction du rapport masse/charge. La MS est une technique destructive, nécessitant d'un traitement spécifique de l'échantillon à étudier impliquant nécessairement une ionisation. Pour les techniques couplant la

GC à la MS, l'analyse métabolique est liée à la volatilité des métabolites. Lors des analyses par LC/MS et GC/MS, les échantillons sont issus de l'extraction cellulaire ou de précipitation par des solvants. De plus, seuls les métabolites que l'on peut ioniser en retirant ou ajoutant un proton ou une autre espèce ionisée sont observables. L'utilisation de la technique de type MALDI (*Matrix Laser Desorption Ionisation*) a permis d'optimiser la phase préparatoire des échantillons, en évitant la nécessité de procédures d'extraction en phase liquide, même si l'étape d'ionisation reste encore indispensable. Si l'identification d'un nombre important de métabolites en utilisant des bases de données standardisées ainsi que la bonne reproductibilité des résultats sont des avantages indiscutables de la GC/MS, la nécessité d'une préparation souvent laborieuse de l'échantillon à analyser peut constituer un frein pour une utilisation routinière de cette technique. En outre, l'interprétation du grand nombre de métabolites détectés n'est pas toujours aisée (Koek et al. 2008).

Bien que la GC-MS et la LC-MS soient largement plus représentées dans les plateformes techniques à visée métabolomique, la spectroscopie en RMN conserve encore plusieurs avantages. Cette dernière, représente une technique non destructive permettant l'identification ainsi que la quantification des nombreux métabolites. La spectroscopie RMN se montre particulièrement utile dans la détection des éléments chimiques difficilement analysables par GC-MS et LC-MS comme les sucres, les amines, les liquides volatiles (acétone, méthanol, éthanol). Malheureusement, un inconvénient majeur de cette technique est sa faible sensibilité relative, avec une limite inférieure de détection autour de 2 à 10 $\mu\text{M/ml}$ (Wishart 2008, Bekonert et al. 2007).

Effectuer des études de spectroscopie RMN sur des cellules ou des tissus demeure nettement plus complexe que les expériences sur des échantillons à l'état liquide pour la principale raison suivante : les cellules et les tissus sont intrinsèquement inhomogènes. Cette inhomogénéité provoque des variations locales du champ magnétique B_0 au niveau cellulaire, qui à son tour, provoque un élargissement des pics spectraux. Cet effet est connu sous le nom de « bulk magnetic susceptibility (BMS) induced broadening » et a été caractérisé comme étant la principale cause de mauvaise résolution spectrale, influençant notamment la détection des petites molécules (Adebodun et al. 1993). Une façon de s'affranchir des artéfacts liés à l'inhomogénéité de l'échantillon est d'adopter des

techniques d'extraction chimique à partir des cellules ou du tissu à analyser. Ce procédé implique généralement la trituration du tissu congelé avant de le lyophiliser. La poudre obtenue est ensuite pesée et extraite avec de l'acide perchlorique qui dénature les enzymes, empêchant donc toute nouvelle activité cellulaires et agissant comme un solvant pour les métabolites. Bien que l'acide perchlorique soit encore très utilisé pour effectuer ces procédures d'extraction, de nombreuses solutions sont disponibles, favorisant l'utilisation du méthanol et du chloroforme qui permettent à la fois l'extraction de l'eau, des métabolites et des lipides solubles (Lin et al. 2007). Les techniques d'extraction ont l'avantage de produire des préparations liquides homogènes, idéales pour l'analyse RMN. Cependant, la préparation des échantillons reste une activité complexe et particulièrement longue. Il est également difficile d'établir dans quelle mesure le processus chimique d'extraction modifie le profil métabolique tissulaire détecté. Typiquement, les expériences RMN impliquent ces techniques d'extraction avant de procéder à l'analyse spectroscopique sachant que la plupart des spectromètres sont optimisés pour ce type d'analyse. On parlera alors de spectroscopie RMN « à l'état liquide ».

La spectroscopie RMN ^1H à haute résolution (HR) en rotation à l'angle magique (Magic Angle Spinning - MAS) s'est avérée être l'une des plus innovantes technologies pour une vision globale du métabolisme et est la seule technique capable d'étudier des tissus biologiques intacts (**figure 2**).



Figure 2. Spectromètre RMN HRMAS Bruker Avance III à 500 MHz.

La technique HRMAS offre une alternative valable à l'extraction chimique en donnant une excellente résolution et un excellent rapport signal sur bruit sans nécessiter les étapes de préparation de l'échantillon. La technique consiste en une rotation de l'échantillon à grande vitesse sur lui-même à un angle de $54,7^\circ$ (angle magique) par rapport au champ magnétique principal B_0 (**figure 3**). Cette inclinaison permet de réduire significativement l'élargissement des spectres induit par les effets des interactions dipolaires et l'anisotropie intrinsèque liée à la matière solide (Cheng et al. 1996). A ce propos, l'énergie d'interaction dipolaire (ED) est proportionnelle à la quantité suivante: $\mu/r_{ij}^3 (3 \cos^2 \theta - 1)$ avec μ : moment magnétique, r_{ij} : distance entre les deux noyaux i et j , θ : angle entre le vecteur ij et le champ B_0 . Par conséquent : (1) en phase liquide, l'angle θ varie constamment et rapidement car l'orientation des molécules varie au cours du temps, la moyenne de l'ensemble des couplages dipolaires valant zéro et (2) en phase solide, l'angle θ ne varie pas et les couplages dipolaires deviennent les interactions principales, induisant des spectres avec des pics très larges. Pour éliminer les couplages dipolaires et annuler les effets des interactions dipolaires sur les spectres, il faut que $(3 \cos^2 \theta - 1) = 0$ soit $\theta = 54,7^\circ$ (angle magique).

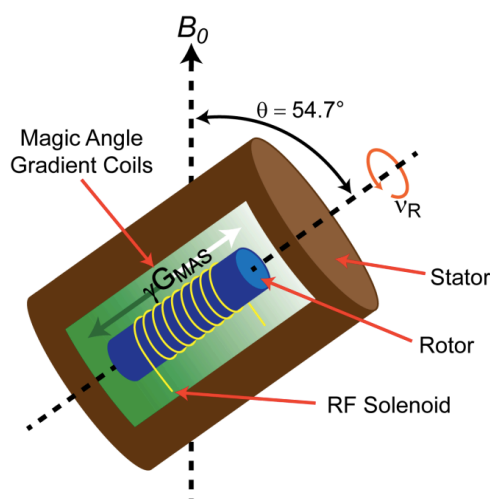


Figure 3. Représentation schématique du principe de rotation à l'angle magique (figure issue de Alam TM and Jenkins JE. HR-MAS NMR Spectroscopy in Material Science, <http://dx.doi.org/10.5772/48340>).

L'intérêt d'incliner un échantillon en spectrométrie RMN a été démontré pour la première fois par Andrew en 1959, en analysant des cristaux de chlorure de

sodium. La même année, Lowe publie une expérience faite sur du fluorure de calcium et du téflon en RMN ^{19}F . En faisant tourner l'échantillon à des angles de 0° , $54,7^\circ$ et 90° par rapport à B_0 , il mettait en évidence des bandes latérales caractéristiques d'une inhomogénéité du champ et ne disparaissant qu'à de grandes vitesses de rotation. C'est à partir du début des années 70, que cellules et préparations tissulaires seront analysées par RMN HRMAS. En 1978, Haberkorn et al. parviennent à obtenir un spectre parfaitement résolu à partir de préparations des lipides membranaires mais il faudra attendre Cheng et al. en 1996 pour assister à la première analyse par RMN HRMAS d'un échantillon intact de tissu lymphatique.

Les travaux de Santos et al. effectués en 2010 ont démontré qu'une analyse spectroscopique de type HRMAS (durée de chaque acquisition : 4,5-9 min) n'entraînait pas une baisse significative de l'intégrité de l'ARN messagère tissulaire (évaluée par immunohistochimie) ni une modification significative de l'expression génique (évaluée par technique de micropuce à ADN).

Finalement, la spectroscopie RMN HRMAS est une technique robuste qui permet d'analyser de nombreux échantillons dans un temps relativement court et d'obtenir des spectres aussi bien résolus que la RMN du liquide à partir de très peu de matériel biologique. En outre, il s'agit d'une technique non destructrice; ceci a pour avantage l'utilisation potentielle du même échantillon pour d'autres analyses. Aujourd'hui, la spectrométrie RMN HRMAS occupe une place prépondérante tant pour l'analyse ciblée des voies métaboliques que pour l'analyse globale du métabolome tissulaire.

Comparaison entre les principales techniques disponibles

Robertson, dans sa revue, rapporte les avantages et inconvénients des deux techniques, la spectroscopie RMN et MS (Robertson, 2005). La comparaison est particulièrement intéressante car on s'aperçoit de la puissance investigatrice représentée par les deux méthodes qui semblent largement complémentaires (**figure 4**).

Synthétiquement, la RMN est l'option la plus rapide (environ 1 heure par échantillon) avec la possibilité de détecter, identifier et quantifier entre 40 et 50

métabolites différents. La méthode LC-MS, nettement plus lente mais extrêmement sensible (limite de détectabilité autour de 100 pM, 300 à 500 métabolites), est identifiée comme la technique de choix pour l'analyse globale du métabolome sans hypothèse *a priori*.

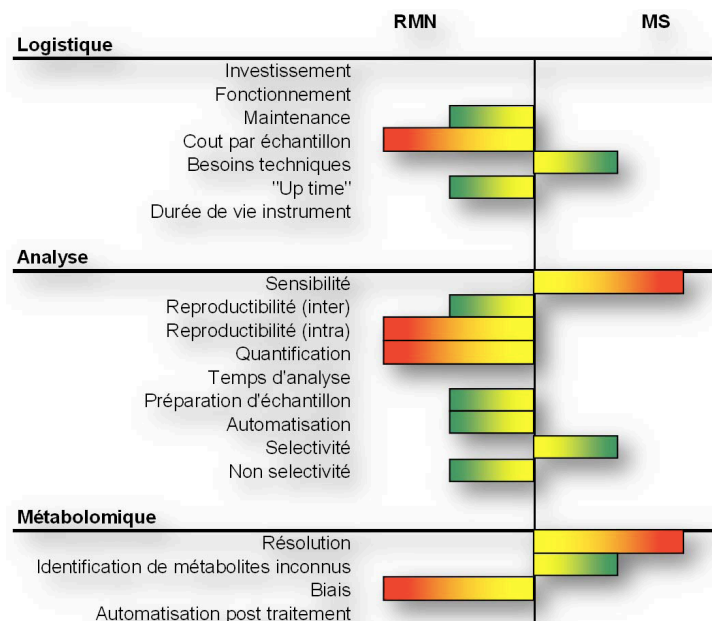


Figure 4. Comparatif entre RMN et MS pour leur application en métabolomique (figure issue de Robertson 2005, modifiée).

En revanche, la LC-MS montre une relative faiblesse dans le processus de quantification. A ce propos, la RMN semble être la méthode la plus robuste. Cependant, la faible sensibilité de détection (1 à 5 µM), limite potentiellement son utilisation. Bien que la sensibilité de la technique RMN HRMAS soit largement plus faible que pour la MS (**figure 5**), la future disponibilité de sondes cryogéniques, l'augmentation du champ magnétique principal et la diminution des volumes nécessaires pourraient réduire cet écart (Griffin et al. 2003, Keun et al. 2002, Grivet et al. 2003).

En outre, la reproductibilité des résultats intra- et inter-laboratoire représente un grand avantage pour l'utilisation de la métabolomique dans une optique de routine clinique (Keun et al. 2002). De plus, la faible dégradation tissulaire laisse la possibilité de réaliser d'autres investigations complémentaires (anatomie

pathologique, biologie moléculaire, MS) lorsque l'on travaille à l'angle magique.

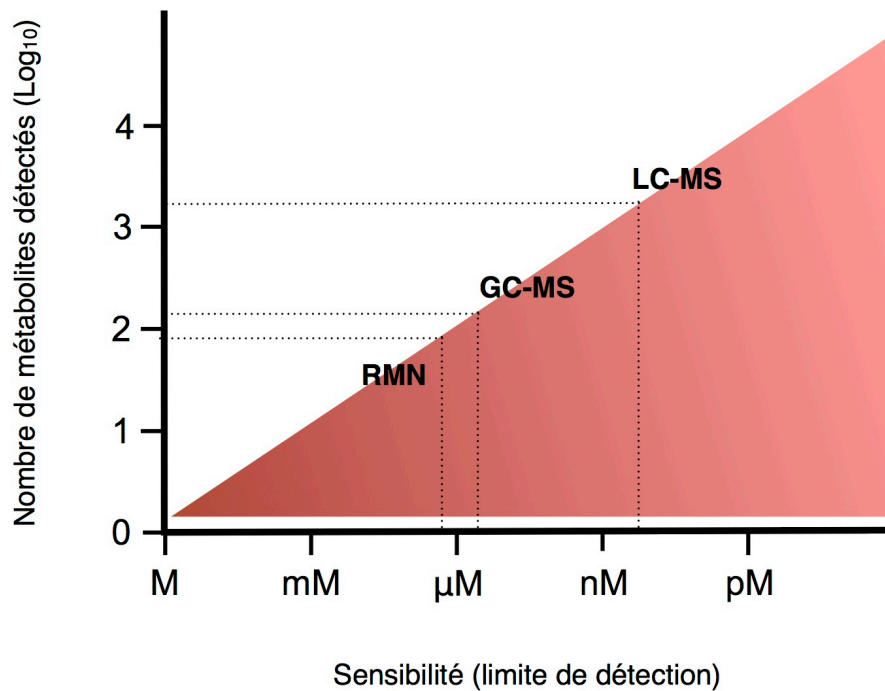


Figure 5. Comparaison des sensibilités et du nombre de métabolites détectés entre la spectroscopie RMN, la GC-MS et la LC-MS.

1.2. METABOLISME ENERGETIQUE TUMORAL

Signature métabolique des cancers

Dans les organismes multicellulaires, la plupart des cellules sont exposées à un apport constant de nutriments. La survie de l'organisme nécessite des systèmes de contrôle qui empêchent la prolifération cellulaire anormale lorsque la disponibilité des éléments nutritifs dépasse les niveaux nécessaires pour soutenir la division cellulaire. Cette prolifération incontrôlée est empêchée parce que les cellules ne consomment les éléments nutritifs qu'en raison de leur stimulation par des facteurs de croissance. Les cellules cancéreuses sont capables d'échapper à cette dépendance par l'acquisition de mutations génétiques qui impliquent des récepteurs de facteur de croissance ou leurs voies de signalisation (De Bernardinis et al. 2008, Hsu et al. 2008). Certaines mutations peuvent entraîner

une absorption de nutriments, en particulier le glucose, qui dépasse les exigences bioénergétiques de la croissance cellulaire et la prolifération. Cette hyper captation de glucose par les cellules cancéreuses est un constat ancien et est la conséquence d'une utilisation incomplète du glucose (avec production de lactates) malgré la présence d'oxygène (Warburg 1956, Warburg 1956). Cette aberration métabolique reste une énigme mais de nombreux travaux permettent désormais d'en décrypter les mécanismes (figure 5).

En présence d'oxygène, la plupart des cellules différenciées métabolisent le glucose en dioxyde de carbone par l'oxydation du pyruvate dans la mitochondrie au cours du cycle tricarboxylique ou cycle de Krebs. Cette réaction produit du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) réduit (NADH), qui permet une production maximale d'adénosine triphosphate (ATP) au cours de la phosphorylation oxydative avec une production limitée de lactates. Cette voie n'est possible qu'en présence d'oxygène qui fait office d'accepteur final d'électrons. Ce n'est que dans des conditions d'anaérobiose que les cellules différenciées produisent de grandes quantités de lactates. En situation physiologique, la glycolyse reste la source privilégiée d'ATP dans la première moitié de la période foétale (Morriss et al. 1979). La plupart des cellules cancéreuses produisent aussi de grandes quantités de lactates, même en présence d'oxygène. Ceci est lié à une utilisation préférentielle de la glycolyse, même en l'absence d'anomalie de la fonction mitochondriale (Fantin et al. 2006, Moreno-Sanchez et al. 2007, Weinhouse 1976).

En fait, de façon analogue aux organismes unicellulaires, les cellules cancéreuses se multiplient en utilisant un processus de fermentation du glucose. Le métabolisme du glucose en lactate ne génère que 2 à 4 ATP par molécule de glucose, alors que la phosphorylation oxydative en génère jusqu'à 36 ATP. Cela soulève la question du choix d'un métabolisme moins efficace, au moins en termes de production d'ATP, serait sélectionné par des cellules en prolifération.

Une explication possible est que l'inefficacité de la production d'ATP n'est un problème que lorsque les ressources sont limitées. Ce n'est pas le cas pour la prolifération des cellules des mammifères, qui sont exposés à un approvisionnement continu en glucose et autres nutriments. Il a été montré que les cellules cancéreuses sont suffisamment pourvues en ATP et NADH (De Bernardinis et al. 2008, Christofk, Vander Heiden, Harris et al. 2008). La régulation

de la production d'ATP est finement régulée car même des perturbations minimales de production d'ATP peuvent entraîner des conséquences fatales sur la survie cellulaire (Izyumov et al. 2004, Lum et al. 2005, Shaw et al. 2004, Vander Heiden et al. 1999). Pour cela, la cellule dispose de voies de signalisation faisant office de senseur métabolique. Le senseur le mieux caractérisé est la protéine kinase AMP (adénosine 5'-monophosphate) - dépendante (AMPK). La baisse de production d'ATP est tamponnée partiellement par l'adénylate kinase qui convertit 2 ADP (adénosine 5'-diphosphate) en 1 ATP et 1 AMP. L'accumulation d'AMP active l'AMPK qui va réguler certains effecteurs clés du métabolisme énergétique. Cette activation est dépendante de la protéine suppresseur de tumeur LKB1 : cela souligne le lien étroit entre métabolisme et transformation oncogénique (Hardie 2007). AMPK activé augmente les métabolismes cataboliques producteurs d'ATP comme la β -oxydation des acides gras et réduit la synthèse des protéines, du cholestérol et des acides gras. L'AMPK agit en phosphorylant certains substrats. L'AMPK inhibe l'HMG-CoA (hydroxyméthylglutaryl-CoA) réductase et l'ACC (acétyl-CoA carboxylase) ; cela réduit la synthèse de cholestérol et d'acides gras. L'AMPK est aussi capable aussi d'interrompre le cycle cellulaire en agissant sur 2 gènes suppresseurs de tumeurs : TSC2 et p53. L'AMPK phosphoryle TSC2, inhibant ainsi l'enzyme mTOR (mammalian target of rapamycin) et donc le cycle cellulaire. AMPK régule aussi le cycle cellulaire en activant p53.

Les cellules cancéreuses pourraient aussi avoir été sélectionnées par l'hypoxie (Gatenby 2004). Cependant, les cellules cancéreuses semblent utiliser la glycolyse avant l'exposition à des conditions hypoxiques (Christofk, Vander Heiden, Harris et al. 2008, Elstrom et al. 2004, Gottschalk et al. 2004, Nolop et al. 1987).

Une troisième explication de l'effet Warburg glycolyse aérobie est que les cellules en prolifération ont des besoins métaboliques qui s'étendent au-delà de la production d'ATP. Les travaux les plus récents soutiennent cette troisième hypothèse.

Pour produire deux cellules filles lors de la mitose, la division cellulaire doit concerner l'ensemble du contenu cellulaire. Cela impose une grande exigence en nucléotides, acides aminés et lipides. Au cours de la croissance, le glucose est utilisé pour produire de la biomasse ainsi que de l'ATP. Bien que l'hydrolyse d'ATP fournisse une énergie libre significative, la division cellulaire requiert des quantités

d'énergie très importantes. Par exemple, la synthèse de palmitate, l'un des principaux constituants des membranes cellulaires, nécessite 7 molécules d'ATP, 16 carbones provenant de 8 molécules de l'acétyl-CoA et 28 électrons provenant de 14 molécules de NADPH. De même, la synthèse des acides aminés et des nucléotides consomme également plus d'équivalents de carbone et de NADPH que d'ATP. Une molécule de glucose peut générer jusqu'à 36 ATP, ou 30 ATP et 2 NADPH (si détournée dans la voie des pentoses), ou de fournir 6 carbones pour la synthèse macromoléculaire. Il est clair que pour assurer la division cellulaire, le métabolisme du glucose ne peut être exclusivement consacré à la production d'ATP. Le métabolisme du glucose est détourné vers la synthèse de précurseurs tels que l'acétyl-CoA pour les acides gras, composés glycolytiques intermédiaires pour des acides aminés non essentiels et les riboses pour les acides nucléiques (Hatzivassiliou et al. 2005).

Cette exigence pourrait expliquer au moins une partie de l'avantage sélectif fourni par l'effet Warburg. Cette hypothèse est soutenue par les travaux réalisés en spectroscopie par RMN montrant que les cellules de glioblastome en culture peuvent convertir jusqu'à 90% de glucose et de 60% de glutamine en lactate et alanine (De Berardinis et al. 2007). Rappelons que les deux seules molécules catabolisées en quantités appréciables sont le glucose et la glutamine. La signalisation des récepteurs des facteurs de croissance régule l'activité des enzymes clés du métabolisme pour soutenir de façon équilibrée la production d'ATP et la synthèse macromoléculaire (Christofk, Vander Heiden, Harris et al. 2008, Christofk, Vander Heiden, Wu et al. 2008). L'excès de production de lactate qui accompagne l'effet Warburg pourrait inhiber la réponse immunitaire (Sonveaux et al. 2008).

Régulateurs du métabolisme

Voie PI3K/Akt

La voie de signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est impliquée à la fois dans le contrôle de la croissance cellulaire et dans le métabolisme du glucose. En plus de son rôle bien établi dans l'orientation des acides aminés disponibles

vers la synthèse des protéines via mTOR, la voie PI3K régule la captation et l'utilisation du glucose. Même dans les tissus non-insulino-dépendants, PI3K via la protéine kinase B (AKT) peut réguler l'expression des transporteurs du glucose et l'activité de l'hexokinase et de la phosphofruktokinase (De Berardinis 2008). L'activation de la voie PI3K rend les cellules dépendantes à des niveaux élevés de flux de glucose (Buzzai et al. 2005). Les petites molécules qui perturbent la signalisation PI3K conduisent à une diminution de la captation cellulaire de glucose et à une régression tumorale (Engelman et al. 2008). Cette privation de glucose entraîne des effets semblables à ceux engendrés par l'absence de facteur de croissance, un phénomène qui pourrait contribuer à l'addiction oncogénique (Vander Heiden et al. 2001). Il a été montré notamment, une corrélation entre la réponse métabolique en TEP au ^{18}F -FDG et la réponse tumorale (Ben-Haim et al. 2009).

Voie de l'hypoxie

L'hypoxie active le complexe transcriptionnel HIF- α ou hypoxia inducible factor alpha. HIF- α comporte 3 iso formes (1 à 3), codées par des gènes différents. Les protéines HIF- α ont une demi-vie très brève (5 minutes) du fait de leur dégradation rapide par le protéasome en présence d'oxygène. L'hydroxylation de HIF est l'étape qui précède son ubiquitination et sa dégradation. L'hydroxylation fait intervenir deux dioxygénases, la PHD (*prolyl hydroxylase domain proteins*) et le FIH (*asparaginyl-hydroxylase factor inhibiting HIF-1alpha*), dépendantes du Fe^{2+} et du 2-oxyglutarate (2-OG). En cas de normoxie, PHD et FIH sont actives et hydroxylent donc HIF-1alpha sur 2 résidus proline. Cette hydroxylation permet la fixation de la protéine VHL, qui par son activité ubiquitine ligase E3 permet la polyubiquitination de HIF. HIF est alors dégradé par le protéasome. En l'absence d'oxygène, les protéines PHD et FIH sont inactives.

Certaines mutations concernant des gènes du métabolisme sont directement impliquées dans les cancers. C'est le cas des mutations de la succinate déshydrogénase (SDH) et de la fumarate hydratase (FH) qui sont responsables de paragangliomes et de cancers du rein (Baysal et al. 2000, Pollard et al. 2003). Un des effets de ces mutations est l'activation du facteur HIF-1alpha (« pseudo-hypoxie ») qui contrôle le métabolisme du glucose (Selak et al. 2005). HIF-alpha

augmente l'expression des transporteurs membranaires du glucose et active la glycolyse en induisant l'expression de toutes les enzymes glycolytiques (Gatenby et al. 2004). Par contre, HIF- α inhibe l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs en inhibant la PHD (via l'activation de la pyruvate déshydrogénase kinase) et active la conversion du pyruvate en lactate par son action sur la LDH (Kim et al. 2006, Papandreou et al. 2006). Il a été aussi identifié un cas de mutation de PHD2 chez un patient atteint de paragangliome avec polyglobulie non paranéoplasique (Ladroue et al. 2008). Des études récentes ont montré l'implication de mutations des gènes de l'isocitrate déshydrogénase cytosolique dans certains gliomes et glioblastomes (Bleeker et al 2009, Parsons et al. 2008, Thompson et al. 2009, Yan et al. 2009).

Pyruvate kinase

La régulation de la pyruvate kinase (PK) dans l'effet Warburg est une étape importante. La PK catalyse la phosphorylation du phosphoénol pyruvate (PEP) en pyruvate, étape cytosolique déterminante avant l'entrée dans la voie de la respiration mitochondriale. Contrairement aux cellules différenciées, les cellules cancéreuses expriment de façon sélective l'iso forme M2 de la pyruvate kinase (PK-M2) (Christofk, Vander Heiden, Harris et al. 2008), qui est régulée par des protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine (Christofk, Vander Heiden, Wu et al. 2008). Ces phosphoprotéines sont situées en aval de nombreuses voies de signalisation qui régulent négativement la PKM2 (Christofk, Vander Heiden, Wu et al. 2008). En réponse à la fixation des phosphoprotéines, la PK-M2 est amenée à un état de faible activité (état dimérique). Cette régulation de l'activité de l'enzyme permet de constituer un interrupteur moléculaire mis en jeu en présence de signaux de croissance. La PK-M2 est nécessaire pour la prolifération cellulaire in vivo (Christofk, Vander Heiden, Harris et al. 2008).

Oncogène MYC

Les cellules tumorales dont la croissance est contrôlée par l'oncogène C-MYC sont particulièrement sensibles à la suppression en glutamine (Yuneva et al. 2007). Les gènes impliqués dans le métabolisme de la glutamine semblent être

sous le contrôle transcriptionnel de MYC (Gao et al. 2009, Wise et al. 2008). La déplétion en glutamine des cellules transformées avec MYC cause une perte rapide de production de composés intermédiaires du cycle de Krebs et une mort cellulaire (Yuneva et al. 2007). En outre, cette dépendance à l'égard de la glutamine pour la survie n'est pas liée à la baisse de la production d'ATP. C-MYC augmente la biogénèse mitochondriale et la respiration cellulaire, effet inhibé par la voie de HIF-1 (Zhang et al. 2009).

Gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs peuvent également réguler le métabolisme cellulaire. Le gène VHL est impliqué dans la régulation du métabolisme cellulaire via HIF-1alpha. En cas de mutation de VHL, HIF-1alpha n'est plus dégradé même en présence d'oxygène ; cela entraîne une activation des gènes normalement induits par l'hypoxie comme le VEGF ou les enzymes glycolytiques. p53 contrôle aussi l'utilisation du glucose. L'expression de la protéine TIGAR, induite par p53, conduit à l'inhibition de la phosphofructokinase, à une réorientation du glucose vers la voie des pentoses et à une production de NADPH (Bensaad et al. 2009). Il pourrait s'agir d'une réponse adaptative, qui protégerait la cellule du stress oxydatif engendré par la production d'espèces réactives de l'oxygène. La phosphorylation oxydative (PHOSOX) est la principale source de production d'espèces réactives de l'oxygène. En l'absence de coopération avec des oncogènes, l'excès d'espèces réactives de l'oxygène aboutit à l'apoptose et/ou la sénescence (Chen et al. 2007, Chiaradonna et al. 2006, Granot et al. 1991, Serrano et al. 1997).

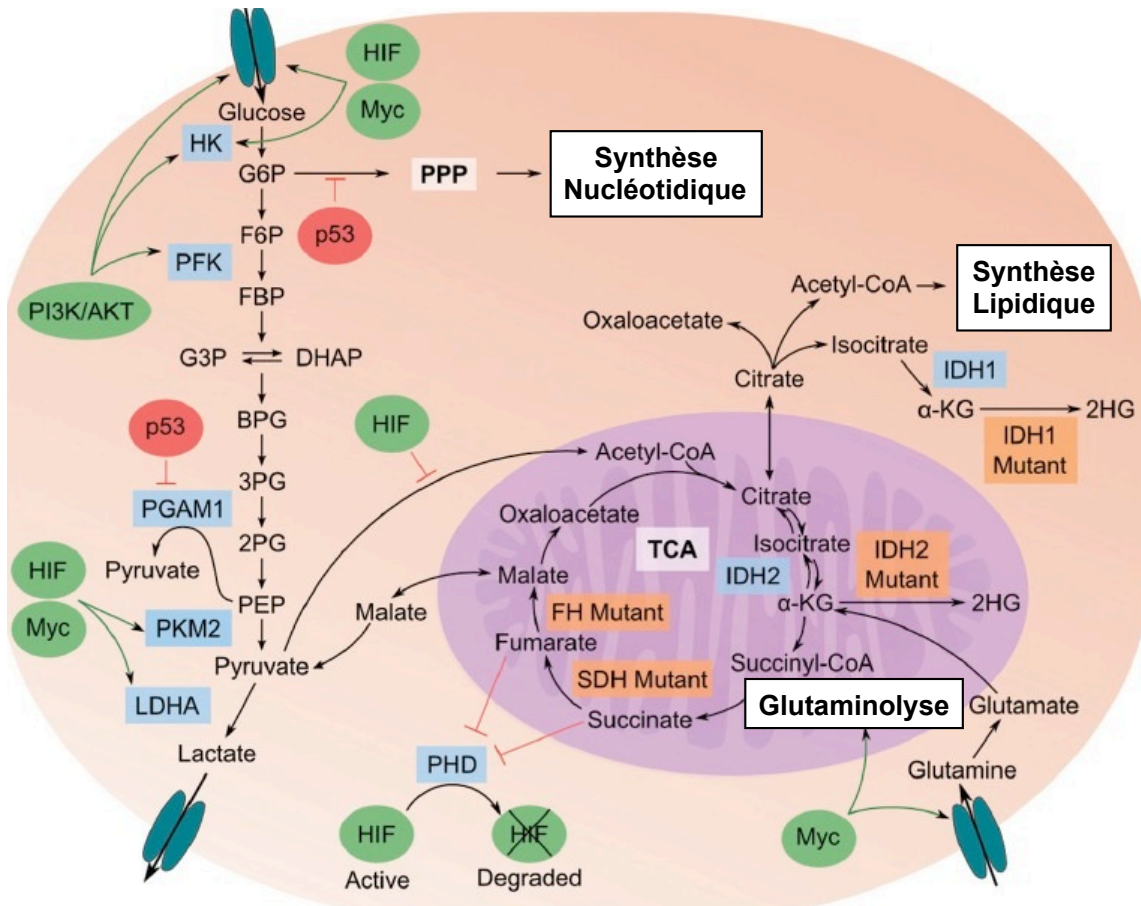


Figure 6. Représentation schématique de relations existant entre le métabolome, protéome et génome dans les cellules néoplasiques. Grâce à la glycolyse, le glucose est métabolisé en pyruvate, qui fermentera en lactate. Dans les cellules cancéreuses, le flux du pyruvate vers le Cycle de Krebs (TCA) est réduit au profit de la voie des pentoses phosphates (PPP), qui est fortement impliqué dans le processus de prolifération tumorale (figure issue de Vermeersch et al. 2013, modifiée).

Rectangles bleus : enzymes importantes dans la transition vers un phénotype métabolique du cancer. Rectangles oranges : enzymes qui sont mutés dans les cellules cancéreuses. Ovaux verts : oncogènes qui sont régulés à la hausse dans le cancer. Ovaux rouges : suppresseurs de tumeurs qui sont régulés à la baisse dans le cancer.

2PG : 2-phosphoglycérate, **3PG** : 3-phosphoglycérate, **BPG** : 1,3-bisphosphoglycérate, **CoA** : coenzyme A, **DHAP** : dihydroxyacétone phosphate, **F6P** : fructose-6-phosphate, **FBP** : fructose-1,6-bisphosphate, **G3P** : glycéraldéhyde-3-phosphate, **G6P** : glucose-6-phosphate, **HK** : hexokinase, **LDHA** : lactate déshydrogénase A, **PFK** : phosphofruktokinase, **PI3K** : Phosphatidylinositide 3-kinase.

1.3. METABOLOMIQUE EN ONCOLOGIE : APPLICATIONS

La métabolomique appliquée au cancer a été définie comme l'étude des variations métaboliques globales ainsi que la mesure des profils biochimiques liés aux voies métaboliques connues sous l'influence d'un processus oncogène (Jordan et al. 2007). A partir de cette définition, l'approche métabolomique de la pathologie cancéreuse é été analysée systématiquement, soulevant un certain nombre de questions concernant: (1) la possibilité de détecter les changements métaboliques spécifiquement liés à un état pathologique et les utiliser pour l'établissement du diagnostic et du pronostic ; (2) le choix d'un métabolite, d'un ensemble de métabolite ou d'un réseau métabolique cible pour la métabolomique ; (3) la sensibilité et la reproductibilité des résultats métabolomiques dans le cadre d'études cliniques systématiques.

Les premières études en métabolomique sur le cancer ont cherché à comparer la lésion tumorale avec le tissu sain de même origine anatomique et embryologique avec l'objectif de discriminer les deux populations. Les pathologies le plus souvent étudiées ont été les tumeurs du sein, du colon, du système nerveux central et de la prostate. Dans ces domaines, de nombreux efforts ont été accomplis pour individualiser et quantifier des biomarqueurs métabolomiques potentiellement utiles pour la détection et/ou l'évaluation de l'efficacité du traitement à partir de cultures cellulaires, de modèles précliniques animaux et d'échantillons tumoraux prélevés chez les malades.

L'étape fondamentale pour atteindre cet objectif est la caractérisation du métabolome tumoral. En utilisant des méthodes métabolomiques classiques, on s'aperçoit que les tumeurs présentent en général, des niveaux élevés de phospholipides (phosphocholine et dérivés), une accentuation de la glycolyse et du catabolisme de la glutamine, ainsi que la surexpression de l'isoenzyme PK-M2 (Mazurek et al. 2003, Ackerstaff et al. 2003, Glunde et al. 2006). La PK catalyse la phosphorylation du phosphoénol pyruvate en pyruvate (étape cytosolique déterminante avant l'entrée dans la voie de la respiration mitochondriale) et sa forme inactive est préponderante dans les tumeurs.

La spectroscopie RMN HRMAS a été utilisée pour la première fois en 1998 afin d'étudier des biopsies tissulaires de cancer du sein (Cheng et al. 1998). Les

spectres obtenus à partir de ces échantillons tissulaires montraient d'importants signaux liés aux lipides, à la choline et au lactate, identifiés à partir d'échantillons tissulaires frais. Les profils métaboliques de tumeurs mammaires ont ensuite pu être établis en utilisant des spectres mono- et bidimensionnels et en comparant ces résultats avec ceux obtenus après extraction à l'acide perchlorique (Sitter et al. 2002). Le tissu cancéreux mammaire montrait un taux élevé d'acides aminés (glycine, lysine, asparagine, aspartate, alanine, valine, leucine, isoleucine, glutamate, glutamine, tyrosine et histidine), des métabolites impliqués dans le cycle énergétique (glucose et lactate) ainsi que des dérivés de la Choline (glycerphosphocholine (GPCho), phosphocholine (PCho) et choline (Cho)). Les relations entre le motif métabolomique et les caractéristiques cliniques des patientes ont été également explorées (Cheng et al. 1998, Sitter et al. 2002) comme la corrélation entre le rapport Lactate/Choline et le grade tumoral ou entre les concentrations de choline et glycine et la taille de la tumeur primitive. D'autres auteurs ont rapporté la possibilité de prédire le statut hormonal, l'envahissement ganglionnaire et le grade tumoral à partir du profil métabolique obtenu à partir des analyses NMR HRMAS (Bathen et al. 2007).

Comme pour le cancer du sein, l'analyse ex vivo d'échantillons tissulaires d'adénocarcinome prostatique par la RMN HRMAS a été testée pour définir un profil biochimique spécifique ainsi que de nouveaux biomarqueurs pouvant être corrélés aux différents critères cliniques et paracliniques. Des concentrations plus élevées de PCho et GPCho, choline totale (tCho), lactate et alanine ont été rapportées au niveau du tissu tumoral par rapport au tissu glandulaire sain et au stroma inflammatoire (Swanson et al. 2006). Le tissu glandulaire sain montrait des concentrations significativement plus importantes de citrate et polyamines et plus faibles de Cho et dérivées. De plus, la taurine et le myo-inositol sont augmentés dans les tumeurs (Kuhranewicz et al. 2002, Swanson et al. 2003). Tomlins et al. en 1998 ont détecté une abondance spectrale relative des lipides dans des échantillons tumoraux comparés à des prélèvements d'hypertrophie prostatique bénigne, analysés par RMN HRMAS à 9,4 T, suggérant une éventuelle utilisation de la NMR HRMAS pour analyser des biopsies prélevées à l'aiguille fine pour le diagnostic clinique. On outre, la corrélation existant entre le stade tumoral et le profil métabolomique global obtenu à partir des échantillons tumoraux a été mise en évidence par Cheng et al. en 2005.

La comparaison par RMN HRMAS entre tissus sain et tumoral prélevés chez le même patient a permis de déterminer le motif métabolique du cancer colorectal et les métabolites clefs dans la différenciation des deux groupes (Chan et al. 2009, (Jordan et al. 2009, Righi et al. 2009, Piotto et al. 2009, Tessem et al. 2010). L'adénocarcinome colique montre une augmentation des taux de glycine, lactate, acétate, taurine et lipides. Par contre, le tissu sain est caractérisé par une abondance majeure de myoinositol (Piotto et al. 2009). Très intéressante est la forte corrélation démontrée entre le profil métabolique d'échantillons tissulaires tumoraux (Cho et dérivées) et une instabilité microsatellitaire fréquemment retrouvée dans certains types de cancer colorectaux (Tessem et al. 2010).

La métabolomique représente une occasion unique d'explorer le processus complexes de la cancérogenèse et de la biologie tumorale dans le sens plus large. La métabolomique permet à la fois une exploration analytique de « découverte » mais également de cibler des aspects spécifiques du métabolisme néoplasique. Un exemple élégant à ce propos est constitué par les isocitrate déshydrogénases 1 et 2 (IDH1 et IDH2) nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) dépendantes, qui montrent fréquemment une altération fonctionnelle liée à des mutations ponctuelles dans les gliomes (Yan et al. 2009). A partir d'études métabolomiques, on peut mettre en évidence que les formes mutées de IDH1 et 2 catalysent la synthèse du (R)-2-hydroxyglutarate (2HG), à partir de l' α -kétoglutarate (α -KG) (42). Le profilage métabolique par LC-MS/MS et GC-MS des cellules de gliome a montré que les mutations IDH 1 et 2 sont responsables d'une réduction nette de niveau des acides aminés N-acétylés ainsi que des intermédiaires du cycle de Krebs avec en conséquence une accumulation des substrats biosynthétiques, sans affecter en revanche le processus de glycolyse (Reitman et al. 2011). En outre, les effets des mutations IDH 1 et 2 sur le métabolome étaient très semblables aux changements observés dans les cellules normales après traitement avec 2HG. Il semblerait donc que ce soit la production de l'oncometabolite 2HG, et non le dysfonctionnement de IDH, qui constitue la clef du processus pathogène (Reitman et al. 2011). Très intéressante est l'étude récente de Jain et al. concernant l'exploration du profil métabolomique extracellulaire à partir de lignées cellulaires néoplasiques NCI-60 de l'Institut National du Cancer américain (Jain et al. 2012). Selon cette étude, la consommation de glycine était corrélée au taux de prolifération cellulaire

néoplasique, sans affecter la croissance des cellules non cancéreuses, suggérant une caractéristique spécifique du cancer et l'implication de la voie de biosynthèse des nucléotides puriques.

Malgré ces avancées dans la connaissance du métabolome tumoral, il persiste encore plusieurs lacunes importantes. En particulier, il est difficile de généraliser les résultats obtenus à partir de chaque type tumoral compte tenu de la variabilité métabolomique constatée entre les différentes néoplasies avec comme conséquence directe l'incapacité de déterminer un profil métabolomique tumoral global (Griffin et al. 2004). Toutefois, à partir du profil métabolomique lipidique urinaire, les sujets atteints de cancer ont été discriminés des volontaires sains avec une précision de 83% (Bathern et al. 2000).

II. GLANDE SURRENALE

2.1. GENERALITES SUR LA GLANDE SURRENALE

Historique

La première description anatomique des glandes surrénales remonte aux études d'Eustache en 1563. Toutefois, pour la définition du rôle fonctionnel des glandes, il faudra attendre Addison en 1855. Dans les années suivantes, Brown-Séquard rapporte les effets de la surrénalectomie dans différentes espèces animales. Dans les années 1930 a été démontrée l'action des hormones cortico-surréaliennes et ont été successivement identifiées les différentes hormones stéroïdiennes d'origine surrenalienne qui, une fois synthétisées, seront utilisées dans le traitement de l'insuffisance surrenale et la polyarthrite rhumatoïde. Au cours du vingtième siècle ont été identifiées différentes dysfonctions surrenaliennes comme l'hypercortisolisme par Cushing en 1912 et l'hyperaldostéronisme primaire par Conn en 1955. La première description d'une femme pseudo-hermaphrodite, souffrant probablement d'hyperplasie congénitale des surrénales, remonte au 1865 mais son origine surrenalienne n'a pas été formellement définie jusqu'en 1939. Le premier cas de phéochromocytome a été décrit par Frankel en 1886.

Embryologie

Les glandes surrénales sont composées chacune de deux parties glandulaires fonctionnellement distinctes et contenues dans une seule capsule. Les deux différentes composantes, appelées médullaire et corticale, ont une origine embryologique indépendante et sont anatomiquement différentes. La partie corticale dérive du mésoderme latéral qui tapisse la cavité coelomique entre la racine du mésentère et la crête génitale. Son ébauche ne migre pas et évolue dans son emplacement originel. Seule la couche fasciculée est présente avant la naissance. La couche glomerulée n'apparaît qu'au 2^{ème} mois et la couche réticulée qu'après 3 ans. Dès la 7^{ème} semaine d'aménorrhée (SA), des sympathogonies migrent ventralement à partir de la crête neurale. Certaines vont former le système sympathique au niveau des ganglions latérovertébraux et un petit contingent se

place au contact de l'ébauche corticosurrénaliene pour se différencier en sympathoblastes et phéochromoblastes. Le tissu d'origine mésodermique encercle progressivement celui-ci, d'origine ectodermique, l'ensemble conférant à la glande sa structure définitive. A la 8^{ème} SA, les fibres nerveuses sympathiques se connectent avec les phéochromoblastes. La glande surrénale est fonctionnelle dès le 5^{ème} mois de vie intra-utérine.

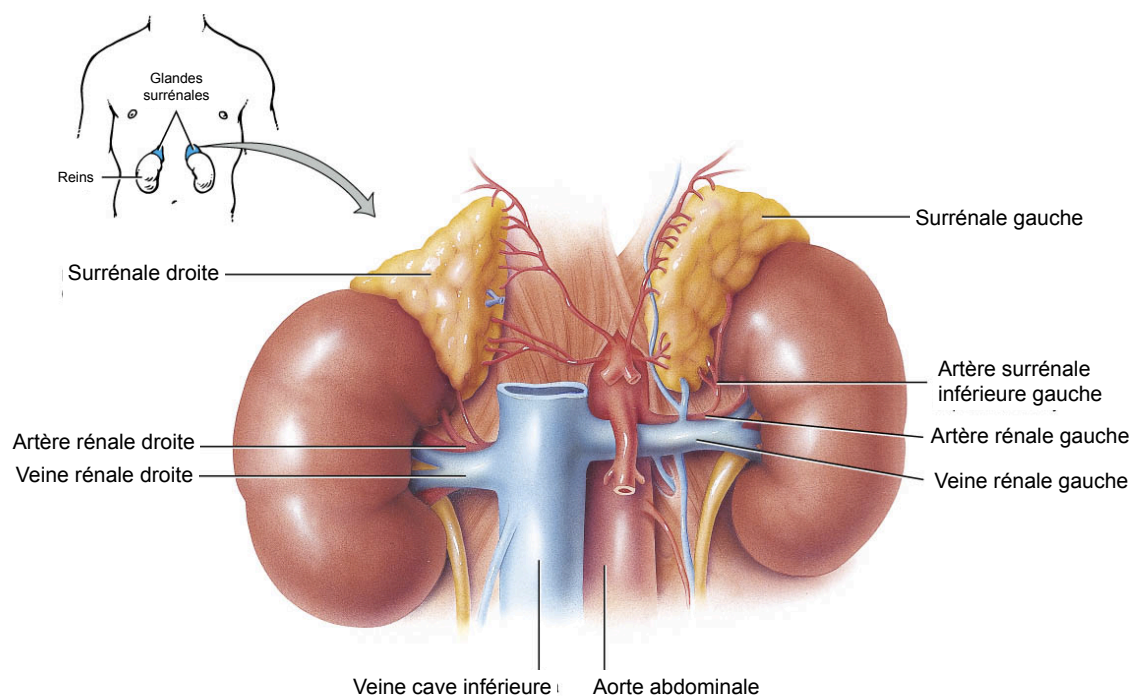


Figure 7. Représentation schématique de l'anatomie des glandes surrénales (figure issue de : Netter FH, Atlas of Human Anatomy, modifiée).

Anatomie

La glande surrénale est un organe paire, localisée dans le rétropéritoine en correspondance de la partie supéro-médiale du pôle supérieur du rein (**figure 7**). Chaque glande a un poids approximatif de 4 g. La glande droite, en forme de pyramide, est adjacente à la veine cave inférieure, au pilier diaphragmatique droit et à la surface libre du foie. La glande gauche est plus plate et s'étend entre le rein homolatéral, l'aorte, la queue du pancréas et l'artère splénique. Les deux glandes ne sont généralement pas visibles à l'exploration directe du rétro péritoine.

Normalement, le cortex surrénalien a une couleur jaune vif et la médullaire est rouge-brun. La structure interne se compose d'une zone centrale ou médullosurrénale (20% du volume total), encerclée par une zone périphérique ou corticosurrénale (80% du volume total). La vascularisation des deux glandes est principalement assurée par l'artère phrénique inférieure, l'aorte et l'artère rénale. Plusieurs petites branches artérielles pénètrent dans la capsule de la glande le long de tout son périmètre (le système microvasculaire) permettant l'intégration fonctionnelle entre les parties médullaire et corticale. La veine surrénale droite s'abouche dans la veine cave inférieure et la veine surrénale gauche s'écoule directement dans la veine rénale homolatérale, mais elle peut parfois se vider directement dans la veine cave inférieure. Le système lymphatique se draine directement dans les ganglions lymphatiques para-aortiques et rénaux.

Histologie et sécrétion hormonale

Corticosurrénale

Chez l'adulte, du point de vue histologique, la corticosurrénale se compose de trois couches concentriques, indissociables macroscopiquement, ayant chacune une structure histologique et une fonction sécrétoire propre. De la périphérie vers le centre, on reconnaît : la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée (**figure 8**).

Zone glomérulée

La zone glomérulée produit l'aldostérone à partir du cholestérol (**figure 9**), un minéralocorticoïde qui a un rôle clef dans l'homéostasie saline et le volume sanguin. Cette région du cortex est régulée principalement par le système rénine-angiotensine, la concentration plasmatique de potassium et le peptide natriurétique auriculaire.

Zone fasciculée

La zone fasciculée produit du cortisol, un glucocorticoïde (**figure 9**). Les cellules de cette zone sont capables de synthétiser directement le cholestérol ou de l'obtenir à partir des protéines LDL et HDL circulantes. Quelle que soit l'origine du

cholestérol, il est converti en prégnénolone puis en progestérone, en 11-deoxycortisol et enfin en cortisol. Une fois produit, le cortisol est transporté dans le sang et la demi-vie moyenne est d'environ 70 minutes. Le cortisol a la fonction de régulateur de la transcription génique. Les actions principales du cortisol peuvent être: métaboliques (augmentation de la glycémie par l'activation de la gluconéogenèse), cardiovasculaires (action synergique avec les catécholamines), immunitaires anti-inflammatoires, osseuses (réduction de l'absorption intestinale du calcium avec hypocalcémie et remodelage osseux accentué secondaire à une hypersécrétion de parathormone). La production de cortisol est régulée par le facteur de libération de l'hormone hypothalamique (CRH ou corticotropin-releasing hormone) et hypophysaire (ACTH ou adrenocorticotropin hormone).

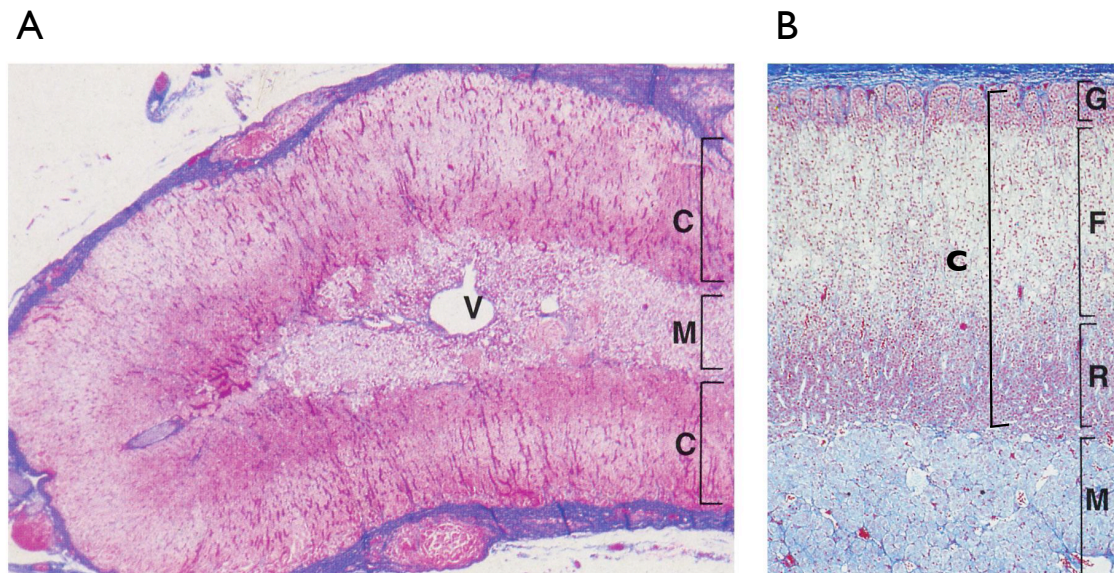


Figure 8. Représentation schématique de l'histologie de la glande surrénale (**A** : Azan x 12, **B** : Azan x 20). V : veine médullaire, M : médulla, C : cortex, G : zone glomérulée, F : zone fasciculée, R : zone réticulée (figure issue de Koeppen & Stanton : Berne and Levy Physiology, 6th Edition, modifiée)

Zone réticulée

La zone réticulée commence à se former autour de la cinquième année de vie et les androgènes surrenaliens, notamment le déhydroépiandrostérone sulfate (DHEAS), ne sont détectables que vers la sixième année. Cet événement, connu sous le nom adrénarque, contribue à l'apparition de la pilosité axillaire et pubienne

autour de l'âge de huit ans. Les cellules de la zone réticulée convertissent le cholestérol en prégnénolone, puis en 17-hydroxyprégnénolone (**figure 9**). Ce dernier est le précurseur du déhydroépiandrostérone (DHEA), qui peut être converti en androstènedione ou DHEAS. Le DHEA et l'androstènedione peuvent être transformés en androgènes actifs (testostérone et dihydrotestostérone) dans les deux sexes. Chez la femme, les androgènes surrenaliens représentent environ 50% du pool circulant et sont nécessaires pour le développement de la pilosité axillaire et pubienne ainsi que pour le maintien de la libido. L'ACTH est le principal régulateur de la zone réticulée. Dès lors, l'androstènedione et le DHEA ont le même rythme circadien que le cortisol.

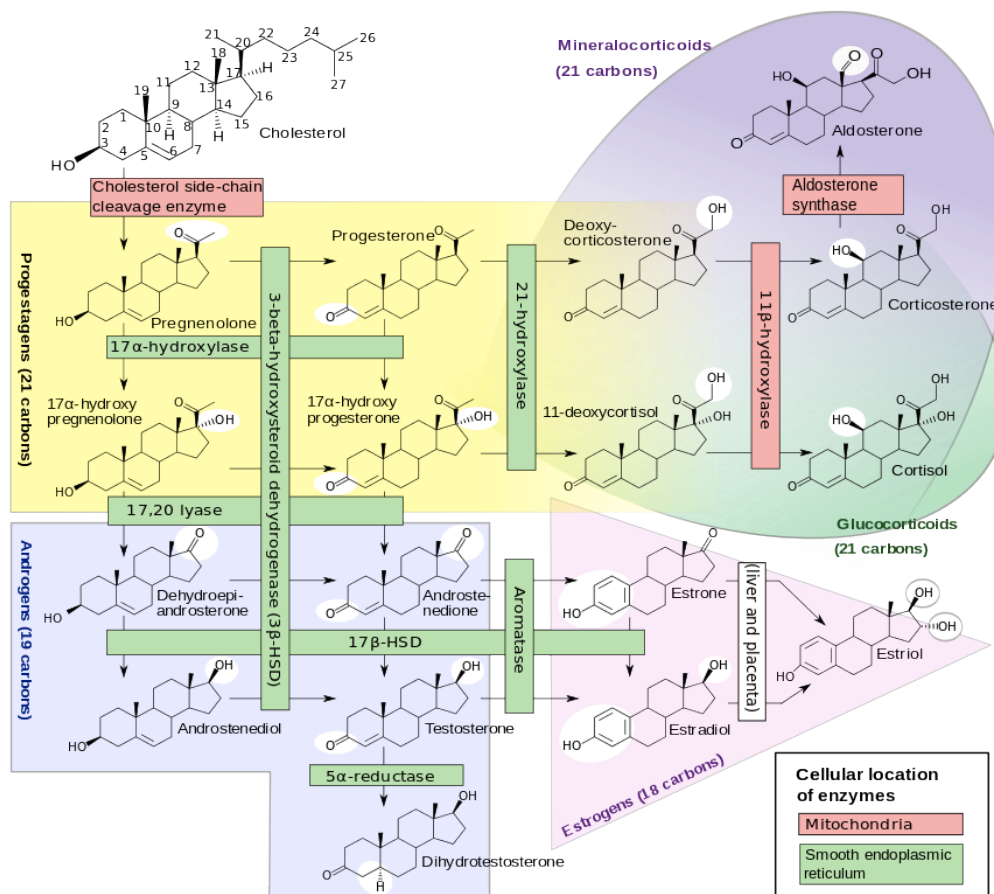


Figure 9. Synthèse des hormones corticosurréaliennes (figure issue de Wikimedia Commons)

Médullosurrénale

La médullosurrénale est composée de groupes irréguliers de grandes cellules glandulaires (cellules chromophobes ou sympathoblastes et cellules chromaffines ou phéochromoblastes) séparées par des travées de tissu conjonctif contenant des petits vaisseaux. Ces cellules sécrètent des catécholamines (principalement épinéphrine mais aussi norépinéphrine) sous l'influence du système nerveux sympathique. Chaque cellule comporte sur sa membrane des terminaisons nerveuses dont l'activation détermine la libération des catécholamines. La synthèse de l'épinéphrine (**figure 10**) commence avec l'intégration cellulaire de la tyrosine par les cellules chromaffines et son hydroxylation en dihydroxyphénylalanine (DOPA) par l'enzyme tyrosine hydroxylase. La DOPA est ensuite convertie en dopamine, transportée à l'intérieur des vésicules sécrétoires et convertie en norépinéphrine. Dans la plupart des cellules la norépinéphrine est méthylée pour produire l'épinéphrine. La sécrétion surrenalienne de catécholamines est régulée principalement par des signaux sympathiques en réponse à diverses formes de stress exogène et endogène.

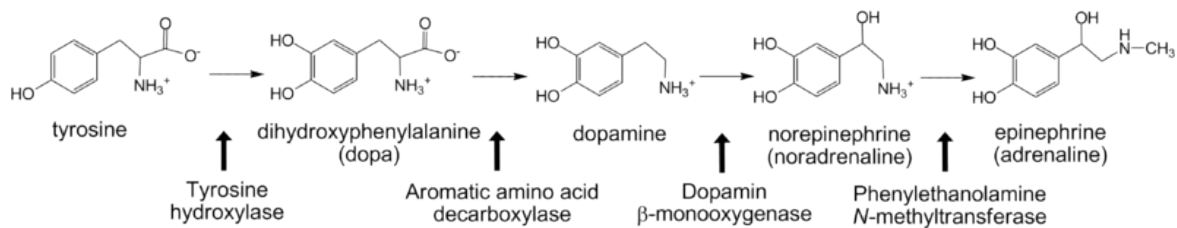


Figure 10. Voie synthétique des catecholamines.

2.2. PRINCIPALES FORMES TUMORALES

Introduction

Comme précédemment exposé, les surrénales renferment en leur sein deux tissus d'origine et de fonctionnalité différentes: la corticosurrénale et la médullosurrénale. Chacun de ces tissus peut être le siège d'un processus néoplasique, bénin ou malin. Les tumeurs surrenaliennes peuvent être découvertes suite à la présence de symptômes cliniques liés à l'excès de sécrétion d'hormones par la tumeur. Les tumeurs du cortex sont potentiellement responsables d'un excès de sécrétion d'hormones stéroïdes et d'aldostérone et les tumeurs de la médullosurrénale produisent des quantités excessives de catécholamines. La plupart des tumeurs corticosurréaliennes sont découvertes fortuitement à l'occasion d'un examen d'imagerie effectué pour une autre indication. Ces lésions sont alors appelées incidentalomes, dénomination traduisant le mode de révélation de la tumeur sans préjuger de son diagnostic. Cette situation peut concerner jusqu'à 2 % des patients examinés en tomodensitométrie (TDM) abdominale et intéresse 2,3 % des cas sur des séries nécropsiques (Barzon et al. 2003, Young et al. 2007). Toutefois, il s'agit le plus souvent d'adénomes non fonctionnels et de faible taille. Le risque de malignité augmente avec la taille des tumeurs avec un seuil optimal (mais imparfait) de 4 cm pour distinguer les lésions malignes des lésions bénignes (Mantero et al. 2000). Les principales tumeurs qui se développent aux dépens du cortex sont les adénomes corticosurréaliens et les corticosurréalomes. En revanche, la médullosurrénale pourra développer des tumeurs endocrines pures ou phéochromocytomes, surtout chez l'adulte, et des tumeurs nerveuses pures, ou neuroblastomes, surtout chez l'enfant. Le neuroblastome est l'une des plus communes tumeurs létales solides extra-crâniennes de l'enfance, ayant pour origine les tissus du système nerveux sympathique comme la médullosurrénale ou les ganglions sympathiques paravertébraux.

Adénome corticosurrénalien

L'adénome est la tumeur bénigne la plus commune de la corticosurrénale. Un adénome peut se développer à tout âge, mais touche plus fréquemment l'adulte de 40 à 60 ans (Golden et al. 2009). D'un point de vue fonctionnel, l'adénome surrenalien peut être sécrétant ou non sécrétant. L'adénome surrenalien non sécrétant est asymptomatique et il est souvent diagnostiqué dans le cadre d'investigations menées pour d'autres raisons (incidentalome). L'adénome surrenalien sécrétant peut provoquer une variété de symptômes en fonction de sa localisation et donc du type d'hormone produite. Les syndromes endocriniens associés sont : le syndrome de Conn (hyperaldostéronisme), le syndrome de Cushing (hypercorticisme) ou le syndrome virilisation/féminisation (hypersecretion d'hormones sexuelles). Le diagnostic est fait grâce à des tests hormonaux et des études d'imagerie telles que l'échographie, la TDM ou l'IRM (Johnson et al. 2009, Pappa et al. 2012). Le traitement est médical (symptomatique) ou chirurgical selon les différentes situations cliniques (Terzolo et al. 2009).

Corticosurréalome malin

Données générales

Les corticosurréalomes malins se développent à partir du cortex surrenalien. L'incidence est d'environ 1 à 2 par million, sachant qu'elle est probablement sous-estimée au regard de l'augmentation de l'incidence des masses surrenaliennes de découverte fortuite. Les corticosurréalomes malins sont responsables de 0,2 % des décès par cancer alors qu'ils ne représentent que 0,02 % de tous les cancers. Les corticosurréalomes malins touchent le plus souvent des sujets de 40 à 50 ans, avec toutefois également un pic d'incidence moindre dans l'enfance. Le sexe ratio F/H est de 1,5 (Allolio et al. 2006, Icard et al. 2001, Schteingart et al. 2005). Les corticosurréalomes malins sont sécrétants dans plus de 50% des cas, la présentation la plus courante étant un syndrome de Cushing rapidement évolutif avec ou sans hyperandrogénie associée. L'hyperaldostéronisme pur est très rare. L'exploration biologique vise donc à rechercher l'existence d'une hypersecretion

hormonale. Les tumeurs non sécrétants se présentent comme des lésions abdominales douloureuses ou des incidentalomes.

Précocité du diagnostic

Le diagnostic préopératoire repose sur un faisceau d'arguments car la biopsie n'est pas recommandée en raison des risques de dissémination tumorale sur le trajet de ponction et de sa faible valeur diagnostique. Devant une masse surrenalienne en imagerie, la démarche diagnostique consiste d'abord à éliminer une hypersecrétion hormonale par les dosages hormonaux sériques et urinaires (ce qui exclut la quasi totalité des phéochromocytomes) ou une néoplasie primitive d'une autre origine par le recueil des antécédents et la présence éventuelle d'autres localisations tumorales. Dans un second temps, si la première étape est non conclusive, on s'aidera des aspects de la lésion en imagerie conventionnelle (TDM notamment) pour caractériser au mieux la nature de la lésion tumorale (Tabarin et al. 2008). En pratique, le problème essentiel concerne la distinction entre adénomes et corticosurréalomes malins car les implications thérapeutiques sont grandes : abstention ou chirurgie limitée dans le premier cas, chirurgie élargie (à la loge de surrénalectomie voire aux organes de voisinage) dans le second cas. Les corticosurréalomes malins ont un pronostic très défavorable avec un taux de survie à 5 ans estimé entre 11 et 62 % dans les formes localisées, de stade 1 et 2 (Icard et al. 2001, Barzon et al. 1997, Bellantone et al. 1997, Fassnacht et al. 2009, Henley et al. 1983, Kendrick et al. 2001, Lee et al. 1995, Pommier et al. 1992, Schulick et al. 1999, Schulick RD, Brennan et al. 1999, Soreide et al. 1992). Après résection complète, le taux de récurrence à 5 ans dépasse 80 %. Cette difficulté diagnostique pour distinguer les lésions bénignes des lésions malignes peut aboutir à des stratégies chirurgicales inadaptées (exérèses inutiles ou, à l'inverse, exérèses chirurgicales trop limitées). Les marqueurs moléculaires n'ont pas d'utilité en préopératoire puisque la biopsie de ces tumeurs est à proscrire (risque d'effraction capsulaire avec ensemencement). Certaines méthodes d'imagerie permettent de mieux caractériser les tumeurs et de renforcer la présomption diagnostique. La scintigraphie corticosurrenalienne au ^{131}I -iodométhylnorcholestérol présente une précision diagnostique insuffisante. La TDM multiphase et l'IRM par déplacement chimique représentent les meilleurs

outils pour discriminer les lésions bénignes et malignes (Caoili et al. 2000, Caoili et al. 2002, Haider et al. 2004, Halefoglou et al. 2009, Israel et al. 2004, Korobkin et al. 1995, Lee et al. 1991, Park et al. 2007, Pena et al. 2000). Le diagnostic d'adénomes (tumeur bénigne) en TDM repose sur l'analyse du contenu lipidique intracellulaire et de la vidange de l'agent de contraste sur le temps tardif. La simple mesure de la densité spontanée (DS) à moins de 10 UH en TDM (région d'intérêt dite ROI, englobant 2/3 de la lésion, en évitant les zones inhomogènes telle que la nécrose ou les calcifications) présente une sensibilité de 71% et une spécificité de 98% (Boland et al. 1998, Hahn et al. 2006). Toutefois, environ 30% des adénomes sont caractérisés par une DS>10 UH, témoignant de leur faible contenu en lipides. Pour ces tumeurs de nature indéterminée (encore nommées « atypiques »), le calcul de la baisse de la densité aux temps portal et tardif augmente la précision diagnostique. Classiquement, les adénomes s'imprègnent d'agent de contraste après injection et le relarguent rapidement (Korobkin et al. 1996, Korobkin 1996). On distingue les pourcentages de lavage relatif (LR) et absolu (LA) : $LR = (DP-DT) / DP * 100$ et $LA = (DP-DT) / (DP-DS) * 100$ où DP = densité fin d'injection (temps portal à 60 s), DT = densité tardive (10-15 min). Les ROI doivent être identiques. En utilisant $LA \geq 60\%$ ou $LR \geq 40\%$, les sensibilités et spécificités pour le diagnostic d'adénome sont de 100% et de 95%, indépendamment de leur contenu en graisse (Blake et al. 2006, Slattery et al. 2006). L'IRM par déplacement chimique est performante mais moins bien validée que la TDM dans cette indication (Park et al. 2007). En dehors des tumeurs hypersecrétantes et des tumeurs manifestement malignes en imagerie, certaines tumeurs dites de nature indéterminée peuvent justifier d'une exérèse, notamment les tumeurs « atypiques » en TDM, les tumeurs ≥ 4 cm et les tumeurs évolutives. Toutefois, une amélioration de la caractérisation de ces tumeurs dans la démarche diagnostique permettrait une optimisation de la prise en charge ultérieure.

Caractérisation moléculaire

Bien que la possibilité de transition de l'adénome au carcinome ait été occasionnellement rapportée, il ne semble pas, d'après les observations à long

terme d'incidentalomes non opérés, que la séquence adénome-dysplasie-cancer soit la règle dans la corticosurrénale.

De nombreuses aberrations chromosomiques, différentes dans les adénomes et les carcinomes, ont été découvertes. L'étude de maladies génétiques associées à des tumeurs surrenaliennes (Li-Fraumeni, Beckwith-Wiedmann, Gardner, Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1) a permis de cibler certains gènes dont le dysfonctionnement, révélé ou majoré par des pertes d'hétérozygotie de l'allèle sain, pourrait être également incriminé dans les formes sporadiques.

Une perte d'hétérozygotie en 17p13 a été décrite dans 84,6 % des corticosurréalomes malins ayant un score de Weiss supérieur à 3 et 40 % des corticosurréalomes malins de score 2 (Assie et al. 2007, Gicquel et al. 2001). Les mutations les plus fréquentes du gène TP53 associées au syndrome de Li-Fraumeni ont été trouvées aussi dans des corticosurréalomes malins sporadiques. La perte d'hétérozygotie en 11p15, avec surexpression d'IGF2 est trouvée dans 60 à 90% des carcinomes (Gicquel et al. 2001). Cette anomalie est liée à une perte de l'allèle maternel (soumis à empreinte) avec duplication de l'allèle paternel (actif) et donc expression bi-allélique du gène de l'IGF-2.

Des mutations activatrices du gène de la β -caténine sont retrouvées fréquemment dans les tumeurs bénins et malins de la corticale surrenalienne: ces mutations caractériseraient des sous groupes de tumeurs plus volumineuses ou dotées d'un potentiel plus agressif (Tissier et al. 2005). Un sous groupe d'adénomes sécrétant du cortisol et possédant une activité PKA très augmentée a été également individualisé (Vincent-Dejean et al. 2008).

Malgré ces données, aucune des anomalies moléculaires décrites dans les corticosurréalomes malins n'est assez spécifique pour permettre de les distinguer des adénomes, même si leur fréquence augmente avec le degré de malignité (Barlaskar et al. 2007).

L'amélioration de la caractérisation moléculaire des corticosurréalomes malins permettrait d'améliorer le diagnostic et d'envisager un ciblage thérapeutique plus spécifique.

Diagnostic

Le diagnostic de certitude du corticosurréalome malin est anatomopathologique. Les tumeurs malignes sont volumineuses, avec une taille moyenne de 10 cm. Le tissu est hétérogène avec des zones de nécrose et des foyers hémorragiques.

L'architecture générale des corticosurréaumes malins rappelle celle de la glande normale: cordons cellulaires sous tendus par un fin réseau sinusoïdal. Il n'y a pas de différence morphologique selon le type de sécrétion hormonale. Les carcinomes ont une architecture plus dense que les adénomes, réalisant soit des nappes cellulaires diffuses sous tendues par un réseau sinusoïdal fin, soit des travées épaisses ou des massifs larges parcourus de bandes scléreuses épaisses. Des plages de nécrose confluyente et des remaniements myxoïdes apparaissent ainsi que des zones d'invasion de la capsule surrenalienne, du tissu adipeux extra-surrealien, des sinusoïdes et même des veines. Les atypies cellulaires peuvent être discrètes ou très marquées. L'activité mitotique est également très variable, de discrète (1 ou 2 mitoses par cm^2), à plus marquée (> 1 mitose par champ à l'objectif x 40), avec des formes atypiques : ces paramètres sont utilisés par les systèmes de scores histopronostiques (Aubert et al. 2002, Blanes et al. 2007, van't Sant et al. 2007, Volante et al. 2008).

Dans certains cas, le diagnostic de malignité ne peut être affirmé. Malgré les espoirs soulevés par les marqueurs moléculaires, aucune méthode ne s'est montrée jusqu'ici suffisamment fiable pour affirmer à elle seule la malignité, comme la perte d'hétérozygotie en 17p13 ou la surexpression d'IGF-2. Récemment, l'étude des tumeurs par puces à ADN a permis d'identifier des nouveaux indexes de malignité (de Reynies et al. 2009).

Pronostic des formes localisées

Les corticosurréaumes malins se propagent par l'intermédiaire des veines rénales et de la veine cave inférieure. Les métastases surviennent en priorité dans le foie, les poumons, les ganglions rétro-péritonéaux, les os. La classification recommandée est celle fondée sur le système de MacFarlane modifié par Sullivan et publiée par l'OMS en 2004 (Allolio et al. 2006) : stade I : tumeur localisée, taille < 5 cm, N0M0 ; stade II : tumeur localisée, taille > 5 cm, N0M0 ; stade III : toute

taille, invasion locale extra surrenalienne et/ou N1 ; stade IV : toute taille, invasion des organes de voisinage ou métastases. Une nouvelle classification a été proposée (Fassnacht et al. 2009). L'invasion des organes de voisinage est désormais classée dans le stade III. Seules les tumeurs M1 sont classées dans le stade IV.

Dans la série de 253 patients de l'AFCE (Association Française de Chirurgie Endocrine), la survie à 5 ans est respectivement de 60 %, 58 %, 24 % et 0 % dans ces 4 groupes (Icard et al. 2001). Les tumeurs opérées au stade II seraient actuellement les plus fréquentes. La recherche de facteurs pronostiques est particulièrement importante chez les patients des stades I et II pour poser l'indication d'un traitement adjuvant, car même après résection complète (R0), le taux de récurrence dans les 5 ans dépasse 80 % (Stojadinovic et al. 2002).

L'exhaustivité de l'exérèse chirurgicale initiale (R0) est un élément essentiel du pronostic, mais des récurrences surviennent dans 75 à 85 % des cas même lorsqu'elle est complète. Dans les stades I et II après chirurgie complète, un traitement par Mitotane, substance adrénolytique dérivée du DDT, est instauré pour limiter et retarder les récurrences (Terzolo et al. 2007).

L'analyse de paramètres cytologiques et architecturaux proposés par Weiss en 1984 et par Von Sloten en 1985 a aussi une valeur pronostique. Dans plusieurs études, la durée de survie et le délai de récurrence sont significativement corrélés au score de Weiss (Schteingart et al. 2005). De tous les paramètres histopronostiques, c'est l'activité mitotique qui a la valeur prédictive la plus forte : des taux de mitoses > 20/40-50 champs (x 40) définissent des tumeurs de haut grade de malignité (Schteingart et al. 2005, Assie et al. 2007). Les autres paramètres « majeurs » du score de Weiss, i.e. retrouvés le plus constamment et dont l'évaluation s'est montrée la plus reproductible, sont la présence de mitoses atypiques, de nécrose confluyente, de moins de 25% de cellules claires, l'invasion veineuse et l'invasion capsulaire : des systèmes simplifiés (Aubert et al. 2005) ou hiérarchisés (Blanes et al. 2007) fondés sur un ou plusieurs de ces critères majeurs ont été proposés mais ne sont pas rentrés dans l'usage courant.

La mise en oeuvre d'un traitement adjuvant par Mitotane est envisagée dès que le score de Weiss dépasse 2, surtout s'il y a d'autres facteurs pronostiques péjoratifs : diamètre > 8 cm, index Ki67 > 10%, invasion vasculaire. Dans certains cas, un traitement adjuvant par radiothérapie externe sur le lit tumoral peut être

envisagé pour réduire les récurrences locales (Fassnacht et al. 2006, Polat et al. 2009). L'étude des tumeurs par puces à ADN a permis d'identifier des nouveaux prédictors de survie (de Reynies et al. 2009).

Traitement des formes localement avancées et métastatiques

Le traitement des formes localement avancées est basé sur la chirurgie. Le traitement chirurgical des formes localisées repose sur des exérèses multi-viscérales associées parfois à des gestes vasculaires. La survie moyenne des formes métastatiques est toujours de moins de 12 mois. Le traitement des corticosurrénales malins métastatiques d'emblée ou en récurrence métastatique fait appel avant tout aux traitements systémiques. La chirurgie peut être envisagée pour éviter certaines complications locales. Le traitement systémique emploie le mitotane associé à des chimiothérapies cytotoxiques utilisant cisplatine, étoposide, doxorubicine, et/ou streptozotocine selon différents protocoles qui font l'objet d'essais thérapeutiques randomisés (Allolio et al. 2006).

Phéochromocytome et Paragangliome extra-surrénalien

Données générales

On distingue les phéochromocytomes ou paragangliomes surrenaliens, qui dérivent des cellules chromaffines sympathiques de la surrenale, des paragangliomes extra-surrenaliens, qui dérivent des cellules chromaffines des ganglions sympathiques (rétropéritone) ou des paraganglions et chémorécepteurs parasympathiques (**figure 11**).

Cette distinction se justifie par plusieurs points : un taux de malignité moindre des phéochromocytomes (5% contre 20% pour les paragangliomes sympathiques), des phénotypes sécrétoires différents (adrénergique contre noradrénergiques pour les paragangliomes) et des contextes génétiques souvent différents.

Les phéochromocytomes sont rares (4% des incidentalomes) mais leur prévalence est élevée (0,05%) dans des séries autoptiques et ils seraient souvent méconnus. L'incidence annuelle des phéochromocytomes dans la population

générale est de 1 à 6 par million. Ils se voient à tout âge mais avec un pic de fréquence dans les 4^e et 5^e décennies.

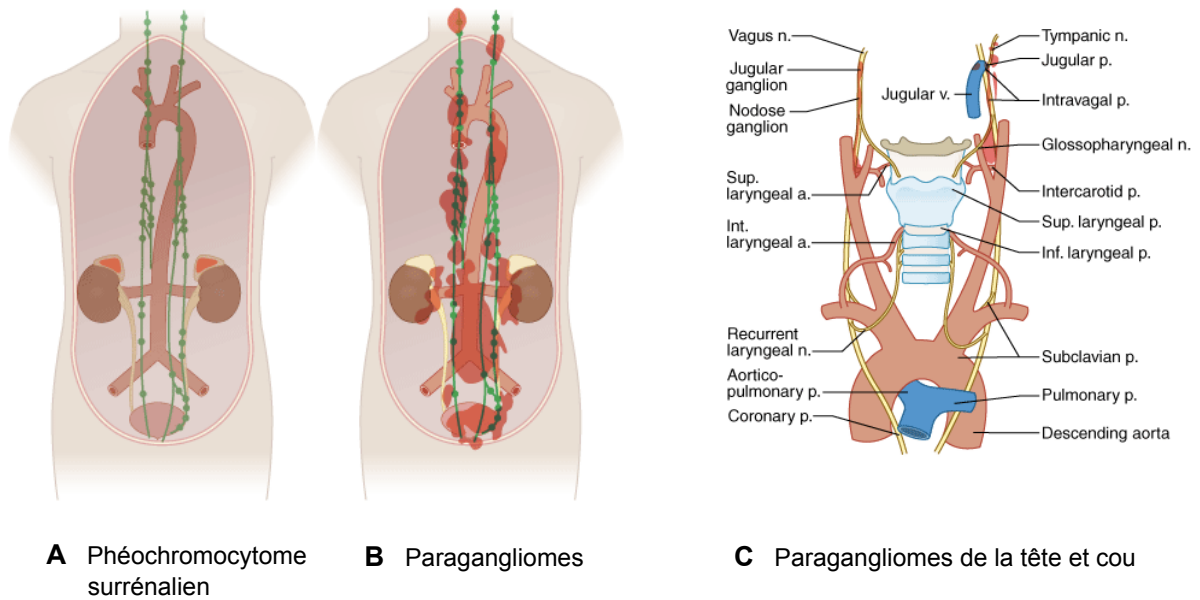


Figure 11. Représentation schématique de la topographie lésionnelle des phéochromocytomes et paragangliomes (figure issue de Fauci et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition : <http://www.accessmedicine.com>, modifiée).

Les phéochromocytomes et paragangliomes sont sporadiques dans environ 70% des cas et associés à des mutations germinales dans 30% des cas dans le cadre d'une syndrome héréditaire, avec à ce jour de multiples gènes de susceptibilité individualisés (Eisenhofer et al. 2004, Lo et al. 2000, Manger et al. 2006, Tischler et al. 2008, Hao et al. 2009, Qin et al. 2010, Comino-Mendez et al. 2011).

Les paragangliomes sont dix fois moins fréquentes que les phéochromocytomes mais souvent multicentriques. Ils surviennent entre 10 et 20 ans, sans franche prédominance de sexe. La morphologie est superposable à celle des phéochromocytomes surrenaliens. Entre 10 et 40 % de ces tumeurs ont une évolution maligne.

Hypothèses relatives à la tumorigénèse

La pathogénèse des paragangliomes n'a pas été encore définitivement élucidée. Les différentes hypothèses qui ont été avancées sont ci dessous succinctement présentées (Dahia 2014, Galan et al. 2013).

a) Hypothèses de l'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal pour éliminer les cellules âgées et celles développées anormalement, éliminant ainsi la propagation de l'erreur. La résistance à l'apoptose est l'un des mécanismes sous-jacents au développement de la plupart des tumeurs (Hanahan et al. 2000). Les mitochondries contribuent directement à l'apoptose par la libération de protéines toxiques. Suite à l'induction de l'apoptose, la membrane externe mitochondriale devient perméable aux protéines mitochondriales toxiques, alors délivrées afin de diriger la destruction cellulaire (van Gurp et al. 2003). Au cours de l'apoptose, le potentiel transmembranaire se dissipe et le gradient protonique n'est en conséquence pas maintenu; il s'ensuit une abolition de la production d'énergie mitochondriale (Kim et al. 2003). L'inhibition de l'apoptose a été proposée comme mécanisme potentiel dans la tumorigénèse des paragangliomes SDH, probablement en inhibant la participation des mitochondries au processus apoptotique. On a aussi proposé que l'inactivation de la succinate déshydrogénase ne conduit pas seulement à l'accumulation de succinate mais également à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) constituant un signal hypoxique important pour les cellules des paraganglions avec pour conséquence l'hyperplasie et la transformation néoplasique éventuelle. Si cette hypothèse est correcte, éviter l'exposition hypoxique pourrait réduire le risque de développement tumoral.

b) Hypothèses de la pseudo-hypoxie

Il a été montré que des mutations de la SDH stimulent la voie de réponse à l'hypoxie dans les tissus tumoraux (Baysal et al. 2003, Pollard et al. 2003). En

particulier, dans les paragangliomes causées par des mutations du gène SDHD, on a observé des niveaux élevés de HIF-1 α ou Hypoxia-Inducible Factor (Gimenez-Roqueplo et al. 2001). La sous-unité HIF-1 α est une composante oxygène inductible du facteur de transcription HIF, un hétérodimère constitué de HIF- α et HIF- β , qui active l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'érythropoïèse, le métabolisme énergétique et l'apoptose (Pugh et al. 2003, Semenza et al. 2002). Dans des conditions de normoxie (pression d'oxygène normale) l'activité de HIF est inhibée par pVHL (la protéine codée par le gène VHL) grâce à l'interaction entre pVHL et le domaine de dégradation oxygène dépendante de HIF-1 α (Oxygen Dependent Degradation ou ODD domain) (Pugh et al. 2003, Semenza et al. 2002). La liaison de pVHL à HIF-1 α est réglée par l'hydroxylation de deux résidus spécifiques de proline dans le domaine OOD (Jaakkola et al. 2001, Yu et al. 2001). Une telle modification post-traductionnelle est catalysée par HIF- α prolyl-hydroxylase (PHD) et conduit à la formation de deux liaisons hydrogène avec la pVHL et à la dégradation subséquente de HIF-1 α par le protéasome (Hon et al. 2002, Min et al. 2002). Dans des conditions d'hypoxie ou en présence des mutations de pVHL, HIF-1 α n'est pas reconnu par pVHL et migrera dans le noyau où il se dimérisera avec la sous-unité β avec pour conséquence l'activation de l'expression de gènes cibles (George et al. 2003). L'accumulation de succinate secondaire à la régulation négative de la SDH imite une condition hypoxique car le succinate quitte la mitochondrie pour gagner le cytosol, inhibant ainsi la PHD. HIF-1 α ne sera donc pas hydroxylée ni reconnue par pVHL et diffusera dans le noyau (Selak et al. 2005). Le succinate fonctionne alors comme messenger intracellulaire entre les mitochondries et le cytosol et a un effet direct sur l'enzyme cytosolique PHD et son expression génique. Une réduction significative de l'expression de la SDH est observée également dans les cancers gastrique et colorectal (Habano et al. 2003) ; ce fait tendrait à démontrer l'implication du succinate dans le processus de tumorigenèse, en particulier dans la transition vers les formes tumorales les plus infiltrantes. Il a été démontré par des études sur les phéochromocytomes et paragangliomes que HIF-1 α inhibe la sous-unité B et a donc une double fonction: d'une part activer l'expression des gènes cibles, de l'autre inhiber l'activité de la SDH (Dahia et al. 2005).

c) Hypothèses du stress oxydatif

Le stress oxydatif est la conséquence directe de l'accumulation des radicaux libres suite à une hyperproduction en l'absence d'une capacité défensive suffisante, avec apparition de dommages oxydatifs au niveau de différents organes et appareils (Harman 1956). L'accumulation de ROS conduit donc à une augmentation du stress oxydatif et à des hypermutations, en particulier dans l'ADN mitochondrial. Étant donné les propriétés oxydo-réductives de la SDH, son implication possible a été suggérée dans la production de superoxydes (Rustin et al. 2002). L'ubiquinone (UQ) dans sa forme réduite (QH₂) se comporte comme un antioxydant protégeant d'une part les phospholipides des membranes de la peroxydation lipidique et d'autre part les protéines mitochondriales et l'ADN des radicaux libres du stress oxydatif (Ernster et al. 1995). Toutefois, lorsque l'UQ est semiréduite, sous la forme Q⁻, il agit comme un pro-oxydant. Compte tenu que la SDH est la seule déshydrogénase capable de maintenir l'état réduit de UQ, une mutation qui entraîne une réduction ou une perte de fonction de la SDH pourrait conduire à une augmentation du stress oxydatif et peut-être à la tumorigenèse (Astuti et al. 2001).

Syndromes héréditaires

Comme précédemment anticipé, les phéochromocytomes et les paragangliomes peuvent survenir de manière sporadique, mais aussi dans le contexte de syndromes héréditaires, causés par des mutations qui mènent à l'activation des certains proto-oncogènes ou à l'inactivation des séquences géniques « suppresseur ». Environ 30% des phéochromocytomes et jusqu'à 50% des paragangliomes présentent des mutations germinales dans l'un des gènes de susceptibilité connus et peuvent donc survenir comme des tumeurs héréditaires (Neumann et al. 2002, Amar et al. 2005) intégrées dans un des syndromes héréditaires suivants :

a) Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2 (NEM2)

Dans la NEM2, les phéochromocytomes représentent une caractéristique clinique dominante. Ce syndrome est causé par une mutation germinale dans le proto-oncogène RET, situé sur le chromosome 10q11. La mutation se produit presque exclusivement dans les exons 10, 11 et 16. Les phéochromocytomes sont bilatéraux dans 85% des cas et sont presque exclusivement bénins (Carling et al. 2005, Eng et al. 1997, Petri et al. 2009). Ils sont caractérisés par une perte du chromosome 1p et 3q et ont pour la plupart un phénotype adrénérgique (Edstrom et al. 2000, van Nederveen et al. 2009). Une mutation somatique du proto-oncogène RET a également été décrite dans 9% des phéochromocytomes sporadiques (van der Harst et al. 1998).

b) Maladie de von Hippel-Lindau (VHL)

Un autre syndrome associé à une haute fréquence du développement de phéochromocytomes est la maladie de von Hippel-Lindau, causée par une mutation germinale qui désactive le gène suppresseur VHL localisé sur le chromosome 3p25.3 (Kaelin et al. 2002). Les patients présentant une maladie de VHL développent également des carcinomes rénaux à cellules claires, des hémangioblastomes cérébelleux, des kystes rénaux et pancréatiques, des tumeurs neuroendocrines du pancréas et, dans de rares occasions, des paragangliomes parasymphatiques (Bender et al. 2000, Gaal et al. 2009). En fonction du développement d'un phéochromocytome au cours de l'affection, la maladie de VHL est subdivisée en type 1 (majoritairement sans phéochromocytome) et type 2 (majoritairement associée à un phéochromocytome). Les phéochromocytomes montrent un phénotype noradrénérgique (Lui et al. 2002) et la plupart sont bénins.

c) Neurofibromatose de type 1 (NF1)

La neurofibromatose de type 1 est provoquée par des mutations germinales dans le gène suppresseur NF1 situé sur le chromosome 17q11.2. Les phéochromocytomes surviennent chez 0,1 à 5,7 % des porteurs de la mutation et

sont généralement bénins. En outre, 10% de ces phéochromocytomes sont bilatéraux et 6% extra surrenaliens (paragangliomes abdominaux ou thoraciques). Les patients sont diagnostiqués sur des critères cliniques nécessitant au moins deux des sept signes cliniques aisés à affirmer comme les taches café-au-lait et les neurofibromes multiples. La recherche d'anomalies génétiques au niveau du gène NF1 est réalisée exclusivement après le diagnostic phénotypique en raison de la volumineuse taille (58 exons) du gène NF1 et la présence de plusieurs pseudo gènes (Bausch et al. 2007, Bausch et al. 2006). Cette séquence d'analyse laborieuse du gène NF1 est la raison pour laquelle aucune étude sur les mutations somatiques du NF1 n'a été rapportée.

d) Syndrome phéochromocytome – Paraganglioma

Le syndrome phéochromocytome - paragangliome est causé par des mutations germinales de sous-unités de l'enzyme succinate déshydrogénase (SDH). La SDH est une oxydoréductase de la chaîne respiratoire située sur la membrane interne des mitochondries. Elle fait partie du complexe II et catalyse le transfert de deux électrons sur l'ubiquinone (coenzyme Q10) lors de l'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs. Si la sous-unité A (SDHA) est la partie enzymatique active du complexe, la sous-unité B (SDHB) est responsable du transfert des électrons vers les autres composantes de la chaîne du transport électronique. Enfin, les sous-unités C et D (SDHC et SDHD) sont les protéines d'ancrage à la membrane mitochondriale (Ackrell et al. 2002). Au début, seules des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités B, C et D ont été associés à des phéochromocytomes et paragangliomes (Lenders et al. 2005, Favier et al. 2005, Neumann et al. 2002). Par la suite, des mutations dans les gènes codant pour la sous-unité SDHA et pour le SDH-assembly factor 2 (SDHAF2) ont été décrites dans ces tumeurs (Bayley et al. 2010, Burnichon et al. 2010). Il y a quelques décennies, lorsque les gènes causant le syndrome phéochromocytome - paragangliome n'étaient pas encore définitivement identifiés, déjà 4 régions chromosomiques sensibles au développement des paragangliomes familiaux ont été mises en évidence par des études de linkage (Hirawake et al. 1997). Le gène codant pour la sous-unité SDHD a été le premier à être associé à un sous type de ce syndrome (PGL-1) (Baysal et al. 2000). Peu de temps après

cette découverte, les gènes codant pour les sous-unités SDHB et C ont été associés à deux autres syndromes phéochromocytome - paragangliome (PGL-4 et PGL-3, respectivement) (van der Mey et al. 1989). Plus récemment le gène codant pour le SDHAF2 et responsable du syndrome PGL-2 était identifié. Le SDHAF2 n'est pas un composant du complexe mitochondrial II. Néanmoins, la protéine semble très importante pour la stabilisation et l'activité du complexe II car elle est requise pour la flavination de la sous-unité SDHA (Hao et al. 2009).

d.1) PGL-1 et PGL-2 (succinate déshydrogénase D, SDH-assembly factor 2)

La première observation décrivant l'association d'une mutation germinale dans le gène SDHD avec le syndrome PGL-1 remonte à l'année 2000 (Baysal et al. 2000). Le gène codant pour la SDHD est situé sur le chromosome 11q23.1 et est à transmission paternelle, ce qui signifie que les enfants qui héritent de la mutation du père sont à risque de développer des phéochromocytomes ou paragangliomes (van der Mey et al. 2008). En outre, il a été suggéré que l'association entre la perte de l'allèle de type sauvage et une région spécifique sur le chromosome 11p maternel est nécessaire pour la tumorigenèse (Hensen et al. 2004). Les porteurs de la mutation SDHD développent dans près de 9 cas sur 10 des paragangliomes parasymphatiques. Phéochromocytomes et paragangliomes sympathiques sont présents chez 7% et 18% des patients SDHD. Habituellement, les tumeurs sont bénignes mais environ 8% des patients présentent des métastases lors du diagnostic initial (Neumann et al. 2004).

SDHAF2, le gène causant le syndrome PGL-2, a été identifié en 2009 (Hao et al. 2009). Comme pour le gène SDHD, SDHAF2 est à transmission paternelle.

d.2) PGL-3 (succinate déshydrogénase C)

Une fois les mutations SDHD associées au locus lié au PGL-1, la liaison entre le gène SDHC et le locus du syndrome PGL-3 (chromosome 1q13) (van der Mey et al. 1989) a été rapidement découverte. La quasi totalité des porteurs d'une mutation SDHC développent exclusivement des paragangliomes parasymphatiques, même si des mutations SDHC ont aussi été détectées dans des phéochromocytomes et un paragangliome sympathique. Aucune des tumeurs

n'était métastatique mais tous les patients accusaient une perte de l'allèle de type sauvage (Mannelli et al. 2007, Niemann et al. 2000, Peczkowska et al. 2008).

d.3) PGL-4 (succinate déshydrogénase B)

Le gène responsable du syndrome PGL-4, situé sur le chromosome 1p36.1, a été identifié en 2001 (van der Mey et al. 1989). Les porteurs de la mutation germinale SDHB présentent principalement des paragangliomes et phéochromocytomes, dont 89% sont sécrétants (Amar et al. 2007). Cependant, des cas de phéochromocytomes et paragangliomes parasymphatiques de la région de la tête et du cou ont été également décrits. Jusqu'à 43 % des patients ont des tumeurs malignes qui métastasent dans le squelette, les ganglions lymphatiques, le foie et les poumons (Neumann et al. 2004, Amar et al. 2007, Benn et al. 2006). Par ailleurs, de nombreuses mutations différentes inactivant la SDHB ont été décrites, toutes d'origine germinale (van Nederveen et al. 2007). La perte du chromosome 1p est la caractéristique principale des tumeurs associées à des mutations du gène SDHB (Gimenez-Roqueplo et al. 2002).

Il est intéressant de constater que des mutations germinales SDHB, SDHC et SDHD ont également été associées au syndrome de Carney-Stratakis, une maladie rare combinant des paragangliomes et des tumeurs stromales gastro-intestinales (Gaal et al. 2010, Janeway et al. 2010).

Dépistage des phéochromocytomes

Environ 50% des phéochromocytomes sont symptomatiques (anomalies tensionnelles, crises vasomotrices). Des symptômes très variés et non spécifiques peuvent être aussi rencontrés, justifiant de son appellation de « grand simulateur ».

On estime que plus de 20% des phéochromocytomes sont asymptomatiques et qu'ils représentent 4,2 % des causes d'incidentalomes surrenaliens. A condition d'y penser, le diagnostic de phéochromocytome est souvent aisé, par le dosage des métanéphrines dans le sang et les urines et la réalisation d'une scintigraphie à la ^{123}I -métaiodobenzylguanadine (^{123}I -MIBG) (Adler et al. 2008).

Diagnostic des formes génétiques

Ce diagnostic permet de dépister des tumeurs chez les apparentés et permet de prédire le risque de malignité chez les sujets atteints, lequel est faible dans les NEM2, le VHL et le syndrome SDHD (2-3%), modéré dans la NF1 (11%) et important dans le syndrome SDHB (66-83%).

Certains syndromes cliniques permettent d'emblée d'évoquer une forme héréditaire comme des antécédents familiaux au premier degré, un cancer médullaire de la thyroïde (mutation de RET), des taches café au lait dans la NF1 ou des tumeurs synchrones appartenant au syndrome de VHL.

Dans de nombreuses formes génétiques, la présentation est apparemment sporadique. Certains signes cliniques et anatomopathologiques, comme la multifocalité et l'existence d'une hyperplasie du tissu médullaire adjacent typique des NEM 2, doivent alerter. Récemment, il a été montré que la perte d'expression de SDHB évaluée en immunohistochimie (IHC) permettait de prédire avec une bonne fiabilité l'existence d'une mutation germinale sur un des gènes SDH. A été donc proposé de dépister une mutation SDH uniquement chez les patients porteurs de tumeurs SDHB négatives en IHC. Ces résultats devraient permettre d'améliorer le diagnostic des formes héréditaires (van Nederveen et al. 2009).

D'autres mutations plus rares ont pu être identifiées, impliquant SDHC, SDHAF2 (ou SDH5) (Hao et al. 2009, Bayley et al. 2010, Kaelin et al. 2009), TMEM127 (Qin et al. 2010), SDHA (Burnichon et al. 2010) et MAX (Comino-Mendez et al. 2011).

Rappelons que certains gènes sont soumis à une empreinte génomique (SDHD, SDHAF2), c'est-à-dire que leur activité va dépendre de leur origine maternelle ou paternelle.

Malgré un effort constant pour identifier de nouveaux gènes, le taux de tumeurs avec mutations reste de l'ordre de 20 à 30% (Grossman et al. 2010). Récemment, d'autres gènes candidats ont été identifiés dans des pathologies tumorales autres, comme les mutations germinales de la fumarase hydroxylase dans les cancers du rein héréditaires avec léiomyomatose, les mutations somatiques des gènes de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1 et IDH2) dans les tumeurs cérébrales (Frezza et al. 2010) et les mutations de ISCU (iron-sulfur cluster scaffold protein) dans certaines myopathies mitochondriales (Olsson et al. 2008). On note d'ailleurs que ISCU régule toutes les protéines SDH. Les recherches de mutations de PHD2

ont été décevantes dans les PGL. Pour IDH1 et 2, les séquençages orientés sur un seul exon n'ont identifié qu'une seule mutation de IDH1 (Gaal et al. 2009). L'ensemble de ces mutations entraînent une activation de HIF-1 alpha et de ses gènes cibles. Récemment, l'équipe de Patricia LM Dahia a identifié la mutation causale responsable des phéochromocytomes familiaux liés à la région chromosomique 2q11. L'anomalie est une mutation inactivatrice du gène TMEM127 responsable d'une activation de la voie mTOR/4EBP1 (Qin et al.2010).

Importance des dosages hormonaux dans le diagnostic

Le dépistage initial pour les phéochromocytomes et paragangliomes s'appuie énormément sur les dosages biochimiques des métanéphrines et/ou normétanéphrines plasmatiques libres et des catécholamines urinaires fractionnées (Fishbein et al. 2012). La mesure des métanéphrines plasmatiques libres a des sensibilité et spécificité (respectivement 98% et 92%) égales ou supérieures au dosage des métanéphrines fractionnées urinaires. De plus, le dosage sur prélèvement plasmatique a l'avantage d'être plus facile à obtenir que l'analyse à partir de la collection des urines des 24 heures (Chen et al. 2010, Eisenhofer et al. 2008). Le motif de sécrétion ainsi que la localisation tumorale peut guider le choix de tests génétiques avec une réduction conséquente des coûts associés à l'analyse même (Karasek et al. 2010, Eisenhofer et al. 2011). Le profil biochimique de phéochromocytomes / paragangliomes chez les patients porteurs de la mutation VHL diffère en raison de la faible expression de la phényléthanolamine-N-méthyltransférase, enzyme qui convertit la norépinéphrine en épinéphrine (Eisenhofer et al. 2011, Eisenhofer et al. 2001). Les phéochromocytomes associés au syndrome NEM 2 surexpriment souvent l'enzyme phényléthanolamine-N-méthyltransferase, surexpression induisant un profil biochimique unique montrant l'élévation de l'épinéphrine (Eisenhofer et al. 2011, Eisenhofer et al. 2001). Les patients avec phéochromocytomes dans le cadre d'une mutation NF1 montrent une élévation de la norépinephrine et des normétanéphrines ainsi que de leurs métabolites (Eisenhofer et al. 2011). Le profil biochimique chez les patients porteurs du gène SDHB muté est similaire à celui des patients VHL montrant une sécrétion prédominante de normétanéphrine, mais ils peuvent aussi avoir une excrétion élevée de méthoxytyramine (le métabolite o-

méthylé de la dopamine) (Eisenhofer et al. 2011). Les tumeurs associées à des mutations SDHC, SDHD et SDHAF2 (souvent situées dans la tête et le cou) ont pour origine les ganglions parasympathiques, qui, habituellement, ne sécrètent pas de catécholamines. Chez ces patients, si les résultats des tests biochimiques montrent des niveaux élevés de sécrétion de catécholamines, des études d'imagerie doivent être proposées pour identifier une autre tumeur synchrone, plus souvent située dans l'abdomen. Enfin, les profils biochimiques des tumeurs associées à des mutations TMEM127, SDHA et MAX n'ont pas encore été bien établis.

Diagnostic de malignité

Le seul critère absolu de malignité des phéochromocytomes est la présence de métastases à distance, à savoir de tissu sympathique dans un site qui n'en comporte pas normalement. L'invasion locale ne devrait pas, en principe, être considérée comme preuve de malignité, mais traduit néanmoins une maladie agressive. Affirmer la malignité d'un phéochromocytome en l'absence de métastase est problématique car aucun critère histologique isolé n'a de valeur absolue.

Les phéochromocytomes volumineux comportent des remaniements kystiques ou hémorragiques, leur donnant un aspect polychrome. Les phéochromocytomes malins sont un peu plus gros que les bénins (en moyenne 8 cm) mais la taille n'est pas un critère pronostique significatif. Ils peuvent être plus compacts, bosselés, hétérogènes et polychromes en coupe, avec des zones de nécrose ou d'invasion extra-surrénalienne.

Les phéochromocytomes bénins ont une architecture prédominante en « nids », en travées ou mixte et sont constitués de cellules identiques à celles de la surrenale normale ou un peu plus grandes avec un cytoplasme granuleux basophile ou amphiphile. La vascularisation est abondante et peut prédominer en donnant un aspect pseudo-angiomateux. Le stroma est pauvre. L'encapsulation vraie est inhabituelle, la limite avec les tissus surrenaliens voisins pouvant être très floue. La cellularité reste modérée, sans aspect de « monotonie » cellulaire ni nécrose confluyente. On peut observer parfois un pléomorphisme modéré, des cellules géantes, des territoires cellulaires fusiformes limités (< 10%), des

inclusions cytoplasmiques intranucléaires. Les mitoses sont très rares. Des cellules sustentaculaires p S100 positives soulignent les nids cellulaires. Un grand nombre de critères ont été rapporté avec une fréquence accrue dans les phéochromocytomes malins. Ils se rapportent à l'architecture (diffuse, compacte, fusiforme), la présence de nécrose, l'invasion capsulaire, l'extension au tissu adipeux, l'invasion vasculaire, l'hypercellularité et la monotonie cellulaire ou au contraire un pléomorphisme très marqué, l'hyperchromatisme nucléaire, une activité mitotique accrue, des mitoses atypiques, la diminution ou la disparition des cellules sustentaculaires dans les zone de croissance diffuse.

Des systèmes de scores multiparamétriques ont été développés afin d'individualiser les tumeurs qui présentent un risque d'évolution maligne.

Le score PASS a été déterminé sur l'analyse de 12 paramètres histologiques dans 100 phéochromocytomes (50 bénins et 50 diagnostiqués histologiquement malins dont 33 avec métastases) suivis pendant au moins 10 ans : tous les cas ayant eu une évolution maligne ont eu un score ≥ 4 (sensibilité 100%) alors que 75% des cas bénins ont eu un score < 4 (spécificité 75%). Ces résultats ont été confirmés dans 3 autres études rétrospectives (August et al. 2004, Gao et al. 2006, Strong et al. 2008). En tout, sur 189 cas analysés, les tumeurs totalisant 4 points ou plus ont montré une évolution cliniquement maligne dans 54% des cas et celles qui avaient un score < 4 sont toutes restées bénignes sur des périodes de surveillance allant de 6 mois à 18 ans.

Bien que le score PASS ne soit pas admis universellement, son utilisation systématique permet d'alerter le clinicien.

Il n'existe aucun marqueur pronostique actuellement applicable au diagnostic de malignité malgré de nombreuses études par immunohistochimie, polymérase chain reaction (PCR) ou microarrays (Chrisoulidou et al. 2007). L'index de prolifération Ki67 a montré un taux de corrélation avec la survenue de métastases de 50% lorsqu'il dépasse 2% (Strong et al. 2008, van der Harst et al. 2000) et 85% lorsqu'il dépasse 5% (August et al. 2004).

Traitement des formes métastatiques

En l'absence de traitement, le taux de survie à 5 ans des phéochromocytomes malins est $< 50\%$ mais de grandes variations existent avec des survies jusqu'à 30

ans. Les métastases atteignent surtout le foie, les os et le poumon (Eisenhofer et al. 2004, Adler et al. 2008).

Le traitement des phéochromocytomes malins est palliatif. Il vise à réduire la masse tumorale et l'hypersécrétion de catécholamines. Celle-ci inclut la résection chirurgicale de la tumeur primaire et des métastases. Des métastases hépatiques peuvent bénéficier de traitements par radiofréquence, cryoablation, ou embolisation artérielle. Le traitement radiométabolique par ^{131}I -mIBG induit une réduction tumorale dans 20-30% des cas et une amélioration des symptômes dans 50% des cas mais rarement une rémission complète. Il est d'autant plus efficace que la masse résiduelle est faible et est donc avantageusement couplé à la chirurgie de réduction. La chimiothérapie est peu efficace et utilise surtout l'association Cyclophosphamide, Vincristine et Dacarbazine. L'identification de nouvelles cibles moléculaires permettrait de mieux cibler le traitement.

Neuroblastome

Données générales

Le neuroblastome, le ganglioneuroblastome et le ganglioneurome sont des tumeurs du système nerveux sympathiques qui dérivent des sympathogonies primitives. Elles peuvent se développer partout où se trouve du tissu sympathique et on peut les observer dans le cou, le médiastin postérieur, la glande surrénale, le rétropéritoine et le pelvis. Ces trois tumeurs se manifestent principalement lors de la première enfance et diffèrent par leur degré de maturation cellulaire. Le ganglioneurome est la tumeur la plus bénigne; elle est composée de gangliocytes et de stroma mature. Le ganglioneuroblastome est composé de gangliocytes matures et de neuroblastes immatures. Cette tumeur a un potentiel malin intermédiaire. Le neuroblastome est la tumeur la plus immature et indifférenciée, et donc la plus maligne. Les neuroblastomes peuvent être de faible, intermédiaire ou haut risque. Les patients à risque faible et moyen ont généralement une maladie localisée et ont moins de 18 mois lors du diagnostic (Spix et al. 2006, Miller et al. 1995, Grovas et al. 1997, Shimada et al. 2001).

Diagnostic

La présentation la plus courante du neuroblastome est une masse abdominale, avec symptômes de compression associés, ou une douleur osseuse liée aux métastases ostéomédullaires. La distension abdominale avec insuffisance respiratoire due à des métastases hépatiques massives peut apparaître chez les nourrissons (Hiyama et al. 2000). Le diagnostic de neuroblastome nécessite l'implication des médecins qui sont familiers avec les tumeurs de l'enfant. Certains neuroblastomes ne peuvent pas être différenciés, par la microscopie optique conventionnelle, d'autres tumeurs à petites cellules rondes bleues de l'enfance. La différenciation neuronale sympathique peut être démontrée par l'immunohistochimie, la microscopie électronique ou en trouvant des niveaux élevés des catécholamines sériques ou des métabolites des catécholamines urinaires, tels que l'acide vanillylmandélique (VMA) ou de l'acide homovanillique (HVA) (Brodeur et al. 1993).

Pronostic

Environ 70 % des patients atteints d'un neuroblastome ont une maladie métastatique au moment du diagnostic. Le pronostic des patients atteints d'un neuroblastome est lié à leur âge au moment du diagnostic. Avant l'âge d'un an, le pronostic est excellent indépendamment du stade. Après un an, la survie à 5 ans ne dépasse pas 10 %, pour les tumeurs volumineuses ou métastasées, quel que soit le traitement (Adams et al. 1993, Brodeur et al. 1999, Matthay et al. 1999). D'autres variables pronostiques classiques comprennent le stade clinique de la maladie, le site de la tumeur primaire, l'histologie de la tumeur et, chez les patients âgés de 1 an, l'atteinte secondaire des ganglions lymphatiques locorégionaux (Adams et al. 1993, Evans et al. 1976, Hayes et al. 1983, Cotteryll et al. 2000). Les anomalies génétiques ont également un rôle dans le pronostic, permettant ainsi de définir le traitement optimal adapté au risque. En particulier : (1) une délétion du bras court du chromosome 1, présente dans 70 à 80 % des cas, traduit un comportement agressif ; (2) une amplification de l'oncogène N-myc est mise en évidence dans 25 % des neuroblastomes dont le nombre de copies augmente avec l'agressivité tumorale ; (3) le potentiel de différenciation tumorale

est influencé par le Facteur de Croissance Nerveuse et son récepteur de haute affinité Trk A. Les caractéristiques cliniques des neuroblastomes chez les adolescents sont similaires à celles constatées chez les enfants. Toutefois, la participation de la moelle osseuse est moins fréquente et il y a une plus grande fréquence des métastases pulmonaires ou cérébrales (Conte et al. 2006).

Régression spontanée

Ce phénomène a été bien décrit chez les nourrissons, en particulier dans ceux avec une maladie stade IV-S (Nickerson et al. 2000, Fritsch et al. 2004). La régression se produit plus fréquemment chez les enfants avec des tumeurs à configuration chromosomique triploïde, sans amplification du N-myc ni aucune perte du chromosome 1p. D'autres éléments associés à la régression spontanée sont décrits, comme le déficit d'expression de la télomérase, l'expression de Ha-ras et l'expression du récepteur de la neurotrophine TrkA (Reynolds et al. 2002, Ambros et al. 2000, Hiyama et al. 1995, Hiyama et al. 2000, Kitanaka et al. 2002).

Traitement

La chirurgie reste fondamentale, incluant une exérèse la plus complète possible qui dépendra de la taille tumorale, de son siège et des rapports avec les structures vasculaires et nerveuses de voisinage. Cette exérèse est parfois impossible ou non justifiée d'emblée (formes métastatiques) et sera donc précédée d'une chimiothérapie (ou radio-chimiothérapie) de réduction tumorale du fait de la très grande chimio-sensibilité des neuroblastomes. Les principaux intérêts de la chimiothérapie sont la réduction tumorale préopératoire et le traitement des métastases et des reliquats tumoraux (Orbach et al. 2013).

OBJECTIFS

Le champ d'application de ce travail est le domaine de la cancérologie surrenalienne, où il existe une difficulté dans la classification tumorale ainsi qu'une dissociation entre le diagnostic histopathologique et le devenir du patient.

Les objectifs de notre travail ont été :

1. de définir le métabolome de la glande surrénale normale (corticale et médullaire séparément), première étape indispensable avant d'aborder l'étude de la pathologie
2. de caractériser le profil métabolomique du neuroblastome, l'une des tumeurs solides extra-crâniennes les plus fréquentes, létal chez l'enfant. Cette tumeur se développe à partir des structures tissulaires constituant le système nerveux sympathique telles que la glande médullosurrénale ou les ganglions sympathiques paraspinaux. Son évolution clinique est très variable, allant de la régression spontanée à la maturation en lésions bénignes ou à l'évolution métastatique rapide et fatale. La relation entre le profil métabolomique tumoral et les données cliniques des patients a été étudiée afin d'identifier les patients ayant un mauvais pronostic
3. de caractériser le profil métabolomique des principales tumeurs de la médullosurrénale et de la corticosurrénale chez l'adulte. L'étude métabolomique globale de la pathologie tumorale a été utilisée afin d'obtenir des informations sur les voies métaboliques actives dans les différents tissus. Des biomarqueurs ont donc été identifiés et corrélés aux données cliniques, biologiques et génétiques du patient.

La littérature disponible concernant le sujet de cette thèse est extrêmement limitée; en conséquence, nos résultats se situent parmi les premières explorations par spectrométrie RMN HRMAS de la glande surrénale normale et de ses principales néoplasies primitives.

MATERIELS ET METHODES

1.1. PHASE PRE-ANALYTIQUE

Prélèvements, conservation et préparation des échantillons tissulaires

Etant donné que l'ensemble de notre travail est basé sur l'analyse expérimentale rétrospective de tissu congelé disponible en tumorothèque, le temps d'ischémie après le prélèvement chirurgical n'a pas pu être directement mesuré. Cependant, les chirurgiens impliqués dans ce projet de recherche ont été sensibilisés afin de réduire au maximum le temps d'ischémie post chirurgicale de la pièce opératoire. En effet, dans plusieurs cas, les échantillons tissulaires dédiés à l'étude métabolomique ont été congelés rapidement dans de l'azote liquide ou de la carboglace afin de garantir l'intégrité du tissu prélevé en réduisant à moins de 5 minutes l'intervalle ischémique. Quoi qu'il en soit, les échantillons tissulaires présentant les stigmates spectroscopiques d'une longue souffrance ischémique ont été détectés et exclus de la population à étudier.

Chaque échantillon à analyser est préparé en 3 à 5 minutes dans une salle dédiée du service d'anatomie pathologique où est installé le spectromètre. Le tissu congelé ainsi que le matériel nécessaire à la préparation sont placés dans un cryostat maintenu à -20°C afin de ralentir le plus possible le processus de décongélation de la pièce biologique. Le prélèvement du tissu à analyser sera fait à l'aide d'un emporte-pièce appelé «punch». L'échantillon tissulaire récupéré sera donc directement introduit, sans aucun traitement chimique préalable, dans un insert en Polychlorotrifluoroéthylène (PCTFE) de $30\mu\text{l}$. L'insert sera ensuite pesé afin de déterminer la masse du matériel biologique prélevé qui est généralement comprise entre 15 et 20 mg. La pesée de l'échantillon est indispensable pour le traitement des spectres (normalisation) et la quantification des métabolites. L'insert sera donc complété avec $12\mu\text{l}$ de D_2O pour disposer d'un signal d'asservissement en RMN dit «lock» et ensuite stocké à -80°C jusqu'au jour de l'analyse. Pour l'enregistrement RMN, l'insert est placé dans un rotor de 4 mm de diamètre externe composé de dioxyde de zirconium (ZrO_2) et est fermé par un bouchon hermétique avec ailettes permettant d'en assurer la rotation par flux d'air continu.

La **figure 12** illustre les étapes principales de la préparation d'un échantillon biologique pour analyse RMN HRMAS.

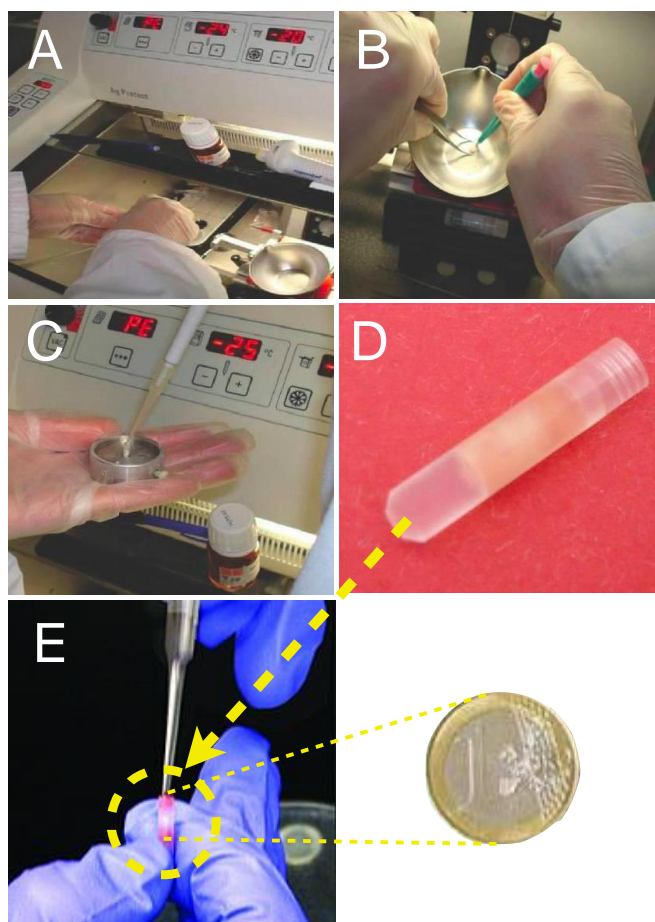


Figure 12. Préparation d'un échantillon biologique pour analyse RMN HRMAS. L'échantillon est récupéré du congélateur à -80°C et placé dans un cryostat (-20°C) (A). La biopsie est disséquée (B) et introduite dans un insert (C). Insert final (D-E). D'après Piotto et al. 2013, modifiée.

1.2. ANALYSE RMN HRMAS

Equipement et conditions expérimentales

Dans le cadre de ce travail de recherche, l'analyse métabolomique par RMN HRMAS a été réalisée à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance III à 500 MHz. Ce spectromètre est installé depuis 2008 dans le service d'anatomie pathologique de l'Hôpital Universitaire de Hautepierre à Strasbourg (**figure 2**). Cet équipement est fourni avec une sonde de 4 mm à double résonance (^{13}C , ^1H) avec un canal deutérium (^2H) utilisé comme signal de verrouillage «lock» nécessaire à

compenser la dérive du champ magnétique principal. Le spectromètre est équipé d'une unité de refroidissement (*Bruker Cooling Unit ; BCU*) nécessaire pour limiter la dégradation de l'échantillon biologique lors de l'analyse. De plus, un flux d'air asséché permet de maintenir la température de l'échantillon relativement constante. Lors de l'enregistrement du signal RMN, la vitesse de rotation de l'échantillon est fixée à 3502 Hz de manière à maintenir les bandes de rotation en dehors de la fenêtre spectrale RMN.

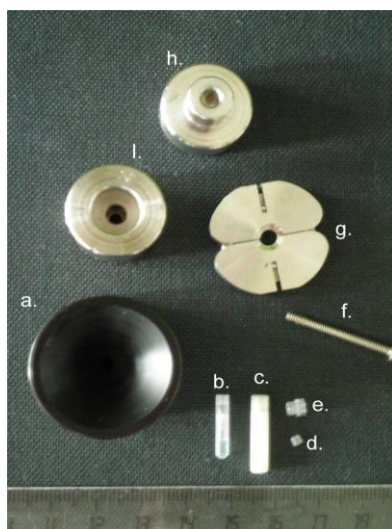


Figure 13. Equipement servant à la mise en place de l'échantillon, (a) dispositif pour la fermeture du rotor, (b) insert en PCTFE de 30 μ l, (c) rotor en ZrO₂ de 50 μ l, (d) bouchon d'insert en PCTFE, (e) bouchon à ailettes, (f) vis d'insertion et d'extraction de l'insert du rotor, (g) extracteur du bouchon, (h, i) guide pour l'introduction de l'insert et armature du rotor.

La vitesse de rotation entraîne une augmentation de la température intrinsèque de l'échantillon de 1°C/kHz, fixant la température réelle pendant l'enregistrement entre 3 et 4°C. Si l'augmentation de la vitesse de rotation de l'échantillon à 5 MHz ne semble pas entraîner de détérioration majeure du tissu (Cheng et al. 1998), la durée prolongée de l'acquisition est responsable d'une dégradation biologique de l'échantillon au cours du temps (Detour et al. 2011, Opstad et al. 2008). Ce phénomène peut se vérifier lors des expériences en 2 dimensions. C'est pour cela que les acquisitions 2D ont été utilisées dans le cadre de nos travaux, uniquement afin d'identifier les métabolites et non pour leur quantification.

La **figure 13** montre l'ensemble formé par le rotor, l'insert et le dispositif pour la

mise en place de l'échantillon.

Le dispositif général en termes d'équipement est représenté sur la **figure 14**.

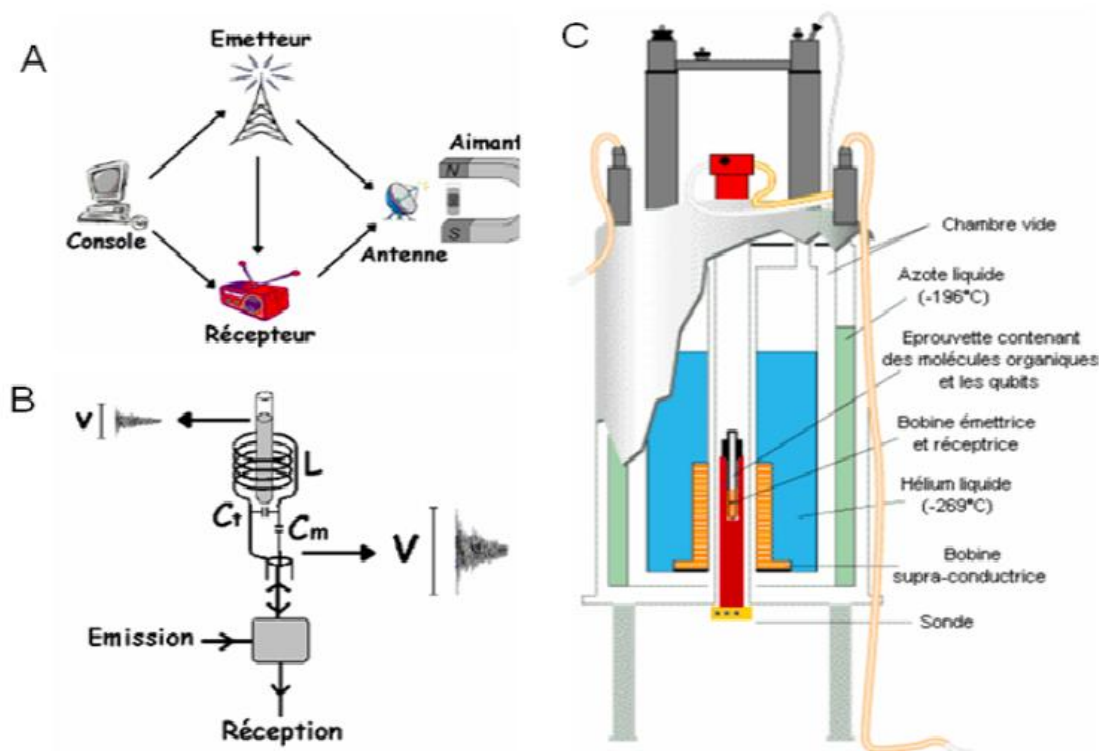


Figure 14. Dispositif général d'un spectromètre. **A.** Un spectromètre RMN est composé : d'un aimant qui génère le champ magnétique, d'une chaîne d'émission qui produit les impulsions RF, d'une bobine qui transmet ces impulsions à l'échantillon et recueille le signal, d'une chaîne de réception qui amplifie ce signal et d'un ordinateur qui gère l'ensemble (d'après S. AKOKA, Université de Nantes). **B.** L'antenne est chargée d'émettre les impulsions RF et de recevoir le signal RMN. C'est un circuit résonant qui transforme la tension v produite par l'échantillon en une tension beaucoup plus importante V ; C_t est la capacité d'un condensateur ajustable dont la valeur doit être réglée pour chaque échantillon pour que la fréquence d'accord coïncide avec la fréquence de Larmor (« tuning ») ; un condensateur variable C_m permet de réaliser l'adaptation d'impédance (« matching ») de la sonde (d'après S. AKOKA, Université de Nantes). **C.** Vue en coupe d'un spectromètre liquide (d'après E. QUIVET, Université de Marseille).

La sonde HRMAS est composée de deux parties: la connectique (**figure 15**) et la tête de mesure intégrant le stator et les antennes d'émission-réception (**figure 16**).



Figure 15. Partie connectique de la sonde HRMAS, (a) canal proton ^1H , (b) canal carbone ^{13}C , (c) canal deutérium ^2H , (d) réglage de l'angle magique, (e) réglage des antennes RF, (f) chauffage, (g) mesure de la température, (h) gradient (d'après M. Benhamed, Université de Strasbourg, 2012).

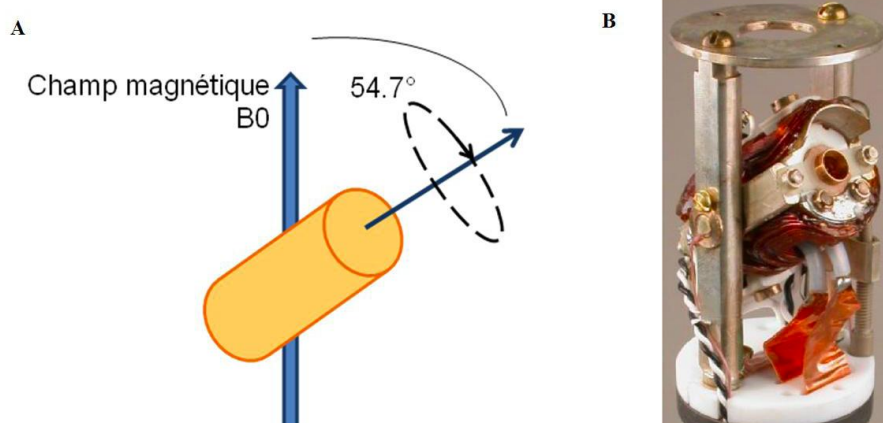


Figure 16. A. Représentation schématique du principe de la rotation à l'angle magique, B. Tête de mesure de la sonde RMN HRMAS pour rotor de 4mm, montrant une bobine à l'angle magique (d'après M. Benhamed, Université de Strasbourg, 2012).

Séquences d'impulsions utilisées

Séquences RMN 1D

Les séquences RMN les plus utilisées en vue d'une analyse systématique et quantitative des métabolites sont les séquences d'acquisition 1D ^1H dites « one-pulse ». Les spectres obtenus reflètent la composition des métabolites et leur abondance relative dans l'échantillon. La forte teneur en eau, caractéristique des systèmes biologiques, représente une source de difficulté dans l'étude du métabolome par techniques RMN. En effet, alors que les métabolites sont en concentrations micro-molaires, l'eau dans les tissus est présente à une concentration supérieure à 10 moles par litre. Réduire le signal de l'eau est donc équivalent à une augmentation de la sensibilité de détection des métabolites. Dans les expériences RMN HRMAS, la technique de présaturation est utilisée pour l'élimination du signal de l'eau. La plus simple des techniques de présaturation est la suppression (**figure 17**). Cette séquence permet d'obtenir une saturation efficace de la résonance de l'eau et une ligne de base relativement plate.

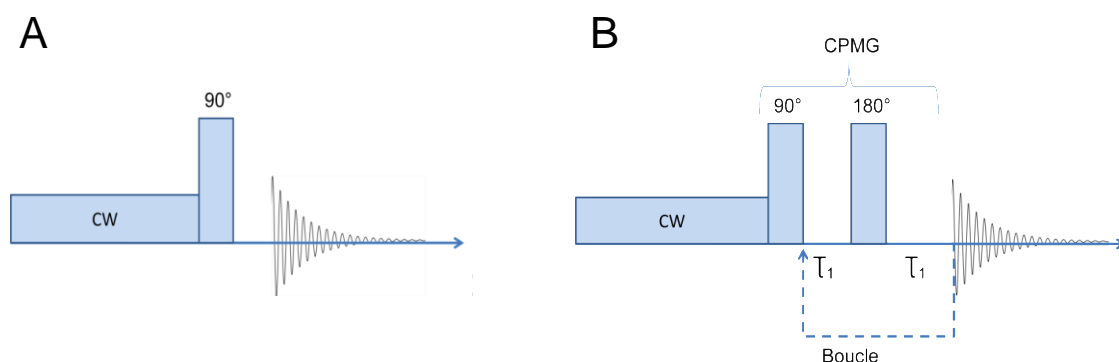


Figure 17. Présaturation de l'eau dans la séquence « one pulse » (A) et la séquence CPMG (B).

La séquence d'impulsion CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) a été appliquée à l'ensemble de nos échantillons (**figure 17**). Cette séquence permet une acquisition sélective des métabolites de faible poids moléculaire dotés d'une forte mobilité générant des signaux fins (**figure 18**). La séquence CPMG est largement utilisée en RMN HRMAS pour établir les profils métaboliques tissulaires. Toutefois, elle a l'inconvénient de ne pas être strictement quantitative.

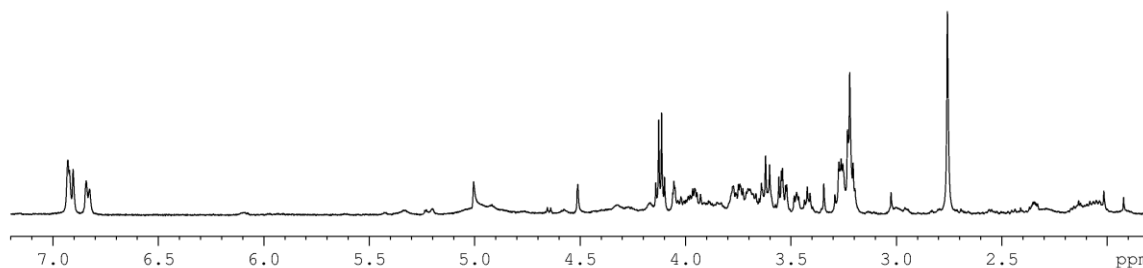


Figure 18. Spectre 1D ^1H CPMG HRMAS d'un phéochromocytome.

Le délai τ entre les impulsions à 180° a été synchronisé avec la rotation de l'échantillon et fixé à $285 \mu\text{s}$ ($\tau = 1 / \omega = 1 / 3502 = 285 \mu\text{s}$) afin d'éviter les pertes de signal dues à des inhomogénéités du champ de radio fréquence B1 (Elbayed et al. 2005; Piotto et al. 2001).

Il est ainsi possible d'utiliser ce délai inter-impulsion et de le faire varier en fonction des signaux larges à éliminer, la séquence CPMG devient alors un outil intéressant comme filtre macromoléculaire. Plus le délai est long et plus le filtre est puissant pour éliminer les signaux des molécules les plus grosses. Le nombre d'impulsions à 180° est fixé à 328 donnant à la séquence d'impulsions CPMG une durée totale (TE, Time Echo) de 93 ms. Cette valeur de τ choisie ainsi que le nombre des boucles (328), convient aux types d'échantillons analysés dans cette thèse.

Pour chaque expérience CPMG, les paramètres suivants ont été utilisés: largeur de balayage, 14,2 ppm; nombre de points: 32k; délai de relaxation: 2 s; temps d'acquisition: 2,3 s. Un total de 128 FID (free induction decay) est acquis correspondant à un temps d'acquisition pour chaque spectre de 10 min. Les déplacements chimiques des spectres sont référencés par rapport à celui du lactate dont le déplacement chimique est à 1,33 ppm.

L'attribution des métabolites sur les spectres CPMG est faite à partir des valeurs de déplacement chimique (ppm) disponibles en littérature (Martinez-Bisbal et al. 2004, Wishart et al. 2007). En général, parmi une trentaine de métabolites détectés, la grande majorité d'entre eux sont communs à plusieurs organes. Cependant, on a pu mettre en évidence pour la glande médullosurrénale l'existence de certaines signatures spécifiques d'organes, notamment l'adrénaline, la noradrénaline et certains de leurs précurseurs synthétiques (**tableau 1**).

Numbers	Metabolite	Group	¹ H chemical shift (p.p.m.)	Numbers	Metabolite	Group	¹ H chemical shift (p.p.m.)
1	Isoleucine	δCH ₃	0.94	19	N-acetyl aspartate (NAA)	CH ₃	2.04
		γCH ₃	1.01			αCH	4.37
		γCH ₂	1.51			CH ₂ -CONH	2.54
2	Valine	αCH	3.65	20	Glutathione	CH ₂ -SH	2.95
		γCH ₃	0.98			CH-NH ₂	3.78
		γ'CH ₃	1.04			CH ₃	1.92
3	Lactate	βCH	2.30	21	Acetate	3CH ₂	1.90
		CH ₃	1.33			4CH ₂	2.28
4	Lysine	CH	4.12	22	γ-Aminobutyric acid (GABA)	2CH ₂	3.01
		γCH ₂	1.43			23	Noradrenaline
5	Alanine	δCH ₂	1.71	24	Ethanolamine		
		βCH ₂	1.89			C6H	6.93
		εCH ₂	3.01			-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.13
6	Glutamate	βCH ₃	1.48	25a	Fatty acids (a)	CH ₂ OH	3.82
		αCH	3.78			CH ₃	0.90
		βCH ₂	2.05			(2)CH ₂	1.29
7	Glutamine	γCH ₂	2.34	25b	Fatty acids (b)	(1)CH ₂	1.31
		αCH	3.76			(2)CH ₂	2.03
		βCH ₂	2.14			CH ₂	2.80
8	Aspartic acid	γCH ₂	2.44	25a,b	Fatty acids (a) and (b)	(2)CH	5.33
		αCH ₂	3.77			(1)CH	5.33
		βCH ₂ (u)	2.70			(n)CH ₂	1.29
9a	Choline	βCH ₂ (d)	2.80	25c	Fatty acids (c)	(2)CH ₂	1.60
		αCH	3.90				
		-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.21				
9b	Phosphorylcholine	βCH ₂	3.52				
		αCH	4.06				
		-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.22				
9c	Glycerophosphocholine	βCH ₂	3.60				
		αCH	4.16				
		-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.23				
10	Taurine	αCH ₂	4.32				
		βCH ₂	3.69				
		CH ₂ -HPO ₄ (d)	3.88				
		CH ₂ OH	3.91				
		CH ₂ -HPO ₄ (u)	3.95				
		-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.26				
11	scyllo-Inositol	-CH ₂ -SO ₃ ⁻	3.42				
		All Hs	3.35				
12	myo-Inositol	C5H	3.27				
		C1H, C3H	3.54				
		C4H, C6H	3.61				
		C2H	4.06				
13	Glycine	αCH	3.56				
		C4H	3.43				
14	β-Glucose	C3H, C5H	3.47				
		C6H(u)	3.75				
		C6H(d)	3.89				
		C1H	4.65				
		CH ₃	3.03				
15	Creatine	CH ₂	3.93				
		-CHOH-	4.02				
16	Ascorbic acid	C4H	4.52				
		(α,β CH ₂)	2.40				
17	Succinic acid	CH ₃ -NH	2.75				
		C4H	6.84				
18	Adrenaline	C3H	6.92				
		C4H	6.84				
		C6H	6.93				

Spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 p.p.m. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature (Martinez-Bisbal *et al.* 2004, Wishart *et al.* 2007).

Tableau 1. Liste de principaux métabolites détectés et quantifiés à partir de spectres RMN HRMAS 1D CPMG obtenus en analysant des échantillons solides de la glande surrénale et ses principales formes tumorales (d'après Imperiale *et al.* 2013, ANNEXE 2).

Séquence RMN 2D

Les acquisitions RMN à deux dimensions (Aue et al. 1976) ont été utilisées pour faciliter l'attribution de signaux de métabolites difficilement identifiés sur les spectres 1D, dans la plupart des cas en raison des phénomènes de recouvrement. Les séquences d'impulsions 2D utilisées en HRMAS sont les mêmes que celles réalisées en RMN du liquide. Dans le cadre de cette thèse, on a utilisé une séquence 2D de corrélations hétéro nucléaires (^1H - ^{13}C) HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) développée au début des années 1980. La séquence HSQC ^1H - ^{13}C permet la détection des corrélations entre ^{13}C et ^1H par l'utilisation du mécanisme de transfert par simple ou multi quanta. Cette séquence d'impulsions utilise des gradients pulsés afin de sélectionner les cohérences et d'améliorer la sensibilité de la technique (**figure 19**).



Figure 19. Séquence HSQC classique. La valeur de τ est égale à $1/4 J^{1\text{H}}-^{13}\text{C}$

On obtient donc un spectre bidimensionnel (**figure 20**) dont les axes correspondent aux signaux RMN du proton et du ^{13}C . Chaque tache représentée dans la cartographie 2D HSQS correspond au couplage scalaire entre ^{13}C et ^1H . L'attribution des métabolites sur la cartographie 2D est faite à partir des valeurs de déplacement chimique (ppm) publiées dans la littérature (Martinez-Bisbal et al. 2004, Wishart et al. 2007).

Dans notre expérience, les spectres hétéronucléaires HSQC ont été réalisés pour un temps total d'acquisition de 15 h 22 min avec les caractéristiques suivantes: durée d'acquisition: 0,073s (^1H) / 0,006s (^{13}C); 136 scans; fenêtre spectrale: 7002 Hz (^1H) / 20833 Hz (^{13}C) et durée de relaxation: 1,5 s.

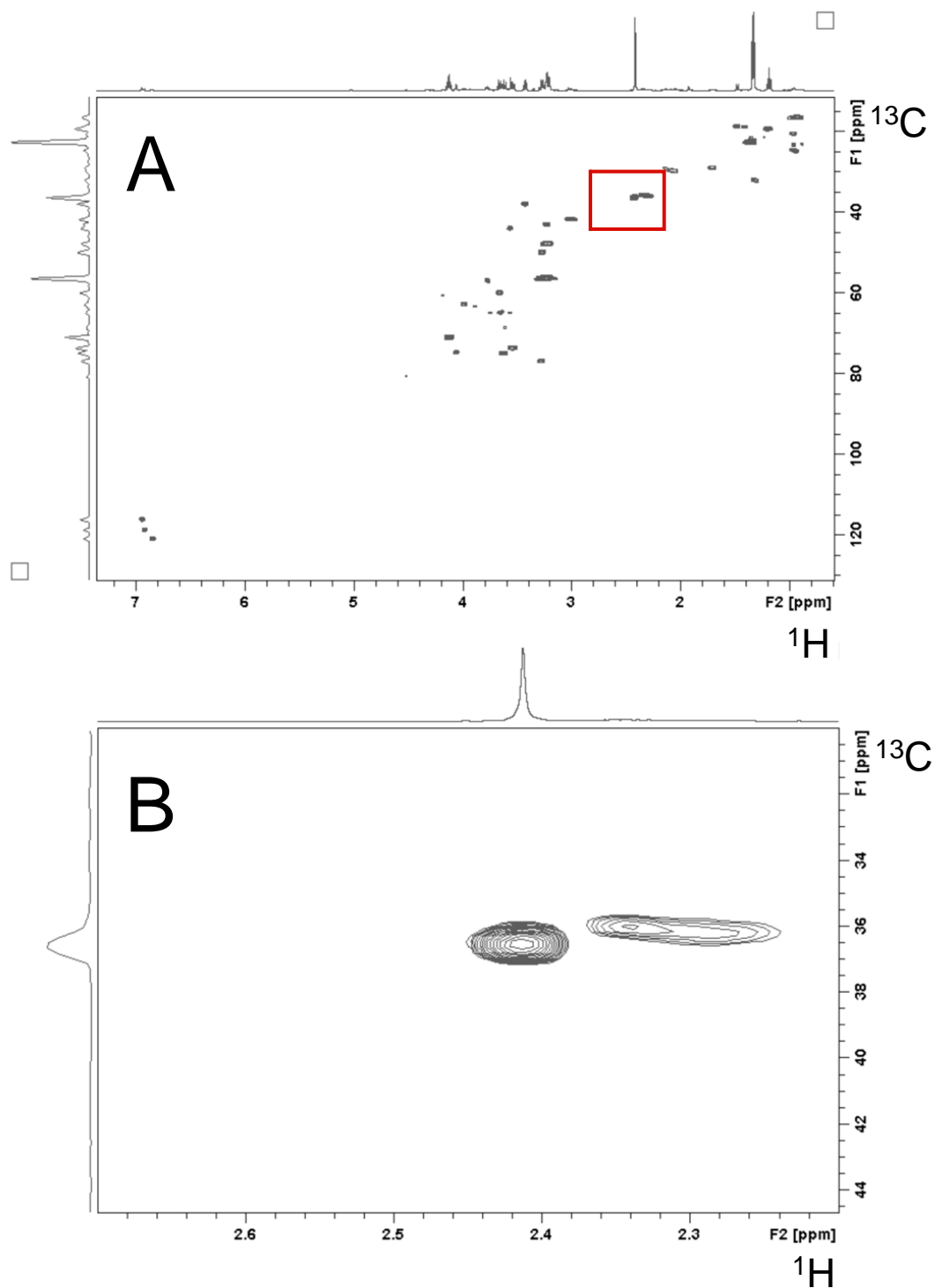


Figure 20. Exemple typique d'un spectre 2D ^1H - ^{13}C HSQC obtenu à partir d'un échantillon de paragangliome abdominal associé à une mutation SDHB et une accumulation de succinate (rectangle rouge). **A.** Spectre global. **B.** Agrandissement sur le succinate.

Prétraitement des spectres

Avant d'effectuer l'identification des métabolites et leur quantification il est nécessaire de procéder à un traitement préalable des spectres 1D. Les différentes étapes comportent :

- le prétraitement : incluant une correction de phase, une correction de la ligne de base et une correction du décalage de la fréquence par rapport au signal du méthyle du lactate (1,33 ppm). Nous ne recommandons pas l'utilisation du TSP (Trimethyl-Silyl-Propionic acid) car celui-ci peut se lier à différentes protéines contenues dans l'échantillon rendant ainsi son déplacement chimique échantillon dépendant.
- la normalisation : dans le cadre de cette thèse, la normalisation des spectres a été effectuée en ramenant la masse de l'échantillon pesé à une masse de référence fixée à 1kg.
- la calibration : elle est effectuée par rapport à une référence externe. Nous avons utilisé une solution avec une concentration connue de lactate (19,3 nmol) qui a été analysée dans les mêmes conditions utilisées pour l'analyse des échantillons biologiques. Le logiciel MatLab R2010 (MathWorks®, France) a été employé dans les étapes de normalisation et calibration des spectres. D'autres laboratoires ont recours à des signaux d'origine non chimique. A ce propos, la méthode ERETIC (Electronic REference To access In-vivo Concentrations) utilise comme référence un signal électronique dans la gamme de radio fréquence durant la période d'acquisition (Barantin et al. 1997). Cette méthode séduisante entraîne en revanche des distortions de la ligne de base (Piotto et al. 2009). Nous ne l'avons, d'ailleurs, plus utilisée dans cette thèse.
- la segmentation (ou « bucketing » ou « binning ») : les régions spectrales d'intérêt sont définies en fonction des objectifs de l'étude. Nous avons retenu les régions du spectre comprises entre 0,5 ppm et 8 ppm excluant le signal de l'eau (5 ppm) pour les analyses statistiques. Cette étape consiste à échantillonner les spectres en n régions qui représenteront autant de variables dans les analyses statistiques multivariées. Cette approche permet ainsi de réduire la dimensionnalité des signaux par « discrétisation » du spectre. Nous avons choisi un intervalle d'échantillonnage de 0,01 ppm qui nous semble être un bon compromis entre le nombre de variables et la préservation de la

résolution de signaux. Nous avons également appliqué une technique de segmentation spectrale par métabolites ou « binning adaptatif » (de Meyer et al. 2008). Ainsi seuls les signaux de certains métabolites sont retenus sur les spectres acquis pour l'analyse statistique (**figure 21**).

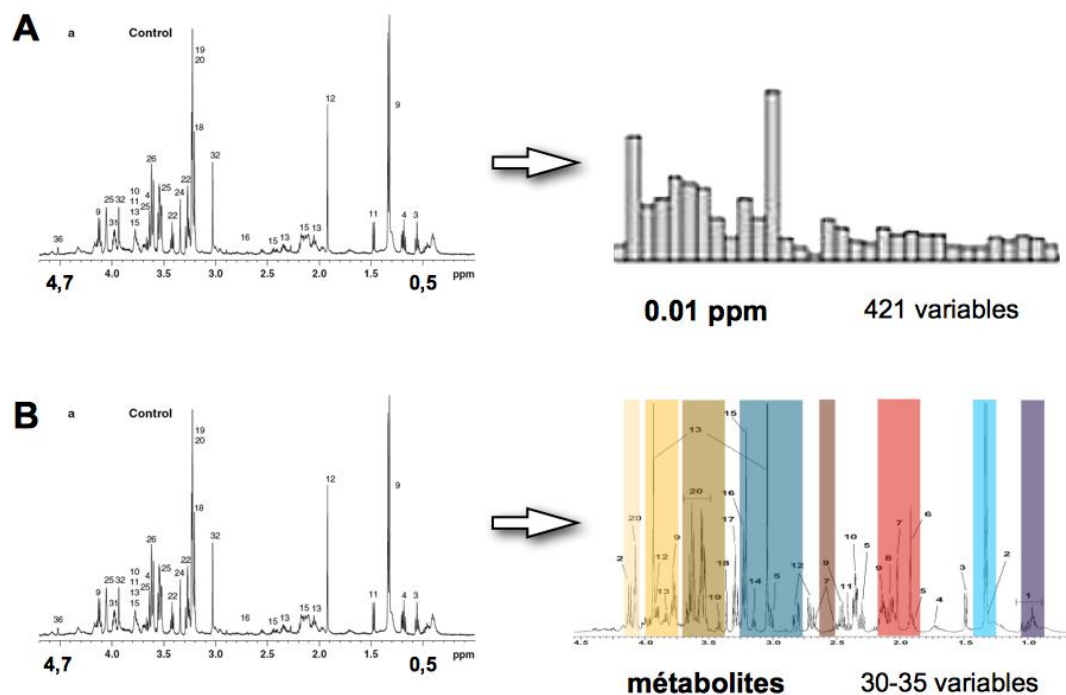


Figure 21. Scéma récapitulatif des procédures de segmentation spectrale ou bucketing ou binning. **A.** Segmentation typique (0,01 ppm). **B.** Binning adaptatif. Les rectangles de couleur représentent schématiquement différents métabolites.

Quantification des métabolites

Différentes méthodes sont utilisées afin d'estimer ou de mesurer la concentration des signaux RMN. La méthode la plus simple est de comparer la hauteur ou l'aire d'un signal par rapport à un signal de référence (externe) dont la concentration molaire est connue. Comme référence nous avons utilisé un insert contenant 1,93 μmol de lactate. L'aire totale pour chaque groupement du métabolite à quantifier prend en compte une normalisation par rapport à la masse de l'échantillon et au nombre de proton du groupement considéré. Pour cette étape on utilise un algorithme développé en interne en utilisant le logiciel MatLab R2010

(MathWorks®, France). Sur notre spectromètre (500 MHz), avec la sequence CPMG, la sensibilité de détection est d'environ 0,1 nmol/mg.

Il existe d'autres méthodes de quantification plus sophistiquées (VARPRO, AMARES) (van der Veen et al. 1988, Vanhamme et al. 1997) Celles-ci ont l'avantage de prendre en compte dans le processus de quantification l'ensemble des groupement du métabolite. De plus, elles peuvent inclure des spectres types, notamment pour les macromolécules et les lipides, permettant d'éviter une surestimation quantitative de certains métabolites. L'utilisation pratique de ces deux méthodes ne peut se faire que par le biais du logiciel jMRUI (Naressi et al. 2001). Malheureusement, ce dernier présente une restriction importante concernant la taille des données à traiter, le rendant en pratique difficilement utilisable.

LCModel (Provencher et al. 1993) et QUEST (Ratiney et al. 2005) sont deux algorithmes de quantification automatique et utilisateur-indépendant. Ils sont basés sur la même approche théorique qui consiste dans l'utilisation d'une série de spectres correspondant à différents métabolites connus qui seront utilisés pour la reconnaissance des signaux expérimentaux, avec la possibilité d'optimiser l'amplitude et le décalage en fréquence (ppm) au cours de l'algorithme pour obtenir un ajustement idéal. Une limitation importante reste l'impossibilité d'ajuster le shift pH-dépendant des différents pics spectraux du même métabolite. Un autre facteur limitant pour une utilisation extensive de QUEST reste la nécessité de passer par le logiciel jMRUI, avec la restriction de la taille de données analysables précédemment mentionnée.

Quantification des catécholamines : dopamine, noradrénaline et adrénaline

Dans ce travail de thèse, l'étude quantitative des catécholamines a été effectuée à partir des échantillons de tissu surrénal sain et pathologique de l'adulte.

Compte tenu de l'absence des triplets à 2,85 ppm et à 3,22 ppm caractéristiques de la dopamine, on a considéré cette dernière comme absente ou non détectable.

Afin de quantifier le contenu en adrénaline et noradrénaline à partir des échantillons examinés, deux régions du spectre ont été plus spécifiquement considérées (**figure 22**):

- la première, centrée à 2,75 ppm siège du pic spectral lié au radical N-méthyl

- (CH₃) spécifique de l'adrénaline,
- la deuxième, comprise environ entre 6,85 et 6,98 ppm, siège du complexe spectral correspondant au groupe 3,4-dihydroxybenzène qui est commun à la noradrénaline et à l'adrénaline. Plus précisément, seule la partie du spectre correspondant au proton en position 5 (nomenclature IUPAC) du noyau benzénique (6,85-6,98 ppm) à été considéré pour la quantification. En conséquence, l'intégrale de la région comprise entre 6,85 et 6,98 ppm représentera la quantité globale d'adrénaline et de noradrénaline. Il est donc intuitif que la quantité de noradrénaline sera obtenue par simple différence entre l'intégrale de la région correspondante au groupe 3,4-dihydroxybenzène et celle du radical N-méthyl.

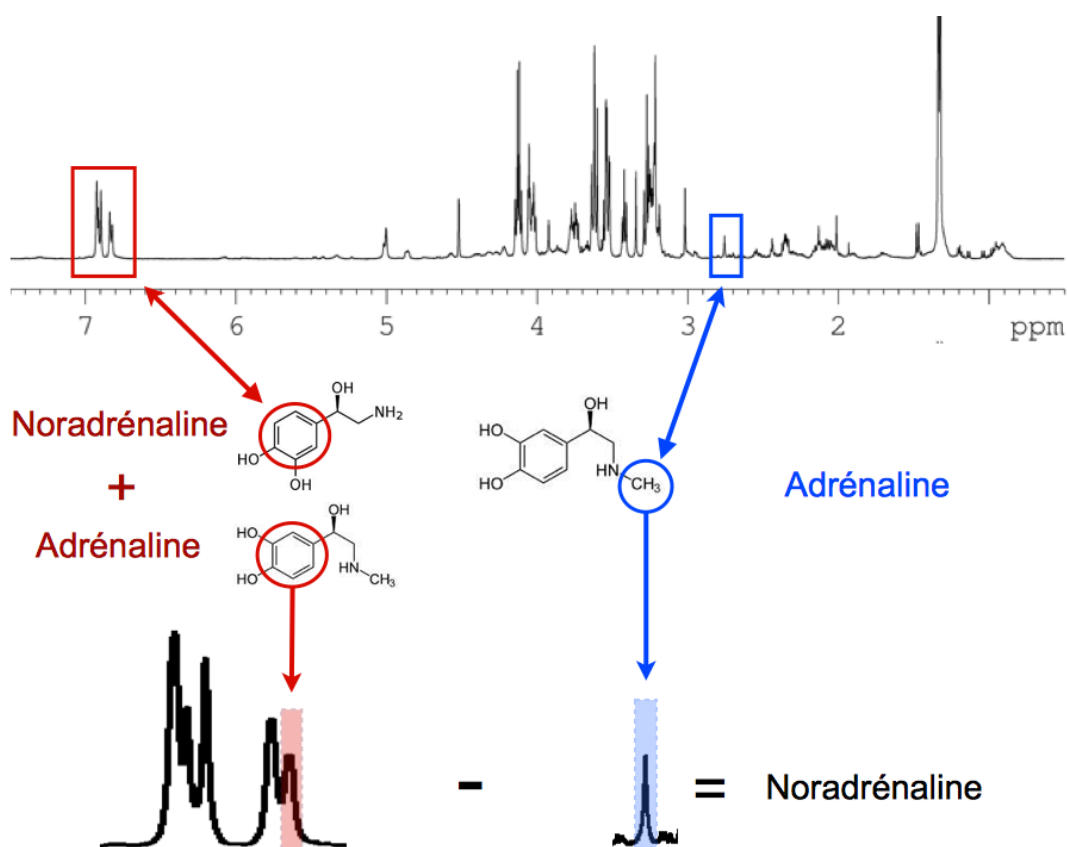


Figure 22. Représentation schématique du processus de quantification de l'adrénaline et de la noradrénaline à partir des échantillons de tissu surrénal sain et pathologique de l'adulte.

Cette méthode a été préalablement testée et confirmée par une étape préliminaire *in vitro* en analysant par RMN des solutions standard d'adrénaline et de noradrénaline à des concentrations respectivement de 5,46 and 5,90 mmol/l, séparément et, ensuite, mélangées (1/1, v/v) (**figure 23**).

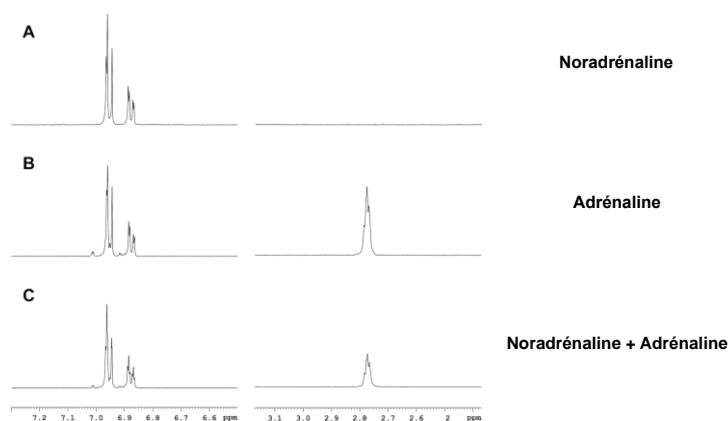


Figure 23. Spectres 1D ^1H CPMG HRMAS représentatifs des trois solutions différentes de catécholamines : (A) adrénaline (5,46 mmol/l), (B) noradrénaline (5,90 mmol/l), et (C) mélange (1/1, v/v) d'adrénaline (2,23 mmol/l) et noradrénaline (2,95 mmol/l).

Pour chaque solution, 6 inserts ont été préparés et analysés par NMR, pour un total de 18 mesures. Les résultats de la quantification des catécholamines obtenus à partir du proton en position 5 du noyau benzénique, et du groupement méthyl de l'adrénaline, montrent la fiabilité de la technique et la reproductibilité des mesures (**tableau 2**).

Experimental Solution	Physical concentration (mmol/L)	HRMAS NMR quantification results (mmol/L)		
		Adrenaline (using CH_3 group)	Adrenaline (using CH group)	Noradrenaline (using CH group)
Adrenaline solution	5.46	5.24 ± 0.12	5.1 ± 0.11	
Noradrenaline solution	5.90			5.80 ± 0.04
Mixed solution:				
- Adrenaline	2.73	2.55 ± 0.11		
- Noradrenaline	2.95			2.64 ± 0.11*

* In mixed solution the noradrenaline concentration was obtained by subtracting the adrenaline (CH_3 group) from the adrenaline measured plus the quantity of noradrenaline (CH group).

Tableau 2. Résultats de la quantification des catécholamines par RMN HRMAS à partir de solutions standard d'adrénaline seule, de noradrénaline seule et d'un mélange d'adrénaline et noradrénaline (1/1, v/v). Les valeurs sont exprimées en moyenne et écart type.

Analyse statistique

On rappelle que l'analyse statistique des données spectrales est toujours précédée par l'étape de « binning » de la région spectrale d'intérêt de chaque spectre CPMG en régions de 0,01 ppm de largeur (la valeur est ajustée afin de minimiser les effets de déplacement des pics dus aux variations de pH) ou de « binning adaptatif ». L'intégrale du pic au sein de chaque région est numérisée et normalisée par rapport à l'intégrale de toute la région spectrale considérée. Cette étape génère une matrice de données X qui seront prétraitées afin de donner un poids statistique équivalent aux métabolites présents en quantité variable.

Si la technique de binning en régions de 0,01 est simple à mettre en place et suffisamment robuste, établir des liaisons entre les résultats de l'analyse multivariée et des métabolites spécifiques peut se révéler peu aisé et chronophage. Quantifier les métabolites d'intérêt afin d'utiliser ces valeurs dans des procédures statistiques univariées représente une façon plus intuitive et complémentaire des analyses multivariées réalisées en première intention. Cette modalité permettrait de mettre en évidence les métabolites significativement différents entre les groupes examinés et donc vraisemblablement à la base de la classification phénotypique des échantillons analysés.

Dans ce travail, les deux approches statistiques ont été utilisées avec des objectifs complémentaires. Les spectres entiers ont été soumis aux méthodes multivariées sans *a priori* (analyse par composante principale ou principal component analysis, PCA) et, successivement, avec *a priori* (analyse discriminante partielle des moindres carrés ou partial least-squares discriminant analysis, PLS-DA). L'association PCA et PLS-DA a été souvent utilisée dans nos études, toujours à l'aide du logiciel SIMCA P (Umetrics AB, Umea, Suède). Nous avons également quantifié un certain nombre de métabolites caractérisés par des signaux suffisamment isolés (sans recouvrement majeur). Les valeurs quantitatives ont été ainsi utilisés dans des procédures statistiques univariées non paramétriques, tel que le test de Mann-Whitney U en utilisant le logiciel STATISTICA version 7 (STATSOFT; www.statsoft.com).

Analyse par composante principale (PCA)

La PCA est une méthode d'analyse statistique descriptive non supervisée et présentée pour la première fois en 1933 par Hotelling. La PCA est une méthode statistique pour l'exploration de données multi - variables, notamment dans le domaine de la transcriptomique ou, plus généralement, du traitement du signal. La PCA est la méthode de base qui sert de fondement théorique aux autres méthodes de statistique factorielle. L'objectif de cette méthode est de réduire la dimension de l'espace des données en déformant le moins possible la réalité. Elle permet de mettre en évidence les corrélations existantes entre N variables aléatoires parmi une population de K individus en recherchant les directions (composantes principales) de l'espace qui contiennent la plus grande quantité d'informations et donc de variance. Cette méthode permet de détecter les variables les plus significatives et de représenter les individus et les variables selon les composantes principales selon deux modalités graphiques : le loading plot, où chaque point représente la projection d'une variable dans un plan défini par les composantes principales, et le score plot où chaque point représente la projection d'un individu dans un plan défini par les composantes principales.

Dans notre travail, l'analyse PCA a été utilisée pour repérer des groupes d'individus dont l'ensemble des variables est homogène et de visualiser les différences de variables entre les individus. Elle a permis également d'évaluer rapidement la qualité des données et d'identifier des échantillons aberrants (outliers) correspondant souvent à des spectres mal résolus ou contenant des signaux anormalement élevés en raison de la présence en grande quantité de contaminants (Ebbels et al. 2007) et qui seront donc exclus de la population étudiée.

Analyse discriminante partielle des moindres carrés (PLS-DA)

Les études typiques de métabolomique comportent en principe deux groupes, souvent appelés pathologique et contrôle, et sont menées de manière exploratoire ou prédictive (Broadhurst et al. 2006). Une étude exploratrice est réalisée pour voir si les données spécifiques contiennent suffisamment d'informations pour

établir une distinction entre les deux groupes. Cette approche est généralement suivie par la création d'un modèle capable de prédire, pour un échantillon donné, l'appartenance à un groupe pathologique ou contrôle.

Le profil métabolique en fonction de la classification tumorale est l'une des premières approches de la métabolomique s'intégrant dans la récente recherche translationnelle. La grande problématique de l'analyse métabolomique est le déséquilibre entre le nombre d'échantillons et le nombre de variables (421 pour l'analyse du spectre entre 0,5 et 4,7 ppm). Pour cette raison, les statistiques multivariées supervisées prennent une grande importance. La PLS-DA est l'une des méthodes d'analyse des données largement utilisée (Barker et al. 2003). Les techniques PLS ont été proposées au cours des années 1980 (Wold et al. 1983); elles se sont montrées ensuite bien adaptées pour les études métabolomiques (Wold et al. 1991). La PLS est une méthode d'analyse supervisée qui prend en considération l'appartenance de classe. Elle est spécifiquement construite pour étudier les relations entre un ensemble de variables réponses Y et un ensemble de variables explicatives X lorsque la multi - colinéarité est forte ou le nombre de variables explicatives et/ou réponses est élevé par rapport au nombre d'échantillons étudiés. La régression PLS effectue une analyse en composantes principales pour chaque ensemble de variables X et Y , sous la contrainte d'une forte corrélation entre les composantes de X et celles de Y . Cette méthode est rapide, efficace et optimale pour un critère de minimisation des covariances bien maîtrisé. Malgré les multiples avantages de la PLS-DA, les résultats obtenus par celle-ci doivent être considérées avec précaution, notamment en raison du risque de surajustement (overfitting) : ceci peut facilement conduire à des classifications qui ne reflètent pas la réalité et, donc, à des modèles qui donnent une séparation des échantillons exclusivement liée au hasard. L'étape de validation des résultats doit être donc effectuée (Brereton et al. 2006, Harrington et al. 2006, Rubingh et al. 2006). Broadhurst et al. (2006) résume bien les principaux problèmes existants dans l'analyse de données multivariées, en alléguant la taille de la population étudiée. Un critère satisfaisant de taille de l'échantillon reste cependant difficile à définir. La méthode de validation croisée est généralement utilisée pour valider une classification avec un faible nombre d'échantillons disponible. Il est fondamental que les éléments à prédire ne soient en aucun cas utilisés dans le

développement du modèle lui même (Anderssen et al. 2006, Brereton et al. 2006, Broadhurst et al. 2006).

L'analyse discriminante partielle orthogonale des moindres carrés ou orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) est une variante très employée de PLS-DA où la première composante orthogonale à la variable dépendante est exclue (Trygg et al. 2002). L'OPLS-DA facilite en ce sens l'interprétation de la PLS-DA en incluant toutes les informations de classification en une seule composante. La puissance de la prédiction des deux modèles est généralement la même (Trygg et al. 2002).

De nombreuses possibilités existent pour évaluer la qualité d'un modèle de classification comme par exemple définir le nombre de faux positifs et négatifs, vrais positifs et négatifs. Cette approche permet de définir les valeurs de sensibilité (nombre de vrais positifs trouvés parmi tous les positifs) et de spécificité (nombre de vrais négatifs trouvés parmi tous les négatifs) du modèle en question.

La **figure 24** résume les différentes étapes de l'analyse métabolomique.

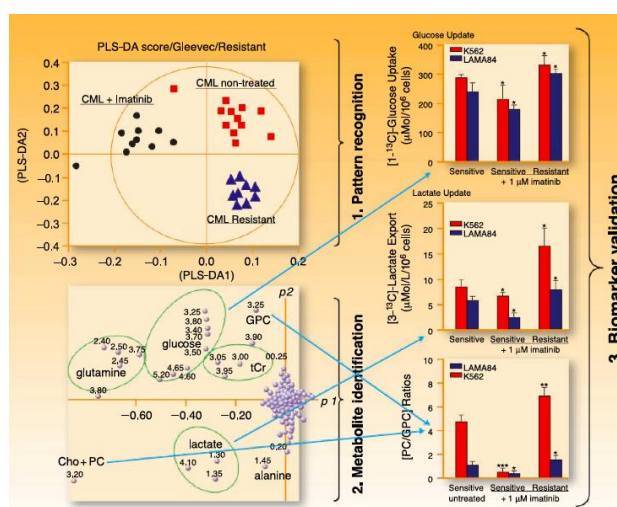


Figure 24. Représentation schématique des 3 principales étapes du processus d'analyse métabolomique : (1) Identification du profil métabolique à partir des spectres des échantillons tissulaires, (2) attribution des métabolites aux signaux spectraux, (3) quantification des métabolites et validation du modèle (figure issue de Spratlin et al. 2009).

Le protocole analytique rapporté dans la section Matériels et Méthodes a fait l'objet d'un chapitre d'un ouvrage récemment publié par notre équipe (Piotto et al. 2013, annexe 4).

RESULTATS et DISCUSSION

Les résultats des études menées ont été publiés sous forme de trois articles dans des journaux de référence internationaux à comité de lecture, notamment en oncopédiatrie, en onco-endocrinologie et en recherche translationnelle. Ces derniers seront brièvement rapportés dans ce chapitre. Nous invitons le lecteur à se reporter à la section ANNEXES pour consulter les publications dans leur intégralité.

Profil métabolomique du neuroblastome pédiatrique (annexe 1)

Le neuroblastome est l'une des tumeurs solides extra crâniennes les plus fréquentes et les plus létales chez le jeune enfant. Cette tumeur se développe à partir des structures tissulaires constituant le système nerveux sympathique telles que la glande médullosurrénale ou les ganglions sympathiques paraspinaux.

Son évolution clinique est très variable, allant de la régression spontanée asymptomatique à l'évolution en lésions bénignes ou au développement métastatique rapide et fatal. Le pronostic des patients dépend de différents paramètres cliniques, comme le stade de la maladie et l'âge du patient au diagnostic, et biologiques. Des facteurs pronostiques génétiques et épigénétiques ont été proposés et évalués tels que l'amplification de l'oncogène NMYC, la ploïdie cellulaire tumoral ou, la perte d'hétérozygotie au niveau du chromosome 11q ou 1p dans la tumeur.

L'imagerie médicale joue un rôle important dans la prise en charge des patients atteints de neuroblastome permettant d'évaluer l'envahissement tumoral et de sélectionner les patients répondeurs ou non à la chimiothérapie.

La Spectroscopie RMN in vivo peut fournir des informations sur les voies métaboliques impliquées dans la progression tumorale mais sa faible résolution spectrale empêche une caractérisation métabolique complète des tumeurs. La Spectroscopie RMN HRMAS, plus sensible, a été récemment utilisée afin de caractériser le profil métabolique global de lignées cellulaires de neuroblastome et pour étudier l'effet sur le profil métabolique tumoral de l'amplification de l'oncogène NMYC. Le profil métabolique de la médullosurrénale saine n'a en revanche pas été encore évalué par RMN HRMAS.

Lors de ce premier travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation par spectroscopie RMN HRMAS du contenu métabolique d'échantillons de neuroblastome prélevés chez douze enfants. Le **tableau 1** résume les caractéristiques cliniques de la population étudiée.

Pt no.	Sex (M/F)	Age at diagnosis (months)	Disease stage (I-IV)	Primary tumor localization (HN/TH/AP)	Primary tumor origin (Adr/ExAdr)	Tumor differentiation	MKI (1-3)	MYCN (Am/NAm)	Survival status (CR/R/D)	Follow-up (years)
1	M	38	IV	AP	Adr	Undifferentiated	1	NAm	MR	3
2	M	36	IV	AP	Adr	Poorly diff.	1	NAm	D	2
3	F	23	IV	AP	Adr	Poorly diff.	1	Am	D	1.5
4	M	18	I	TH	ExAdr	Poorly diff.	1	NAm	CR	13
5	F	18	I	AP	Adr	Poorly diff.	2	NAm	CR	10
6	M	0.3	I	AP	ExAdr	Undifferentiated	1	NAm	CR	12
7	F	3	I	AP	Adr	Poorly diff.	2	NAm	CR	11
8	M	182	IV	AP	ExAdr	Poorly diff.	1	NAm	D	4
9	M	8	I	AP	Adr	Poorly diff.	1	NAm	CR	9
10	M	4	I	HN	ExAdr	Poorly diff.	1	NAm	CR	8
11	M	0.5	I	AP	ExAdr	Undifferentiated	1	NAm	CR	8
12	M	13	IIA	AP	Adr	Poorly diff.	2	NAm	CR	4

Pt, patient; HN, head-neck; TH, thorax; AP, abdomino-pelvis; Adr, adrenal; ExAdr, extra adrenal; diff., differentiated; MKI, mitosis-karyorrhexis index; MKI 1, low; MKI 2, intermediate; MKI 3, high; Am, amplified; NAm, not amplified; CR, complete remission; MR, major relapse; D, death.

Tableau 1. Caractéristiques cliniques et pathologiques de la population étudiée.

Le profil métabolique global du neuroblastome a été tout d'abord comparé à celui de la médullosurrénale normale et, dans un deuxième temps, la relation entre le phénotype métabolomique et des facteurs pronostiques bien établis (i.e. âge de l'enfant lors du diagnostic et stade tumoral) a été étudiée. Enfin, l'évolution clinique des patients a été corrélée au profil métabolomique obtenu afin d'identifier des biomarqueurs de mauvais pronostic.

Tous les échantillons tissulaires considérés dans l'étude (tumeurs et tissu sain) ont été analysés et un spectre 1D ^1H HRMAS CPMG avec présaturation du signal de l' H_2O a été acquis (**figure 1**). Afin d'améliorer la précision de l'attribution spectrale et donc la détection des métabolites présents dans les échantillons tissulaires analysés, une acquisition ^1H - ^{13}C 2D HSQC HRMAS a été effectuée dans des cas particuliers (**figure 2**).

Une approche statistique multivariée, comprenant des méthodes supervisées (PLS-DA) et non supervisées (PCA), a été utilisée pour l'analyse des données spectrales. L'ensemble des spectres 1D obtenus a donc fait l'objet d'une

discrétisation de 0,01 ppm des régions comprises entre 0,5 et 4,7 ppm et 6,7 et 7,9 ppm. L'analyse de cette dernière région spectrale n'est pas considérée de façon routinière et représente une nouveauté dans les études de spectroscopie RMN. De plus, cette région contient des informations métaboliques spécifiques aux tissus de dérivation de la crête neurale. Plus précisément, dans cette région, on retrouve les signaux liés à la présence du groupe aromatique commun aux catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline).

Les modèles statistiques multivariés obtenus à partir de cette approche globale ont permis d'identifier les métabolites clef permettant la distinction entre le neuroblastome et le tissu médullo-surrénalien sain (**figure 3**).

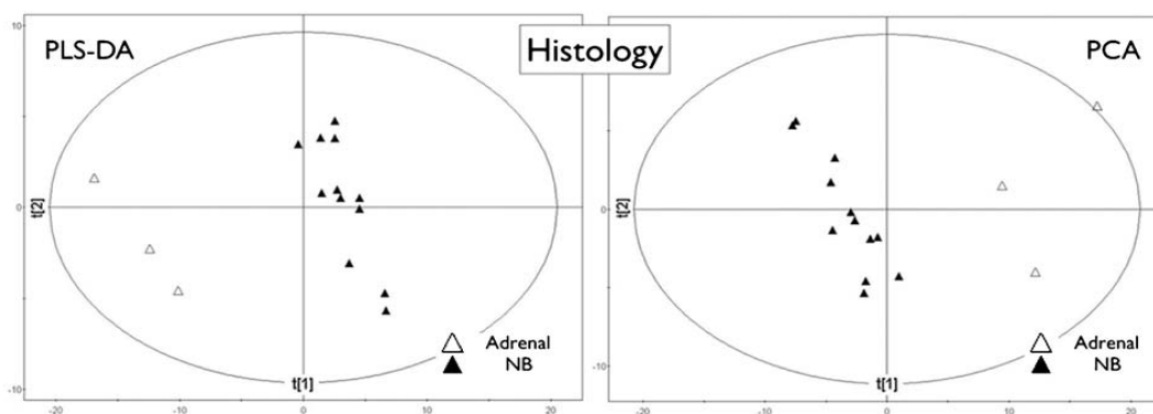


Fig. 3. Représentation schématique des résultats des l'analyses PCA et PLS-DA appliquées aux échantillons du neuroblastome et du tissu médullaire sain.

Un taux plus élevé de créatine, de glutamine, de glutamate, d'acétate et de glycine caractérise les biopsies de neuroblastome alors que la médullo-surrénale normale contient de l'adrénaline et une quantité plus importante d'ascorbate. L'adrénaline et la noradrénaline représentent la signature métabolique de la médullo-surrénale normale et n'ont pas été détectées dans les spectres de neuroblastome. Par ailleurs, cette étude montre pour la première fois la possibilité de détecter les catécholamines par spectroscopie RMN dans des échantillons tissulaires de surrenale. Par contre, les échantillons tumoraux montrent la présence de certains métabolites précurseurs (tyrosine, DOPA), suggérant un défaut dans la cascade synthétique catecholaminergique et, en particulier, une baisse de l'activité de la dopamine β -hydroxylase et/ou de la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT) qui sont les enzymes déterminantes dans la synthèse de l'adrénaline à

partir de la tyrosine. Dans ce contexte, la faible différenciation cellulaire pourrait être responsable de la diminution de la production d'adrénaline et l'augmentation conséquente des métabolites intermédiaires de la voie de synthèse.

L'étape suivante a comporté l'identification du profil métabolique tumoral en fonction de deux facteurs pronostiques reconnus : l'âge de l'enfant au diagnostic et le stade de la maladie.

A partir des analyses multivariées, on a montré que les neuroblastomes avec un pronostic défavorable, donc issus des patients âgés de plus d'un an (**figure 4**) et/ou avec une maladie de stade IV (**figure 5**), contiennent des taux plus élevés d'acétate.

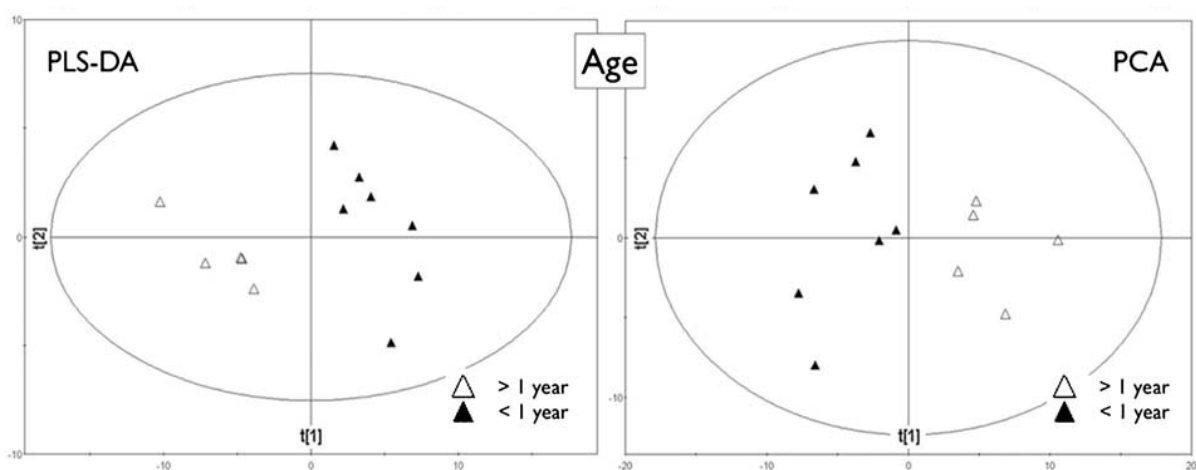


Fig. 4. Représentation schématique des résultats des l'analyses PCA et PLS-DA appliquées aux échantillons des neuroblastomes d'enfants âgés de plus ou de moins d'un an.

Enfin, une quantité relativement plus élevée d'acétate et de taurine était caractéristique de patients décédés ou qui ont développé une rechute majeure lors d'un suivi clinique moyen de sept ans (**figure 6**).

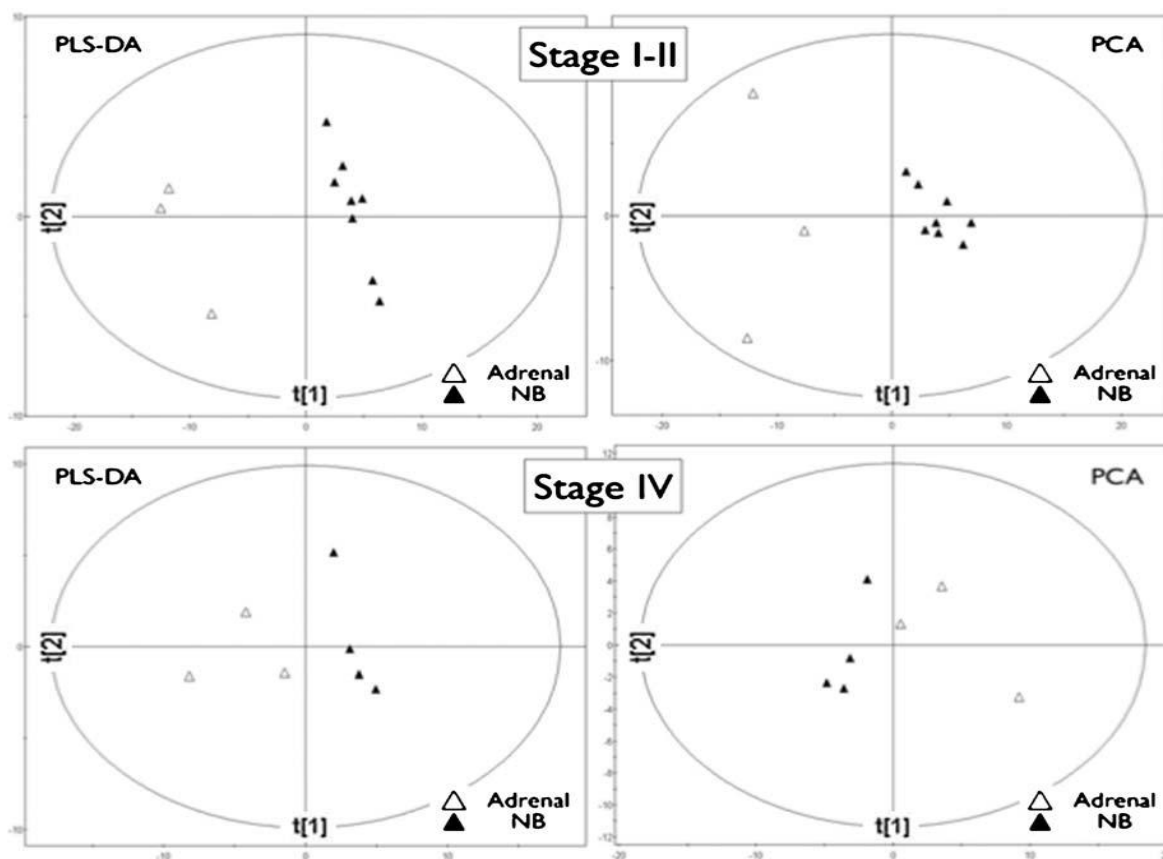


Fig. 5. Représentation schématique des résultats des analyses PCA et PLS-DA appliquées aux échantillons des neuroblastomes en fonction du stade de la maladie au diagnostic initial.

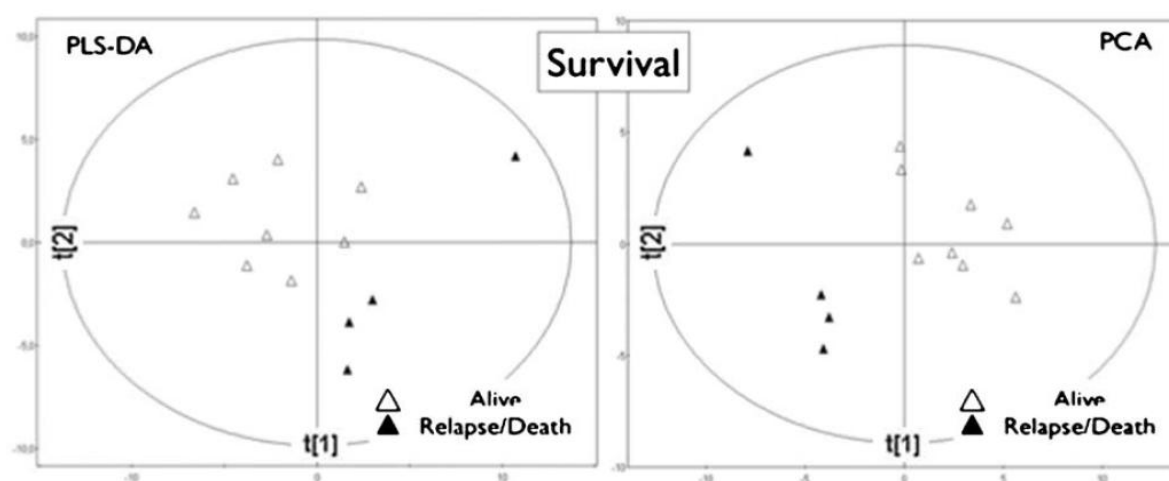


Fig. 6. Représentation schématique des résultats des l'analyses PCA et PLS-DA appliquées aux échantillons de neuroblastome en fonction du résultat d'un suivi clinique moyen de 7 ans.

Selon nos résultats, il semble que la taurine et l'acétate représentent des marqueurs métaboliques d'agressivité tumorale. Les études publiées par d'autres équipes et obtenues à partir de l'analyse HRMAS de lignées cellulaires de neuroblastome (Peet et al. 2007) confirment la présence d'une concentration tumorale élevée de taurine, soulignant son rôle éventuel dans le développement néoplasique. En outre, une augmentation du taux cellulaire de taurine et choline a été également associée à l'amplification de l'oncogène NMYC (Peet et al. 2007). Cependant, le rôle de la taurine dans la physiopathologie du neuroblastome reste indéterminé.

Le processus d'estérification de l'acétate pour former l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) en tant que précurseur majeur de la β -oxydation pour la synthèse des acides gras est considéré comme le principal mécanisme d'incorporation de l'acétate dans les tumeurs. Néanmoins, d'autres voies biochimiques de l'absorption de l'acétate ou de l'accumulation peuvent être impliquées, telles que le cycle de Krebs et la synthèse du cholestérol par le biais du citrate.

Des études supplémentaires utilisant de l'acétate ou de la taurine radiomarqué pourraient représenter un axe de recherche intéressant dans des modèles animaux pour évaluer la réponse à de nouveaux médicaments ciblés, tels les modulateurs métaboliques spécifiques.

En conclusion, nos résultats préliminaires suggèrent l'existence d'une réalité métabolique complexe pour le neuroblastome, probablement représentative d'un comportement tumoral spécifique. Cependant, l'impact réel de ces résultats devra être évalué par des études prospectives à long terme sur une cohorte plus importante de patients.

Caractérisation métabolomique de la glande surrénale normale et pathologique chez l'adulte (annexe 2)

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'analyse métabolomique exploratrice par RMN HRMAS de l'ensemble de la glande surrénale et des principales pathologies tumorales associées de dérivation corticale et médullaire, de l'adulte. Pour cela, nous avons établi le profil biochimique de l'adénome, du corticosurréalome (malin) et du phéochromocytome en les comparant au tissu sain de même origine embryologique.

Le métabolome tumoral a été comparé au profil sécrétoire biologique obtenu par des analyses standards urinaires ou plasmatiques. Pour les phéochromocytomes, les profils sécrétoire et métabolomique ont été évalués également en fonction du profil génétique du patient. Le phénotype métabolomique a été corrélé à la sécrétion hormonale dans les adénomes et les corticosurréalomes et à l'agressivité tumorale dans les corticosurréalomes uniquement.

Soixante-six échantillons tissulaires, dont 21 de tissu normal (13 corticales et 8 médullaires), 13 adénomes, 12 corticosurréalomes et 20 phéochromocytomes, ont été inclus dans l'analyse. Parmi les adénomes, 4 étaient aldostérone-sécrétants (adénome de Conn) et les 9 restant étaient non fonctionnels. Dans tous les corticosurréalomes, le score de Weiss était supérieur à 4 et 6 sur 12 étaient sécrétants. Tous les phéochromocytomes étaient sécrétants. Par rapport à leur statut génétique, 14 sur 20 ont été considérés comme sporadiques et les 6 restants associés à un syndrome héréditaire : Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2 (NEM2) (2 cas), maladie de von Hippel-Lindau (VHL) (2 cas) et Neurofibromatose de type 1 (NF1) (2 cas). Aucun phéochromocytome inclus ne montrait les caractéristiques cliniques de malignité.

Un spectre 1D ^1H HRMAS CPMG avec presaturation du signal de l' H_2O a été acquis pour tous les échantillons (**figures 1 et 2**). Une acquisition 2D ^1H - ^{13}C HSQC a été effectuée dans des cas sélectionnés pour affiner l'attribution spectrale.

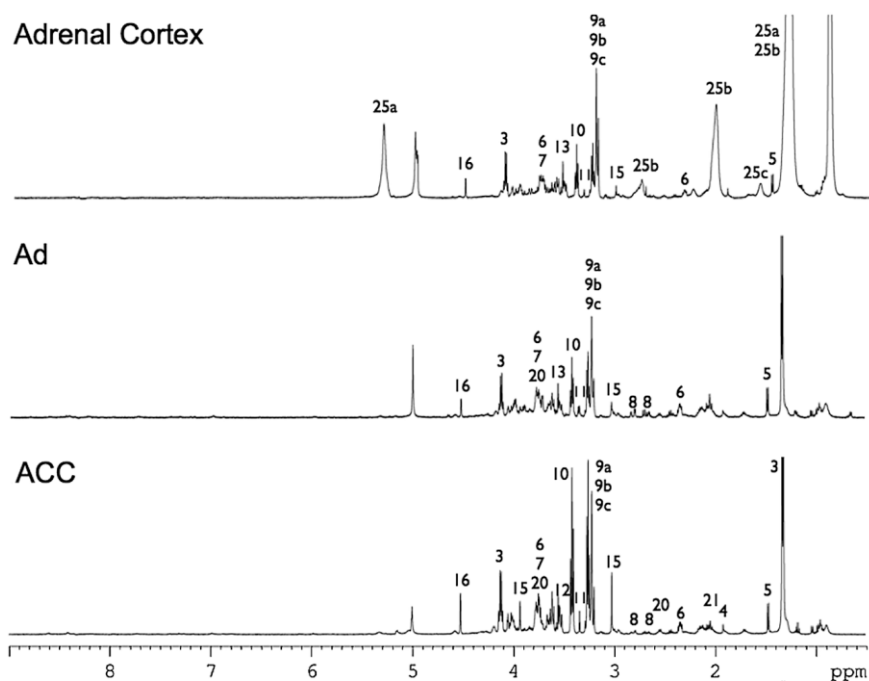


Fig. 1. Spectre 1D ^1H CPMG HRMAS représentatif de la corticale saine (**adrenal cortex**), d'un adénome (**Ad**) et d'un corticosurrénaome malin (**ACC**). L'attribution des métabolites est détaillée dans le tableau 1 de l'article en Annexe 2.

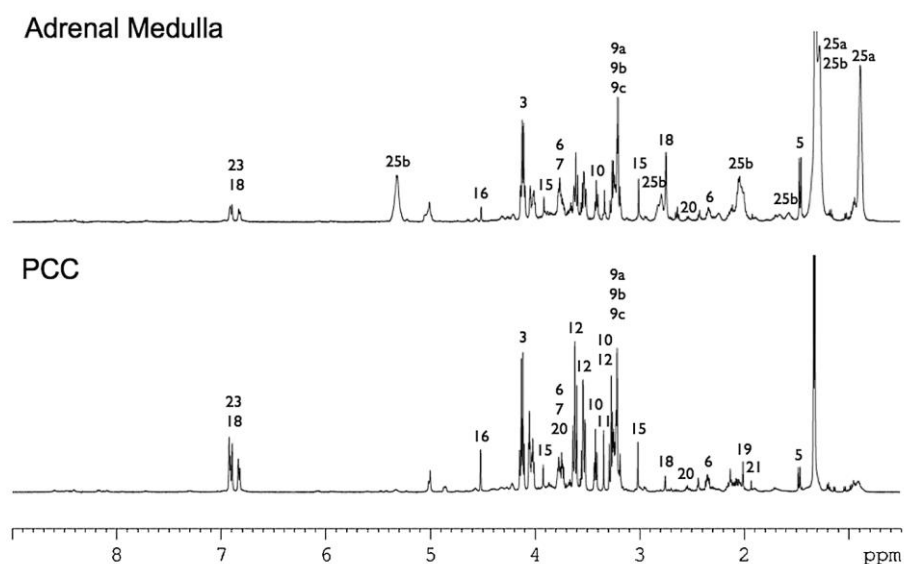


Fig. 2. Spectre 1D ^1H CPMG HRMAS représentatif de la médullaire saine (**adrenal medulla**) et d'un phéochromocytome (**PCC**). L'attribution des métabolites est détaillée dans le tableau 1 de l'article en Annexe 2.

Une approche statistique multivariée supervisée (PLS-DA) a été utilisée afin d'établir les différences métaboliques inter-groupes (**figure 3**).

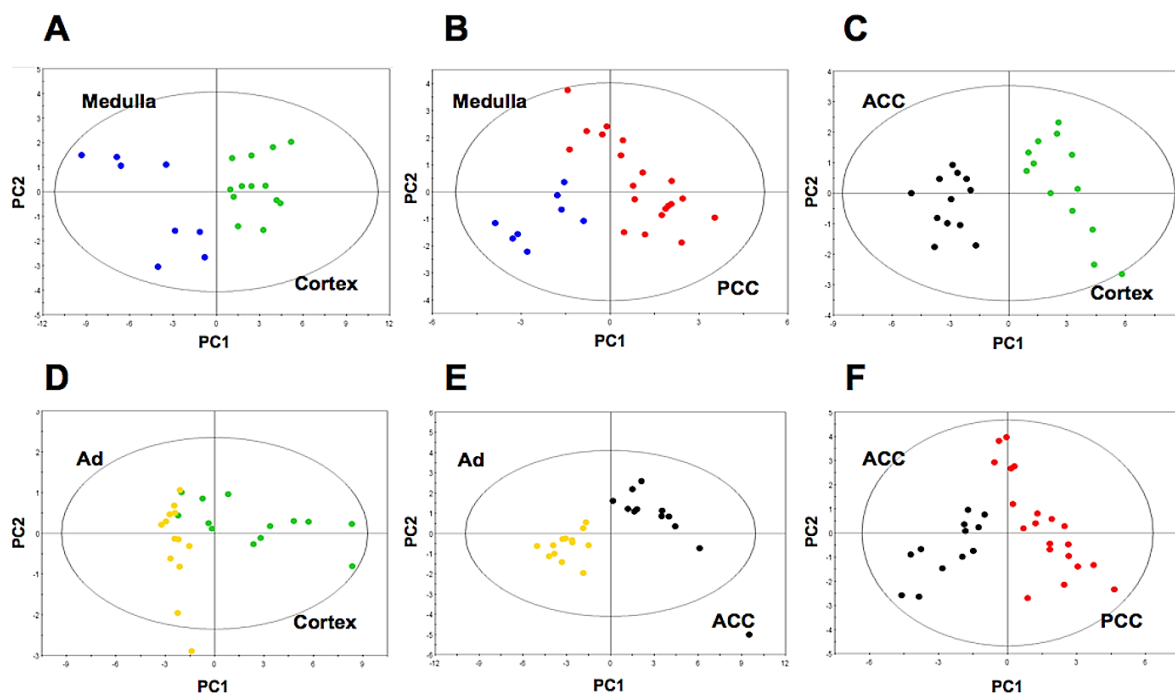


Fig. 3. Représentation schématique des résultats de l'analyse PLS-DA appliquée aux différents groupes histologiques avec des modèles à 2 groupes. **Cortex** : corticosurrénale saine, **Médulla** : médulosurrénale saine, **PCC** : phéochromocytome, **ACC** : corticosurrénalome malin, **Ad** : adénome.

Celle-ci a été précédée par une analyse non supervisée (PCA) des données spectrales de chaque groupe (gamme : 0,5-4,7 ppm et 6,7-7,9 ppm) pour tester la qualité des échantillons et déterminer la présence d'éventuels échantillons aberrants (outliers).

Dans cette étude, une approche de type binning adaptatif a été adoptée, comportant donc : (1) la définition des régions spectrales correspondant à chaque métabolite d'intérêt et (2) l'utilisation de ces dernières comme variables quantitatives dans les analyses multivariées à la place des intervalles spectraux multiples de 0,01 ppm.

La mesure de la concentration de certains métabolites, et notamment des catécholamines, a été réalisée dans cette étude. Les valeurs quantitatives (nmol/mg) obtenues ont été comparées entre les différents groupes en utilisant le test statistique non-paramétrique de Mann-Whitney.

Dans tous les échantillons d'origine corticale, l'adrénaline et la noradrénaline étaient indétectables. Au contraire, les signaux de catécholamines représentent la signature métabolique du tissu dérivant de la médullosurrénale et, de façon plus générale, de la crête neurale (**figure 1 et 2**). Une similitude a été montrée entre le profil métabolique de l'adénome et celui du tissu cortical normal. Inversement, les échantillons de corticosurrénalome ont présenté la signature typique du tissu néoplasique agressif comme une abondance de choline, de marqueurs biochimiques du métabolisme anaérobie et d'une augmentation de la glycolyse (**figure 4**). L'abondance d'acides aminés dans les échantillons tissulaires des corticosurrénalomes suggère une augmentation de leur production par des voies non oxydatives. L'augmentation du taux de dégradation des protéines associées à la mort cellulaire, particulièrement évidente dans les tumeurs volumineuses et nécrotiques, ou la dérégulation du cycle de Krebs peuvent expliquer la modification de concentration d'acides aminés altérés observée dans les corticosurrénalomes. De plus, des niveaux significativement plus élevés de lactate, d'acétate, d'acides gras et de dérivés phosphorylés de la choline jouent un rôle majeur dans la différenciation entre corticosurrénalomes et adénomes.

Selon le modèle de PLS-DA construit en fonction de la sécrétion hormonale, il semble exister une séparation en termes de profil métabolomique entre les adénomes non sécrétants et sécrétants. En particulier, le glutamate, la glutamine,

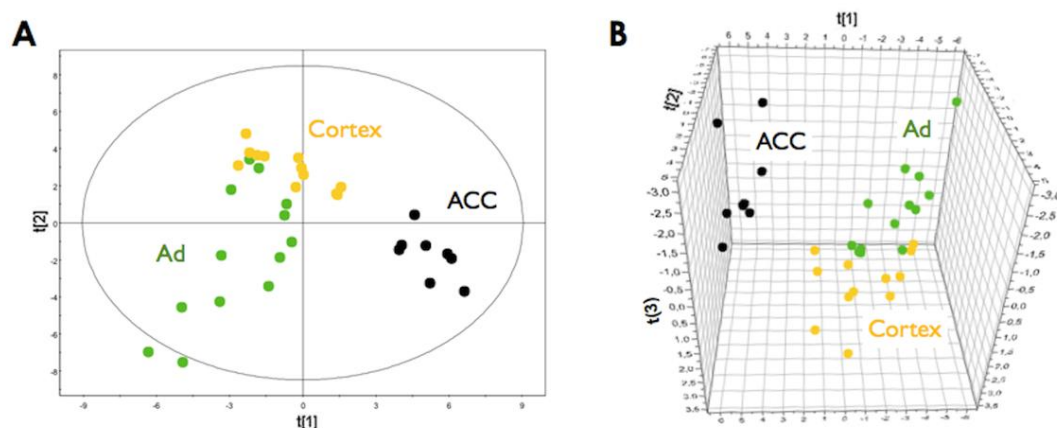


Fig. 4. Représentation schématique 2D (A) et 3D (B) des résultats de l'analyse PLS-DA appliquée aux échantillons de corticosurrénale saine (**Cortex**), d'adénomes (**Ad**) et de corticosurrénalomes malins (**ACC**) dans un modèle à 3 groupes.

le GABA et le succinate sont plus abondants dans les formes fonctionnelles. Une confirmation sera cependant nécessaire grâce à l'analyse d'une cohorte de patients plus importante (étude en cours).

Les résultats obtenus en fonction du profil sécrétoire des corticosurrénales ont été moins probants. En effet, bien que les tumeurs sécrétantes montrent un taux plus important d'aspartate, d'acides gras et des dérivés de la choline, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour l'un de ces métabolites.

Enfin, le profil métabolomique d'agressivité tumorale a été déterminé en considérant un modèle PLS-DA qui comprenait : (1) dix patients avec corticosurrénales métastatique au bilan initial ou avec dissémination systémique précoce après chirurgie et (2) deux patients avec une maladie localisée au moment du diagnostic et non métastatiques au cours des 5 premières années de suivi post-chirurgical. Malheureusement, aucune tendance discriminante n'a été mise en évidence par l'analyse statistique. Cependant, le faible effectif global ainsi que le déséquilibre de taille entre les deux groupes rendent ces résultats non définitifs.

Le profil métabolomique du phéochromocytome obtenu en comparant les échantillons tumoraux avec la médullosurrénale montre une augmentation significative du taux de :

- Choline, Phosphocholine, Phosphatidylcholine : marqueurs généraux de malignité, indiquant un turnover augmenté des phospholipides,
- Alanine : index de production non oxydative des acides aminés et/ou dégradation protéique liée à la mort cellulaire et/ou dérégulation du cycle du Krebs,
- Taurine : marqueur d'agressivité retrouvé dans d'autres tumeurs comme l'adénocarcinome colique et le neuroblastome de stade IV ou avec amplification de l'oncogène NMYC,
- Acide Ascorbique : élément critique dans la cascade de production de catécholamines. Dans notre série il a été corrélé (Spearman) à la noradrénaline ($R=0,56$), à l'adrénaline ($R=0,55$) et à la quantité totale noradrénaline plus adrénaline ($R=0,64$),
- Glutathion : important antioxydant,
- Noradrénaline : signature métabolique spécifique de la tumeur.

Par rapport à la sécrétion tumorale, les résultats de la RMN HRMAS obtenus sur les phéochromocytomes après excision chirurgicale sont en accord avec le profil sécrétoire tumoral obtenu avec les analyses biologiques standards avant chirurgie. Il a été mis en évidence au niveau des échantillons de 12 des 14 patients avec phéochromocytome sporadique la présence prédominante ou exclusive de noradrénaline (**figure 5**). En revanche, la situation était inversée dans les échantillons tissulaires normaux (**tableau 1**).

	Number of samples	NA (nmol/mg)	Adrenaline (nmol/mg)
Normal medulla	8	0.6 (0–1.8) ^a	1.6 (0.7–4.4) ^a
Sporadic PCC	14	2.4 (0–11.6) ^a	1.8 (0–5.3) ^a
VHL disease-related PCC	1	1	ND
	1	0.4	ND
NF1-related PCC	1	2.8	2.1
	1	1.6	1.1
MEN2-related PCC	1	5.8	2.3
	1	0.8	3.9

NA, noradrenaline; ND, undetectable.
^aMedian (range).

Tableau 1. Résultats de la quantification de la noradrénaline et de l'adrénaline dans la médullosurrénale saine, dans les phéochromocytomes sporadiques et dans les phéochromocytomes associés à un syndrome génétique (NEM2, VHL, NF1).

La synthèse de l'adrénaline dépend de la présence de l'enzyme phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT). Le niveau d'ARNm de PNMT est réputé plus faible dans le phéochromocytome par rapport au tissu médullaire normal. Cette disparité est probablement responsable de la différence en terme de quantité relative de catécholamines entre la tumeur et la médullosurrénale normale.

Les échantillons des phéochromocytomes associés aux NEM2 et NF1 présentaient à la fois de l'adrénaline et de la noradrénaline. En cas de syndrome VHL, seule la noradrénaline était détectable dans le tissu analysé. Dans ces phéochromocytomes héréditaires, une très bonne corrélation a été obtenue entre les résultats métabolomiques et le profil sécrétoire catécholaminergique.

Nos résultats sont globalement en accord avec les données d'une étude concernant l'application de la spectroscopie RMN à la pathologie surrenalienne,

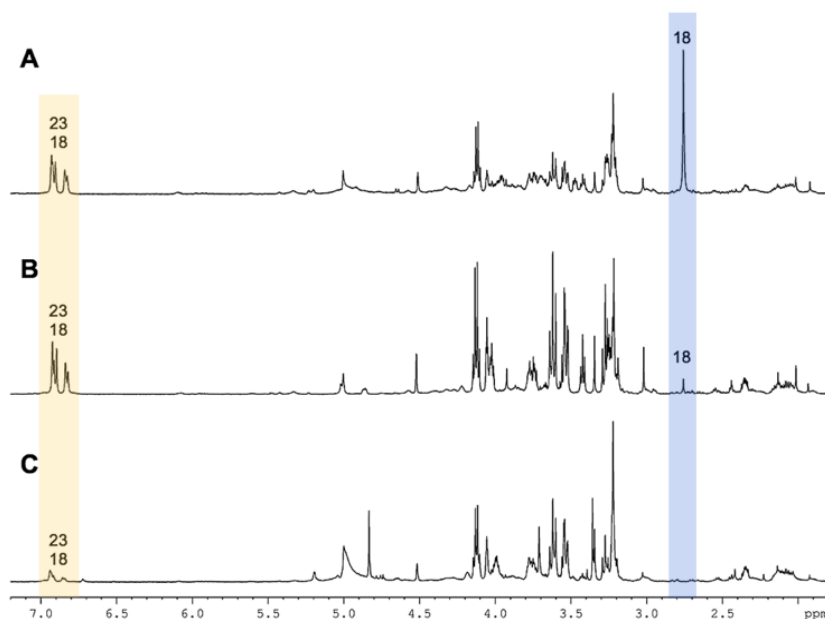


Fig. 5. Spectres 1D ^1H CPMG HRMAS représentatif des trois phéochromocytomes sporadiques avec différents profils sécrétoires : **A.** sécretion prédominante d'adrénaline, **B.** sécretion prédominante de noradrénaline, **C.** sécretion exclusive de noradrénaline.

parue seulement quelques mois avant la publication de notre article (Rao et al. 2013). Dans cette étude, la spectroscopie RMN en phase liquide a été utilisée pour analyser des paragangliomes. Les relations entre le contenu tumoral en catécholamines et l'activité mitochondriale ont été établies en fonction des différents génotypes. Les auteurs ont également démontré la possibilité de détecter des catécholamines par spectroscopie RMN dans les paragangliomes, confirmant les résultats de notre première étude obtenus à partir de l'analyse des échantillons de médullosurrénale normale (Imperiale et al. 2011). Contrairement à l'étude de Rao, qui nécessite des procédures préanalytiques laborieuses, nous avons étudié des échantillons tissulaires par RMN HRMAS sans aucune préparation préalable. Bien que la sensibilité de notre technique soit moindre, nous avons obtenu une bonne qualité spectrale nous permettant une quantification métabolique fiable.

En conclusion, cette étude est l'une des premières applications de la spectroscopie RMN HRMAS dans l'exploration de la physiopathologie de la surrenale et ouvre des perspectives pour des investigations plus exhaustives dans le cadre d'une approche multi -omique.

Rapport succinate/glutamate: un nouveau marqueur spécifique des paragangliomes liés à une mutation SDHx (annexe 3)

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux phéochromocytomes et aux paragangliomes associés à des mutations germinales au niveau des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et en particulier les gènes codant pour l'enzyme succinate déshydrogénase (SDH). Les tumeurs SDH sont extrêmement agressives, en particulier celles présentant une altération de la sous unité génique SDHB. Nous n'avons pas inclus les tumeurs associées aux mutations RET ou NF1 car ces formes sont presque toujours associées à d'autres manifestations syndromiques qui permettent plus facilement leur diagnostic.

L'approche méthodologique utilisée dans cette étude est différente des deux présentées auparavant. En effet, nous avons exploré les modifications métaboliques secondaires à des mutations génétiques connues. Nous avons sélectionné quatre métabolites ayant un rôle clef potentiel dans la physiopathologie tumorale : le succinate, le glutamate, le glutathion (GSH) et l'ATP. Une fois quantifiés, ces métabolites ont été utilisés afin de caractériser les phéochromocytomes et les paragangliomes héréditaires et les différencier des formes *a priori* sporadiques.

Vingt-huit patients non apparentés présentant un diagnostic histologique de phéochromocytome ou paragangliome ont été inclus. Les échantillons tumoraux ont été analysés par spectroscopie RMN HRMAS. Douze patients avaient des mutations germinales des gènes SDH, 6 étaient porteurs de la maladie de von Hippel-Lindau (VHL) et 10 étaient sporadiques. Un spectre 1D ^1H HRMAS CPMG avec présaturation du signal de l' H_2O a été obtenu pour tous les échantillons (**figure 1**). Une acquisition 2D ^1H - ^{13}C HSQC a été effectuée dans un deuxième temps à partir de cas sélectionnés afin d'affiner l'attribution spectrale des différents métabolites considérés.

Sur la base du succinate, du glutamate, du glutathion (GSH) et de l'ATP, des analyses non supervisées (PCA) et supervisées (PLS-DA) ont été effectuées

respectivement pour tester la qualité des échantillons (outliers) et optimiser la séparation entre les différents génotypes tumoraux dans des modèles de classification à 2 ou 3 groupes : (1) Sporadique vs. SDH vs. VHL, (2) Sporadique vs. SDH, (3) Sporadique vs. VHL, (4) SDH vs. VHL. La technique « Monte-Carlo resampling » a été utilisée pour évaluer les performances des modèles en terme de sensibilité, de spécificité et de valeurs prédictives négative et positive. Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été employé pour comparer les quantités de métabolites entre les différents groupes.

Le modèle de PLS-DA à trois groupes (**figure 2A**) basé sur le succinate, le glutamate, le glutathion (GSH) et l'ATP permettait une classification correcte de 8 cas sporadiques sur 10, de 5 cas VHL sur 6 et de tous les SDH. Les performances du modèle pour identifier les tumeurs mutées (VHL + SDHx) ont été les suivantes : sensibilité : 94%, spécificité : 80%, valeurs prédictives positive et négative : 89% et 89% respectivement, précision globale : 89%.

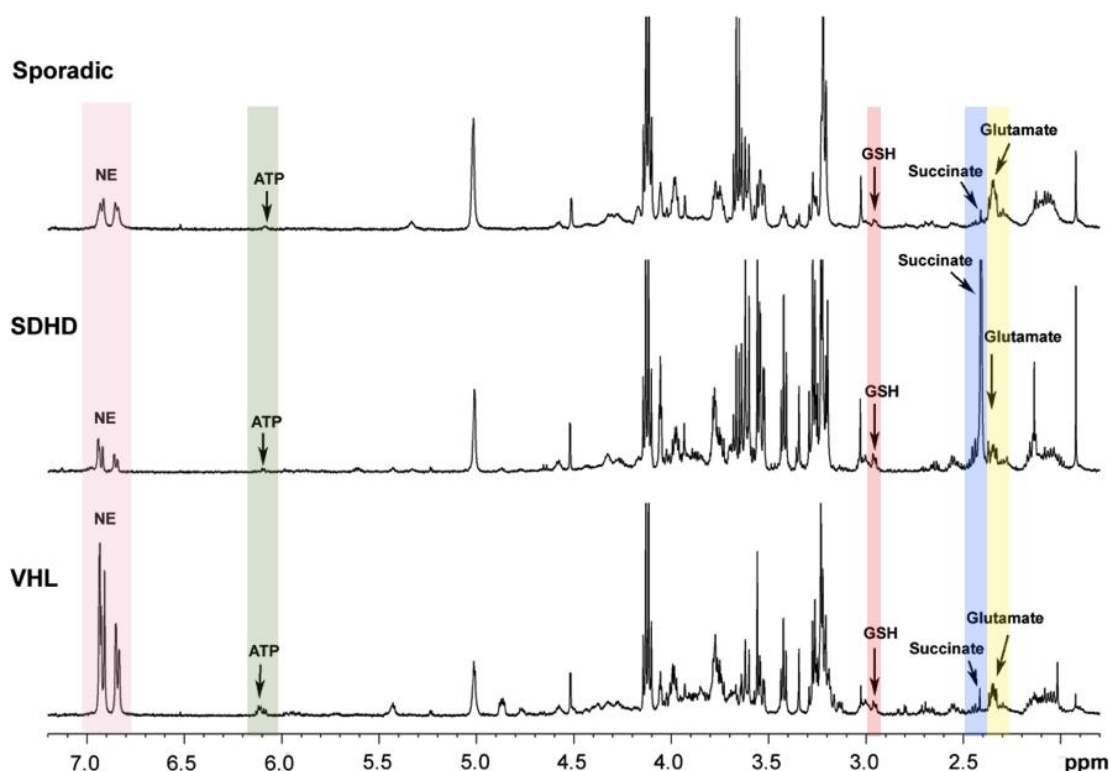


Figure 1. Spectre 1D ^1H CPMG HRMAS représentatif des trois sous types génétiques de phéochromocytomes/paragangliomes analysés dans l'étude : sporadiques, SDH et VHL. Le succinate, le glutamate, le glutathion (GSH), l'ATP et la noradrénaline (NE) sont indiqués.

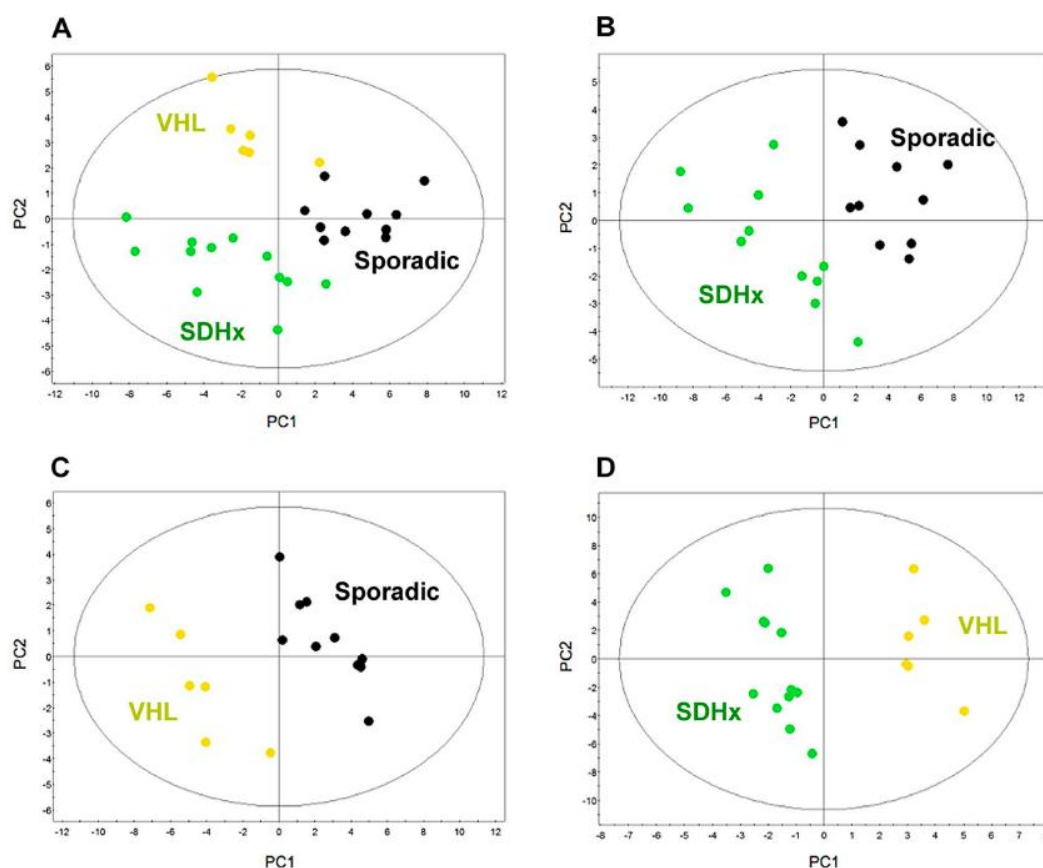


Fig. 2. Représentation schématique des résultats de l'analyse PLS-DA (modèles à 2 et 3 groupes) appliquée aux différents groupes génétiques de phéochromocytomes/paragangliomes étudiés.

Le modèle de PLS-DA construit à partir des échantillons de phéochromocytomes/paragangliomes sporadiques et SDH (**figure 2B**) permettait une classification correcte de 9 cas sporadiques sur 10 et de 11 cas SDH sur 12. Les performances du modèle pour identifier les tumeurs SDH sont : sensibilité : 92%, spécificité : 90%, valeur prédictive positive et négative : 92% et 90% respectivement, précision globale : 91%.

Dans les deux modèles restants (i.e. sporadique vs. VHL et SDH vs. VHL), toutes les tumeurs ont été correctement classées (**Fig. 2C et 2D**).

Les tumeurs SDHx présentent une augmentation significative du taux de succinate par rapport aux autres sous-types tumoraux (**tableau 1**). Ce résultat reflète directement le blocage métabolique lié à l'absence de fonctionnalité de l'enzyme SDH, cruciale dans l'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs.

	Sporadic	SDHx	VHL	<i>p</i> Sporadic vs SDHx	<i>p</i> Sporadic vs VHL	<i>p</i> SDHx vs VHL
Succinate	0.03 (0-0.06)	3,6 (0.9-9.07)	0.06 (0.03-0.12)	0.000003	0.02	0.0001
Glutathione	0.04 (0.03-0.22)	0.15 (0.05-0.39)	0.32 (0.17-0.43)	0.01	0.003	0.08
Glutamate	1.36 (0.23-2.55)	0.67 (0.13-1.52)	1.49 (0.88-2.18)	0.003	1	0.0007
ATP/ADP/AMP	0.10 (0.03-0.18)	0.05 (0-0.21)	0.16 (0.06-0.29)	0.1	0.1	0.01

Tableau 1. Résultats de la quantification du succinate, du glutamate, du glutathion et de l'ATP dans les phéochromocytomes/paragangliomes sporadiques, SDH et VHL.

En outre, les tumeurs SDH étaient caractérisées par des valeurs significativement plus faibles de glutamate par rapport aux formes sporadiques ou associées à la maladie de VHL (**tableau 1**), suggérant ainsi une altération possible du métabolisme du glutamate intracellulaire principalement produit par la désamination oxydative de la glutamine. A ce titre, les cellules avec mutation du gène codant pour l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH 1 et IDH 2) sont également caractérisées par des niveaux inférieurs de glutamate comparativement à leurs homologues de type sauvage. Il est possible que la disponibilité réduite du glutamate dans les tumeurs SDH conduise à la génération de conditions peroxydantes qui favorisent la carcinogénèse. Il n'y a pas d'explication claire pour le faible niveau de glutamate dans les tumeurs SDHx par rapport à d'autres sous-types. L'hypothèse d'une consommation accrue de glutamate dans des voies de biosynthèse alternatives ou d'une biosynthèse réduite du glutamate via la modulation négative de l'activité de la glutaminase ou de la glutamate déshydrogénase peuvent être envisagées.

Nous observons des valeurs plus faibles d'ATP dans les tumeurs SDH par rapport aux tumeurs VHL, probablement en raison d'une glycolyse marquée chez ces dernières. En revanche, les phéochromocytomes et les paragangliomes VHL montrent les valeurs les plus élevées de GSH (**tableau 1**). Le niveau de GSH semble être un indicateur sensible de la capacité cellulaire à résister au stress

oxydatif. En effet, son potentiel oxydo-réducteur élevé fait du GSH à la fois un puissant antioxydant et un cofacteur pour les réactions enzymatiques qui nécessitent des électrons. La faible quantité de GSH dans les formes tumorales sporadiques peut être liée à l'inhibition de la chaîne de transport électronique (ETC) qui est nécessaire pour la régénération du GSH par synthèse de NADPH. En effet, il a été montré précédemment que les tumeurs sporadiques peuvent présenter une diminution de la respiration mitochondriale.

Ces constatations apportent de nouveaux éléments qui semblent importants pour une meilleure compréhension de la physiopathologie tumorale. Nos résultats suggèrent l'existence d'une empreinte spécifique succinate-glutamate pour les phéochromocytomes et paragangliomes SDH, potentiellement utile dans l'amélioration du diagnostic, le suivi de ces tumeurs et la conception de nouvelles options de traitement.

Enfin, cette étude montre que la spectroscopie RMN HRMAS est une méthode prometteuse et fiable pour la caractérisation ex vivo du profil métabolomique des phéochromocytomes et paragangliomes sympathiques.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous avons exploré le métabolome de la glande surrénale et de ses principales tumeurs primitives, par spectroscopie RMN HRMAS. Les études métabolomiques dans ce domaine sont très peu nombreuses et donc notre travail se situe parmi les premières approches métabolomiques de la glande surrénale par RMN HRMAS.

Nous nous permettons de souligner la bonne qualité spectrale obtenue à partir de l'analyse des échantillons tissulaires. Les spectres ainsi acquis ont permis d'obtenir des informations métaboliques pertinentes, conduisant à des résultats similaires à ceux fournis par spectroscopie RMN en phase liquide (Rao et al. 2013). En effet, les fastidieuses étapes d'extraction pré-analytiques ont pu être évitées. Il semble donc que, malgré une sensibilité moindre, la RMN HRMAS représente une alternative méthodologique efficace pour l'étude du métabolisme surrenalien normal et pathologique.

Un deuxième point à retenir, directement lié au tissu examiné, concerne la région spectrale incluse lors des analyses RMN HRMAS du tissu médullo-surrenalien sain et tumoral. Dès les premières expériences RMN, nous nous sommes aperçus de la nécessité d'ajouter à la région spectrale typique, comprise entre 0,5 et 4,7 ppm, la région située entre 6,7 et 8 ppm. Cette dernière n'est pas habituellement prise en considération. Elle représente donc une nouveauté intéressante. En effet, c'est dans cette région que l'on retrouve les signaux du groupe 3,4-dihydroxybenzène, commun à l'adrénaline et à la noradrénaline. Les informations métaboliques contenues dans cette région spectrale sont donc spécifiques aux tissus dérivés de la crête neurale. De plus, les signaux du groupe 3,4-dihydroxybenzène se situent dans une région relativement pauvre en signal, et donc facile à identifier et à quantifier. Au vu de ces considérations, les signaux du groupe 3,4-dihydroxybenzène prennent une signification diagnostique et peuvent avoir un impact sur la pratique clinique. A ce titre, l'évolution de la spectroscopie RMN in vivo intégrant l'analyse des régions spectrales spécifiques aux catécholamines pourrait constituer un axe de recherche clinique utile pour les patients ayant des masses surrenaliennes atypiques, difficiles à caractériser par les examens paracliniques usuels. A ce sujet, des résultats préliminaires intéressants ont été rapportés par Kim et al. en 2009. En utilisant la spectroscopie

RMN *in vivo*, ces auteurs ont pu décrire un signal à 6,8 ppm dans les phéochromocytomes, probablement représentatif des catécholamines et non retrouvé dans les adénomes corticosurréaliens. Cependant, le temps d'examen prolongé nécessite la mise en oeuvre d'une acquisition RMN synchronisée au cycle respiratoire afin d'éliminer les artefacts liés aux mouvements abdominaux. **Dans un avenir très proche, nous projetons de développer cette application *in vivo*. Ceci représente la conséquence directe des résultats des nos études *ex vivo* à partir d'échantillons tumoraux.** On retrouve alors le lien étroit existant entre l'analyse exploratoire RMN *ex vivo* et la spectroscopie RMN *in vivo* en vue du développement de biomarqueurs cliniques pour des applications en imagerie fonctionnelle par IRM ou en médecine nucléaire (TEP). En effet, un objectif important de la métabolomique est l'identification de biomarqueurs spécifiques pour un diagnostic efficace en routine clinique. Détecter le cancer à un stade précoce ou prédire son agressivité aurait alors un impact décisif sur le diagnostic et le choix du traitement. Cependant, il reste à déterminer si les premiers changements métaboliques indicateurs de la maladie seront suffisamment importants pour être détectés par l'analyse d'échantillons de biopsies ciblées. Bien que l'analyse des échantillons biologiques permette l'identification des métabolites discriminants du processus cancéreux, les métabolites détectés sont, dans la plupart des cas, caractéristiques de la pathologie cancéreuse sans pouvoir distinguer une origine spécifique d'organe. Les résultats obtenus à partir des analyses des échantillons de phéochromocytomes et de paragangliomes ont mis en évidence des métabolites spécifiques à ces types tumoraux et, en particulier, de certains profils génétiques. En conséquence, établir un lien entre la détection d'un biomarqueur tissulaire par RMN HRMAS et un évènement mutationnel, conditionnerait le devenir clinique et, en conséquence, la réponse thérapeutique. L'exemple le plus représentatif est la détection d'un taux anormalement élevé de succinate dans les tumeurs associées à une altération génétique de l'enzyme SDH. Selon nos travaux, en considérant uniquement ce métabolite clef, les sujets porteurs de phéochromocytomes ou de paragangliomes SDH ont été identifiés efficacement. On pourrait alors imaginer la RMN HRMAS comme un outil diagnostique intégrant les techniques d'immunohistochimie dans le dépistage des mutations SDH. Le marquage immunohistochimique analyse la présence des protéines codées par des gènes

cibles. Si le marquage est anormal, il est possible que la protéine ait une structure altérée suite aux mutations du gène qui l'encode. Par exemple, un examen normal montre clairement le marquage correspondant au complexe SDHB-SDHC-SDHD. Si le marquage est absent, la mutation d'un de ces trois gènes est probable. Le résultat va orienter en conséquence les recherches génétiques sanguines. Bien que l'immunohistochimie soit très performante dans l'identification des tumeurs liées aux mutations SDH, elle nécessite parfois une certaine prudence dans l'interprétation des résultats (Barletta et al. 2012). Pour pouvoir considérer une tumeur comme SDH-déficiente, l'ensemble du matériel analysé doit être négatif à la coloration pour SDH. Cependant, le marquage pour le complexe SDHB peut être hétérogène (« patchy »), montrant de larges zones de perte de marquage au sein desquelles on retrouve une positivité seulement focale. La spectroscopie RMN HRMAS pourrait alors avoir un rôle dans ces situations qualifiées d'équivoques à l'immunohistochimie. De plus, lorsque l'analyse génétique révèle une nouvelle mutation la question se pose de savoir si la mutation est pathogène ou s'il s'agit d'un polymorphisme rare (Canu et al. 2014).

A partir de ces considérations, nous projetons de poursuivre nos recherches avec les objectifs suivants :

1. **confirmer nos résultats précédents dans une population de malades plus importante** (grâce à une collaboration multicentrique nationale et internationale) ;
2. **déterminer le seuil diagnostique de succinate** qui identifie la forme tumorale SDH ;
3. **évaluer le caractère pathogène ou non de certaines mutations SDH de signification inconnue ou fonctionnellement incertaine**, en comparant les résultats RMN HRMAS à ceux de l'immunohistochimie et au suivi clinique du patient.

Un objectif ambitieux serait de permettre la conception et le développement de thérapies ciblées, nécessaires à une médecine personnalisée ou théranostique. Ces dernières années, l'utilisation croisée de plusieurs « -omiques » est un sujet de plus en plus fréquemment étudié (Kroemer et al., 2008, Dang 2012, Yun et al. 2012, Bathen et al. 2012), avec des résultats tout particulièrement intéressants

(Casado-Vela et al. 2011, Cavill et al. 2011, Borgan et al. 2010). Le développement d'études transversales deviendra une condition incontournable, afin de mettre en évidence des biomarqueurs à visée diagnostique ou pronostique. Ceci a été illustré par les études que nous avons menées dans le cadre de ce travail de thèse. Elles nous ont permis de corréler les données métaboliques, histopathologiques, cliniques et génomiques. Bien qu'encourageants, les résultats obtenus devront être confirmés à une plus large échelle. Actuellement, nous menons une **étude focalisée sur les tumeurs issues de la corticosurrénale. Dans cette étude, nous comparons le profil métabolomique aux paramètres anatomopathologiques standards (score de Weiss), à la biologie moléculaire (LOH), à la génétique (IGF2) et enfin à la clinique (profil sécrétoire, statut métastatique et suivi à long terme).**

En conclusion, la spectroscopie RMN HRMAS semble être une technique robuste permettant une analyse rapide d'échantillons minimaux de tissu sans surseoir à la qualité des spectres obtenus. De plus, il s'agit d'une technique non destructive qui a pour avantage d'utiliser le même échantillon pour d'autres analyses. Nous considérons donc que la métabolomique par RMN HRMAS peut être efficacement appliquée à l'étude de la pathologie tumorale de la glande surrénale et soit potentiellement intégrée dans un environnement médical avec un coût d'investissement non prohibitif. Toutefois, certains points doivent encore être optimisés. En particulier, le protocole de préparation et d'acquisition des échantillons biologiques reste une étape fondamentale afin de produire des résultats suffisamment reproductibles. Les métabolites doivent être identifiés et validés avant d'être considérés dans la stratégie diagnostique. Ce point nécessite des investissements dans le développement de bases de données standards et d'algorithmes d'identification métabolique automatique. Enfin, des essais cliniques à plus grande échelle, multi-centriques, doivent être menés afin de valider des résultats souvent obtenus sur des cohortes à faible effectifs de patients.

REFERENCES

1. Ackerstaff E, Glunde K, Bhujwala ZM. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? *J Cell Biochem.* 2003;90:525-33.
2. Ackrell, B. A. Cytopathies involving mitochondrial complex II. *Mol Aspects Med.* 2002;23:369- 84.
3. Adams GA, Shochat SJ, Smith EI, et al. Thoracic neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Surg.* 1993;28:372-7.
4. Adler JT, Meyer-Rochow GY, Chen H, Benn DE, Robinson BG, Sippel RS, et al. Pheochromocytoma: current approaches and future directions. *Oncologist.* 2008;13:779-83.
5. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:2027-37.
6. Amar L, Baudin E, Burnichon N, Peyrard S, Silvera S, Bertherat J, et al. Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3822- 8.
7. Amar L, Bertherat J, Baudin E, Ajzenberg C, Bressac-de Paillerets B, Chabre O, et al. Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J Clin Oncol.* 2005;23:8812-8.
8. Ambros PF, Brodeur GM. Concept of tumorigenesis and regression. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y: *Neuroblastoma.* New York, NY: Elsevier Science, 2000, pp 21-32.
9. Anderssen E, Dyrstad K, Westad F, Martens H. Reducing over-optimism in variable selection by cross-model validation. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2006;84:69-74.
10. Andrew ER, Bradbury A, Eades RG. Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature.* 1959;183:1802-3.
11. Assie G, Antoni G, Tissier F, Caillou B, Abiven G, Gicquel C, et al. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:148-54.
12. Astuti D, Hart-Holden N, Latif F, Laloo F, Black GC, Lim C, et al. Genetic analysis of mitochondrial complex II subunits SDHD, SDHB and SDHC in paraganglioma and phaeochromocytoma susceptibility. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;59:728-33.

13. Aubert S, Buob D, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Do Cao C, et al. Weiss system: a still in-use diagnostic tool for the assessment of adrenocortical malignancy. *Ann Pathol.* 2005;25:545-54.
14. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, et al. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1612-9.
15. Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR. Two-dimensional spectroscopy: application to nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys.* 1976;64:17.
16. August C, August K, Schroeder S, Bahn H, Hinze R, Baba HA, et al. CGH and CD 44/MIB-1 immunohistochemistry are helpful to distinguish metastasized from nonmetastasized sporadic pheochromocytomas. *Mod Pathol.* 2004;17:1119-28.
17. Baldi P, and Hatfield GW. DNA Microarrays and Gene Expression. pp. 230. Cambridge University Press, Cambridge, UK. ISBN: 0521800226 (2002).
18. Barantin L, Le Pape A, Akoka S. A new method for absolute quantitation of MRS metabolites. *Magn Reson Med.* 1997;38:179-82.
19. Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J Chemom.* 2003;17:166-73.
20. Barlaskar FM, Hammer GD. The molecular genetics of adrenocortical carcinoma. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8:343-8.
21. Barletta JA, Hornick JL. Succinate Dehydrogenase-deficient Tumors: Diagnostic Advances and Clinical Implications. *Adv Anat Pathol.* 2012;19:193-203.
22. Barzon L, Fallo F, Sonino N, Daniele O, Boscaro M. Adrenocortical carcinoma: experience in 45 patients. *Oncology.* 1997;54:490-6.
23. Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palu G, Boscaro M. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol.* 2003;149:273-85.
24. Bathen TF, Engan T, Krane J, et al. Analysis and classification of proton NMR spectra of lipoprotein fractions from healthy volunteers and patients with cancer or CHD. *Anticancer Res.* 2000;20:2393-408.
25. Bathen TF, Sitter B, Sjøbakk TE, Tessem MB, Gribbestad IS. Magnetic Resonance Metabolomics of Intact Tissue: A Biotechnological Tool in Cancer Diagnostics and Treatment Evaluation. *Cancer Res.* 2010;70:6692-6.
26. Bathen TF, Jensen LR, Sitter B, Fjøsne HE, Halgunset J, Axelson DE, et al.

- MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status. *Breast Cancer Res.* 2007;104:181-9.
27. Bausch B, Borozdin W, Mautner VF, Hoffmann MM, Boehm D, Robledo et al. Germline NF1 mutational spectra and loss-of-heterozygosity analyses in patients with pheochromocytoma and neurofibromatosis type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:2784-92.
 28. Bausch B, Koschker AC, Fassnacht M, Stoevesandt J, Hoffmann MM, Eng C, et al. Comprehensive mutation scanning of NF1 in apparently sporadic cases of pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;85:3478-81.
 29. Bayley JP, Kunst HP, Cascon A, Sampietro ML, Gaal J, Korpershoek E, et al. SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and pheochromocytoma. *Lancet Oncol.* 2010;11:366-72.
 30. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science.* 2000;287:848-51.
 31. Baysal BE. On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14:453-9.
 32. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. *Nat Protoc.* 2007;2:2692-703.
 33. Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, Lombardi CP, Crucitti P, Crucitti F, et al. Role of reoperation in recurrence of adrenal cortical carcinoma: results from 188 cases collected in the Italian National Registry for Adrenal Cortical Carcinoma. *Surgery.* 1997;122:1212-8.
 34. Ben-Haim S, Eil P. 18F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response. *J Nucl Med.* 2009;50:88-99.
 35. Bender BU, Gutsche M, Glasker S, Muller B, Kirste G, Eng C et al. Differential genetic alterations in von Hippel-Lindau syndrome-associated and sporadic pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4568-74.
 36. Benn DE, Gimenez-Roqueplo AP, Reilly JR, Bertherat J, Burgess J, Byth K, et al. Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:827-836.

37. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. 2006;126:107-20.
38. Blake MA, Kalra MK, Sweeney AT, Lucey BC, Maher MM, Sahani DV, et al. Distinguishing benign from malignant adrenal masses: multi-detector row CT protocol with 10-minute delay. *Radiology*. 2006;238:578-85.
39. Blanes A, Diaz-Cano SJ. Histologic criteria for adrenocortical proliferative lesions: value of mitotic figure variability. *Am J Clin Pathol*. 2007;127:398-408.
40. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat*. 2009;30:7-11.
41. Boland GW, Lee MJ, Gazelle GS, Halpern EF, McNicholas MM, Mueller PR. Characterization of adrenal masses using unenhanced CT: an analysis of the CT literature. *AJR Am J Roentgenol*. 1998;171:201-204.
42. Borgan E, Sitter B, Lingjærde OC, Johnsen H, Lundgren S, Bathen TF, et al. Merging transcriptomics and metabolomics: Advances in breast cancer profiling. *BMC Cancer*. 2010;10:628.
43. Brereton RG. Consequences of sample size, variable selection, and model validation and optimisation, for predicting classification ability from analytical data. *Trends Analyt Chem*. 2006;25:1103–11.
44. Broadhurst DI, Kell DB. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics*. 2006;2:171-96.
45. Brodeur GM, Azar C, Brother M, et al. Neuroblastoma. Effect of genetic factors on prognosis and treatment. *Cancer*. 1992;70:1685-94.
46. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993;11: 1466-77.
47. Burnichon N, Briere JJ, Libe R, Vescovo L, Riviere J, Tissier F, et al. SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet*. 2010;19: 3011- 20.
48. Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deberardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, et al. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed

- by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene*. 2005;24:4165-73.
49. Canu L, Rapizzi E, Zampetti B, Fucci R, Nesi G, Richter S, et al. Pitfalls in Genetic Analysis of Pheochromocytomas/Paragangliomas-Case Report. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2014 (in press).
 50. Caoili EM, Korobkin M, Francis IR, Cohan RH, Dunnick NR. Delayed enhanced CT of lipid-poor adrenal adenomas. *AJR Am J Roentgenol*. 2000;175:1411-5.
 51. Caoili EM, Korobkin M, Francis IR, Cohan RH, Platt JF, Dunnick NR, et al. Adrenal masses: characterization with combined unenhanced and delayed enhanced CT. *Radiology*. 2002;222:629-33.
 52. Carling T. Multiple endocrine neoplasia syndrome: genetic basis for clinical management. *Curr Opin Oncol*. 2005;17:7- 12.
 53. Casado-Vela J, Cebrián A, Gómez del Pulgar MT, Lacal JC. Approaches for the study of cancer: Towards the integration of genomics, proteomics and metabolomics. *Clin Transl Oncol*. 2011;13:617–28.
 54. Cavill R, Kamburov A, Ellis JK, Athersuch TJ, Blagrove MS, Herwig R, et al. Consensus-phenotype integration of transcriptomic and metabolomic data implies a role for metabolism in the chemosensitivity of tumour cells. *PLoS Comput Biol*. 2011;7:e1001113.
 55. Chan ECY, Koh PK, Mal M, Cheah PY, Eu KW, Backshall A, et al. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J Proteome Res*. 2009;8:352.
 56. Chen H, Sippel RS, O'Dorisio MS, et al. The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma, and medullary thyroid cancer. *Pancreas*. 2010;39:775–83.
 57. Chen Z, Odstrcil EA, Tu BP, McKnight SL. Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science*. 2007;316:1916-9.
 58. Cheng LL, Burns MA, Taylor JL, He W, Halpern EF, McDougal WS, et al. Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res*. 2005;65:3030-4.

59. Cheng LL, Chang IW, Smith BL, Gonzalez RG. Evaluating Human Breast Ductal Carcinomas with High-Resolution Magic-Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Magn Reson.* 1998;135:194.
60. Cheng LL, Lean CL, Bogdanova A, Wright SC, Jr, Ackerman JL, Brady TJ, et al. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn Reson Med.* 1996;36:653–8.
61. Chiaradonna F, Sacco E, Manzoni R, Giorgio M, Vanoni M, Alberghina L. Ras-dependent carbon metabolism and transformation in mouse fibroblasts. *Oncogene.* 2006;25:5391-404.
62. Chrisoulidou A, Kaltsas G, Ilias I, Grossman AB. The diagnosis and management of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14:569-85.
63. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature.* 2008;452:230-3.
64. Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature.* 2008;452:181-6.
65. Comino-Mendez I, Gracia-Aznarez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-Garcia LJ, Leton R, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet.* 2011;43:663-7.
66. Conte M, Parodi S, De Bernardi B, et al. Neuroblastoma in adolescents: the Italian experience. *Cancer.* 2006;106:1409-17.
67. Dahia PL, Hao K, Rogus J, Colin C, Pujana MA, Ross K, et al. Familial Pheochromocytoma Consortium. Novel pheochromocytoma susceptibility loci identified by integrative genomics. *Cancer Res.* 2005;65:9651-8.
68. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 2012;26:877-90.
69. De Berardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:19345-50.
70. De Berardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008;7:11-20.

71. de Meyer T, Sinnaeve D, Van Gasse B, Tsiorkova E, Rietzschel ER, De Buyzere ML, et al. NMR-Based Characterization of Metabolic Alterations in Hypertension Using an Adaptive, Intelligent Binning Algorithm. *Anal Chem.* 2008;80:3783-90.
72. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol.* 2009;27:1108-15.
73. Detour J, Elbayed K, Piotta M, Moussallieh FM, Nehlig A, Namer IJ. Ultrafast in vivo microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis. *J NeurosciMethods.* 2011;201:89-97.
74. Dombrauckas JD, Santarsiero BD, Mesecar AD. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry.* 2005;44:9417-29.
75. Ebbels TM, Keun HC, Beckonert OP, Bollard ME, Lindon JC, Holmes E, et al. Prediction and Classification of Drug Toxicity Using Probabilistic Modeling of Temporal Metabolic Data: The Consortium on Metabonomic Toxicology Screening. Approach. *J Proteome Res.* 2007;6:4407- 22.
76. Edstrom E, Mahlamaki E, Nord B, Kjellman M, Karhu R, Hoog A, et al. Comparative genomic hybridization reveals frequent losses of chromosomes 1p and 3q in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas, suggesting a common genetic etiology. *Am J Pathol.* 2000;156:651- 9.
77. Eisenhofer G, Bornstein SR, Brouwers FM, Cheung NK, Dahia PL, de Krijger RR, et al. Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11:423-36.
78. Eisenhofer G, Lenders JW, Timmers H, et al. Measurements of plasma methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine as discriminators of different hereditary forms of pheochromocytoma. *Clin Chem.* 2011;57:411–20.
79. Eisenhofer G, Siegert G, Kotzerke J, et al. Current progress and future challenges in the biochemical diagnosis and treatment of pheochromocytomas and paragangliomas. *Horm Metab Res.* 2008;40:329–37.

80. Eisenhofer G, Walther MM, Huynh TT, et al. Pheochromocytomas in von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1999–2008.
81. Elbayed K, Dillman B, Raya J, Piotto M, Engelke F. Field modulation effects induced by sample spinning: application to high resolution magic angle spinning NMR. *Adv Magn Reson.* 2005;174:2-26.
82. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:3892-9.
83. Eng C and Mulligan LM. Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease. *Hum Mutat.* 1997;9:97- 109
84. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med.* 2008;14:1351-6.
85. Ernster L, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1271:195-204.
86. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell.* 2006;9:425-34.
87. Fassnacht M, Hahner S, Polat B, Koschker AC, Kenn W, Flentje M, et al. Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4501-4.
88. Fassnacht M, Johansen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, et al. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer.* 2009;115:243-50.
89. Favier J, Briere JJ, Strompf L, Amar L, Filali M, Jeunemaitre X, et al. Hereditary paraganglioma/pheochromocytoma and inherited succinate dehydrogenase deficiency. *Horm Res.* 2005;63:171- 9.
90. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 2002;48:155-171.

91. Fishbein L and Nathanson KL. Pheochromocytoma and Paraganglioma: Understanding the Complexities of the Genetic Background. *Cancer Genet.* 2012;205:1-11.
92. Frezza C, Tennant DA, Gottlieb E. IDH1 mutations in gliomas: when an enzyme loses its grip. *Cancer Cell.* 2010;17:7-9.
93. Fritsch P, Kerbl R, Lackner H, et al. "Wait and see" strategy in localized neuroblastoma in infants: an option not only for cases detected by mass screening. *Pediatr Blood Cancer.* 2004;43:679-82.
94. Gaal J, Burnichon N, Korpershoek E, Roncelin I, Bertherat J, Plouin PF, et al. Isocitrate Dehydrogenase Mutations Are Rare in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1274-8.
95. Gaal J, Stratakis CA, Carney JA, Ball ER, Korpershoek E, Lodish MB, et al. SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney-Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol.* 2010;24:147- 51.
96. Gaal J, van Nederveen FH, Erlic Z, Korpershoek E, Oldenburg R., Boedeker CC, et al. Parasympathetic paragangliomas are part of the Von Hippel-Lindau syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:4367- 71.
97. Gao B, Meng F, Bian W, Chen J, Zhao H, Ma G, et al. Development and validation of pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score for predicting malignant pheochromocytomas. *Urology.* 2006;68:282-6.
98. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 2009;458:762-5.
99. Gartland KPR, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson JK. The application of pattern recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton NMR spectroscopy of urine. *Mol Pharmacol.* 1991;39:629-42.
100. Gartland KPR, Sanins SM, Nicholson JK, Sweatman BC, Beddell CR, Lindon JC. Pattern recognition analysis of high resolution ¹H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR Biomed.* 1990;3: 166-172.

101. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004;4:891-9.
102. George DJ, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:419-21.
103. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2001;61:6762-7.
104. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Mourad JJ, Plouin PF, Corvol P, et al. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am J Hum Genet*. 2001;69:1186-97.
105. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Kerlan V, Plouin PF, et al. Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:4771-4.
106. Glunde K, Serkova NJ. Therapeutic targets and biomarkers identified in cancer choline phospholipid metabolism. *Pharmacogenomics*. 2006;7:1109-23.
107. Golden SH, Robinson KA, Saldanha I, Anton B, Ladenson PW. Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:1853-78.
108. Goodacre R. Metabolomics – the way forward. *Metabolomics*. 2005;1:1-2.
109. Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6661-8.
110. Granot D, Snyder M. Glucose induces cAMP-independent growth-related changes in stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:5724-8.
111. Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4:551-61.
112. Griffin JL. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition

- analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Curr Op Chem Biol.* 2003;7:648- 54.
113. Grivet JP, Delort AM, Portais JC. NMR and microbiology: from physiology to metabolomics. *Biochimie.* 2003;85,823- 40.
114. Grossman AB. Where metabolism meets oncogenesis: another false lead? *Lancet Oncol.* 2010;11:309-10.
115. Grovas A, Fremgen A, Rauck A, et al. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. *Cancer.* 1997;80:2321-32.
116. Habano W, Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, Higuchi T, Terashima M, Horiuchi S. Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep.* 2003;10:1375-80.
117. Haberkorn RA, Herzfeld J, Griffin RG. High resolution ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of unsonicated model membranes. *J Am Chem Soc.* 1978;100:1296-8.
118. Hahn PF, Blake MA, Boland GW. Adrenal lesions: attenuation measurement differences between CT scanners. *Radiology.* 2006;240:458-63.
119. Haider MA, Ghai S, Jhaveri K, Lockwood G. Chemical shift MR imaging of hyperattenuating (>10 HU) adrenal masses: does it still have a role? *Radiology.* 2004;231:711-6.
120. Halefoglu AM, Bas N, Yasar A, Basak M. Differentiation of adrenal adenomas from nonadenomas using CT histogram analysis method: A prospective study. *Eur J Radiol.* 2009;73:643-51.
121. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
122. Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephore N, Bayley JP, Kunst H, et al. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science.* 2009;325:1139-42.
123. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:774-85.
124. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul;11(3):298-300.
125. Harrington, P. D. B. (2006). Statistical validation of classification and calibration models using bootstrapped Latin partitions. *Trends Analyt Chem.* 2006;25:1112–24.

126. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. 2005;8:311-21.
127. Henley DJ, van Heerden JA, Grant CS, Carney JA, Carpenter PC. Adrenal cortical carcinoma - a continuing challenge. *Surgery*. 1983;94:926-31.
128. Hensen EF, Jordanova ES, van Minderhout IJ, Hogendoorn PC, Taschner PE, van der Mey AG, et al. Somatic loss of maternal chromosome 11 causes parent- of- origin- dependent inheritance in SDHD- linked paraganglioma and pheochromocytoma families. *Oncogene*. 2004;23:4076- 83.
129. Hirawake H, Taniwaki M, Tamura A, Kojima S, Kita K. Cytochrome b in human complex II (succinate- ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of the components in liver mitochondria and chromosome assignment of the genes for the large (SDHC) and small (SDHD) subunits to 1q21 and 11q23. *Cytogenet Cell Genet*. 1997;79:132- 8.
130. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, et al. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med*. 1995;1:249-55.
131. Hiyama E, Reynolds CP. Telomerase as a biological and prognostic marker in neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y: *Neuroblastoma*. New York, NY: Elsevier Science, 2000, pp 159-174.
132. Hiyama E, Yokoyama T, Hiyama K, et al. Multifocal neuroblastoma : biologic behaviour and surgical aspects. *Cancer*. 2000;88:1955-63.
133. Holmes E, Bonner FW, Sweatman BC, Lindon JC, Beddell CR, Rahr E, et al. NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury II chloride and 2-bromoethanamine. *Mol Pharmacol*. 1992;42:922-30.
134. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature*. 2002;417:975-8.
135. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134:703-7.
136. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, et al. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient

- series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg.* 2001;25:891-7.
137. Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh FM, Reix N, Piotto M, Bellocq JP, et al. Metabolomic profile of the adrenal gland: from physiology to pathological conditions. *Endocr-Relat Cancer.* 2013;20:705-16.
138. Israel GM, Korobkin M, Wang C, Hecht EN, Krinsky GA. Comparison of unenhanced CT and chemical shift MRI in evaluating lipid-rich adrenal adenomas. *AJR Am J Roentgenol.* 2004;183:215-19.
139. Izyumov DS, Avetisyan AV, Pletjushkina OY, Sakharov DV, Wirtz KW, Chernyak BV, et al. "Wages of fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1658:141-7.
140. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292:468-72.
141. Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science.* 2012;336:1040-4.
142. Janeway KA, Kim SY, Lodish M, Nose V, Rustin P, Gaal J, et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;108:314- 18.
143. Johnson PT, Horton KM, Fishman EK. Adrenal mass imaging with multidetector CT: pathologic conditions, pearls, and pitfalls. *Radiographics.* 2009;29:1333-51.
144. Jordan KW, Nordenstam J, Lauwers GY, Rothenberger DA, Alavi K, Garwood M, et al. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis Colon Rectum.* 2009;52:520.
145. Jordan KW, Cheng LL. NMR-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer. *Exp Rev Proteomics.* 2007;4:389-400.
146. Kaelin WG, Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:673- 82.

147. Kaelin WG, Jr. SDH5 mutations and familial paraganglioma: somewhere Warburg is smiling. *Cancer Cell*. 2009;16:180-2.
148. Karasek D, Fryszak Z, Pacak K. Genetic testing for pheochromocytoma. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12:456–64.
149. Kendrick ML, Lloyd R, Erickson L, Farley DR, Grant CS, Thompson GB, et al. Adrenocortical carcinoma: surgical progress or status quo? *Arch Surg*. 2001;136:543-9.
150. Keun HC, Beckonert O, Griffin JL, Richter C, Moskau D, Lindon JC, et al. Cryogenic probe ¹³C-NMR spectroscopy of urine for metabolomic studies. *Analytical chemistry*. 2002;74:4588- 93.
151. Keun HC, Ebbels TM, Antti H, Bollard ME, Beckonert O, Schlotterbeck G, et al. Analytical reproducibility in (1)H NMR- based metabolomic urinalysis. *Chem Res Toxicol*. 2002;15:1380- 6.
152. Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:463-70.
153. Kim S, Salibi N, Hardie AD, Xu J, Lim RP, Lee VS & Taouli B 2009 Characterization of adrenal pheochromocytoma using respiratory-triggered proton MR spectroscopy: initial experience. *AJR Am J Roentgenol* 192 450-4.
154. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3:177-85.
155. Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, et al. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J Natl Cancer Inst*. 2002;95:358-68.
156. Koek MM, Muilwijk B, van Stee LL, Hankemeier T. Higher mass loadability in comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry for improved analytical performance in metabolomics analysis. *J Chromatogr A*. 2008;1186:420-9.
157. Korobkin M, Brodeur FJ, Francis IR, Quint LE, Dunnick NR, Goodsitt M. Delayed enhanced CT for differentiation of benign from malignant adrenal masses. *Radiology*. 1996;200:737-42.

158. Korobkin M, Brodeur FJ, Yutzy GG, Francis IR, Quint LE, Dunnick NR, et al. Differentiation of adrenal adenomas from nonadenomas using CT attenuation values. *AJR Am J Roentgenol*. 1996;166:531-6.
159. Korobkin M, Lombardi TJ, Aisen AM, Francis IR, Quint LE, Dunnick NR, et al. Characterization of adrenal masses with chemical shift and gadolinium-enhanced MR imaging. *Radiology*. 1995;197:411-8.
160. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*. 2008;13 :472-82.
161. Kurhanewicz J, Swanson MG, Nelson SJ, Vigneron DB. Combined magnetic resonance imaging and spectroscopic imaging approach to molecular imaging of prostate cancer. *J Magn Reson Imaging*. 2002;16:451.
162. Ladroue C, Carcenac R, Leporrier M, Gad S, Le Hello C, Galateau-Salle F, et al. PHD2 mutation and congenital erythrocytosis with paraganglioma. *N Engl J Med*. 2008;359:2685-92.
163. Lee JE, Berger DH, el-Naggar AK, Hickey RC, Vassilopoulou-Sellin R, Gagel RF, et al. Surgical management, DNA content, and patient survival in adrenal cortical carcinoma. *Surgery*. 1995;118:1090-8.
164. Lee MJ, Hahn PF, Papanicolaou N, Egglin TK, Saini S, Mueller PR, et al. Benign and malignant adrenal masses: CT distinction with attenuation coefficients, size, and observer analysis. *Radiology*. 1991;179:415-8.
165. Lenders JW, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Pheochromocytoma. *Lancet*. 2005;366:665-75.
166. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem*. 2003;75:384A-91A.
167. Lo CY, Lam KY, Wat MS, Lam KS. Adrenal pheochromocytoma remains a frequently overlooked diagnosis. *Am J Surg*. 2000;179:212-5.
168. Lowe IJ. Free Induction Decays of rotating Solids. *Phys Rev Lett*. 1959;2:285-7.
169. Lui WO, Chen J, Glasker S, Bender BU, Madura C, Khoo SK, et al. Selective loss of chromosome 11 in pheochromocytomas associated with the VHL syndrome. *Oncogene*. 2002;21:1117-22.

170. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. Jan 28 2005;120:237-8.
171. Manger WM. An overview of pheochromocytoma: history, current concepts, vagaries, and diagnostic challenges. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1073:1-20.
172. Mannelli M, Ercolino T, Giache V, Simi L, Cirami C, Parenti G. Genetic screening for pheochromocytoma: should SDHC gene analysis be included? *J Med Genet*. 2007;44: 586-7.
173. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Ali A, et al. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:637-44.
174. Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, et al. ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed*. 2004;17:191-205.
175. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med*. 1999;341:1165-73.
176. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol*. 2005;15:300-8.
177. Mazurek S, Eigenbrodt E. The tumor metabolome. *Anticancer Res*. 2003;23:1149-54.
178. Miller RW, Young JL Jr, Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer*. 1995;75:395-405.
179. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*. 2002;296:1886-9.
180. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *Febs J*. 2007;274:1393-418.
181. Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Suzuki T, Abe T, Tanemoto M, et al. Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical

- carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. *Endocr J.* 2008;55:49-55.
182. Morriss GM, New DAT. Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1979;54:17-35.
183. Naressi A, Couturier C, Devos JM, Janssen M, Mangeat C, de Beer R. Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. *MAGMA.* 2001;12:141–52.
184. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, et al. Pheochromocytoma Study Group. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 2002;346:1459-66.
185. Neumann HP, Hoegerle S, Manz T, Brenner K, Iliopoulos O. How many pathways to pheochromocytoma? *Semin Nephrol.* 2002;22:89-99.
186. Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *Jama.* 2004;292:943-51.
187. Nicholson JK and Wilson ID. High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog. NMR Spectrosc.* 1989;21:449–501.
188. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Disc.* 2002;1:153-62.
189. Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC, Wilson ID. The challenges of modeling mammalian biocomplexity. *Nature Biotech.* 2004;22:1268–74.
190. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999;29:1181-9.
191. Nicholson JK, Wilson ID. Understanding 'global' systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism. *Nature Rev Drug Disc.* 2003;2:668–76.
192. Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, et al. Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* 2000;18:477-86.

193. Niemann S, Muller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet.* 2000;26:268-70.
194. Nolop KB, Rhodes CG, Brudin LH, Beaney RP, Krausz T, Jones T, et al. Glucose utilization in vivo by human pulmonary neoplasms. *Cancer.* 1987;60:2682-9.
195. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 1998;16:373-8.
196. Olsson A, Lind L, Thornell LE, Holmberg M. Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3-24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1666-72.
197. Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning (1)H NMR. *NMR Biomed.* 2008;21:1138-47.
198. Orbach D, Sarnacki S, Brisse HJ, Gauthier-Villars M, Jarreau PH, Tsatsaris V, Baruchel A, Zerah M, Seigneur E, Peuchmaur M, Doz F. Neonatal cancer. *Lancet Oncol.* 2013;1413:e609-20.
199. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3:187-97.
200. Pappa T, Papanastasiou L, Kaltsas G, Markou A, Tsounas P, Androulakis I, et al. Pattern of adrenal hormonal secretion in patients with adrenal adenomas: the relevance of aldosterone in arterial hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E537-45.
201. Park BK, Kim CK, Kim B, Lee JH. Comparison of delayed enhanced CT and chemical shift MR for evaluating hyperattenuating incidental adrenal masses. *Radiology.* 2007;243:760-5.
202. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321:1807-12.
203. Peczkowska M, Cascon A, Prejbisz A, Kubaszek A, Cwikla BJ, Furmanek M, et al. Extra-adrenal and adrenal pheochromocytomas associated with a

- germline SDHC mutation. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4:111-5.
204. Peet AC, McConville C, Wilson M, et al. ¹H MRS identifies specific metabolite profiles associated with MYCN-amplified and non-amplified tumour subtypes of neuroblastoma cell lines. *NMR Biomed* 2007;20:692–700.
205. Pena CS, Boland GW, Hahn PF, Lee MJ, Mueller PR. Characterization of indeterminate (lipid-poor) adrenal masses: use of washout characteristics at contrast-enhanced CT. *Radiology.* 2000;217:798-802.
206. Petri BJ, van Eijck CH, de Herder WW, Wagner A, de Krijger RR. Pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas. *Br J Surg.* 2009;96:1381-92.
207. Piotto M, Bourdonneau M, Furrer J, Bianco A, Raya J, Elbayed K. Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under magic angle spinning: effects of radial B1 inhomogeneities. *J Magn Reson.* 2001;149:114-8.
208. Piotto M, Moussallieh FM, Dillmann B, Imperiale A, Neuville A, Brigand C, Bellocq JP, Elbayed K, Namer IJ. Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics.* 2009;5:293-301.
209. Piotto M, Moussallieh FM, Imperiale A, Benahmed MA, Detour J, Bellocq JP, Namer IJ, Elbayed K. Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by proton high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance. Lutz NW, editor. Cambridge: Cambridge University Press. 2013; 496-524.
210. Polat B, Fassnacht M, Pfreundner L, Guckenberger M, Bratengeier K, Johanssen S, et al. Radiotherapy in adrenocortical carcinoma. *Cancer.* 2009;115:2816-23.
211. Pollard PJ, Wortham NC, Tomlinson IP. The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. *Ann Med.* 2003;35:632-9.
212. Pommier RF, Brennan MF. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. *Surgery.* 1992;112:963-70.
213. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in

- vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med.* 1993;30:672–9.
214. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003;9:677-84.
215. Qin Y, Yao L, King EE, Buddavarapu K, Lenci RE, Chocron ES, et al. Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet.* 2010;42:229-33.
216. Rao JU, Engelke U, Rodenburg R, Wevers R, Pacak K, Eisenhofer G, et al. Genotype-specific abnormalities in mitochondrial function associate with distinct profiles of energy metabolism and catecholamine content in pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res.* 2013;30:3787-95.
217. Ratiney H, Sdika M, Coenradie Y, Cavassila S, van Ormondt D, Graveron-Demilly D. Time-domain semi-parametric estimation based on a metabolite basis set. *NMR Biomed.* 2005;18:1–13.
218. Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, Spasojevic I, Yang J, Kinzler KW, et al. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:3270–5.
219. Reynolds CP. Ras and Seppuku in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:319-21.
220. Righi V, Durante C, Cocchi M, Calabrese C, Di Febo G, Lecce F, et al. Discrimination of healthy and neoplastic human colon tissues by ex vivo HR-MAS NMR spectroscopy and chemometric analyses. *J Proteom Res.* 2008;8:1859.
221. Robertson DG. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci.* 2005;85:809-22.
222. Rubingh, C. M., Bijlsma, S., Derks, E. P. P. A., et al. (2006). Assessing the performance of statistical validation tools for megavariate metabolomics data. *Metabolomics.* 2006;2:53-61.
223. Rustin P, Munnich A, RoÅNtig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:289-91.
224. Santos CF, Kuhranewicz J, Tabatabai ZL, Simko JP, Keshari KR, Gbegnon A, et al. Metabolic, pathologic, and genetic analysis of prostate tissues: Quantitative evaluation of histopathologic and mRNA integrity after HR-MAS spectroscopy. *NMR Biomed.* 2010;23:391-8.

225. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, et al. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12:667-80.
226. Schulick RD, Brennan MF. Adrenocortical carcinoma. *World J Urol*. 1999;17:26-34.
227. Schulick RD, Brennan MF. Long-term survival after complete resection and repeat resection in patients with adrenocortical carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 1999;6:719-26.
228. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005;7:77-85.
229. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8:S62-7.
230. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88:593-602.
231. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:3329-35.
232. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, et al. International Neuroblastoma Pathology Classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001;92:2451-61.
233. Sitter B, Sonnewald U, Spraul M, Fjøsne HE, Gribbestad IS. High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR Biomed*. 2002;15:327.
234. Slattery JM, Blake MA, Kalra MK, Misdraji J, Sweeney AT, Copeland PM, et al. Adrenocortical carcinoma: contrast washout characteristics on CT. *AJR Am J Roentgenol*. 2006;187:W21-24.
235. Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:3930-42.

236. Soreide JA, Brabrand K, Thoresen SO. Adrenal cortical carcinoma in Norway, 1970-1984. *World J Surg.* 1992;16:663-7.
237. Spix C, Pastore G, Sankila R, Stiller CA, Steliarova-Foucher E. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer.* 2006;42:2081-91.
238. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res.* 2009;15:431-40.
239. Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Nissan A, Marshall D, Dudas M, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization. *J Clin Oncol.* 2002;20:941-50.
240. Strong VE, Kennedy T, Al-Ahmadie H, Tang L, Coleman J, Fong Y, et al. Prognostic indicators of malignancy in adrenal pheochromocytomas: clinical, histopathologic, and cell cycle/apoptosis gene expression analysis. *Surgery.* 2008;143:759-768.
241. Swanson MG, Vigneron DB, Tabatabai ZL, Males RG, Schmitt L, Carroll PR, et al. Proton HR-MAS Spectroscopy and Quantitative Pathologic Analysis of MRI/3D-MRSI-Targeted Postsurgical Prostate Tissues. *Magn Reson Med.* 2003;50:944.
242. Swanson MG, Zektzer AS, Tabatabai ZL, Simko JP, Jarso S, Keshari KR, et al. Quantitative analysis of prostate metabolites using ¹H HR-MAS spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2006;55:1257.
243. Tabarin A, Bardet S, Bertherat J, Dupas B, Chabre O, Hamoir E, et al. Exploration and management of adrenal incidentalomas. French Society of Endocrinology Consensus. *Ann Endocrinol.* 2008;69:487-500.
244. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, et al. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356:2372-80.
245. Terzolo M, Bovio S, Pia A, Reimondo G, Angeli A. Management of adrenal incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23:233-43.
246. Tessem MB, Selnæs KM, Sjørusen W, Tranø G, Giskeødegård G, Bathen TF, Gribbestad IS & Hofslie E (2010) Discrimination of patients with microsatellite instability colon cancer using ¹H HR MAS MR spectroscopy and chemometric analysis. *J Prot Res.* 2010;9:3664-70.

247. Thompson CB. Metabolic enzymes as oncogenes or tumor suppressors. *N Engl J Med.* 2009;360:813-5.
248. Tischler AS. Pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma: updates. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:1272-84.
249. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlempine K, Fumey G, Hagnere AM, et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2005;65:7622-7.
250. Tomlins AM, Foxall PJD, Lindon JC, Lynch MJ, Spraul M, Everett JR, et al. High resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance analysis of intact prostatic hyperplastic and tumour tissues. *Anal Commun.* 1998;35:113.
251. Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J Chemom.* 2002;16:119–28.
252. van der Harst E, Bruining HA, Jaap Bonjer H, van der Ham F, Dinjens WN, Lamberts SW, et al. Proliferative index in phaeochromocytomas: does it predict the occurrence of metastases? *J Pathol.* 2000;191:175-80.
253. van der Harst E, de Krijger RR, Bruining HA, Lamberts SW, Bonjer HJ, Dinjens WN, et al. Prognostic value of RET proto-oncogene point mutations in malignant and benign, sporadic phaeochromocytomas. *Int J Cancer.* 1998;79:537-40.
254. van der Mey AG, Maaswinkel-Mooy PD, Cornelisse CJ, Schmidt PH, van de Kamp JJ. Genomic imprinting in hereditary glomus tumours: evidence for new genetic theory. *Lancet.* 1989;2:1291-4.
255. van der Veen JW, de Beer R, Luyten PR, van Ormondt D. Accurate quantification of in vivo ³¹P NMR signals using the variable projection method and prior knowledge. *Magn Reson Med.* 1988;6:92–8.
256. van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenaabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:487-97.
257. van Nederveen FH, Korpershoek E, Deleeuw R, Verhofstad AA, Lenders JW,

- Dinjens W, et al. Array-CGH in sporadic benign pheochromocytomas. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16:505-13.
258. van Nederveen FH, Gaal J, Favier J, Korpershoek E, Oldenburg RA, de Bruyn EM, et al. An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol*. 2009;10:764-71.
259. van Nederveen FH, Korpershoek E, Lenders JW, de Krijger RR, Dinjens WN. Somatic SDHB mutation in an extraadrenal pheochromocytoma. *N Engl J Med*. 2007;357:306-8.
260. van't Sant HP, Bouvy ND, Kazemier G, Bonjer HJ, Hop WC, Feelders RA, et al. The prognostic value of two different histopathological scoring systems for adrenocortical carcinomas. *Histopathology*. 2007;51:239-45.
261. Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell*. 1999;3:159-67.
262. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol*. 2001;21:5899-912.
263. Vanhamme L, van den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson*. 1997;129:35-43.
264. Vermeersch KA, Styczynski MP. Applications of metabolomics in cancer research. *J Carcinog*. 2013;18:12-9.
265. Vincent-Dejean C, Cazabat L, Groussin L, Perlempoine K, Fumey G, Tissier F, et al. Identification of a clinically homogenous subgroup of benign cortisol-secreting adrenocortical tumors characterized by alterations of the protein kinase A (PKA) subunits and high PKA activity. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:829-39.
266. Volante M, Buttigliero C, Greco E, Berruti A, Papotti M. Pathological and molecular features of adrenocortical carcinoma: an update. *J Clin Pathol*. 2008;61:787-93.

267. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124:269-70.
268. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123:309-314.
269. Weinhouse S. The Warburg hypothesis fifty years later. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol*. 1976;87:115-26.
270. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:18782-7.
271. Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: Human metabolome database. *Nucleic Acids Res* 2007;35:D521–D526 (Database issue).
272. Wishart DS. Human Metabolome Database: completing the 'human parts list'. *Pharmacogenomics*. 2007;8:683-6.
273. Wishart DS. Quantitative metabolomics using NMR. *Trends Anal Chem*. 2008;27:228-37.
274. Wold S, Hellberg S, Dunn WJ 3rd. Computer methods for the assessment of toxicity. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1983;52:158-189.
275. Wold S. Chemometrics, why, what and where to next? *J Pharm Biomed Anal*. 1991;9:589-96.
276. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360:765-73.
277. Young WF, Jr. Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med*. 2007;356:601-10.
278. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9630-5.
279. Yun J, Johnson JL, Hanigan CL, Locasale JW. Interactions between epigenetics and metabolism in cancers. *Front Oncol*. 2012;2:1-10.
280. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol*. 2007;178:93-105.

281. Zhang J, Sattler M, Tonon G, Grabher C, Lababidi S, Zimmerhackl A, et al. Targeting angiogenesis via a c-Myc/hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent pathway in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2009;69:5082-90.

ANNEXES

ANNEXE 1

Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh FM, Neuville A, Piotto M, Bellocq JP, Lutz P and Namer IJ.

Metabolomic pattern of childhood neuroblastoma obtained by 1H-High-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy.

Pediatr Blood Cancer. 2011;56:24-34.

Metabolic Pattern of Childhood Neuroblastoma Obtained by ¹H-High-Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) NMR Spectroscopy

Alessio Imperiale, MD,^{1,2*} Karim Elbayed, PhD,³ François-Marie Moussallieh, Pharm D,^{1,3} Agnès Neuville, MD,⁴ Martial Piotto, PhD,^{3,5} Jean-Pierre Bellocq, MD,⁴ Patrick Lutz, MD,⁶ and Izzie-Jacques Namer, MD, PhD^{1,2}

Background. The aim of this preliminary study is to characterize by ¹H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy (HRMAS) the metabolic content of intact biopsy samples obtained from 12 patients suffering from neuroblastoma (NB). **Procedure.** The biochemical NB profile was first compared to normal adrenal medulla. In a second step, the relationship between the tumor metabolic profile and the patients' clinical data was investigated. **Results.** A higher level of creatine, glutamine/glutamate, acetate and glycine characterized NB biopsies while healthy adrenal medulla tissue contained adrenaline and a larger amount of ascorbic acid. Adrenaline, which was undetectable in NB spectra, represented the metabolic signature of normal adrenal medulla. NB from patients younger than 12 months contained a higher level of acetate and lysine. Conversely, higher amounts of glutathione, glutamate, myo-

inositol, glycine, serine and ascorbic acid were detected in NB samples belonging to younger children. Glutamine/glutamate, aspartate, creatine, glycine were characteristic of stage I–II NB. Acetate and creatine were characteristic of stage IV NB. Finally, a relatively higher amount of aspartate, succinate, and glutathione was detected in patients alive without active disease after a mean follow-up of 7 years whereas a higher concentration of acetate and taurine was characteristic of patients with worse prognosis. **Conclusions.** Our preliminary results suggest the existence of a complex metabolic reality in NB, probably representative of tumor behavior. However, the real impact of these promising results should be assessed by long-term prospective studies on a larger cohort of patients. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:24–34. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: adrenal medulla; childhood malignancy; HRMAS; neuroblastoma; NMR; spectroscopy

INTRODUCTION

Neuroblastoma (NB) is one of the most common and lethal extracranial solid tumors of early childhood. According to the Automated Childhood Cancer Information System [1] the age-standardized incidence rate of NB in Europe in 1988–1997 was of 10.9 cases per million children, being highest in infants (52.6). NB arises from sympathetic nervous system tissues like adrenal medulla and paraspinal sympathetic nodes in the neck, chest and pelvis [2–5]. The clinical course of children with NB is highly variable, ranging from spontaneous regression or maturation into benign lesions to a rapid and dramatic metastatic spread [6,7]. The prognosis for patients with NB depends on several parameters such as the clinical stage of the disease, patient age at diagnosis and regional lymph node involvement for patients older than 1 year. Other potential prognostic variables include the site of the primary tumor as well as the catecholamine metabolite excretion ratio and the lactate dehydrogenase levels [6,7]. More recently, genetic and epigenetic prognosis factors have been identified such as the amplification of the *MYCN* oncogene, the tumoral cell ploidy as well as the loss of heterozygosity of 11q or 1p chromosome in tumor tissues [6].

Multimodal medical imaging plays a primary role in the management of children with NB. Computed tomography (CT), magnetic resonance (MR) and molecular imaging are successfully used for the assessment of tumor extension, both at primary staging and during follow-up [8–10]. Noninvasive imaging techniques also play a role, during the earlier phase of the treatment, in the selection of patients responding to conventional chemotherapy as opposed to the ones requiring alternative therapeutic strategies [11].

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) can improve the understanding of the metabolic characteristics of the tissue that are directly related to tumor behavior. The potential value of *in vivo* and *in vitro* MRS has been previously documented in human and animal models of NB and other neuroectodermal tumors such as gliomas. Furthermore, MRS appears as a powerful non-invasive technique to investigate specific biochemical pathways in tumors and to

predict the response to chemotherapy [12–17]. Unfortunately, the low spectral resolution of MRS only allows for the detection of a small number of molecules. Therefore, this technique might not be able to define with sufficient details the tumor characteristics. On the other hand, ¹H high-resolution magic angle spinning (HRMAS) is a nuclear magnetic resonance (NMR) technique that allows the characterization of the metabolic phenotype of intact cells, tissues and organs, from the analysis of intact tissue biopsy [18]. HRMAS NMR provides important biochemical information related to the regulation of specific gene transcripts that are altered in the genome of the tumor [19]. Multivariate statistical analysis applied to the whole NMR spectrum permits the assessment of the metabolic biomarkers responsible for the classification of the different tissues. To date, only a few applications of HRMAS NMR to pediatric brain and nervous system tumors have been described in the literature. Peet and coworkers showed the interest and the potential applications of HRMAS NMR in the evaluation of childhood NB in two recent studies by identifying not only the tumor metabolic profile, but also the specific biochemical fingerprint of *MYCN*-amplified and non-amplified tumor subtypes of NB cell lines [20,21].

¹Biophysics and Nuclear Medicine Department, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France; ²University of Strasbourg, CNRS LINC FRE 3289, Strasbourg, France; ³University of Strasbourg, Institut de Chimie, CNRS UMR 7177, Strasbourg, France; ⁴Pathology Department, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France; ⁵Bruker Biospin, Wissembourg, France; ⁶Pediatric Oncology Department, University Hospitals of Strasbourg, France

Conflict of interest: Nothing to declare.

*Correspondence to: Alessio Imperiale, Service de Biophysique et de Médecine Nucléaire, Hôpital de Hautepierre, 1, Avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France.

E-mail: alessio.imperiale@chru-strasbourg.fr

Received 20 October 2009; Accepted 30 April 2010

© 2011 Wiley-Liss, Inc.

DOI 10.1002/pbc.22668

Published online 14 October 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

In the present study we have assessed, by means of HRMAS NMR, the metabolite profile of tumor tissue samples obtained from a cohort of 12 patients affected by NB. This work was performed with a twofold aim: (1) to define the NB biochemical profile with respect to normal adrenal medulla; (2) to establish the potential relationships existing between the NB metabolic profile and patients' clinical data such as: age at diagnosis, disease stage, and long term survival.

METHODS

Patients Population

Among all the patients affected with NB which were admitted in our Pediatric Oncology Department for primary staging, 12 children (9 boys, 3 girls; median age: 10 months; age range: 0.3–182 months) were retrospectively selected for this preliminary investigation according to the five following criteria: (1) final diagnosis of NB according to pathological criteria of the International Classification [22,23], (2) absence of both medical and surgical treatment before obtaining the tumor sample for HRMAS analysis, (3) tumor tissue sample acceptable to perform a correct HRMAS analysis (viable tumor/necrosis ratio), (4) tissue specimens collected immediately (≤2 min) after surgery and snap-frozen in liquid nitrogen before storage at –80°C, and (5) absence of pollution of tissue samples by the histopathological fixing medium.

Among the 12 selected patients, 5 were younger than 12 months at diagnosis. The tumor developed in the retroperitoneum in 10 children. The adrenal gland was the primary tumoral site in seven of them. For the remaining two patients, NB originated from the thoracic or neck paraspinal sympathetic nodes. According to the International Neuroblastoma Staging System [24], seven patients were classified as stage 1, one patient as stage 2A and four patients as stage 4. Tumor was undifferentiated and poorly differentiated in respectively three and nine cases. *MYCN* gene amplification was determined by Southern blot analysis of the number of copies of the gene. Tumors with cells containing >10 copies of *MYCN* were considered as amplified. Among the 12 selected children, only one showed *MYCN* amplification. In our cohort, the clinical mean follow-up was 7 years (follow-up range: 1.5–13 years). During this period, three patients died, one is currently treated for a major relapse and eight are free of disease at the time of redaction of the article. Table I summarizes the main clinical characteristics of the selected patient cohort.

Human medullary adrenal tissue, which was obtained from subjects who underwent both nephrectomy and adrenalectomy, was used as normal control. Due to the retrospective nature of our study and to the difficulty in obtaining tissue sample from adrenal medulla that was properly stored after surgery, only three specimens (from three different patients) of normal adrenal medulla were available for HRMAS analysis.

Tissue Samples Collection and Preparation

Dissected tumor specimens were snap-frozen in liquid nitrogen immediately (≤2 min) after surgery and then stored at –80°C. The amount of tumor tissue used for HRMAS analysis ranged from 15 to 20 mg. Each biopsy sample was introduced into a 30 μl disposable insert. Ten microliters of D₂O were added to the rotor to

TABLE I. Summary of the Clinical Characteristics of the Patient Population

Pt no.	Sex (M/F)	Age at diagnosis (months)	Disease stage (I–IV)	Primary tumor localization (HN/TH/AP)	Primary tumor origin (Adr/ExAdr)	Tumor differentiation	MKI (1–3)	MYCN (Am/NAAm)	Survival status (CR/R/D)	Follow-up (years)
1	M	38	IV	AP	Adr	Undifferentiated	1	NAAm	MR	3
2	M	36	IV	AP	Adr	Poorly diff.	1	NAAm	D	2
3	F	23	IV	AP	Adr	Poorly diff.	1	Am	D	1.5
4	M	18	I	TH	ExAdr	Poorly diff.	1	NAAm	CR	13
5	F	18	I	AP	Adr	Poorly diff.	2	NAAm	CR	10
6	M	0.3	I	AP	ExAdr	Undifferentiated	1	NAAm	CR	12
7	F	3	I	AP	Adr	Poorly diff.	2	NAAm	CR	11
8	M	182	IV	AP	ExAdr	Poorly diff.	1	NAAm	D	4
9	M	8	I	AP	Adr	Poorly diff.	1	NAAm	CR	9
10	M	4	I	HN	ExAdr	Poorly diff.	1	NAAm	CR	8
11	M	0.5	I	AP	ExAdr	Undifferentiated	1	NAAm	CR	8
12	M	13	IIA	AP	Adr	Poorly diff.	2	NAAm	CR	4

Pt, patient; HN, head-neck; TH, thorax; AP, abdomino-pelvis; Adr, adrenal; ExAdr, extra adrenal; diff., differentiated; MKI, mitosis-karyorrhexis index; MKI 1, low; MKI 2, intermediate; MKI 3, high; Am, amplified; NAAm, not amplified; CR, complete remission; MR, major relapse; D, death.

provide a lock frequency for the NMR spectrometer. The exact weight of sample used was determined by weighting the empty rotor and the rotor containing the biopsy. The insert was stored at -80°C and placed into a 4 mm ZrO_2 rotor just before the HRMAS analysis.

HRMAS: Technical Features

HRMAS spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz and equipped with a 4 mm double resonance (^1H , ^{13}C) gradient HRMAS probe. A Bruker Cooling Unit is used to regulate the temperature by cooling down the bearing air flowing into the probe. To minimize the effects of tissue degradation, all *ex vivo* spectra were acquired at a temperature of 4°C . This value was calibrated exactly using a 100% methanol sample. All NMR experiments were conducted on samples spinning at 3,502 Hz in order to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest and to minimize sample degradation.

For each biopsy sample, a one-dimensional proton spectrum using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence with a presaturation of the water signal was acquired as previously reported [25]. The inter-pulse delay between the 180° pulses of the CPMG pulse train was synchronized with the sample and set to 285 μsec ($1/\omega = 1/3,502 = 285 \mu\text{sec}$) in order to eliminate signal losses due to B_1 inhomogeneities [26,27]. The number of loop was set to 328 giving the CPMG pulse train a total length of 93 msec. Parameters for the CPMG experiment were: sweep width 14.2 ppm, number of points 32k, relaxation delay 2 sec, and acquisition time 2.3 sec. A total of 128 FID were acquired resulting in an acquisition time of 10 min. All spectra were recorded in such a manner that only a zero phase order correction was necessary to properly phase the spectrum. The FID was multiplied by an exponential weighing function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. Spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm.

In order to confirm resonance assignments, two-dimensional homonuclear and heteronuclear experiments were also recorded on eight samples immediately after the end of 1D spectra acquisition. 2D DIPS12 spectra [28] were acquired with a 170 msec acquisition time, a 60 msec mixing time, a 14.2 ppm spectral width and a 1.5 sec relaxation delay. Thirty-two transients were averaged for each of the 512 increments during t_1 , corresponding to a total acquisition time of 8 h. Data were zero filled to a $2\text{k} \times 1\text{k}$ matrix and weighted with a shifted square sine bell function prior to Fourier transformation. 2D ^1H - ^{13}C HSQC experiments using echo-antiecho gradient selection for phase-sensitive detection were acquired using a 73 msec acquisition time with GARP ^{13}C decoupling and a 1.5 sec relaxation delay [29]. A total of 128 transients were averaged for each of 256 t_1 increments, corresponding to a total acquisition time of 15 h. Two 1 msec sine-shaped gradient pulses of strength 40 and 10.05 G/cm were used in the experiment. Data were zero-filled to a $2\text{k} \times 1\text{k}$ matrix and weighted with a shifted square sine bell function before Fourier transformation.

Statistical Analysis

HRMAS NMR signals were bucketed into integral regions of 0.01 ppm width (ppm range: 7.95–6.75 and 4.7–0.5) using the AMIX 3.8 software (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany)

and exported into SIMCA P (version 11.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). To accommodate the influence of metabolites present in both high and low concentrations, without emphasizing spectral noise, unit variance scaling was employed for all analyses.

Principal component analysis (PCA) and Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) were conducted on 1D HRMAS CPMG NMR spectra of NB and normal adrenal medulla. PCA is an unsupervised statistical method commonly used to classify biological samples. However, PCA tends to generate a model with a large number of principal components, making the analysis of the variances along the different axis sometime difficult. PLS-DA is a supervised analysis procedure incorporating prior knowledge of class identity that maximizes the separation between groups, rather than explaining the maximum variation in the data. PLS-DA is able to differentiate two classes according to the pathological effect of interest using a relatively small number of components (2 or 3). Given the fact that the number of variables is usually much larger than the number of samples, there is clearly a risk of overfitting the data. However, when building a statistical PLS-DA model, the number of principal components is determined by cross-validation. This means that samples are kept out of model development and tested using the model. This procedure significantly limits the risks of overfitting by limiting the number of principal components. In the course of the PLS-DA analysis the class membership of every sample was iteratively predicted and the results were used to generate a goodness of the fit measure (Q^2) of the overall model where $Q^2 = (1 - \text{PRESS}/\text{SS})$. PRESS is the predicted squared sum of error and represents the squared differences between observed and predicted Y values when the samples are kept out and SS is the residual sum of squares of the previous dimension. Even if the theoretical maximum is 1 for a perfect prediction, a $Q^2 > 0.5$ is generally considered as good predictor for PLS components. Finally, a circular validation was performed for each model. A model was considered as valid if the regression line obtained by random circular permutation of the Y values showed a negative slope and if all the estimated Q^2 were lower than the original one.

In our study, PLS-DA was initially performed on the whole set of variables in order to select those with a real discriminating power. Afterwards, a second PLS-DA analysis, based on the variables determined previously, was used to classify tissue samples according to the following factors: (1) histology (NB and control healthy adrenal), (2) patient age at diagnosis (below or above 1 year), (3) stage of disease (stage I–II or IV), and (4) patient outcome (long-term free disease survival or major relapse/death). Finally, a PCA analysis was performed on the whole biopsy cohort using only data points corresponding to the previously selected metabolites in order to validate the PLS-DA results by an unsupervised statistical technique.

RESULTS

NB and Healthy Adrenal Tissue

The mean 1D HRMAS CPMG spectra of both NB and healthy medullary adrenal tissue are presented in Figure 1. A representative 2D HSQC spectrum of the two types of tissues is presented in Figure 2. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature [30,31]. From the analysis of all NB and healthy control biopsies, 35 different metabolites were identified between 7.95–6.75 and 4.7–0.5 ppm (Table II).

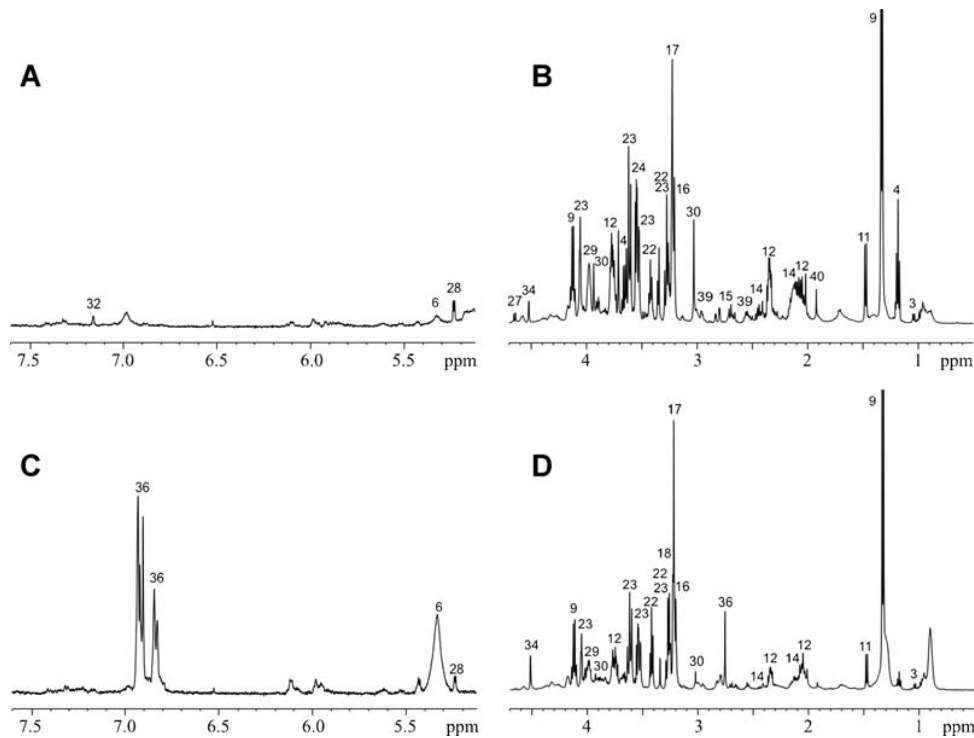


Fig. 1. Mean 1D ¹H CPMG HRMAS spectra of neuroblastoma (A,B) and healthy adrenal medulla (C,D) tissues. Partial metabolite assignment is indicated. The numbers refer to the metabolites listed in Table II. The metabolic content of healthy and cancerous biopsies can be directly compared since the intensity of each spectrum was normalized with respect to the weight of biopsy present in each sample.

These spectra show that NB are characterized by a higher level of creatine, glutamine/glutamate, acetate, and glycine. Correspondingly, healthy tissues contain adrenaline and a larger amount of ascorbic acid. The adrenaline complex, which is undetectable in all NB spectra (Figs. 1 and 2), represents the metabolic signature of normal adrenal medulla.

A PLS-DA analysis was performed on the CPMG data in the 7.95–6.75 and the 4.7–0.5 ppm range (12 NB and 3 normal adrenal medulla). The analysis generated a two-component PLS-DA model characterized by a faithful representation of the Y data ($R^2Y = 0.97$) and a good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2 = 0.76$). The score plot of the PLS-DA model showed a very clear separation of the two sets of biopsies. Indeed, the PLS-DA model revealed a statistically significant elevation of creatine, glutamine/glutamate, acetate, and glycine in NB compared to healthy tissues. Apart from a higher amount of ascorbic acid, the main metabolic signature of adrenal medulla consisted in the presence of adrenaline which was undetectable in all NB specimens.

A second two-component PLS-DA model was built using only the most discriminant metabolites previously determined (Fig. 3). The resulting PLS-DA model was characterized by the same R^2Y value (0.97) and a better cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2 = 0.86$).

Following this classification process, a three component PCA analysis was performed on the whole biopsy cohort using only data points corresponding to creatine, glutamine/glutamate, acetate, glycine, ascorbic acid and adrenaline. The PCA model showed a differentiation between tumoral and control biopsies ($R^2X = 0.55$ and $Q^2 = 0.30$) (Fig. 3).

Patient Age at Diagnosis

According to the age of the patient at diagnosis, two groups were defined: children younger ($n = 7$) and older ($n = 5$) than 12 months. A PLS-DA analysis was performed on the CPMG data (4.7–0.5 ppm) obtained from the whole set of NB biopsies. The analysis generated a two components PLS-DA model showing an accurate representation of the data ($R^2Y = 0.96$) and a good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2 = 0.64$). A statistically significant elevation of glutathione, glutamate, myo-inositol, glycine, serine and ascorbic acid was detected in tissue samples belonging to the seven younger children. Conversely, a higher concentration of acetate and lysine was evidenced in the five patients older than 1 year.

A second PLS-DA model was built using only the most discriminant metabolites (Fig. 3). The resulting two components PLS-DA model was characterized by $R^2Y = 0.99$ and $Q^2 = 0.90$.

A two components PCA analysis was subsequently performed using only the data points corresponding to glutathione, glutamate, myo-inositol, glycine, serine, ascorbic acid, acetate, and lysine. PCA was able to differentiate, in an unsupervised manner, biopsies from younger (<1 year) and older patients (>1 year) ($R^2X = 0.53$ and $Q^2 = 0.2$). Figure 3 represents the score plot of the PCA model showing a clear separation of the two classes of biopsies.

Disease Stage and Patient Outcome

In our population, patients' disease stage at diagnosis was accurately correlated to prognosis. Indeed, three out of four stage IV

TABLE II. ¹H NMR Resonance Assignments of the Metabolites Present in Neuroblastoma and Healthy Human Adrenal Medulla

	Metabolites	Group	¹ H chemical shift (ppm)	¹³ C chemical shift
1	Isoleucine	δCH ₃	0.94	13.79
		γCH ₃	1.01	17.29
		γCH ₂	1.51	27.30
2	Leucine	αCH	3.65	62.34
		δCH ₃	0.95	23.43
		δ'CH ₃	0.91	24.52
		γCH	1.70	—
3	Valine	βCH ₂	1.70	42.37
		αCH	3.73	56.06
		γCH ₃	0.98	19.16
4	Ethanol	γ'CH ₃	1.04	20.65
		βCH	2.30	31.94
		CH ₃	1.18	19.47
5	Fatty acids (a)	CH ₂ OH	3.66	60.16
		(2)CH ₂	1.29	34.53
6	Fatty acids (b)	(1)CH ₂	1.31	25.36
		(2)CH ₂	2.03	27.35
7	Fatty acids (a) (b)	CH ₂	2.80	28.16
		(1)CH	5.33	130.51
		(2)CH	5.33	132.20
		(n)CH ₂	1.29	32.40
8	Fatty acids (c)	(2)CH ₂	1.60	27.30
9	Lactate	CH ₃	1.33	22.70
		CH	4.12	71.11
10	Lysine	γCH ₂	1.43	24.21
		δCH ₂	1.71	29.10
		βCH ₂	1.89	32.56
11	Alanine	εCH ₂	3.01	41.80
		βCH ₃	1.48	18.81
12	Glutamate	αCH	3.78	53.22
		βCH ₂	2.05	29.74
		γCH ₂	2.34	35.95
13	MethionineεCH ₂	αCH	3.76	57.20
		2.12	16.61	—
14	Glutamine	βCH ₂	2.14	—
		γCH ₂	2.44	33.48
		αCH ₂	3.77	—
15	Aspartic acid	βCH ₂ (u)	2.70	39.17
		βCH ₂ (d)	2.80	39.17
		αCH	3.90	54.93
16	Choline	-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.21	—
		βCH ₂	3.52	69.96
		αCH	4.06	58.27
17	Phosphorylcholine	-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.22	56.52
		βCH ₂	3.60	68.98
		αCH	4.16	60.60
18	Glycerophosphocholine	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.23	—
		αCH ₂	4.32	62.19
		βCH ₂	3.69	68.50
		CH ₂ -HPO ₄ (d)	3.88	69.10
		CH ₂ OH	3.91	73.24
		CH ₂ -HPO ₄ (u)	3.95	69.10
19	Arginine	γCH ₂	1.70	26.75
		βCH ₂	1.92	30.15
		δCH ₂	3.21	43.27
20	Taurine	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.26	50.13
		-CH ₂ -SO ₃ ⁻	3.42	38.06
21	Proline	δCH ₂ (u)	3.32	48.83
		δCH ₂ (d)	3.41	48.83
		αCH	4.10	64.39
22	Scyllo-inositol	All Hs	3.35	76.32
23	Myo-inositol	C ₅ H	3.27	77.00

TABLE II. (Continued)

	Metabolites	Group	¹ H chemical shift (ppm)	¹³ C chemical shift
		C ₁ H, C ₃ H	3.54	73.84
		C ₄ H, C ₆ H	3.61	75.06
		C ₂ H	4.06	74.85
24	Glycine	αCH	3.56	44.09
25	Threonine	αCH	3.60	63.04
		βCH	4.24	68.67
26	Glycerol	1,3 CH ₂ OH(u)	3.56	65.09
		1,3 CH ₂ OH(d)	3.65	65.09
		–CH(OH)–	3.78	74.85
27	β-Glucose	C ₄ H	3.43	72.58
		C ₃ H, C ₅ H	3.47	78.44
		C ₆ H(u)	3.75	63.44
		C ₆ H(d)	3.89	63.44
		C ₁ H	4.65	—
28	α-Glucose	C ₁ H	5.23	—
29	Serine	αCH	3.84	59.12
		βCH	3.97	62.88
30	Creatine	CH ₃	3.03	39.64
		CH ₂	3.93	56.36
31	Asparagine	αCH	4.00	54.15
32	Tyrosine	αCH	3.92	58.72
		CH 3,5	6.87	118.50
		CH 2,6	7.16	133.37
33	Phenylalanine	CH 2,6	7.30	131.81
		C ₄	7.37	131.49
34	Ascorbic acid	CH ₂ OH	4.02	72.12
		C ₄ H	4.52	—
35	Succinic acid	(α,β,CH ₂)	2.40	—
36	Adrenaline	CH ₃ –NH	2.76	65.61
		C ₄ H	6.84	120.93
		C ₃ H	6.92	118.88
		C ₆ H	6.93	116.26
37	Uracil	C ₅ H	5.78	103.65
		C ₆ H	7.53	146.66
38	N-Acetyl aspartate	CH ₃	2.04	24.65
		αCH	4.37	55.90
39	Glutathione	CH ₂ –CONH	2.54	33.79
		CH ₂ –SH	2.95	28.20
		CH–NH ₂	3.78	46.03
40	Acetate	CH ₃	1.92	25.97

Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature [17,20].

children died, and one developed a major relapse during follow-up. Consequently, the statistical analysis was performed according to different criteria: (1) normal adrenal tissues versus NB specimens from stage I–II and stage IV children, in separate and independent manner; (2) NB specimens from dead or relapsing children (stage IV) versus NB specimens from free-disease patients after a mean follow-up of 9 years (stage I–II), reflecting both the overall survival and disease stage effect.

Healthy Adrenal and NB Stages I–II and IV

Two independent PLS-DA analysis (two components each) of the CPMG data applied to the 7.95–6.75 and the 4.7–0.5 ppm ranges were able to differentiate control tissues (n = 3) from stage I to II (n = 8) or stage IV (n = 4) NB samples, showing accurate representation of the data and good cumulative confidence criterion of prediction: (a) control versus stage I–II: R²Y = 0.90,

Q² = 0.80; (b) control versus stage IV: R²Y = 0.96, Q² = 0.77.

A statistically significant elevation of glutamine/glutamate, aspartate, creatine, glycine was detected in stage I–II NB samples. Acetate and creatine mainly contributed to the discrimination of stage IV NB from healthy control. Adrenaline remained the most specific metabolite for normal tissue characterization, associated to ascorbate, glycerophosphocoline and fatty acids.

PLS-DA and PCA models (two components each) were then built using only the most discriminant metabolites and the following promising results were achieved: (a) control versus stage I–II: R²Y = 0.99, Q² = 0.93 for PLS-DA and R²X = 0.65, Q² = 0.33 for PCA; (b) control versus stage IV: R²Y = 0.99, Q² = 0.89 for PLS-DA and R²X = 0.77, Q² = 0.36 for PCA.

Figure 4 represents the score plot of the PLS-DA and PCA models. A clear separation between the two classes of biopsies by both supervised and unsupervised approaches is indeed achieved.

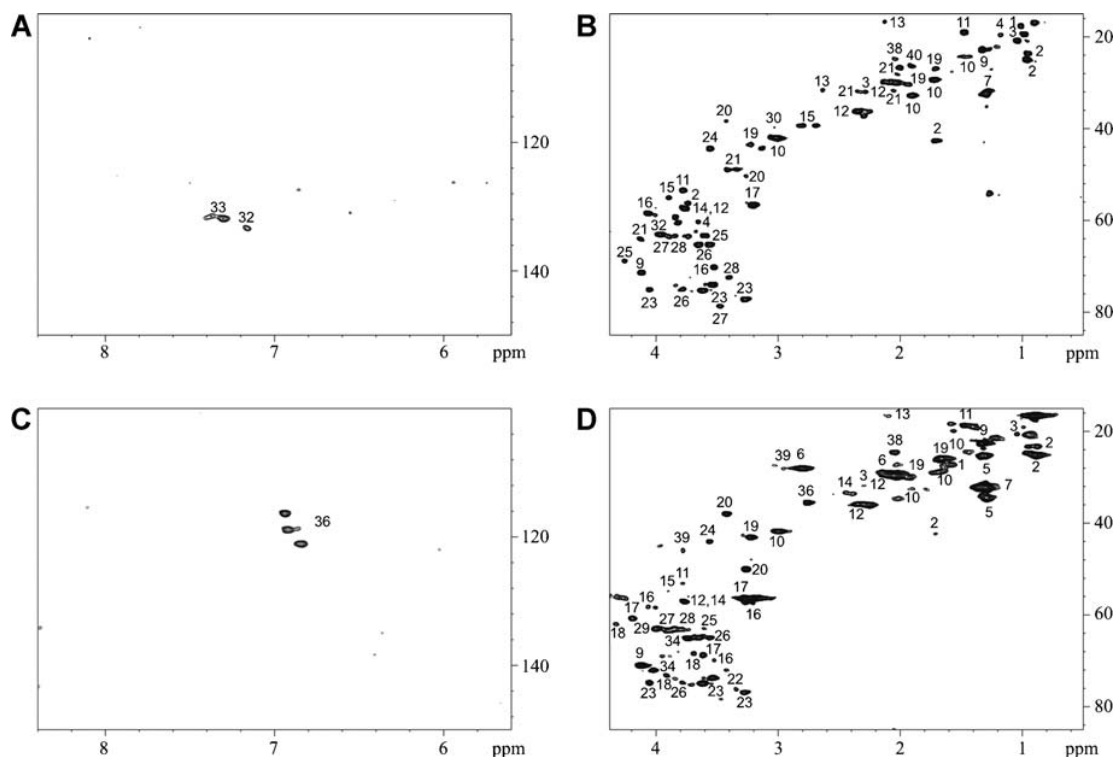


Fig. 2. Representative 2D ^1H - ^{13}C HSQC HRMAS spectra of neuroblastoma (A,B) and healthy adrenal medulla (C,D) tissues. Partial metabolite assignment is indicated. The numbers refer to the metabolites listed in Table II.

Patient Late Outcome

Based on patients' long-term survival (mean follow-up of 7 years), two groups were defined as follows: (a) patients who died or had a major relapse ($n = 4$) and (b) patients with complete remission ($n = 8$). A PLS-DA analysis (two components, $R^2Y = 0.90$, $Q^2 = 0.30$) was performed on the CPMG data (4.7–0.5 ppm region) obtained from the whole set of NB biopsies, showing a relative higher amount of aspartate, succinate, and glutathione in patients without active disease. Conversely, a higher concentration of acetate and taurine was present in the four patients with worse prognosis. A second PLS-DA model, which was created using only the most discriminant metabolites, was characterized by $R^2Y = 0.90$ and $Q^2 = 0.62$. A three components PCA analysis was successfully performed using only data points corresponding to aspartate, succinate, glutathione, acetate and taurine ($R^2X = 0.67$ and $Q^2 = 0.20$). PLS-DA and PCA results are graphically presented in Figure 4.

DISCUSSION

In this work, we have analyzed by HRMAS NMR tissue samples of childhood NB obtained by diagnostic biopsy from 12 untreated children. The first goal of this study was to characterize the metabolic profile of childhood NB. Although the metabolic fingerprint of NB has previously been studied using both *in vivo* and *in vitro* MRS and HRMAS NMR [12–17][20,21,32], the characteristics of NB were only assessed with respect to brain and nervous system tumors. In our study, we have compared childhood NB to healthy tissues that have the same neuroectodermal embryological origin as the adrenal

medulla. This approach allowed for the characterization of the biochemical pattern of the physiological adrenergic tissue. Its specific signature is the presence of adrenaline whose resonances are particularly evident in the 7–6.5 ppm region of the NMR spectrum. The second aim of our study was to explore the potential relationships existing between the NB metabolite profile and the patients' clinical data such as the age at diagnosis, the disease stage and the long-term survival. To our knowledge, no previous work has reported such an exhaustive correlation study between HRMAS NMR data and clinical parameters of children with NB. Nevertheless, given the small number of samples, we must still consider the results of our work as preliminary.

Multivariate statistical analysis was applied to all the NMR spectra obtained from NB and healthy adrenal tissue. This type of analysis allows classifying the samples into two different groups according to their metabolic profile. The metabolites responsible for the classification appear clearly in such an analysis. It is necessary to stress that the discriminating power of each metabolite is linked to its relative difference in concentration between the two groups (i.e., NB vs. healthy control). Therefore, a metabolite present in low concentration in one group but completely absent in the other one will play a major role in discriminant analysis. Conversely, a metabolite detected in high concentration in both groups will be less significant in the clustering process (inconsistent relative difference).

The metabolic fingerprint of NB was characterized by general metabolic markers of malignancy such as choline-containing compounds, which are linked to an increased phospholipid turnover, but also by biochemical markers representative of fermentative processes and increased glycolytic activity such as lactate and

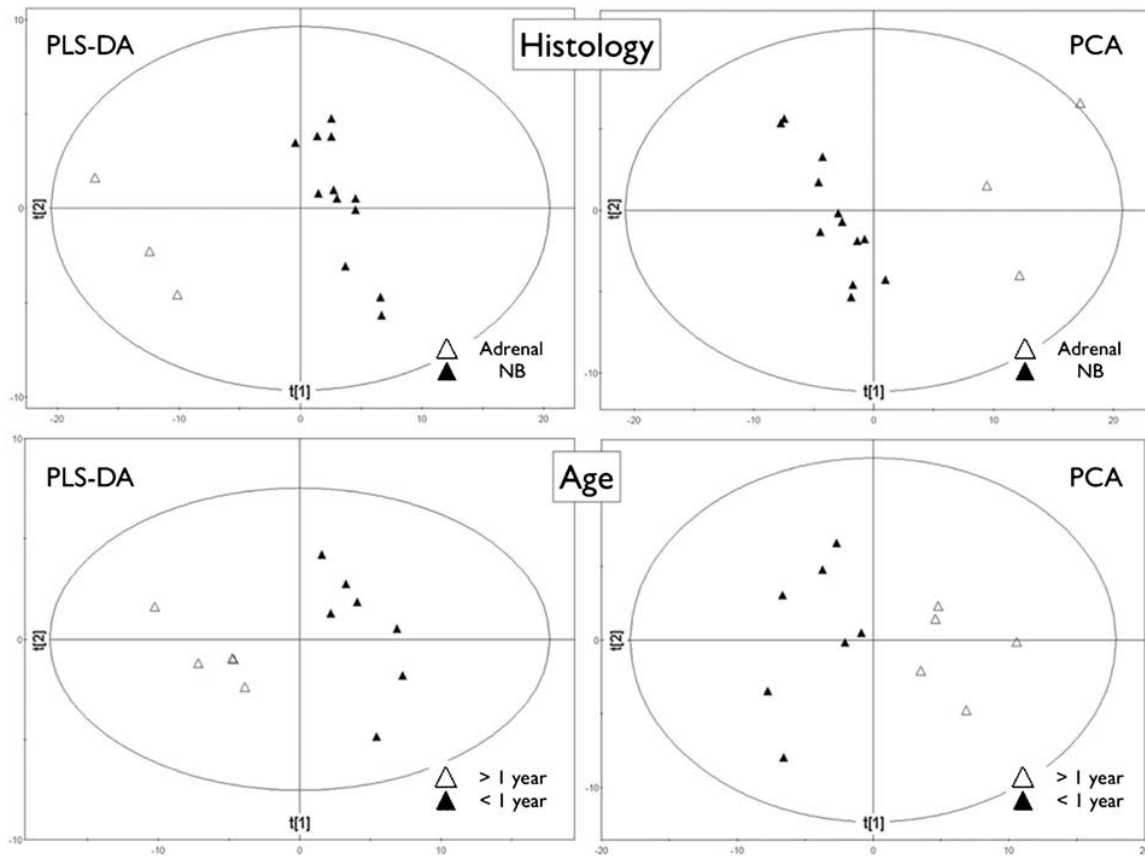


Fig. 3. PLS-DA and PCA models obtained when classifying neuroblastoma and healthy adrenal biopsies according to histopathological criteria (**upper panel**) and neuroblastoma biopsies according to patient age at diagnosis: older or younger than 1 year (**lower panel**).

glucose. The abundance of amino acids resonance peaks suggested an increase in amino acids production via non-oxidative pathways. The increased rate of protein degradation related to cell death, which is particularly evident in large and necrotic tumors, or the deregulation of the Krebs cycle, may explain the altered amino acid concentration observed in NB biopsies. Lipids, creatine, taurine, myoinositol, glycerol, glutamine/glutamate, and acetate were also present, playing an important complementary role in defining the metabolic profile of NB.

In 1995, Florian et al. [32] determined the metabolic characteristics of three types of human brain and nervous system tumors by high-resolution in vitro MRS and chromatographic analysis. Signals from leucine, isoleucine, glycine, valine, threonine, lactate, acetate, glutamate, and choline-containing compounds were similarly detected in meningiomas, glioblastomas, and NB. Intense signals from creatine were exclusively found in spectra obtained from perchloric extracts of NB cells. In our experiments, creatine was relatively more abundant in NB tissue than in control biopsies, especially in stage IV patients. Furthermore, creatine played a role in the statistical recognition of children with a bad prognosis.

In our study, the signals of the glutamate/glutamine complex were also present in NB tissue. A possible explanation is that some human NB cell lines are able to convert glutamate to GABA [33]. Roberts et al. [34] reported for the first time the association between the GABAergic system and the clinical outcome in human models

of NB. These authors showed that a lower expression of GABAergic system genes was associated with both older age at diagnosis and decreased survival. The effective relationship between the degree of GABA concentration and patient age should be assessed in long-term prospective studies using a larger cohort of patients.

The spectral fingerprint of NAA was also detected in HSQC and DIPSI2 spectra suggesting the presence of NAA in both NB and healthy control specimen. The origin from primordial neural crest cells may explain the detection of NAA in both NB and adrenal medulla samples. In normal condition, NAA is found mainly in healthy neuron and has been reported as a neuronal marker.

The metabolic profile of the normal adrenal medulla has not been previously assessed by HRMAS NMR. Our study shows that adrenaline is the specific metabolic signature of normal adrenal medulla (Figs. 1 and 2). Adrenaline resonances were undetectable in all NB spectra. Interestingly, both tyrosine and dihydroxyphenylalanine (DOPA), which are direct metabolic precursors in the adrenaline synthetic pathway, were identified in NB specimens. Thus, we could hypothesize a lower activity of dopamine β -hydroxylase and/or phenylethanolamine-N-transferase that are key role enzymes in adrenaline synthesis starting from tyrosine. In this context, the low cellular differentiation could account for the low adrenaline production and the consequent increase of intermediate metabolites.

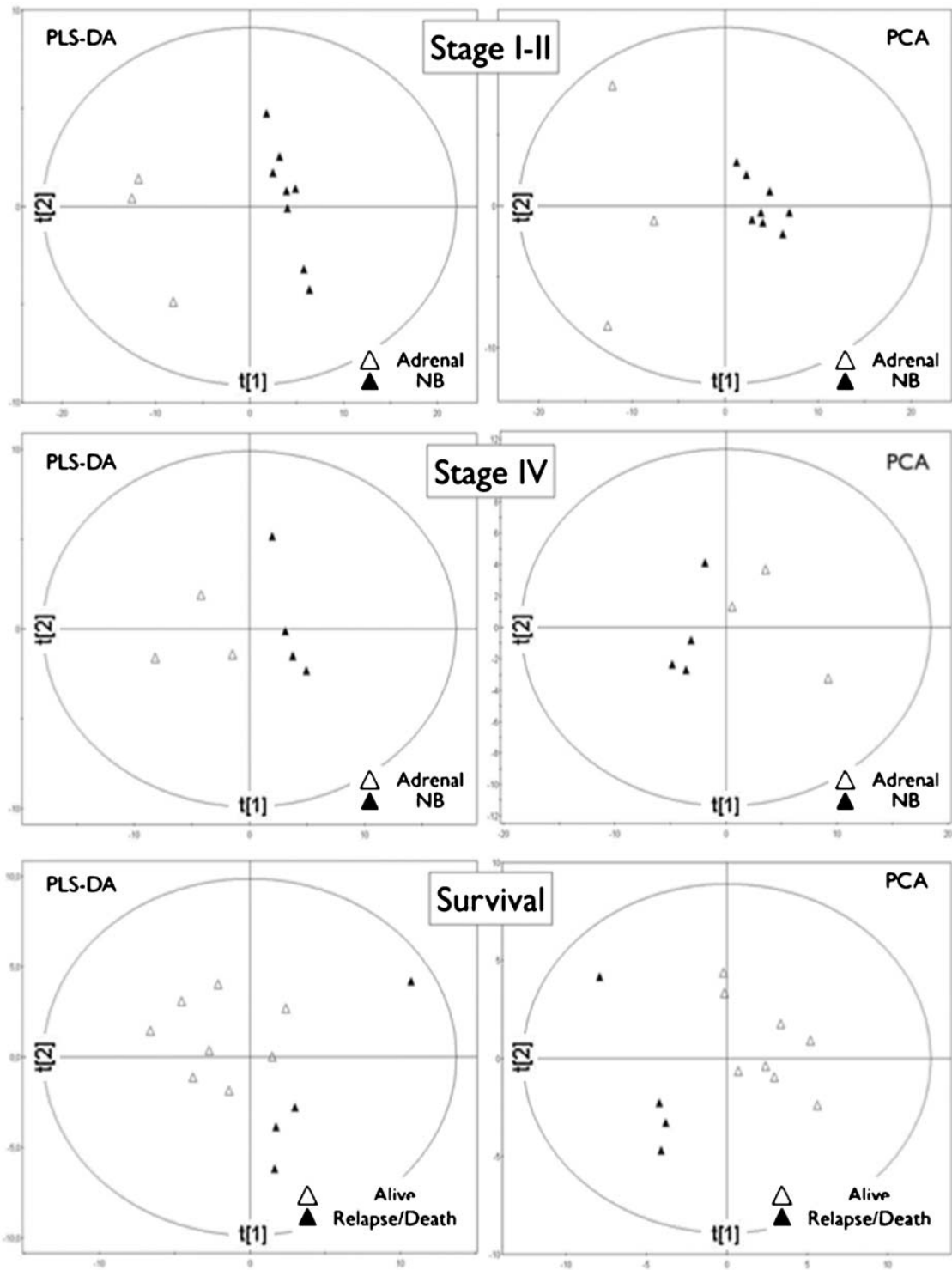


Fig. 4. PLS-DA and PCA models obtained when classifying neuroblastoma and healthy adrenal biopsies according to disease stage in separate and independent manner (**upper and middle panels**) and neuroblastoma biopsies according to patient long term survival: death/major relapse and complete remission after a mean follow-up of 9 years (**lower panel**).

In 2007, Peet et al. [20] reported the results of in vitro HRMAS investigations performed on cell suspension of 13 lines of NB possessing multiple genetic alterations. In their study, a specific metabolite profile associated with *MYCN*-amplified and non-amplified tumor subtypes was described. Phosphocholine and taurine concentration ratios relative to total choline were found to be significantly more elevated in the *MYCN*-amplified as compared to the *MYCN*-non-amplified cell lines, suggesting that choline and taurine molecular pathways could be potential therapeutic targets. Unfortunately, only one NB of our cohort showed *MYCN* amplification, thus *MYCN* was not included in the statistical analysis. According to our results, taurine and acetate concentrations are more elevated in NB, particularly in children older than 1 year at the time of diagnosis and in stage IV patients. Even if taurine is physiologically implicated in neurodevelopment [35], its role in NB pathophysiology remains undetermined. The esterification of acetate to form acetyl coenzyme A (acetyl CoA) as a major precursor in beta-oxidation for fatty acid synthesis is believed to be the main mechanism of acetate incorporation in tumors. Nevertheless, alternative biochemical pathways of acetate intake or accumulation may include the Krebs cycle and the synthesis of cholesterol through citrate. Further studies using radiolabeled acetate could represent an interesting axis of research in NB animal models to assess metabolic responses to novel targeted drugs such as specific metabolic modulators.

Recently, Wilson et al. [21] identified the key differences in the metabolite profiles of pediatric glial and primitive neuro-ectodermal tumors by HRMAS NMR analysis. These authors provided an accurate biochemical characterization useful to improve our understanding of tumor molecular pathways, which are potential targets for drug development. According to previously published results obtained from the analysis of NB cell lines [20], Wilson and coworkers showed the presence of high taurine concentration in NB tissue, underlining its possible role in tumor development. The existence of high tissue heterogeneity in the same tumor, a major characteristic of human malignancy, could in theory reduce the accuracy of our HRMAS NMR results. However it has recently been reported that for NB, there is a smaller variability in metabolite concentrations within a given tumor than between different tumors [21]. This result pleads for a biochemical characterization of NB by HRMAS NMR.

The small number of samples and the lack of a prior hypothesis make however this study a very preliminary investigation. The metabolic profile of NB found in three patients who ultimately died cannot be considered as predictive of fatal issue. A larger cohort of patients will be absolutely necessary to confirm these first observations. In addition, the relative lack of tissue available for both high stage tumors and *MYCN* amplified tumors means that the most clinically important tumors with a particularly poor prognosis are not adequately represented.

In conclusion, our preliminary results suggest the existence of a complex metabolomic reality in NB, representative of tumor behavior and probably related to established clinical prognosis factors. However, the real impact of these interesting results should be assessed in long-term prospective studies of a larger cohort of patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the CARMEN project and was supported by grants from Région Alsace, Oséo, Communauté Urbaine de

Strasbourg, Conseil Départemental du Bas-Rhin, Bruker BioSpin, University of Strasbourg and University Hospitals of Strasbourg. The technical assistance of Mrs. F. Ackerman, Mrs. H. Kada, and Mrs. TT. Tong is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Spix C, Pastore G, Sankila R, et al. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978–1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* 2006;42:2081–2091.
- Miller RW, Young JL, Jr., Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer* 1995;75:395–405.
- Grovas A, Fremgen A, Rauck A, et al. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. *Cancer* 1997;80:2321–2332.
- Shimada H, Umehara S, Monobe Y, et al. International Neuroblastoma Pathology Classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: A report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 2001;92:2451–2461.
- Goto S, Umehara S, Gerbing RB, et al. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and *MYCN* status in patients with peripheral neuroblastic tumors: A report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 2001;92:2699–2708.
- Cotterill SJ, Pearson ADJ, Pritchard J, et al. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: Results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982–1992. *Eur J Cancer* 2000;36:901–908.
- Adams GA, Shochat SJ, Smith EI, et al. Thoracic neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Surg* 1993;28:372–377.
- Hiorns MP, Owens CM. Radiology of neuroblastoma in children. *Eur Radiol* 2001;11:2071–2081.
- Goo HW. Whole-body MRI of neuroblastoma. *Eur J Radiol* 2009;23 [Epub ahead of print].
- Kushner BH. Neuroblastoma: A disease requiring a multitude of imaging studies. *J Nucl Med* 2004;45:1172–1188.
- Taggart DR, Han MM, Quach A, et al. Comparison of iodine-123 metaiodobenzylguanidine (MIBG) scan and ¹⁸F fluorodeoxyglucose positron emission tomography to evaluate response after iodine-131 therapy for relapsed neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:5343–5349.
- Lindskog M, Kogner P, Ponthan F, et al. Noninvasive estimation of tumor viability in a xenograft model of human neuroblastoma with proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS). *Br J Cancer* 2003;88:478–485.
- Vaidya SJ, Payne GS, Leach MO, et al. Potential role of magnetic resonance spectroscopy in assessment of tumor response in childhood cancer. *Eur J Cancer* 2003;39:728–735.
- Lindskog M, Spenger C, Jarvet J, et al. Predicting resistance or response to chemotherapy by proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1457–1466.
- Lindskog M, Spenger C, Klason T, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma: Current status, prospects and limitations. *Cancer Lett* 2005;228:247–255.
- Maris JM, Evans AE, McLaughlin AC, et al. ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopic investigation of human neuroblastoma in situ. *N Engl J Med* 1985;312:1500–1505.
- Naruse S, Hirakawa K, Horikawa Y, et al. Measurements of in vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectra in neuroectodermal tumors for the evaluation of the effects of chemotherapy. *Cancer Res* 1985;45:2429–2433.
- Nicholson JK, Wilson ID. Understanding 'global' systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism. *Nature Rev Drug Discov* 2003;2:668–676.

19. Griffin JL, Shocker JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4:551–561.
20. Peet AC, McConville C, Wilson M, et al. ¹H MRS identifies specific metabolite profiles associated with MYCN-amplified and non-amplified tumour subtypes of neuroblastoma cell lines. *NMR Biomed* 2007;20:692–700.
21. Wilson M, Davies NP, Brundler MA, et al. High resolution magic angle spinning ¹H NMR of childhood brain and nervous system tumours. *Mol Cancer* 2009;8:6.
22. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. Terminology and morphologic criteria of Neuroblastic tumors: Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999;86:349–363.
23. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer* 1999;86:364–372.
24. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group. *J Clin Oncol* 1991;9:581–591.
25. Piotto M, Moussallieh FM, Dillmann B, et al. Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* 2009;5:292–301.
26. Elbayed K, Dillmann B, Raya J, et al. Field modulation effects induced by sample spinning: Application to high-resolution magic angle spinning NMR. *J Magn Reson* 2005;174:2–26.
27. Piotto M, Bourdonneau M, Furrer J, et al. Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under magic angle spinning: Effect of radial B1 inhomogeneities. *J Magn Reson* 2001;149:114–118.
28. Shaka AJ, Lee CJ, Pines A. Iterative schemes for bilinear operators: application to spin decoupling. *J Magn Reson* 1988;77:274–293.
29. Davis AL, Keeler J, Laue ED, et al. Experiments for recording pure absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *J Magn Reson* 1992;98:207–216.
30. Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, et al. ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 2004;17:191–205.
31. Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: Human metabolome database. *Nucleic Acids Res* 2007;35:D521–D526 (Database issue).
32. Florian CL, Preece NE, Bhakoo KK, et al. Characteristic metabolic profiles revealed by ¹H NMR spectroscopy for three types of human brain and nervous system tumours. *NMR Biomed* 1995;8:253–264.
33. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, et al. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 1978;38:3751–3757.
34. Roberts SS, Mori M, Pattee P, et al. GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2004;22:4127–4134.
35. Wharton BA, Morley R, Isaacs EB, et al. Low plasma taurine and later neurodevelopment. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89:F497–F498.

ANNEXE 2

Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh FM, Reix N, Piotto M, Bellocq JP, Goichot B, Bachellier P and Namer IJ.

Metabolomic profile of the adrenal gland: from physiology to pathological conditions.

Endocr Relat Cancer. 2013;20:705-716.

Metabolomic profile of the adrenal gland: from physiology to pathological conditions

Alessio Imperiale^{1,2}, Karim Elbayed², François-Marie Moussallieh^{1,2}, Nathalie Reix^{2,3}, Martial Piotto^{2,4}, Jean-Pierre Bellocq⁵, Bernard Goichot⁶, Philippe Bachellier⁷ and Izzie-Jacques Namer^{1,2}

¹Department of Biophysics and Nuclear Medicine, Strasbourg University Hospitals, Hôpital de Hautepierre, 1, Avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France

²ICube, University of Strasbourg/CNRS (UMR 7357), FMTS – Faculty of Medicine, Strasbourg, France

³Laboratory of Hormonology, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France

⁴Bruker Biospin, Wissembourg, France

⁵Department of Pathology, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France

⁶Department of Internal Medicine, Diabetes and Metabolic Disorders, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France

⁷Department of Visceral Surgery and Transplantation, Strasbourg University Hospitals, Strasbourg, France

Correspondence should be addressed to A Imperiale
Email
alessio.imperiale@chru-strasbourg.fr

Abstract

In this study, we i) assessed the metabolic profile of the normal adrenal cortex and medulla of adult human subjects by means of ¹H-high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance (HRMAS NMR) spectroscopy; ii) compared the biochemical profile of adenoma (Ad), adrenal cortical carcinoma (ACC), and pheochromocytoma (PCC) samples with that of healthy adrenal tissue samples; and iii) investigated the metabolic differences between ACCs and Ads as well as between ACCs and PCCs. Sixty-six tissue samples (13 adrenal cortical tissue, eight medullary tissue, 13 Ad, 12 ACC, and 20 PCC samples) were analyzed. Adrenaline and noradrenaline were undetectable in cortical samples representing the metabolic signature of the tissue derived from neural crest. Similarity between the metabolic profile of Ads and that of the normal adrenal cortex was shown. Inversely, ACC samples clearly made up a detached group exhibiting the typical stigmata of neoplastic tissue such as choline-containing compounds, biochemical markers of anaerobic processes, and increased glycolysis. Significantly higher levels of lactate, acetate, and total choline-containing compounds played a major role in the differentiation of ACCs from Ads. Moreover, the high fatty acid content of ACCs contributed to the cluster identification of ACCs. Of the 14 sporadic PCC samples, 12 exhibited predominant or exclusive noradrenaline secretion. The noradrenaline:adrenaline ratio was inverted in the normal medullary tissue samples. Multiple endocrine neoplasia type 2- and NF1-related PCC samples exhibited both adrenaline and noradrenaline secretion. In the von Hippel–Lindau disease-related PCC samples, only noradrenaline secretion was detected by HRMAS NMR spectroscopy. This study is one of the first applications of metabolomics to adrenal pathophysiology and it is the largest study to report HRMAS NMR data related to the adrenal cortex and adrenal cortical tumors.

Key Words

- ▶ pheochromocytoma
- ▶ adrenal cortical carcinoma
- ▶ adrenal adenoma
- ▶ HRMAS
- ▶ metabolomics

Endocrine-Related Cancer
(2013) 20, 705–716

Introduction

The adrenal gland is a fascinating organ with two functionally distinct structures called the adrenal cortex and medulla, each with its own embryonic origin. While the adrenal cortex derives from mesoderm, the adrenal medulla is composed of chromaffin cells originating from neural crest tissue.

Tumors originating from the adrenal cortex are commonly classified as functional or nonfunctional with a variable degree of malignancy. The most clinically relevant adrenocortical pathologies are adenomas (Ads) and adrenal cortical carcinomas (ACCs). While ACCs are relatively rare and extremely aggressive tumors, Ads are more frequently found and always benign. There is no evidence that Ads degenerate into malignant lesions (Young 2007, Lloyd 2011). The rarity of the disease and the presence of special variants (pediatric, oncocytic, myxoid, and sarcomatoid) complicate the pathological diagnosis of ACCs. Accurate discrimination between atypical adrenal cortical Ads and malignant ACCs in patients without gross evidence of malignancy can be difficult (Roman 2006). Nowadays, ACCs are being diagnosed based on the recognition of at least three of nine morphological parameters using light microscopy, according to the Weiss scoring system (Weiss et al. 1989, Papotti et al. 2011). Nevertheless, diagnostic accuracy could be reduced in borderline cases with only one or two Weiss criteria, particularly for nonexpert pathologists.

In adults, tumors originating from the adrenal medulla are mainly functional and called pheochromocytomas (PCCs). Although it is well established that the malignancy rate depends on the patient's genetic background, presently no marker of malignant potential is completely defined. The presence of metastases is indispensable to identify patients with malignant disease who require a more aggressive therapeutic approach. Finally, the combination of various clinical, biochemical, and/or histological markers can indicate an aggressive tumor behavior (Korevaar & Grossman 2011).

Briefly, for both cortical and medullary neoplasms, the degree of malignancy is estimated according to the histological features clinical stage (particularly size) of the tumors and functional tests (McNicol 2011). Genetic and molecular alterations have been the subject of several studies, without, however, definitive conclusions being reached (Stratakis 2003, 2005, Lombardi et al. 2006).

¹H-high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance (HRMAS NMR) spectroscopy can characterize the metabolic phenotype of intact cells,

tissues, and organs from the analysis of an intact tissue sample (Nicholson & Wilson 2003). HRMAS NMR spectroscopy provides biochemical information related to the regulation of specific gene transcripts that are altered in the tumoral genome (Griffin & Shockor 2004), generating great interest on the part of both the scientific and medical communities, particularly in oncology (Claudino et al. 2012, O'Connell 2012). At present, very limited data are available concerning the adrenal tissue. A few applications of HRMAS NMR spectroscopy to pediatric neuroblastomas have been described in the literature (Peet et al. 2007, Wilson et al. 2009, Imperiale et al. 2011). More recently, Timmers' team has reported an *in vitro* ¹H-NMR spectroscopic study exploring the genotype-specific abnormalities in mitochondrial function associated with distinct profiles of energy metabolism and catecholamine content in PCCs and paragangliomas (Rao et al. 2013). To date, to the best of our knowledge, no other HRMAS NMR investigations concerning healthy adrenal tissue and the related pathologies have been reported, particularly regarding the adrenal cortex.

In this study, we first assessed the metabolic profile of both normal adrenal cortex and medulla of adult human subjects using HRMAS NMR spectroscopy. Then, we compared the biochemical pattern of healthy tissue with the profiles obtained from the Ad, ACC, and PCC samples. Finally, we investigated the differences between ACCs and Ads as well as between ACCs and PCCs.

Subjects and methods

Tissue samples analyzed

Among all the adrenal specimens collected in the tumor bank of the Strasbourg University Hospital until January 2010, 66 tissue samples including normal adrenal cortical and medullary tissue, Ad, ACC, and PCC samples were retrospectively selected for this study according to the following criteria: i) final diagnosis according to the pathological standards; ii) absence of both medical and surgical treatment before obtaining the tumor sample for HRMAS analysis; iii) tissue specimens collected after surgery and snap-frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C ; and iv) tissue samples not contaminated by the histopathological fixing medium.

Of the 66 tissue specimens analyzed, 13 normal adrenal cortical and eight normal medullary tissue samples were obtained from subjects who underwent

both nephrectomy and adrenalectomy for localized and early-stage renal cell carcinoma. The other 45 tissue samples included 13 Ad, 12 ACC, and 20 PCC samples.

In the Ad group, four samples were aldosterone-secreting Ads. No hormonal hypersecretion was associated with the remaining nine cases. The mean size of Ads determined during pathological examination was 3.3 cm (range 1.5–6 cm). The mean age of the patients during adrenal surgery was 53 years (range 43–76 years).

In the ACC group, six of the 12 samples were secreting tumors. The mean size of ACCs determined during pathological examination was 12 cm (range 6–24 cm). In all the cases, the Weiss score was ≥ 4 . Seven patients exhibited a locoregional involvement associated with nodal metastases. In the remaining five cases, ACC was confined to the adrenal gland at the time of surgery. Of these, three patients exhibited a systemic metastatic spread about 1 year later and two patients were free of disease during the first 5 years of postsurgical follow-up. The mean age of the patients during adrenal surgery was 62 years (range 32–80 years).

Finally, in the PCC group, all the 20 samples were secreting tumors. In 14 of the 20 patients, no somatic mutation associated with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2) and von Hippel–Lindau (VHL) disease was identified at the time of diagnosis. Moreover, no mutations in any of the succinate dehydrogenase complex subunit genes were identified in these patients. No case had a positive family history of nonsyndromic PCCs or paragangliomas. Hence, PCCs were considered as sporadic in 14 cases. On the other hand, PCCs were associated with MEN2 in two patients, Recklinghausen's disease (NF1) in two patients, and VHL disease in the remaining two cases. In all the 20 included patients, no metastatic spread was observed both at diagnosis and during a follow-up of at least 5 years after surgery. The mean size of the PCCs determined during pathological examination was 6.2 cm (range 1.5–14 cm). The mean age of the patients during adrenal surgery was 36 years (range 29–63 years). The tumor secretion profile was determined according to the results of the presurgical biochemical tests for plasma free metanephrines and/or urinary fractionated metanephrines and catecholamines.

Tissue sample preparation for HRMAS NMR spectroscopy

The amount of tissue used for the HRMAS analysis ranged from 15 to 20 mg. For each sample, the percentage of tumor cells and the percentage of necrosis with regard to the total surface were calculated based on frozen sections

using a mirror sample stored in the tissue bank. Samples containing at least 30% tumor cells and $< 50\%$ necrosis were used for this study. Each tissue sample was introduced into a 30 μl disposable insert. Ten microliters of D_2O were added to the rotor to provide a lock frequency for the NMR spectrometer. The exact weight of the sample used was determined by weighing the empty insert and the insert containing the tissue sample. The insert was stored at -80°C and placed in a 4 mm ZrO_2 rotor just before the HRMAS analysis.

HRMAS NMR spectroscopy technical features

HRMAS NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz and equipped with a 4 mm double-resonance (^1H and ^{13}C) gradient HRMAS probe. A Bruker cooling unit was used to regulate the temperature by cooling down the bearing air flowing into the probe. To minimize the effects of tissue degradation, all *ex vivo* spectra were acquired at a temperature of 4°C . This value was calibrated exactly using a 100% methanol sample. To keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest and to minimize sample degradation, all NMR experiments were conducted on samples spinning at 3502 Hz. For each sample, a one-dimensional (1D) proton spectrum using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence with presaturation of the water signal was acquired as reported previously (Piotto *et al.* 2009). To eliminate signal losses due to B_1 inhomogeneity, the inter-pulse delay between the 180° pulses of the CPMG pulse train was synchronized with the sample and set to 285 μs (Piotto *et al.* 2001, Elbayed *et al.* 2005). The number of loops was set to 328, thus giving the CPMG pulse train a total length of 93 ms. The parameters for the CPMG experiment were set as follows: sweep width, 14.2 p.p.m.; number of points, 32k; relaxation delay, 2 s; and acquisition time, 2.3 s. A total of 128 free induction decays were acquired, resulting in an acquisition time of 10 min. Spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 p.p.m. In order to confirm resonance assignments, 2D homonuclear and heteronuclear experiments were also carried out immediately after the acquisition of 1D spectra. Because the duration of these experiments was long, they were conducted on only a few samples representative of each class of tissues and exclusively for signal assignment. Significant tissue degradation occurs during this long measurement time; therefore, ^1H CPMG experiments were completed before the 2D signal assignment experiments. Data were zero-filled to a $2\text{k} \times 1\text{k}$ matrix and

weighted with a shifted square sine-bell function before Fourier transformation. HRMAS NMR signals were bucketed into integral regions 0.01 p.p.m. wide (p.p.m. range 8.65–1) using the AMIX 3.8 Software (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany) and exported into SIMCA P (version 11.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). To accommodate the influence of metabolites present at both high and low concentrations, without emphasizing spectral noise, unit variance scaling was employed for all the analyses. Spectra were referenced for chemical shift according to the lactate peak.

Metabolite quantification procedure

Metabolites were quantified by means of a proprietary program based on a custom MATLAB algorithm in a Windows-based environment. The quantification procedure was based on the pulse length-based concentration measurement (PULCON) described previously by our team (Piotto *et al.* 2012). Spectra were normalized according to the weight of each sample and calibrated using the signal intensity of a 19.3 nmol reference solution of lactate, scanned under the same analytical conditions. The peak integral corresponding to each metabolite's region was normalized to the integral of the entire spectrum. For our experiments, only peaks that were well resolved in the 1D CPMG spectra were quantified. One pulse sequence was acquired in addition to the CPMG sequence for fatty acid (FA) estimation. Quantification results are expressed as nanomoles per milligram of tissue. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature (Martinez-Bisbal *et al.* 2004, Wishart *et al.* 2007).

To assess adrenaline concentrations in the tissue samples, the signal resulting from the N-methyl radical selected at 2.75 p.p.m. was considered. The 3,4-dihydroxybenzene group of both adrenaline and noradrenaline generates a spectral complex between about 6.85 and 6.98 p.p.m. The integral of the region corresponding to the ^1H in position 5 of the aromatic ring (IUPAC nomenclature) was selected to quantify the amount of adrenaline plus noradrenaline in each tissue sample. Finally, noradrenaline concentrations were determined by subtracting adrenaline concentrations from adrenaline plus noradrenaline concentrations. A negative value of noradrenaline indicates that there was no physical quantity, so the 0 value was assigned to noradrenaline for the statistical analysis. Dopamine could contribute to peaks in the region between 6.85 and 6.98 p.p.m. However, no triplets at 2.85 and 3.22 p.p.m., representing the spectral

signature of dopamine, were detected in HRMAS NMR spectra, suggesting the absence or an undetectable amount of dopamine in the analyzed tissue samples.

The above approach has been tested and confirmed (data not shown) previously using the quantification NMR analysis of adrenaline and noradrenaline standard solutions that were first separated and subsequently mixed (1/1, v/v).

Statistical analysis

The standardized metabolite concentration values are expressed as median and range. As has been widely suggested (Sitter *et al.* 2009, Beckonert *et al.* 2010), a combination of principal component analysis (PCA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) was employed.

A PCA was carried out to quickly evaluate the quality of the data and to identify possible outliers (Ebbels & Cavill 2009). Then, a PLS-DA was employed to optimize the separation between groups in each of the following six models: i) normal adrenal cortex vs medulla; ii) normal adrenal cortex vs Ads; iii) normal adrenal cortex vs ACCs; iv) ACCs vs Ads; v) normal adrenal medulla vs PCCs; and vi) ACCs vs PCCs. PLS-DA was initially carried out for the whole set of variables (i.e. metabolites) in order to select those with a real discriminating power. These metabolites were determined using the regression coefficient plot with 95% jackknifed CIs. Metabolites with a variable importance for projection (VIP) value ≥ 0.9 were selected and labeled VIP metabolites. Afterwards, a second PLS-DA, based on the VIP metabolites, was carried out to classify the samples. Cross-validation was used in each PLS-DA model to determine the number of components and to avoid overfitting the data because of the small number of samples. Two measurements of model quality were reported for PLS-DA: R^2Y and Q^2 , representing respectively the goodness of fit (i.e. data variation) and the goodness of prediction, as estimated by cross-validation. A value of $Q^2 \geq 0.5$ is generally considered a good predictor for PLS-DA components. The relationships between variables were assessed using the Spearman's rank test. Comparisons were computed using the nonparametric Mann-Whitney U test. The STATISTICA 7 (STATSOFT; www.statsoft.com) package was used for statistical data analysis. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The representative 1D HRMAS CPMG spectra of the normal adrenal cortical and medullary tissue, Ad, ACC,

and PCC samples are shown in Figs 1 and 2. A total of 24 identified metabolites were quantified from the spectra obtained from all the 66 tissue samples within the range of 8.65–1 p.p.m. (Table 1). Apart from peaks due to small water-soluble molecules, the acquired spectra displayed consistent broad resonances, which were attributed to three different FA moieties defined as a, b, and c (Martinez-Bisbal *et al.* 2004). Finally, five additional resolved signals that peaked at 1.14, 2.20, 3.36, 4.30, and 8.50 p.p.m. were visualized in the CPMG spectra without definitive metabolite attribution and therefore called $X_{1.14}$, $X_{2.20}$, $X_{3.36}$, $X_{4.30}$, and $X_{8.50}$.

Normal adrenal cortex vs normal medulla

Thirteen normal adrenal cortical and eight normal medullary tissue samples were included in the analysis. A two-component PLS-DA based on VIP metabolites was characterized by a faithful representation of the Y data ($R^2Y=0.8$) and a good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2=0.7$). The score plot of the PLS-DA model

showed a separation of the two sets of samples (Fig. 3). Normal medulla was characterized by a significantly higher abundance of adrenaline, noradrenaline, myo-inositol, glutamate, glutathione, lactate, succinic and ascorbic acids, creatine, scyllo-inositol, glutamine, taurine, glycine, total choline-containing compounds, and $X_{4.30}$, $X_{3.36}$, and $X_{8.50}$. The adrenal cortex was characterized by a higher level of FA (a) and (b). Both adrenaline and noradrenaline complexes were undetectable in all the cortical samples.

Normal adrenal cortex vs cortical Ads

Thirteen normal adrenal cortical tissue and 13 Ad samples were considered. According to visual analysis, spectra belonging to adrenal cortical tissue and Ad samples were mostly related. The two-component PLS-DA model based on VIP metabolites showed only incomplete separation between the two sets of samples (Fig. 3) and was characterized by a low goodness-of-prediction value ($Q^2=0.4$). Valine, alanine, aspartic acid, γ -aminobutyric

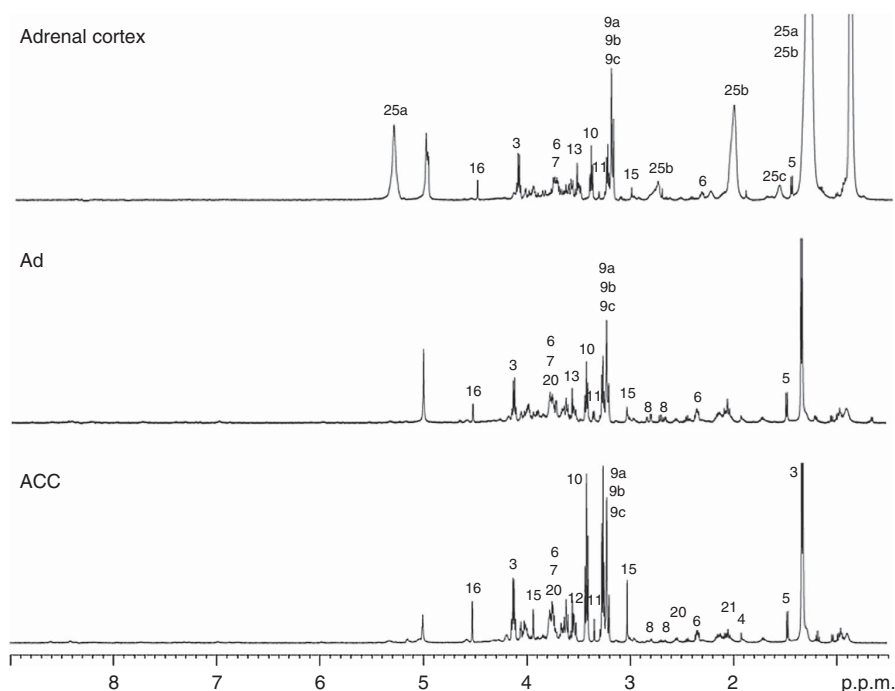


Figure 1

Representative 1D ^1H CPMG HRMAS spectra of healthy adrenal cortical tissue, Ad, and ACC samples. Partial metabolite assignment is indicated. The numbers refer to the metabolites listed in Table 1. The metabolic

content of healthy and cancerous tissues can be directly compared since the intensity of each spectrum was normalized with respect to the weight of the sample.

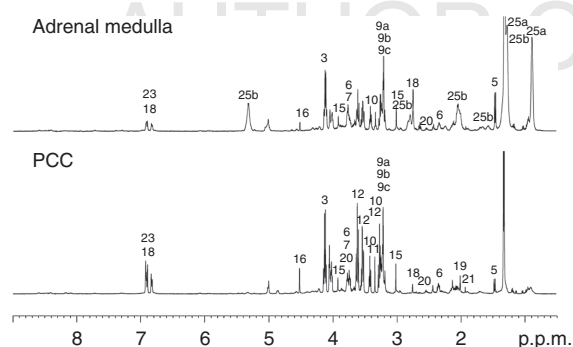


Figure 2

Representative 1D ^1H CPMG HRMAS spectra of both healthy adrenal medullary tissue and PCC samples. Partial metabolite assignment is indicated. The numbers refer to the metabolites listed in Table 1. The metabolic content of healthy and cancerous tissues can be directly compared since the intensity of each spectrum was normalized with respect to the weight of the sample.

acid (GABA), isoleucine, N-acetyl aspartate (NAA), acetate, lysine, $X_{2.20}$, and FA (a), (b), and (c) were significantly more abundant in the cortical samples. Succinic acid and $X_{3.36}$ were slightly more abundant in Ad samples, without, however, reaching statistical significance.

A two-component PLS-DA model based on VIP metabolites was built from Ad samples according to hormonal secretion (Fig. 4A; $R^2Y=0.72$ and $Q^2=0.44$). scyllo-Inositol and $X_{3.36}$ and $X_{4.30}$ characterized non-secreting Ad samples. On the other hand, glutamate, glutamine, GABA, $X_{2.20}$, and succinate were more abundant in secreting Ad samples. A statistically significant difference was found for $X_{3.36}$ and $X_{2.20}$, scyllo-inositol, GABA, and glutamate.

Normal adrenal cortex vs ACCs

Thirteen normal adrenal cortical tissue and 12 ACC samples were analyzed. The two tissue classes were clearly separated by a two-component PLS-DA based on VIP metabolites (Fig. 3), showing an accurate representation of the data and good cumulative confidence criterion of fit ($R^2Y=0.9$) and prediction ($Q^2=0.85$). The statistically significant abundance of glutathione, lactate, myo-inositol, glycine, total choline-containing compounds, creatine, glutamate, glutamine, scyllo-inositol, and $X_{8.50}$ was found to be a discriminator of ACCs. The adrenal cortex was characterized by a higher level of NAA, isoleucine, FA (a) and (b), and $X_{4.30}$ and $X_{1.14}$. A two-component PLS-DA model based on VIP metabolites was

built from ACC samples according to hormonal secretion (Fig. 4B; $R^2Y=0.71$ and $Q^2=0.44$). Glutamine, glutamate, acetate, lysine, valine, and succinate were more abundant in nonsecreting tumors, without reaching statistical significance. Secreting ACC samples exhibited a higher abundance of aspartate, FA (b), $X_{1.14}$, and total choline-containing compounds. However, no significant difference was observed for any of these metabolites.

Finally, when PLS-DA was built according to clinical aggressivity, the ten patients with metastatic ACCs were not successfully discriminated from the remaining two with confined disease at diagnosis and without systemic spread during the first 5 years of postsurgical follow-up.

ACCs vs cortical Ads

Twelve ACC and 13 Ad samples were included in the analysis. A two-component PLS-DA model based on VIP metabolites was characterized by $R^2Y=0.9$ and $Q^2=0.85$, showing a good differentiation of Ad and ACC samples (Fig. 3). A significantly higher abundance of lactate, GABA, creatine, NAA, acetate, alanine, glutamate, glutamine, valine, myo-inositol, glycine, glutathione, isoleucine, lysine, ethanolamine, FA, total choline-containing compounds, and $X_{2.20}$, and $X_{8.50}$ was found to be a discriminator of ACCs.

Normal adrenal medulla vs PCCs

Eight normal medullary tissue and 20 PCC samples were compared. When a two-component PLS-DA model was built using only data points corresponding to VIP metabolites, the following results were obtained: $R^2Y=0.8$ and $Q^2=0.7$. Figure 3 presents the score plot of the PLS-DA showing a clear separation between the two sets of samples. A significantly higher abundance of taurine, alanine, aspartate, GABA, glutathione, noradrenaline, ascorbic acid, total choline-containing compounds, and $X_{4.30}$ was observed in PCC samples than in the normal medullary tissue samples.

According to the presurgical biological evaluation, ten of the 14 sporadic PCC samples exhibited predominant noradrenaline secretion, two exclusive noradrenaline secretion and two predominant adrenaline secretion (Fig. 5). For all the examined sporadic PCC samples, HRMAS NMR spectroscopy revealed the presence of a greater amount of noradrenaline than of adrenaline. On the other hand, in the normal medullary tissue samples, adrenaline was more abundant than noradrenaline (Table 2). The abundance of noradrenaline was

Table 1 ¹H-NMR resonance assignments of the metabolites identified and quantified in the 66 adrenal samples examined

Numbers	Metabolite	Group	¹ H chemical shift (p.p.m.)
1	Isoleucine	δCH ₃	0.94
		γCH ₃	1.01
		γCH ₂	1.51
		αCH	3.65
2	Valine	γCH ₃	0.98
		γ'CH ₃	1.04
		βCH	2.30
3	Lactate	CH ₃	1.33
		CH	4.12
4	Lysine	γCH ₂	1.43
		δCH ₂	1.71
		βCH ₂	1.89
		εCH ₂	3.01
5	Alanine	βCH ₃	1.48
		αCH	3.78
6	Glutamate	βCH ₂	2.05
		γCH ₂	2.34
7	Glutamine	αCH	3.76
		βCH ₂	2.14
		γCH ₂	2.44
8	Aspartic acid	αCH ₂	3.77
		βCH ₂ (u)	2.70
		βCH ₂ (d)	2.80
9a	Choline	αCH	3.90
		-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.21
		βCH ₂	3.52
9b	Phosphorylcholine	αCH	4.06
		-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.22
		βCH ₂	3.60
9c	Glycerophosphocholine	αCH	4.16
		-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.23
		αCH ₂	4.32
		βCH ₂	3.69
		CH ₂ -HPO ₄ (d)	3.88
		CH ₂ OH	3.91
10	Taurine	CH ₂ -HPO ₄ (u)	3.95
		-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.26
		-CH ₂ -SO ₃ ⁻	3.42
11	scyllo-Inositol	All Hs	3.35
		C5H	3.27
12	myo-Inositol	C1H, C3H	3.54
		C4H, C6H	3.61
		C2H	4.06
		C4H	3.56
13	Glycine	αCH	3.56
		C4H	3.43
		C3H, C5H	3.47
		C6H(u)	3.75
		C6H(d)	3.89
		C1H	4.65
15	Creatine	CH ₃	3.03
		CH ₂	3.93
16	Ascorbic acid	-CHOH-	4.02
		C4H	4.52
17	Succinic acid	(α,β CH ₂)	2.40
		CH ₃ -NH	2.75
18	Adrenaline	C4H	6.84
		C3H	6.92
		C6H	6.93
		C4H	6.93

Table 1 Continued

Numbers	Metabolite	Group	¹ H chemical shift (p.p.m.)
19	N-acetyl aspartate (NAA)	CH ₃	2.04
		αCH	4.37
20	Glutathione	CH ₂ -CONH	2.54
		CH ₂ -SH	2.95
		CH-NH ₂	3.78
21	Acetate	CH ₃	1.92
		3CH ₂	1.90
22	γ-Aminobutyric acid (GABA)	4CH ₂	2.28
		2CH ₂	3.01
23	Noradrenaline	C4H	6.84
		C3H	6.92
		C6H	6.93
24	Ethanolamine	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.13
		CH ₂ OH	3.82
25a	Fatty acids (a)	CH ₃	0.90
		(2)CH ₂	1.29
25b	Fatty acids (b)	(1)CH ₂	1.31
		(2)CH ₂	2.03
		CH ₂	2.80
25a,b	Fatty acids (a) and (b)	(2)CH	5.33
		(1)CH	5.33
25c	Fatty acids (c)	(n)CH ₂	1.29
		(2)CH ₂	1.60

Spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 p.p.m. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature (Martinez-Bisbal et al. 2004, Wishart et al. 2007).

significantly higher in PCC samples than in the normal medullary tissue samples ($P=0.04$). Adrenaline was moderately more abundant in PCC samples than in the normal tissue samples, without, however, reaching statistical significance.

In patients with VHL disease-related PCCs, only noradrenaline was detected by HRMAS NMR spectroscopy. MEN2- and NF1-related PCC samples showed an elevation of the levels of both adrenaline and noradrenaline (Table 2).

ACCs vs PCCs

Twelve ACC and 20 PCC samples were included in the analysis. A two-component PLS-DA based on VIP metabolites (Fig. 3) was characterized by a good representation of the Y data ($R^2Y=0.8$) and a good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2=0.6$). Statistically significant differences between ACC and PCC samples were found in 14 of the 24 metabolites identified. A higher abundance of adrenaline, noradrenaline, aspartate, scyllo-inositol, GABA, myo-inositol, and ascorbic acid was found to be a significant discriminator of PCCs. On the other hand, ACC

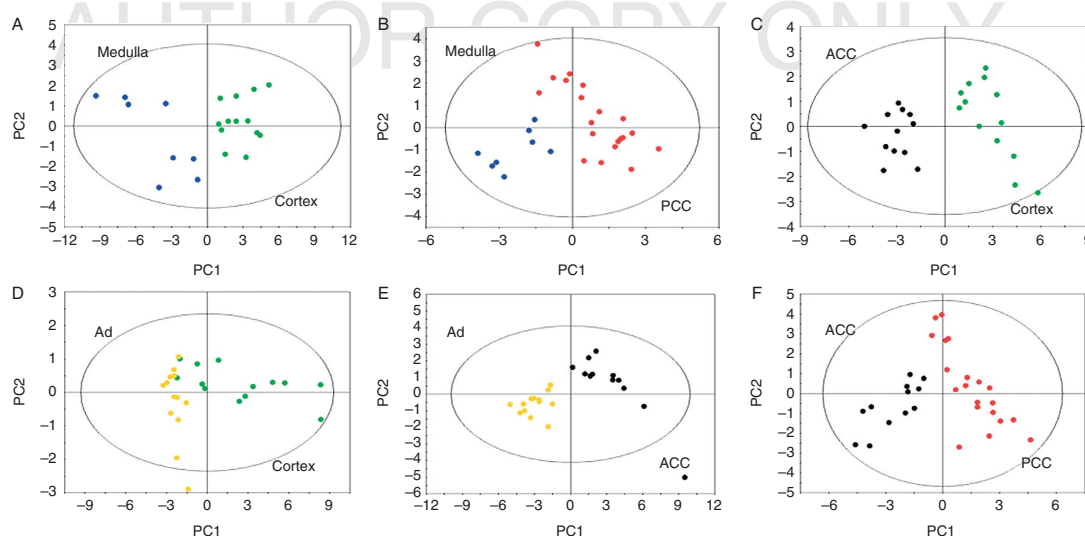


Figure 3

Results of PLS-DA models built according to histological classification: (A) normal adrenal cortex vs normal adrenal medulla, (B) normal adrenal

medulla vs PCC, (C) normal adrenal cortex vs ACC, (D) normal adrenal cortex vs Ad, (E) ACC vs Ad, and (F) ACC vs PCC.

samples contained a larger amount of glycine, alanine, taurine, creatine, ethanolamine, total choline-containing compounds, and FA (b).

Discussion

In this study, we analyzed 66 tissue samples of normal and pathological adrenal tissues of adult human subjects by means of HRMAS NMR spectroscopy. The first objective was to characterize the global metabolic profile differentiating normal adrenal cortex from medulla. Afterwards, the biochemical pattern of healthy tissue was compared with that of pathological tissue of the same embryological origin. Finally, the differences between ACCs and both Ads and PCCs were investigated. To the best of our knowledge, no previous study has reported the metabolic fingerprint of the normal adult human adrenal gland and adrenal cortical pathologies such as Ads and ACCs.

The visual comparison of spectra obtained from the cortical tissue samples demonstrated a significant similarity between Ad and normal adrenal cortical tissue samples (Fig. 1), afterwards confirmed by the results of a multivariate analysis. PLS-DA scatter plots evidenced a continuum-like distribution of Ad and normal adrenal cortical tissue samples. Inversely, despite the common embryological origin, ACC samples clearly represented a detached group, reflecting the substantial malignant properties of ACCs. Interestingly, other authors (Rechache

et al. 2012) who have conducted genome-wide DNA methylation profiling of adrenocortical tumor and normal adrenal cortical tissue samples have recently reported similar PCA results. Moreover, in a recent article by the same team, Jain *et al.* (2012) proposed a working model of the molecular pathogenesis of ACCs showing a malignancy progression from normal cortex to ACCs through cortical hyperplasia and Ads.

Predictably, when compared with the normal adrenal cortical samples, ACC samples exhibited the typical stigmata of neoplastic tissue. The metabolic fingerprint of ACC samples was characterized by the general metabolic markers of malignancy such as choline-containing compounds, which are linked to increased phospholipid turnover. Biochemical markers representative of anaerobic processes and increased glycolytic activity such as lactate levels were also present. The abundance of amino acid resonance peaks suggested an increase in amino acid production via nonoxidative pathways. The increased rate of protein degradation related to cell death, which is particularly evident in large and necrotic tumors, or the deregulation of the Krebs cycle may explain the altered amino acid concentration observed in ACC samples.

Significantly higher levels of lactate, acetate, and total choline-containing compounds play a major role in the differentiation of ACCs from Ads. Moreover, the large FA content of ACC samples contributed to the cluster

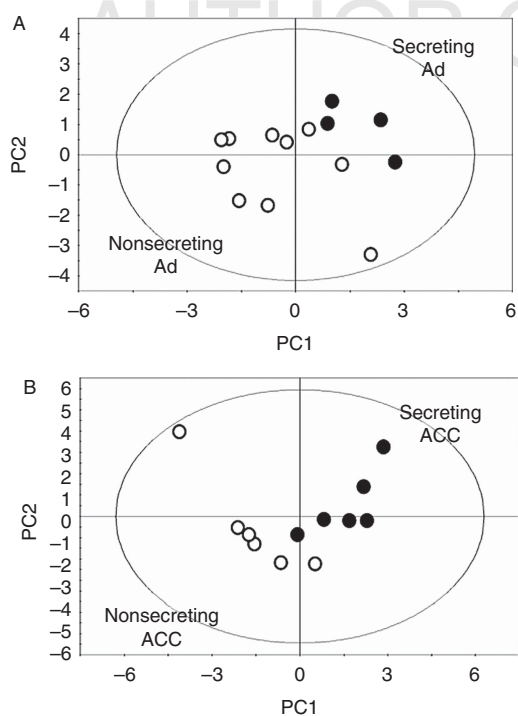


Figure 4
Results of PLS-DA models built respectively from Ad (A) and ACC (B) samples according to tumoral secreting properties. Both classes of PLS-DA models show a separation between secreting and nonsecreting lesions.

identification of ACCs. The esterification of acetate to form acetyl CoA as a major precursor in β -oxidation for FA synthesis is believed to be the main mechanism of acetate incorporation in tumors. Nevertheless, alternative biochemical pathways of acetate intake or accumulation may include the Krebs cycle and the synthesis of cholesterol through citrate.

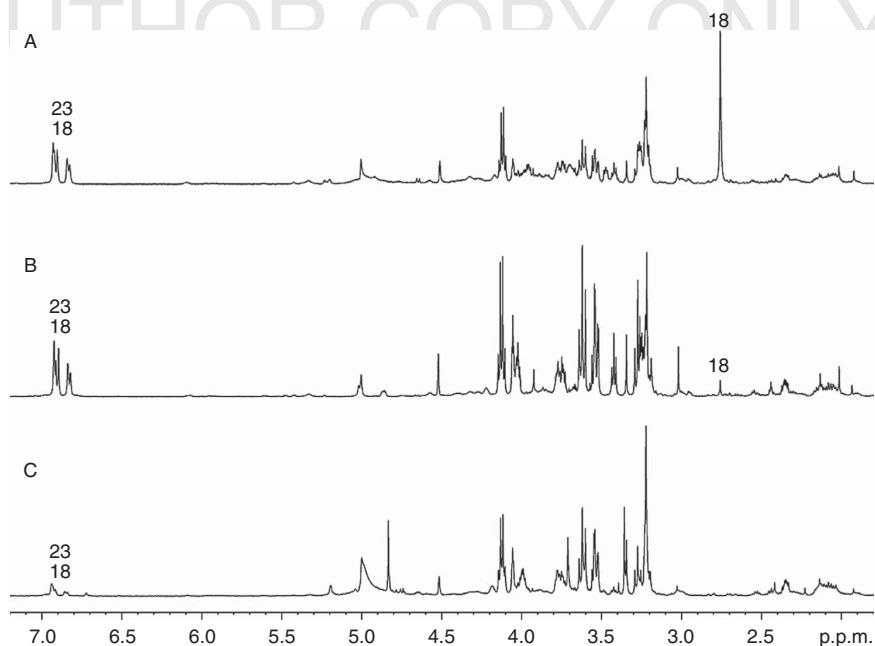
According to the secreting properties, good results were obtained by PLS-DA models built from both ACC and Ad samples. Unfortunately, when considering the natural history of ACCs, patients with aggressive ACCs (metastatic spread at diagnosis or within 1 year of surgery) were not successfully separated by PLS-DA from patients without metastatic ACCs at diagnosis and during the first 5 years of postsurgical follow-up. However, both the small size and the asymmetry of groups are limiting factors potentially influencing the final results. Further investigations with a larger population are necessary to assess a potential metabolic fingerprint specific for a poor prognosis.

To date, only one recent paper mainly focused on PCCs and paragangliomas (Rao *et al.* 2013) is available concerning the application of NMR spectroscopy for

adrenal pathology investigation. Compared with Rao's study, in which liquid NMR spectroscopy was used to analyze homogenized and centrifuged tissue preparations, we studied intact tissue samples using HRMAS NMR spectroscopy. While the inferior sensitivity compared with that of the liquid-state NMR spectroscopy may be a disadvantage, HRMAS NMR spectroscopy allows for a good spectral quality, avoiding laborious procedures for tissue preparation prior to the analysis. Moreover, the tissue sample can be stored again after the acquisition of spectra and is therefore available for pathological analysis when a discrepancy arises between the metabolic and histopathological data of the mirror sample. In Rao's work, the relationships between genotype-specific differences in mitochondrial function and catecholamine content in paragangliomas (PGLs) have been established. These authors also demonstrated for the first time the feasibility of detecting catecholamines by NMR spectroscopy in PCC and paraganglioma samples, confirming our previous findings obtained from the analysis of normal adrenal medullary tissue samples (Imperiale *et al.* 2011).

Of the 14 sporadic PCC samples analyzed, 12 exhibited predominant or exclusive noradrenaline secretion. In sporadic PCC samples, HRMAS NMR spectroscopy revealed a greater amount of noradrenaline than of adrenaline. In contrast, in the normal medullary tissue samples, adrenaline was more abundant than noradrenaline. As is well known, the synthesis of adrenaline depends on the presence of phenylethanolamine-*N*-methyltransferase (PNMT). The levels of *PNMT* mRNA have been found to be lower in PCC samples than in the normal medulla (Lehnert 1998). This disparity is probably responsible for the difference in catecholamine content between tumors and normal adrenal medulla, leading to higher noradrenaline secretion in PCC samples examined in the present study. Unfortunately, the data concerning *PNMT* tumor activity in the PCC samples examined are not available for further correlations.

In patients with hereditary PCCs, the results of HRMAS NMR investigation matched the biological findings. *MEN2*- and *NF1*-related PCC samples exhibited the presence of both adrenaline and noradrenaline. In the *VHL* disease-related PCC samples, only noradrenaline was detected by HRMAS NMR spectroscopy. The low noradrenaline value measured in the *VHL* disease-related PCC samples contrasts with the high catecholamine production and the elevated rate constants of catecholamine secretion in this PCC genotype. The small quantity of starting material for the NMR analysis may be a potential bias in the assessment of the amount of noradrenaline.

**Figure 5**

One-dimensional ^1H CPMG HRMAS spectra obtained from three sporadic PCC samples with different catecholamine-secreting patterns: (A) predominant adrenaline secretion, (B) predominant noradrenaline

secretion, and (C) exclusive noradrenaline secretion. The intensity of each spectrum was normalized with respect to the weight of the tissue sample. The numbers refer to the metabolites listed in Table 1.

Unfortunately, the size of the samples analyzed does not allow us to draw any definitive conclusion. However, these results are in agreement with the findings of Rao *et al.* (2013), who investigated a larger cohort of patients with hereditary paragangliomas.

A higher quantity of GABA discriminated PCC samples from the normal medullary tissue and ACC samples, suggesting a role in PCC pathophysiology. Interestingly, in the

early 1980s, Hatanaka *et al.* (1980) described a clonal cell line (PC 12) established from a rat PCC model able to synthesize GABA together with catecholamine and acetylcholine.

Ascorbic acid is critical in the biochemical cascade of catecholamine production (Lehnert 1998). In the present series, ascorbic acid was identified as a significant discriminator of PCCs than of the normal medulla and ACCs. In 1977, a clonal line of rat PCC cells was used as

Table 2 Catecholamine quantification results obtained from the HRMAS NMR analysis of eight normal medullary tissue and 20 PCC samples

	Number of samples	NA (nmol/mg)	Adrenaline (nmol/mg)
Normal medulla	8	0.6 (0–1.8) ^a	1.6 (0.7–4.4) ^a
Sporadic PCC	14	2.4 (0–11.6) ^a	1.8 (0–5.3) ^a
VHL disease-related PCC	1	1	ND
	1	0.4	ND
NF1-related PCC	1	2.8	2.1
	1	1.6	1.1
MEN2-related PCC	1	5.8	2.3
	1	0.8	3.9

NA, noradrenaline; ND, undetectable.

^aMedian (range).

a model of noradrenergic tissue to study ascorbic acid transport (Spector & Greene 1977). In these cells, ^{14}C -ascorbic acid was concentrated by an energy-dependent transport system. Moreover, the optimal production of noradrenaline required ascorbate in the medium. In our 20 PCC samples, ascorbic acid was significantly correlated (Spearman's correlation test, $P < 0.05$) to the amount of noradrenaline ($R = 0.56$). The level of noradrenaline in PCC samples could also be biased from the lack of PNMT. However, the correlation existing also between ascorbic acid and adrenaline amounts ($R = 0.55$) and the sum of noradrenaline plus adrenaline amounts ($R = 0.64$) underlines the role played by ascorbate in catecholamine biosynthetic pathway.

The 3,4-dihydroxybenzene group, common to both adrenaline and noradrenaline, generates a clear signal between 6.8 and 6.9 p.p.m. This signal, unaffected by any significant pollution, is hence easy to recognize and quantify. According to these considerations, the 3,4-dihydroxybenzene group resonance assumes a diagnostic significance and may have an impact on clinical practice. Interesting results were reported on this topic by Kim *et al.* (2009), who used *in vivo* MRS to describe a signal at 6.8 p.p.m. in PCC samples probably representing catecholamines not observed in cortical Ad samples. Indeed, further developments of *in vivo* magnetic resonance spectroscopy (MRS) focusing on catecholamine spectral regions could be an interesting and useful axis of clinical research in patients with atypical adrenal masses that are challenging to characterize by preoperative investigations.

Despite these interesting results, this study has the inherent limitations of any retrospective observational case series including a relatively limited number of patients because it was focused on a rare condition. Consequently, the small number of samples makes this study a preliminary investigation. In addition, malignant PCCs, which are the most clinically important tumors with a particularly poor prognosis, are not adequately represented. Nevertheless, this study represents one of the first applications of metabolomics to adrenal pathophysiology and it is the largest study to report HRMAS data related to the adrenal cortex and adrenal cortical tumors, laying the foundations for future, more complex investigations also including data from molecular biology and other omics procedures.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work is part of the CARMen project and was supported by grants from Région Alsace, Oséo, Communauté Urbaine de Strasbourg, Conseil Départemental du Bas-Rhin, Bruker BioSpin, University of Strasbourg, and Strasbourg University Hospital.

Author contribution statement

A I wrote the manuscript and was responsible for study design, data analysis, bibliographic research, and manuscript review; F-M M was responsible for HRMAS NMR data acquisition, spectral analysis, and manuscript review; K E was responsible for experimental design, spectral analysis, and manuscript review; N R was involved in patient biological exploration and manuscript review; M P had responsibility for experimental design and manuscript review; J-P B conducted the histopathological analysis; B G was involved in patient clinical management and manuscript review; P B was responsible for patient surgical management and manuscript review; and I-J N was involved in experimental design, data analysis, and manuscript review. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The Tumor Bio-bank (Centre de Ressources Biologiques) personnel of the Strasbourg University Hospital are gratefully acknowledged for their technical assistance.

References

- Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, Holmes E, Lindon JC & Nicholson JK 2010 High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature Protocols* **5** 1019–1032. (doi:10.1038/nprot.2010.45)
- Claudino WM, Goncalves PH, di Leo A, Philip PA & Sarkar FH 2012 Metabolomics in cancer: a bench-to-bedside intersection. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **84** 1–7. (doi:10.1016/j.critrevonc.2012.02.009)
- Ebbels T & Cavill R 2009 Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **55** 361–374. (doi:10.1016/j.pnmrs.2009.07.003)
- Elbayed K, Dillmann B, Raya J, Piotto M & Engelke F 2005 Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *Journal of Magnetic Resonance* **174** 2–26. (doi:10.1016/j.jmr.2004.11.017)
- Griffin JL & Shokor JP 2004 Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews. Cancer* **4** 551–561. (doi:10.1038/nrc1390)
- Hatanaka H, Tanaka M & Amano T 1980 A clonal rat pheochromocytoma cell line possesses synthesizing ability of γ -aminobutyric acid together with catecholamine and acetylcholine. *Brain Research* **183** 490–493. (doi:10.1016/0006-8993(80)90487-4)
- Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh FM, Neuville A, Piotto M, Bellocq JP, Lutz P & Namer IJ 2011 Metabolomic pattern of childhood neuroblastoma obtained by ^1H -high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *Pediatric Blood & Cancer* **56** 24–34. (doi:10.1002/pbc.22668)
- Jain M, Rechache N & Kebebew E 2012 Molecular markers of adrenocortical tumors. *Journal of Surgical Oncology* **106** 549–556. (doi:10.1002/jso.23119)
- Kim S, Salibi N, Hardie AD, Xu J, Lim RP, Lee VS & Taouli B 2009 Characterization of adrenal pheochromocytoma using respiratory-triggered proton MR spectroscopy: initial experience. *AJR. American Journal of Roentgenology* **192** 450–454. (doi:10.2214/AJR.07.4027)

- Korevaar TI & Grossman AB 2011 Pheochromocytomas and paragangliomas: assessment of malignant potential. *Endocrine* **40** 354–365. (doi:10.1007/s12020-011-9545-3)
- Lehnert H 1998 Regulation of catecholamine synthesizing enzyme gene expression in human pheochromocytoma. *European Journal of Endocrinology* **138** 363–367. (doi:10.1530/eje.0.1380363)
- Lloyd RV 2011 Adrenal cortical tumors, pheochromocytomas and paragangliomas. *Modern Pathology* **24** S58–S65. (doi:10.1038/modpathol.2010.126)
- Lombardi CP, Raffaelli M, Pani G, Maffione A, Princi P, Traini E, Galeotti T, Rossi ED, Fadda G & Bellantone R 2006 Gene expression profiling of adrenal cortical tumors by cDNA microarray analysis. Results of a preliminary study. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **60** 186–190. (doi:10.1016/j.biopha.2006.03.006)
- Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llacer JL, Piotto M, Assemat O & Celda B 2004 1H and 13C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples *ex vivo* and *in vivo* 1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR in Biomedicine* **17** 191–205. (doi:10.1002/nbm.888)
- McNicol AM 2011 Update on tumours of the adrenal cortex, pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma. *Histopathology* **58** 155–168. (doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03613.x)
- Nicholson JK & Wilson ID 2003 Understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2** 668–676. (doi:10.1038/nrd1157)
- O'Connell TM 2012 Recent advances in metabolomics in oncology. *Bioanalysis* **4** 431–451. (doi:10.4155/bio.11.326)
- Papotti M, Libé R, Duregon E, Volante M, Bertherat J & Tissue F 2011 The Weiss score and beyond – histopathology for adrenocortical carcinoma. *Hormones & Cancer* **2** 333–340. (doi:10.1007/s12672-011-0088-0)
- Peet AC, McConville C, Wilson M, Levine BA, Reed M, Dyer SA, Edwards EC, Strachan MC, McMullan DJ, Wilkes TM *et al.* 2007 1H MRS identifies specific metabolite profiles associated with MYCN-amplified and non-amplified tumour subtypes of neuroblastoma cell lines. *NMR in Biomedicine* **20** 692–700. (doi:10.1002/nbm.1181)
- Piotto M, Bourdonneau M, Furrer J, Bianco A, Raya J & Elbayed K 2001 Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under magic angle spinning: effect of radial B1 inhomogeneities. *Journal of Magnetic Resonance* **149** 114–118. (doi:10.1006/jmre.2001.2287)
- Piotto M, Moussallieh FM, Dillmann B, Imperiale A, Neuville A, Brigand C, Bellocq JP, Elbayed K & Namer IJ 2009 Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning 1H magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* **5** 292–301. (doi:10.1007/s11306-008-0151-1)
- Piotto M, Moussallieh FM, Imperiale A, Benahmed MA, Detour J, Bellocq JP, Namer IJ & Elbayed K 2012 Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by proton high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance. In *Methodologies for Metabolomics: Experimental Strategies and Techniques*, pp 496–524. Ed P Lutz. UK: Cambridge University Press.
- Rao JU, Engelke U, Rodenburg R, Wevers R, Pacak K, Eisenhofer G, Qin N, Kuster B, Goudswaard A, Lenders JW *et al.* 2013 Genotype-specific abnormalities in mitochondrial function associate with distinct profiles of energy metabolism and catecholamine content in pheochromocytoma and paraganglioma. *Clinical Cancer Research* **30** 3787–3795. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3922)
- Rechache NS, Wang L, Stevenson HS, Killian JK, Edelman DC, Merino M, Zhang L, Nilubol N, Stratakis CA, Meltzer PS *et al.* 2012 DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97** E1004–E1013. (doi:10.1210/jc.2011-3298)
- Roman S 2006 Adrenocortical carcinoma. *Current Opinion in Oncology* **18** 36–42. (doi:10.1097/01.cco.0000198976.43992.14)
- Sitter B, Bathen TF, Tessem MB & Gribbestad IS 2009 High-resolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **54** 239–254. (doi:10.1016/j.pnmrs.2008.10.001)
- Spector R & Greene LA 1977 Ascorbic acid transport by a clonal line of pheochromocytoma cells. *Brain Research* **136** 131–140. (doi:10.1016/0006-8993(77)90137-8)
- Stratakis CA 2003 Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in symphony. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **14** 404–410. (doi:10.1016/j.tem.2003.08.005)
- Stratakis CA 2005 Applications of genomic medicine in endocrinology and post-genomic endocrine research. *Hormones* **4** 38–44.
- Weiss LM, Medeiros LJ & Vickery AL Jr 1989 Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology* **13** 202–206. (doi:10.1097/00000478-198903000-00004)
- Wilson M, Davies NP, Brundler MA, McConville C, Grundy RG & Peet AC 2009 High resolution magic angle spinning 1H NMR of childhood brain and nervous system tumours. *Molecular Cancer* **8** 6–17. (doi:10.1186/1476-4598-8-6)
- Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Chi Guo A, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S *et al.* 2007 HMDB: Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research* **35** D521–D526. (doi:10.1093/nar/gkl923)
- Young WF 2007 Incidentally discovered adrenal mass. *New England Journal of Medicine* **356** 601–610. (doi:10.1056/NEJMcp065470)

Received in final form 25 July 2013

Accepted 6 August 2013

Made available online as an Accepted Preprint

6 August 2013

ANNEXE 3

Imperiale A, Moussallieh FM, Sebag F, Brunaud L, Barlier A, Elbayed K, Bachellier P, Goichot B, Pacak K, Namer IJ and Taïeb D.

A new specific succinate-glutamate metabolomic hallmark in SDHx-related paragangliomas.

PLoS One. 2013;8:e80539.

A New Specific Succinate-Glutamate Metabolomic Hallmark in *Sdhx*-Related Paragangliomas

Alessio Imperiale^{1,2*}, François-Marie Moussallieh^{1,2}, Frédéric Sebag³, Laurent Brunaud⁴, Anne Barlier⁵, Karim Elbayed², Philippe Bachellier⁶, Bernard Goichot⁷, Karel Pacak⁸, Izzie-Jacques Namer^{1,2}, David Taïeb⁹

1 Department of Biophysics and Nuclear Medicine, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France, **2** ICube, UMR (Unité Mixte de Recherche) 7357 University of Strasbourg/CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and FMTS (Fédération de médecine translationnelle de Strasbourg), Faculty of Medicine, Strasbourg, France, **3** Department of Endocrine Surgery, La Timone University Hospital, Aix-Marseille University, Marseille, France, **4** Department of Digestive, Hepato-Biliary and Endocrine Surgery, Brabois University Hospital, Nancy, France, **5** Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Conception Hospital, Aix-Marseille University, Marseille, France, **6** Department of Visceral Surgery and Transplantation, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France, **7** Department of Internal Medicine, Diabetes and Metabolic Disorders, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France, **8** Program in Reproductive and Adult Endocrinology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America, **9** Department of Biophysics and Nuclear Medicine, La Timone University Hospital, European Center for Research in Medical Imaging, Aix-Marseille University, Marseille, France

Abstract

Paragangliomas (PGLs) are frequently associated with germline mutations in genes involved in energy metabolism. The purpose of the present study was to assess whether the tumor metabolomic profile of patients with hereditary and apparently sporadic PGLs enables the distinction of different subtypes of tumors. Twenty-eight unrelated patients with a histological diagnosis of PGLs were included in the present study. Twelve had germline mutations in *SDHx* genes (5 *SDHB*, 7 *SDHD*), 6 *VHL*, and 10 were apparently sporadic. Intact tumor samples from these patients (one per patient) were evaluated with ¹H high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *SDHx*-related tumors were characterized by an increase in succinate levels in comparison to other tumor subtypes ($p=0.0001$ vs *VHL* and $p=0.000003$ vs apparently sporadic). Furthermore, we found significantly lower values of glutamate in *SDHx*-related tumors compared to other subtypes ($p=0.0007$ vs *VHL* and $p=0.003$ vs apparently sporadic). Moreover, *SDHx*-tumors also exhibited lower values of ATP/ADP/AMP ($p=0.01$) compared to *VHL*. *VHL* tumors were found to have the highest values of glutathione (GSH) compared to other tumors. Based on 4 metabolites (succinate, glutamate, GSH, and ATP/ADP/AMP), tumors were accurately distinguished from the other ones on both 3- and 2-class PLS-DA models. The present study shows that HRMAS NMR spectroscopy is a very promising method for investigating the metabolomic profile of various PGLs. The present data suggest the existence of a specific succinate-glutamate hallmark of *SDHx* PGLs. The relevance of such a metabolomic hallmark is expected to be very useful in designing novel treatment options as well as improving the diagnosis and follow-up of these tumors, including metastatic ones.

Citation: Imperiale A, Moussallieh F-M, Sebag F, Brunaud L, Barlier A, et al. (2013) A New Specific Succinate-Glutamate Metabolomic Hallmark in *Sdhx*-Related Paragangliomas. PLoS ONE 8(11): e80539. doi:10.1371/journal.pone.0080539

Editor: Andrea Motta, National Research Council of Italy, Italy

Received: August 10, 2013; **Accepted:** October 15, 2013; **Published:** November 27, 2013

Copyright: © 2013 Imperiale et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work is part of the CARMen project and was supported by grants from Région Alsace, Oséo, Communauté Urbaine de Strasbourg, Conseil Départemental du Bas-Rhin, Bruker BioSpin, University of Strasbourg and Strasbourg University Hospital. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: alessio.imperiale@chru-strasbourg.fr

Introduction

Paragangliomas (PGLs) are neural crest-derived neuroendocrine neoplasms arising from chromaffin cells that are located in the adrenal medulla (also called pheochromocytomas, PHEOs) or aligned along the para-aortic sympathetic system or from head and neck or thoracic paraganglia, which often act as chemoreceptors. Although most PGLs arise sporadically, PGL susceptibility genes have been identified in approximately one-third of cases and in more than 90% of patients with multifocal tumors [1,2].

Hereditary PGLs are frequently associated with germline mutations in one of the succinate dehydrogenase subunits genes (collectively named *SDHx*-related tumors), often in the absence of positive family history or even with negative biochemistry [3]. This is in contrast to other hereditary PHEOs/PGLs, in which the

family history is usually very well known and therefore, PHEOs/PGLs related to these syndromes can be diagnosed early and often properly and successfully treated.

Moreover, *SDHx* tumors are considered to be more aggressive, particularly those with *SDHB* mutations. Currently there is no cure, and current therapeutic options are either suboptimal or short-lasting despite a good initial response [4]. Therefore, any new information that could bring new insight into the pathogenesis of these tumors, their metabolic activities, and proper monitoring, including early assessment of their therapeutic responses, is very desirable.

SDH (also called respiratory complex II) is an iron-sulfur cluster-containing protein composed of 4 subunits that participates in the tricarboxylic acid (TCA) cycle and electron transport chain

(ETC). SDH mediates the transfer of two electrons to CoQ during the oxidation of succinate to fumarate. Inactivation of SDH leads to the accumulation of succinate. The accumulation of specific metabolites has been illustrated in different tumor models with inherited and acquired alterations in enzymes of the TCA cycle, such as fumarate in cases of fumarate hydroxylase gene mutations [5] and 2-hydroxyglutarate (2HG) in mutations in one of the 2 isocitrate dehydrogenase genes (*IDH1/2*) [6]. The accumulation of these oncometabolites inhibits 2-oxoglutarate (2OG)-dependent dioxygenases that include EglN (also called PHD) family members, methylcytosine dioxygenases and JmjC domain-containing histone demethylases, which induces both pseudohypoxic and hypermethylated phenotypes [7–10]. These findings have important implications for our understanding of tumorigenesis via pseudo-hypoxia, alteration of epigenetic homeostasis and alteration of the cellular redox state.

Simultaneous detection of several metabolites (also called metabolomics) is a fast-growing field, promising to improve our understanding of cell biology and relating the genetics and epigenetics to tumor phenotypes. The metabolites (molecular weight <1 kDa) can be detected *in vitro* by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS), liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [11]. Magnetic resonance spectroscopy also enables *in vivo* assessment of metabolites (such as 2HG) in the setting of brain tumors [12]. NMR-based methods are less sensitive but more reproducible than LCMS for the quantitative assessment of metabolites.

In recent years, ¹H high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy has been introduced for *ex vivo* characterization of small intact tissue samples (solid-state NMR). This technique also offers several advantages, such as the simplicity of sample preparation, the intra- and inter-laboratory reproducibility, the relatively low cost to perform the technique, and the availability of major metabolite databases [13]. HRMAS NMR spectroscopy has been suggested as a promising tool in the diagnosis and characterization of cancer.

The objective of the present study was to find out whether there is a specific metabolomic profile in sympathetic *SDHx* and other hereditary or apparently sporadic PHEOs/PGLs.

Materials and Methods

Ethics Statement

Data was acquired under regular clinical care conditions, with Ethics Committee approval obtained for the use of these data for scientific purposes at Strasbourg, Marseille, and Nancy University Hospitals. Written informed consent was obtained from all patients included in the present study.

Tissue samples

Twenty-eight specimens of sympathetic PGLs/PHEOs from 28 unrelated patients who fulfilled the following criteria were included:

1. Histological diagnosis of PGL/PHEO.
2. Absence of distant metastases within the first year following surgery.
3. Genetic screening for germline mutations in the *SDHB/C/D*, *SDHAF2* (including large gene rearrangements of all the *SDH* genes), *VHL* (including large gene rearrangements), *RET*, *TMEM127*, and *MAX* genes.
4. Tissue specimens collected just after tumor removal and snap-frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C .

The tumors were obtained from 3 different institutions in France (Strasbourg, Marseille, and Nancy University Hospitals) and were distributed as follows: 10 sporadic (9 PHEOs, 1 sympathetic PGL), 5 *SDHB* (2 PHEOs, 3 sympathetic PGLs), 7 *SDHD* (1 PHEO, 6 sympathetic PGLs), and 6 *VHL* (3 PHEOs, 3 sympathetic PGLs).

Tissue sample preparation for HRMAS NMR

The amount of tissue used for HRMAS analysis ranged from 15 to 20 mg. For each sample, the percentage of tumor cells in the total sample of cells and the percentage of necrosis with regard to the total surface were calculated based on frozen sections using a mirror sample stored in the tissue bank. Samples containing at least 30% tumor cells and less than 50% necrosis were used for the study. Each tissue sample was placed in a 30 μL disposable insert. 10 μL of D_2O were added to the rotor to provide a lock frequency for the NMR spectrometer. The exact weight of the sample used was determined by weighing the empty insert and the insert containing the tissue sample. The insert was stored at -80°C and placed in a 4-mm ZrO_2 rotor just before the HRMAS analysis.

HRMAS NMR data acquisition, spectra processing, and metabolite quantification

1D HRMAS NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz, installed at the Pathological Department of Strasbourg University Hospitals. A one-dimensional (1D) proton spectrum using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence [14] and 1024 transients was acquired for each serum sample. Free induction decays were multiplied by an exponential window function of 0.3 Hz prior to Fourier transformation and were corrected for phase and baseline distortions using TopSpin 2.1 (Bruker GmbH, Germany). The chemical shift was referenced to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 ppm. In order to confirm resonance assignments, two-dimensional (2D) homonuclear and heteronuclear experiments were also recorded immediately after the end of 1D spectra acquisition. Because the duration of these experiments is long and significant tissue degradation occurs during NMR acquisition, only a few representative samples were analyzed by 2D experiments. A description of the HRMAS NMR data acquisition and spectra processing has been previously detailed [13].

In the present study, we focused on four selected metabolites with a potential key role in tumoral pathophysiology. Accordingly, succinate, glutamate, glutathione, and energy phosphorylated compounds were precisely identified and quantified. Catecholamines were also measured. The quantification procedure was based on the pulse length-based concentration measurement (PULCON) as previously described [13]. Spectra were normalized according to each sample weight and calibrated using the signal intensity of a 19.3 nmol reference solution of lactate, scanned under the same analytical conditions. The peak integral corresponding to each metabolite's region was normalized to the integral of the entire spectrum within the range of 8.65–1 ppm. Quantification results were expressed as nmol/mg of tissue. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature [15,16].

Succinate concentrations in tissue samples were estimated by integrating the area comprised between 2.39 ppm and 2.43 ppm. The spectral complex previously assigned to ATP/ADP/AMP [17] was identified on our spectra within the range of 6.07–6.11 and thus integrated to quantify the metabolite amount. The glutathione and glutamate amounts were measured from the integral of NMR spectra comprised by 2.93–2.98 ppm and 2.32–

2.38 ppm, respectively. To measure epinephrine concentrations in tissue samples, the signal resulting from the N-methyl radical selected at 2.75 ppm was considered. The 3,4-dihydroxybenzene groups of both epinephrine and norepinephrine generate a spectral complex between about 6.85 and 6.98 ppm. The integral of the region corresponding to the ^1H in position no. 5 of the aromatic ring (IUPAC nomenclature) was selected to quantify the amount of epinephrine plus norepinephrine in each tissue sample. Finally, the norepinephrine concentration was obtained by subtracting epinephrine from the sum of epinephrine and norepinephrine. The above approach has been previously tested and confirmed (data not shown) by the quantification NMR analysis of epinephrine and norepinephrine standard solutions first separated and subsequently mixed (1/1, v/v). Dopamine could contribute to peaks in the region between 6.85 and 6.98 ppm. However, no triplets at 2.85 ppm and 3.22 ppm, which represent the spectral signature of dopamine, were detected on HRMAS NMR spectra, suggesting an undetectable amount of dopamine in the analyzed tissue.

Statistical analysis

As widely suggested [18,19], a combination of principal component analysis (PCA) and partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was adopted. PCA and PLS-DA analysis were done including only succinate, glutamate, glutathione, and energy phosphorylated compounds.

A PCA was performed to evaluate the quality of the data quickly and to identify possible outliers [20]. Then a PLS-DA was employed to optimize the separation between groups and to classify the samples in each of the following 3- or 2-group models: 1. Sporadic vs. *SDHx* vs. *VHL*, 2. Sporadic vs. *SDHx*, 3. Sporadic vs. *VHL*, 4. *SDHx* vs. *VHL*. Cross-validation was used in each PLS-DA model to determine the number of components and to avoid overfitting the data because of the small number of samples. An extensive cross-validation embedded in a Monte-Carlo resampling approach was used during the construction of the model in order to build a confusion matrix that allowed a direct visualization of the performances of the model in term of classification power (sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV)) [21,22]. The non-parametric Mann-Whitney U-test (MWU-test) was utilized for the comparison of metabolite amounts between groups. The results of tissular metabolite concentrations are expressed as medians and ranges. The relationship among the selected metabolites was assessed by the Spearman nonparametric regression coefficient (R).

SIMCA P (version 11.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden) and STATISTICA 7 (STATSOFT; www.statsoft.com) packages were used for statistical data analysis. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

General findings

Representative 1D HRMAS CPMG spectra of sporadic, *SDHD*, and *VHL*-related PGLs are presented in Figure 1. Metabolites such as succinate, glutamate, glutathione (GSH), and energy phosphorylated compounds (ATP/ADP/AMP) were identified in 1D spectra, with variable signal intensity according to the genetic background.

In all the examined tumor samples, no significant spectra overlap that prevented quantification was found. The quality of the examined samples was indirectly proven by the lack of signals arising from both lactate and fatty acids, which are usually considered hallmarks of tissular necrosis. 2D NMR acquisitions

were used to better characterize the metabolic substrate appearing on our 1D spectra within the range of 6.07–6.11 ppm and previously assigned to ATP/ADP/AMP (Fig. 2). In particular, the results of 2D HRMAS acquisition from one *VHL*-related PGL were compared to the widely available NMR spectroscopy database [16,23]. Our 2D HSQC spectrum was almost superimposable to the known reference of ATP. Nevertheless, a slight chemical shift difference of 0.06 ppm related to the carbon atom linking the ribosyl ring and the aminopurine may generate confusion with inosine triphosphate (ITP). This difference could be explained by the intratissular pH variability in our samples.

All NMR spectra from the *SDHx*-related tumors showed very high levels of succinate compared to sporadic and *VHL*-related tumors. On the other hand, apparently sporadic tumors were characterized by high values of glutamate compared to *SDHx*-related PGLs/PHEOs. Finally, *VHL*-related tumors exhibited more pronounced ATP/ADP/AMP signals. GSH was predominant in *SDHx*- and *VHL*-related tumors.

Three-class model

A multivariate two-component PLS-DA based on succinate, glutamate, GSH, and energy phosphorylated compounds (ATP/ADP/AMP) was first generated including patients with apparently sporadic, *SDHx*-, and *VHL*-related PGLs/PHEOs. The score plot of the PLS-DA model (Fig. 3A) showed a clear distinction between these three classes of tumors. According to this model, all 12 patients with *SDHx*-related PGLs/PHEOs were correctly identified. Moreover, eight of ten (80%) and five of six (83%) patients with respectively apparently sporadic and *VHL*-related PGLs/PHEOs were also accurately classified. To detect patients with germline mutations (*SDHx* and *VHL*), the Se and Sp of the established model were respectively 94% and 80%. PPV, NPV, and global accuracy were all 89%.

In the *SDHx*-related tumor cohort, PHEOs exhibited higher values of energy-phosphorylated compounds (ATP/ADP/AMP) compared to PGLs ($p=0.04$). Succinate, GSH, and glutamate were statistically equivalent regardless of the *SDHx* tumor location. In contrast, *VHL*-related PHEOs had higher GSH levels than PGLs ($p=0.04$). Considering all tissue samples, a significant negative correlation was shown between succinate and glutamate ($R=0.52$), glutamate and energy phosphorylated compounds (ATP/ADP/AMP) ($R=0.54$), and succinate and GSH ($R=0.51$).

Two-class models

Three multivariate PLS-DA models based on succinate, glutamate, GSH, and energy phosphorylated compounds (ATP/ADP/AMP) were built to compare: (1) apparently sporadic to *SDHx*- (Fig. 3B), (2) apparently sporadic to *VHL*- (Fig. 3C), and (3) *SDHx*- to *VHL*-related tumors (Fig. 3D). The score plot of each PLS-DA model showed a very clear delineation of the single classes. The results of the MWU-test are detailed in Table 1.

When comparing apparently sporadic to *SDHx*-related tumors, the model correctly classified 9 of 10 apparently sporadic cases and 11 of 12 *SDHx*-. The model identified *SDHx*-related tumors with a Se of 92%, a Sp of 90%, a PPV of 92%, a NPV of 90%, and a global accuracy of 91%. The model did not correctly identify only one *SDHD*-related PGL. Interestingly, it was easily recognized by visual inspection of the spectra because of a pronounced succinate peak.

In the model comparing apparently sporadic and *VHL*-related tumors, all cases were correctly classified. The *VHL* group exhibited a significant increase in both succinate and GSH levels.

Finally, *SDHx*- and *VHL*-related PGLs/PHEOs were compared. The model was able to correctly classify all the tumor

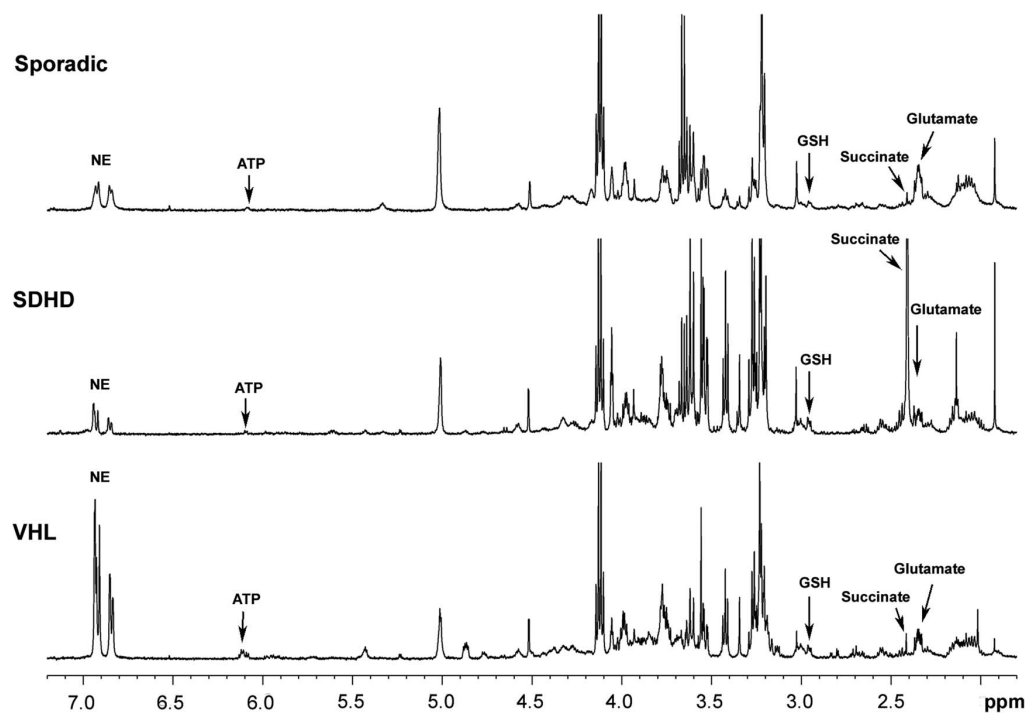


Figure 1. Representative 1D ^1H -HRMAS spectra of sporadic, *SDHx*-, and VHL-related PGLs. The partial metabolite assignment is indicated. The metabolic contents of each spectra are directly comparable, since the intensity of each spectrum has been normalized with respect to the weight of the analyzed sample.
doi:10.1371/journal.pone.0080539.g001

samples. Succinate remains highly discriminant between the 2 subgroups. No difference in the succinate amount was shown between *SDHB* and *SDHD* subtypes, as well as for the remaining selected metabolites. VHL-related tumors showed a more abundant content of energy phosphorylated compounds (ATP/ADP/AMP). Interestingly, despite a greater amount of GSH in VHL vs. *SDHx* tumors, this parameter did not reach statistical significance ($p = 0.08$).

In apparently sporadic PGLs/PHEOs, glutamate and energy phosphorylated compounds (ATP/ADP/AMP) ($R = 0.71$) as well as succinate and GSH ($R = 0.68$) in *SDHx*-related tumors were statistically correlated.

Epinephrine was not measurable in any VHL-related tumors and in only one of 12 *SDHx* samples (1.98 nmol/ml). Only 2 of 10 apparently sporadic tumors showed an epinephrine peak in the NMR spectra (0.93 and 1.04 nmol/ml). On the other hand, norepinephrine was detected in 9 of 10 apparently sporadic tumors (median, 0.90 nmol/ml; range, 0–4.60 nmol/ml), in 9 of 12 *SDHx*-related PHEOs/PGLs (median, 0.87 nmol/ml; range, 0–2.40 nmol/ml), and in all of the 6 VHL-related PHEOs/PGLs (median, 1.80 nmol/ml; range, 0.26–4.53 nmol/ml). No statistical difference was observed between VHL and *SDHx* PHEOs/PGLs despite higher values of norepinephrine in VHL tumors.

Discussion

In the present study, we analyzed 28 sympathetic PGLs with different genetic backgrounds (10 sporadic, 6 VHL, 12 *SDHx*). We did not include *RET*- or *NF1*-related tumors because these are almost always associated with other syndromic manifestations that enable physicians to easily diagnose them.

In the present study we show that HRMAS NMR-based metabolomics should be considered as a new reliable tool for *ex vivo* characterization of sympathetic PGLs. The present data suggests the existence of a specific succinate-glutamate hallmark of *SDHx* sympathetic PGLs. Based on 4 metabolites (succinate, glutamate, GSH, and ATP/ADP/AMP), tumors were accurately distinguished from the other ones on both 3- and 2-class PLS-DA models. This is an extension of the results published by Rao et al., who identified a *SDHx* signature (increased succinate, decreased ATP/ADP/AMP) but with some overlaps between apparently sporadic and VHL tumors for the other parameters [17].

Until the present, only a few studies employing HRMAS NMR spectroscopy have been published for metabolic profiling of PGLs/PHEOs [17,24]. An increase in succinate accumulation and a decrease in ATP/ADP/AMP accumulation were observed in *SDHx*-related PGLs when compared to sporadic PGLs and PGLs of other genotypes [17]. Interestingly, despite methodological differences, we found similar results. Compared to the previous study [17], in which liquid NMR spectroscopy was used to analyze homogenized and centrifuged tissue preparation, our analysis was done on intact tissue samples. This approach may be considered less sensitive compared to liquid-state NMR spectroscopy but also leads to good quality spectra. Furthermore, it has several advantages, such as avoiding technical procedures for tissue preparation prior to the analysis and allowing refreeze and storage of tissue samples for additional analyzes such as pathological analysis in cases of result discrepancies. Small changes (0.1 ppm) in chemical shift in the peak areas assigned to the ATP/ADP/AMP between the 2 studies could be attributed to pH differences (perchloric acid extracts for Rao et al) [17].

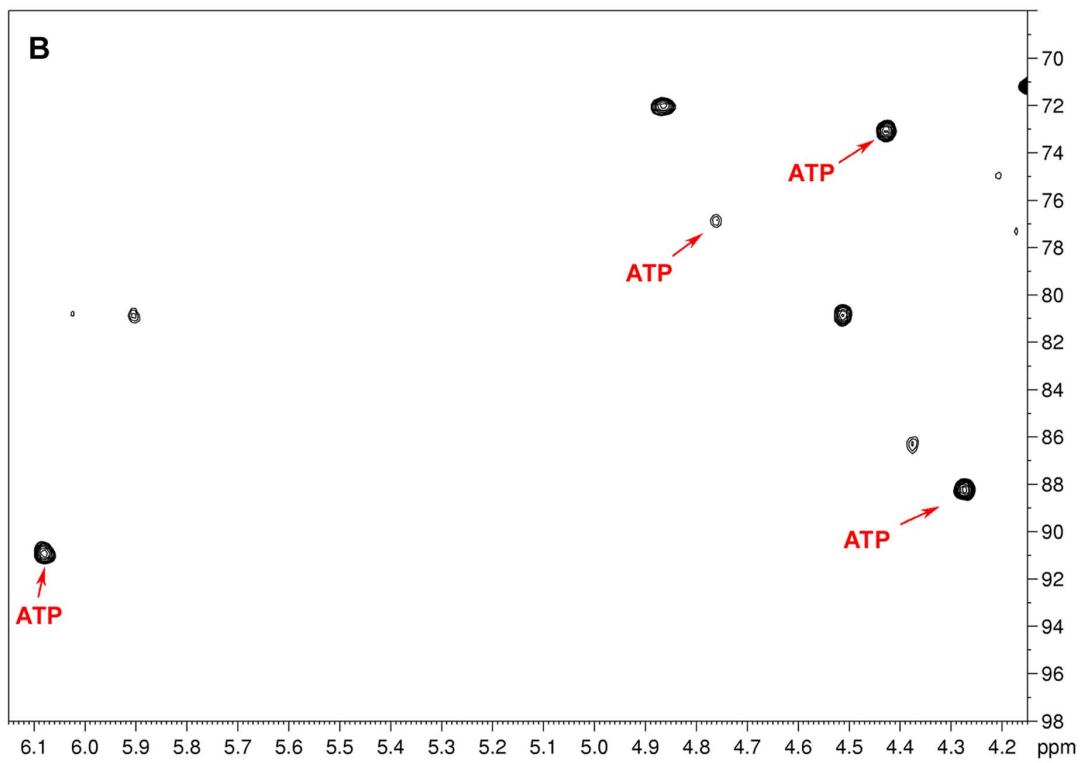
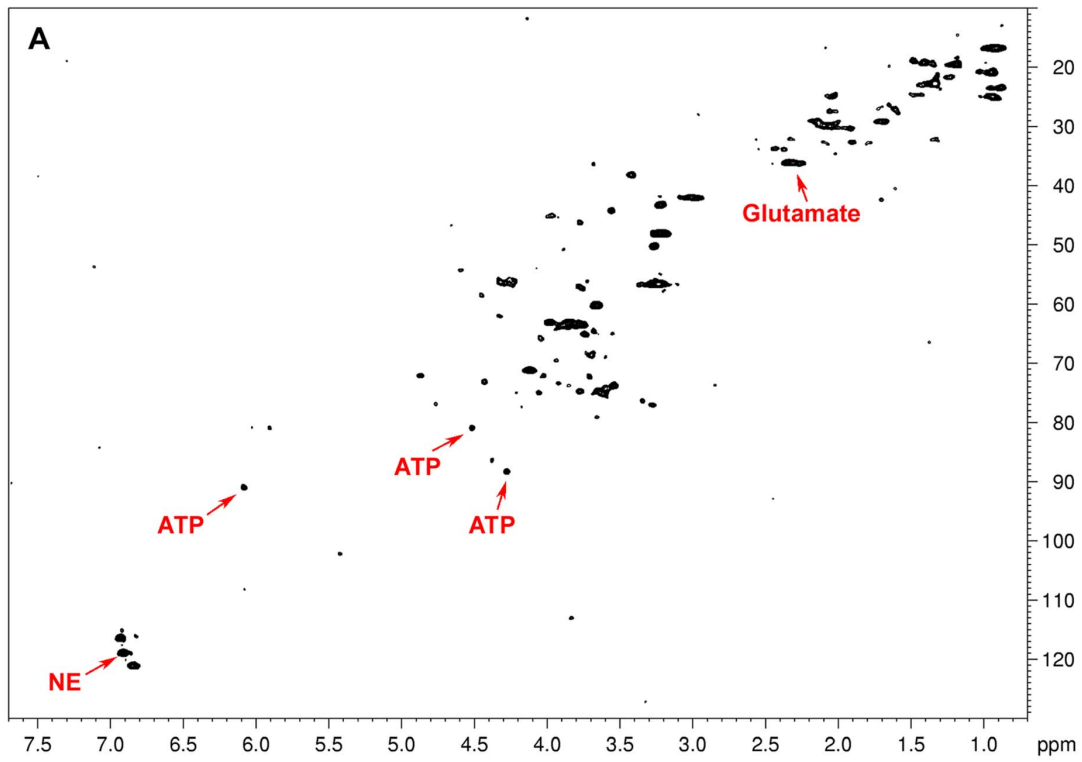


Figure 2. Representative 2D ^1H - ^{13}C HSQC HRMAS NMR spectra (A), zoomed in on the ATP region (B), obtained from a sample of a VHL-related abdominal PGL. The 2D NMR experiment confirms the presence of ATP in tumoral tissue as suggested by the 1D spectra of the same patient (Figure 1C). Glutamate and norepinephrine assignments are also indicated. Because of their low concentration in the tissular sample, both succinate and glutathione are not clearly visible in the whole 2D spectrum (7.7-0.7 ppm in ^1H dimension) without focusing on their characteristic regions.
doi:10.1371/journal.pone.0080539.g002

We also found lower values of ATP/ADP/AMP in *SDHx*-related tumors in comparison to VHL tumors, probably because increased glycolysis preferentially occurs in VHL tumors [17,25].

We have added greater levels of discrimination by using additional metabolites besides succinate and ATP/ADP/AMP peaks. We found that apparently sporadic tumors were characterized by a low level of reduced GSH compared to VHL tumors ($p = 0.01$) and *SDHx*-related tumors ($p = 0.003$). There was a trend towards statistical differences between *SDHx*- and VHL-related tumors ($p = 0.08$), but the sample size was too small to achieve statistical significance. GSH is the most prevalent non-protein thiol

in animal cells. Its high redox potential renders GSH both a potent antioxidant and a convenient cofactor for enzymatic reactions that require readily available electron pairs. GSH appears to be a sensitive indicator of the ability to resist toxic challenge. It has previously been shown that sporadic tumors may also exhibit reduction of mitochondrial respiration [26]. The low GSH peak in these tumors could be related to several cell events, such as inhibition of the ETC that is needed for GSH regeneration via NADPH synthesis and/or an increase in ROS production.

Interestingly, *SDHx*-related tumors were also characterized by low glutamate levels in comparison to apparently sporadic

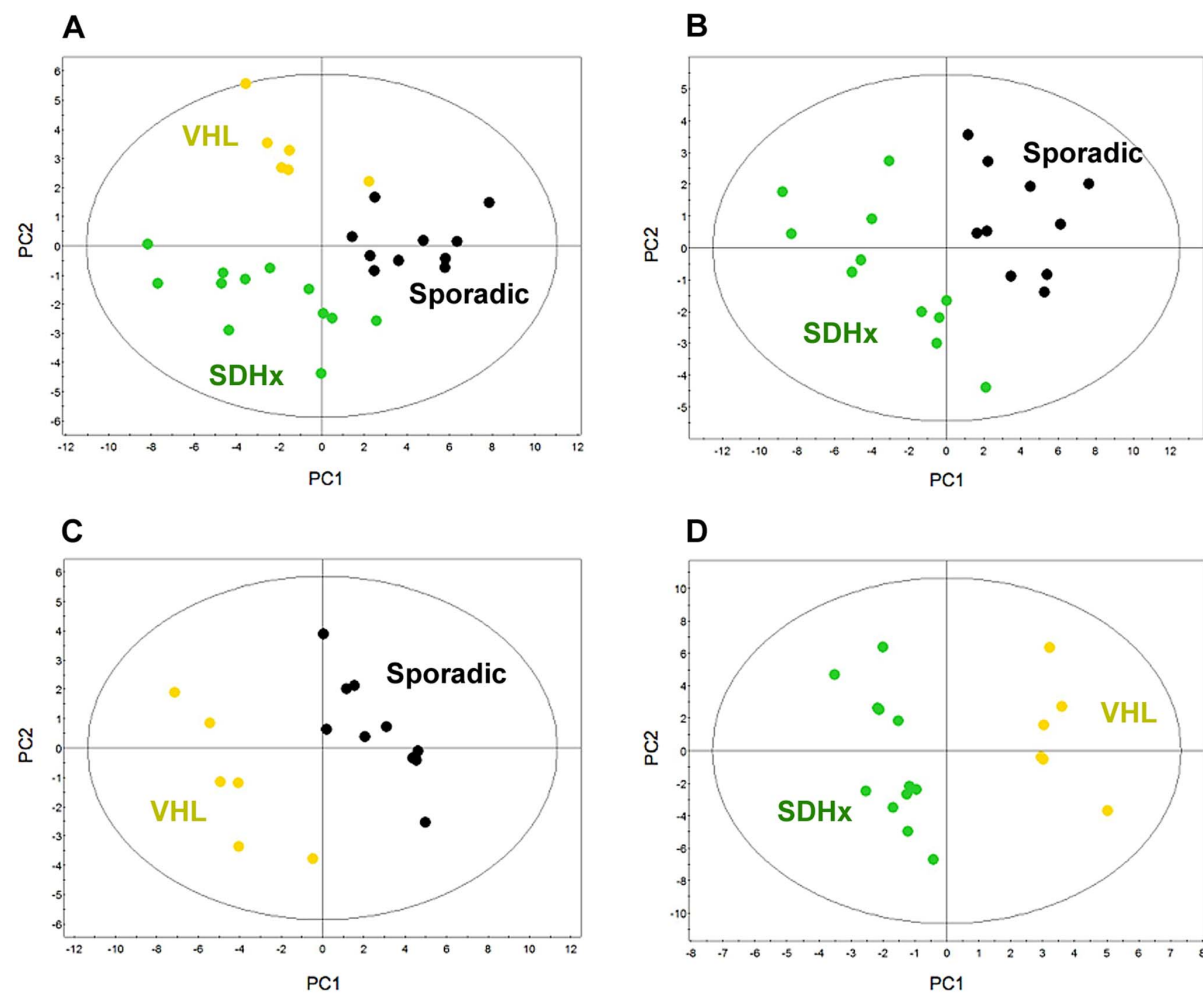


Figure 3. Results of two-component PLS-DA models built on succinate, glutamate, glutathione, and energy phosphorylated compounds (ATP/ADP/AMP) according to the patients' genotypes: A) 3-class model including apparently sporadic (black dots), *SDHx*- (green dots), and VHL-related tumors (yellow dots); B) 2-class model including apparently sporadic and *SDHx*-related tumors; C) 2-class model including apparently sporadic and VHL-related tumors; D) 2-class model including *SDHx*- and VHL-related tumors. A clear distinction between the different classes of tumors is shown in each model.
doi:10.1371/journal.pone.0080539.g003

Table 1. Median values and ranges of succinate, glutathione, glutamate, and ATP/ADP/AMP levels measured by 1D ¹H-HRMAS spectroscopy in intact tissue samples of 28 apparently sporadic, *SDHx*, and VHL-related PHEOs/PGLs. Quantification results are expressed as nmol/mg of tissue.

	Sporadic	<i>SDHx</i>	VHL	<i>P</i> Sporadic vs <i>SDHx</i>	<i>P</i> Sporadic vs VHL	<i>P</i> <i>SDHx</i> vs VHL
Succinate	0.03 (0–0.06)	3,6 (0.9–9.07)	0.06 (0.03–0.12)	0.000003	0.02	0.0001
Glutathione	0.04 (0.03–0.22)	0.15 (0.05–0.39)	0.32 (0.17–0.43)	0.01	0.003	0.08
Glutamate	1.36 (0.23–2.55)	0.67 (0.13–1.52)	1.49 (0.88–2.18)	0.003	1	0.0007
ATP/ADP/AMP	0.10 (0.03–0.18)	0.05 (0–0.21)	0.16 (0.06–0.29)	0.1	0.1	0.01

doi:10.1371/journal.pone.0080539.t001

($p = 0.003$) and VHL tumors ($p = 0.0007$). This finding is new and provides critical information for accurate classification of tumors. Intracellular glutamate is mainly produced by the oxidative deamination of glutamine. Interestingly, *IDH1/2* mutant cells are also characterized by lower levels of glutamate with respect to their wild type counterparts [27]. It is also possible that lower glutamate availability in *SDHx*-deficient tumors leads to the generation of peroxidant conditions that promote carcinogenesis. There is no clear explanation for the low glutamate level in *SDHx*-related tumors in comparison to other subtypes. It could be related to increased consumption of glutamate for further biosynthetic pathways or decreased glutamate biosynthesis via modulation of the activity of glutaminase or glutamate dehydrogenase.

In contrast, increased GSH levels in VHL-tumors may be related to increased activity of the pentose phosphate pathway in response to enhanced oxidative stress.

Our 3-class model enabled us to accurately predict the presence of *SDHx* or *VHL* germline mutations with the following performances: Se 94%, Sp 80%, and PPV/NPV 89%. The presence of a succinate peak alone easily distinguishes *SDHx*-related tumors from the other ones. The 2-class model based on succinate/GSH could be used to distinguish VHL from apparently sporadic tumors (global accuracy of 100%). Although our results are promising, they should be validated in a large sample size and independent cohort. This would help build a reliable probability predictive model that may be used in clinics to guide genetic testing and provide functional information about mutations of equivocal pathogenicity (uncertain variants).

Immunohistochemical studies can also be used as a screening method for guiding genetic testing. The absence of *SDHB* immunoexpression is indicative of a germline mutation in one of the *SDHx* genes [28,29]. Additionally, a subset of these tumors may also be immunohistochemically negative for *SDHA*, which is highly suggestive of the presence of an *SDHA* mutation [30]. Compared to other methods, metabolomic approaches provide several practical advantages, such as the simplicity of sample preparation, reproducibility, low cost for sample analysis, and simultaneous measurement of several metabolites. Thus, they may enable global metabolomic profiling of tumors with a distinction of different tumor subtypes. Metabotyping various tumors, including PGLs, might indeed identify new oncometabolites for their future diagnostic and therapeutic options.

The present study further supports the existence of different secretory phenotypes in PGLs according to their hereditary background. In our series, epinephrine was not measurable in any VHL-related tumors and in only one of the 12 *SDHx* samples. By contrast, norepinephrine was detected in 9 out of 12 *SDHx*-related tumors and in all of the 6 examined VHL-related PHEOs/

PGLs. The lack of epinephrine secretion in VHL- and *SDHx*-related PGLs was previously reported [31–33] and linked to reduced or absent expression of phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT). PNMT catalyzes the last step in catecholamine biosynthesis, the conversion of norepinephrine to epinephrine. *SDHx*-related tumors exhibit an immature catecholamine secretory profile by the absence of epinephrine, possibly explained by hypermethylation of the PMNT promoter [34]. These tumors accumulate succinate, which inhibits 2-oxoglutarate-dependent histone and DNA demethylase enzymes, resulting in epigenetic modifications [8]. These findings further emphasize the interplay between the Krebs cycle, oxidative phosphorylation, and epigenetic events [35,36].

We acknowledge several limitations to the present study: a) the absence of carriers of mutations in the *TMEM127/SDHAF2/MAX/SDHA* genes; and b) the absence of screening of tumors for somatic mutations, mainly in apparently sporadic tumors, that could potentially occur and influence the presented tumor metabolomic profiles. We also have to admit that the high proportion of hereditary PGLs in our series is related to a selection bias. Nevertheless, the present study provides new data about specific genotype-metabolomic phenotype of *SDHx*-related PGLs compared to VHL-related and apparently sporadic counterparts.

The present study advances our knowledge of the pathogenesis of PGLs and also provides important and promising information about the classification of these tumors. It is expected that in the near future, various metabolomic approaches will reveal new diagnostic and therapeutic targets. A large-scale study comparing PGL clinical and imaging phenotypes, genotypes, somatic mutations, gene expression levels, DNA methylation phenotypes, protein spectra, and metabolomic profiles will have a great impact on our understanding of how they function and contribute to the development of various PGLs, resulting in the most optimal early and accurate diagnosis, treatment, and outcome.

Acknowledgments

Victoria Martucci and the personnel of the Tumor Bio-bank (Centre de Ressources Biologiques) of the Strasbourg University Hospitals are gratefully acknowledged for their technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AI FMM IJN DT KP. Performed the experiments: AI FMM KE. Analyzed the data: AI FMM KE IJN DT KP FS LB AB PB BG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AI IJN DT FS LB AB PB BG. Wrote the paper: AI FMM DT KP IJN FS LB AB.

References

- Jafri M, Whitworth J, Rattenberry E, Vialard L, Kilby G, et al. (2013) Evaluation of SDHB, SDHD and VHL gene susceptibility testing in the assessment of individuals with non-syndromic pheochromocytoma, paraganglioma and head and neck paraganglioma. *Clinical endocrinology* 78: 898–906.
- Piccini V, Rapizzi E, Bacca A, Di Trapani G, Pulli R, et al. (2012) Head and neck paragangliomas: genetic spectrum and clinical variability in 79 consecutive patients. *Endocr Relat Cancer* 19: 149–155.
- Timmers HJ, Gimenez-Roqueplo AP, Mannelli M, Pacak K (2009) Clinical aspects of SDHx-related pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Relat Cancer* 16: 391–400.
- Huang H, Abraham J, Hung E, Averbuch S, Merino M, et al. (2008) Treatment of malignant pheochromocytoma/paraganglioma with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine: recommendation from a 22-year follow-up of 18 patients. *Cancer* 113: 2020–2028.
- Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, et al. (2005) HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 8: 143–153.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, et al. (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462: 739–744.
- Kaelin WG Jr, McKnight SL (2013) Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell* 153: 56–69.
- Letouze E, Martinelli C, Lorient C, Burnichon N, Abermil N, et al. (2013) SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma. *Cancer Cell* 23: 739–752.
- Pollard PJ, Briere JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, et al. (2005) Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet* 14: 2231–2239.
- Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, et al. (2012) Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & development* 26: 1326–1338.
- Wishart DS (2013) Exploring the human metabolome by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectroscopy; Lutz NW, editor. Cambridge: Cambridge University Press.
- Pope WB, Prins RM, Albert Thomas M, Nagarajan R, Yen KE, et al. (2012) Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate and other metabolites in IDH1 mutant glioma patients using magnetic resonance spectroscopy. *Journal of neuro-oncology* 107: 197–205.
- Piotto M, Moussallich FM, Imperiale A, Benahmed MA, Detour J, et al. (2013) Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by proton high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance; Lutz NW, editor. Cambridge: Cambridge University Press. 627 p.
- Meiboom S, Gill D (1958) Modified spin echo method for measuring nuclear relaxation times. *The Review of scientific instruments* 29: 688–691.
- Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, et al. (2004) 1H and 13C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo 1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR in biomedicine* 17: 191–205.
- Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, et al. (2007) HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic acids research* 35: D521–526.
- Rao JU, Engelke UF, Rodenburg RJ, Wevers RA, Pacak K, et al. (2013) Genotype-Specific Abnormalities in Mitochondrial Function Associate with Distinct Profiles of Energy Metabolism and Catecholamine Content in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Clin Cancer Res* 19: 3787–3795.
- Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, et al. (2010) High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature protocols* 5: 1019–1032.
- Sitter B, Bathen TF, Tessem MB, Gribbestad IS (2009) High-resolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 54: 239–254.
- Ebbels TMD, Cavill R (2009) Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 55: 361–374.
- Picard RR, Cook RD (1984) Cross-Validation of Regression Models. *Journal of the American Statistical Association* 79: 575–583.
- Xu QS, Liang YZ (2001) Monte Carlo cross validation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 56: 1–11.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, et al. (2013) HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic acids research* 41: D801–807.
- Imperiale A, Elbayed K, Moussallich FM, Reix N, Piotto M, et al. (2013) Metabolomic profile of the adrenal gland: from physiology to pathological conditions. *Endocr Relat Cancer* 20: 705–716.
- Favier J, Briere JJ, Burnichon N, Riviere J, Vescovo L, et al. (2009) The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PLoS One* 4: e7094.
- Feichinger RG, Zimmermann FA, Mayr JA, Neureiter D, Ratschek M, et al. (2011) Alterations of respiratory chain complexes in sporadic pheochromocytoma. *Frontiers in bioscience* 3: 194–200.
- Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, Spasojevic I, Yang J, et al. (2011) Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3270–3275.
- van Nederveen FH, Gaal J, Favier J, Korpershoek E, Oldenburg RA, et al. (2009) An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *The lancet oncology* 10: 764–771.
- Gill AJ, Benn DE, Chou A, Clarkson A, Muljono A, et al. (2010) Immunohistochemistry for SDHB triages genetic testing of SDHB, SDHC, and SDHD in paraganglioma-pheochromocytoma syndromes. *Hum Pathol* 41: 805–814.
- Korpershoek E, Favier J, Gaal J, Burnichon N, van Gessel B, et al. (2011) SDHA Immunohistochemistry Detects Germline SDHA Gene Mutations in Apparently Sporadic Paragangliomas and Pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1472–1476.
- Eisenhofer G, Lenders JW, Linehan WM, Walther MM, Goldstein DS, et al. (1999) Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *N Engl J Med* 340: 1872–1879.
- Eisenhofer G, Pacak K, Huynh TT, Qin N, Bratslavsky G, et al. (2011) Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer* 18: 97–111.
- Eisenhofer G, Walther MM, Huynh TT, Li ST, Bornstein SR, et al. (2001) Pheochromocytomas in von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1999–2008.
- Burnichon N, Cascon A, Schiavi F, Morales NP, Comino-Mendez I, et al. (2012) MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res* 18: 2828–2837.
- Yang M, Pollard PJ (2013) Succinate: a new epigenetic hacker. *Cancer Cell* 23: 709–711.
- Burgess DJ (2013) Metabolism: Epigenetic links to the web of Krebs. *Nat Rev Cancer* 13: 437.

ANNEXE 4

Piotto M, Moussallieh FM, Imperiale A, Benahmed MA, Detour J, Bellocq JP, Namer IJ, Elbayed K.

Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolic profiling of human tissues by proton high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance.

Lutz NW, editor. Cambridge: Cambridge University Press. 2013; 496-524.

23 Reproducible Sample Preparation and Spectrum Acquisition Techniques for Metabolic Profiling of Human Tissues by Proton High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance

Martial Piotto, François-Marie Moussallieh, Alessio Imperiale, Malika A. Benahmed, Julien Detour, Jean-Pierre Bellocq, Izzie J. Namer, and Karim Elbayed

High-resolution magic angle spinning (HR-MAS) is a nuclear magnetic resonance (NMR) technique (1–3) that enables the characterization of metabolic phenotypes of intact cells, tissues, and organs under normal and pathological conditions. As with NMR in general, HR-MAS can be applied to a variety of NMR-active nuclei. However, this chapter is exclusively concerned with the proton-based (^1H) variant, which is the most commonly used HR-MAS method. Therefore, in the remainder of this chapter, “NMR” and “HR-MAS” are synonymous with “ ^1H NMR” and “ ^1H HR-MAS.” A brief introduction of NMR basics and an example of ^{31}P HR-MAS NMR spectroscopy are presented in Chapter 22. HR-MAS can be used to assess cellular metabolic networks that are directly related to specific genetic information and to the regulation of specific gene transcripts. The basic principle of HR-MAS is to spin samples at a 54.7-degree angle (“magic angle”) with respect to the main magnetic field, B_0 , to remove most of the line broadening created by magnetic susceptibility gradients in heterogeneous systems such as biopsy specimens (3–8). Magic-angle spinning results in a dramatic sharpening of the NMR signals of the metabolites contained in a biopsy sample. The first applications of HR-MAS to biological tissues were published in 1996 by Cheng et al. (9). In this seminal publication, data obtained on malignant lymph nodes and on tissue samples from different brain regions in a case of Pick’s disease were presented. Since then, the technique has been applied to study various pathologies in brain (10–15), breast (16–21), prostate (22–25), kidney (26–28), cervix (29,30), esophagus (31), and colon (32–34). Several reviews describing HR-MAS studies of different human malignancies have appeared in the literature more recently (35–37). However, most of the studies reported until now have been performed on a small number of biopsy samples and only in academic research laboratories as opposed to a hospital environment. Certain procedures used in these studies can differ substantially from laboratory to laboratory, making it difficult to compare results. There is a need for establishing a well-defined protocol covering all aspects of a large-scale metabolic study of biopsy samples. The same fundamental

problem had to be solved previously for metabolic studies of urine, plasma, serum, and tissue extracts, and standard protocols eventually were adopted for some of these analyses (38,39) (biofluid NMR methods are described in Chapters 11 through 17). Regarding the study of human biopsy specimens, the situation has been more confusing than for biofluids because only one article by Beckonert et al. (40), has detailed a protocol for the study of biopsy samples by HR-MAS. This article is extremely valuable and describes the essential steps that have to be followed for a successful study. However, the authors' protocol was not embedded in the context of a medical environment where tissue samples have to be analyzed within the regular flow of routine analysis taking place daily in a hospital. Notwithstanding, the HR-MAS NMR spectroscopic protocols employed by groups working on human samples have begun to converge in recent years, and the rough contours of a consensus are emerging.

This chapter is a first attempt to standardize formally the protocols being used in this field and is part of the CARMEN (*Cancer Résonance Magnétique Nucléaire*) project carried out at the Strasbourg University Hospitals. This chapter describes the current stage of the development of a general protocol for HR-MAS NMR spectroscopy of human biopsy specimens, optimized for use in a hospital environment. This work is based on the results of more than 5 years of practical progress toward establishing a common, clinically relevant approach. The techniques described in the sections of this chapter are widely used today in laboratories analyzing human biopsy samples by HR-MAS NMR spectroscopy, but alternative approaches are also pointed out. The different steps involved in these experimental protocols are explained in detail, and the underlying rationales are presented, followed by some practical application examples in Sections 7 and 8. Reliable metabolic profiling of human biopsy samples can be achieved only if numerous conditions are met in the protocol used for analysis. To illustrate the subject of this study, we present in Figure 23.1 a representative HR-MAS one-dimensional (1D) CPMG (41). ^1H NMR spectrum obtained from an oligodendroglioma biopsy sample, which is a grade II/III brain tumor (42). Many metabolites are easily identified in this spectrum, such as creatine (Cr) and choline (Cho). Characteristic brain metabolites such as *N*-acetyl aspartate (NAA) and γ -aminobutyric acid (GABA) are also visible.

1. Sample Collection and Storage

Proper sample collection is one of the most critical aspects of successful HR-MAS analysis of human biopsy specimens. In contrast to metabolic studies performed on body fluids – notably urine, plasma, serum, and semen – where sample collection is relatively straightforward, taking a tissue sample from a patient is an invasive process. HR-MAS studies of human tissue, in contrast to studies performed on animal models, need to be carefully integrated into a standard medical procedure. Typically, tissue samples are collected by a surgeon during an operation either as a small biopsy specimen or as a large part of an organ during an exeresis (ablation of the organ). In the first case, the amount of tissue sample is small (a few milligrams), whereas in the second case, entire organs can be removed. In a medical setup, these tissue samples are used primarily for histopathological analysis and for biomolecular analysis. Histopathological analysis consists of studying the detailed

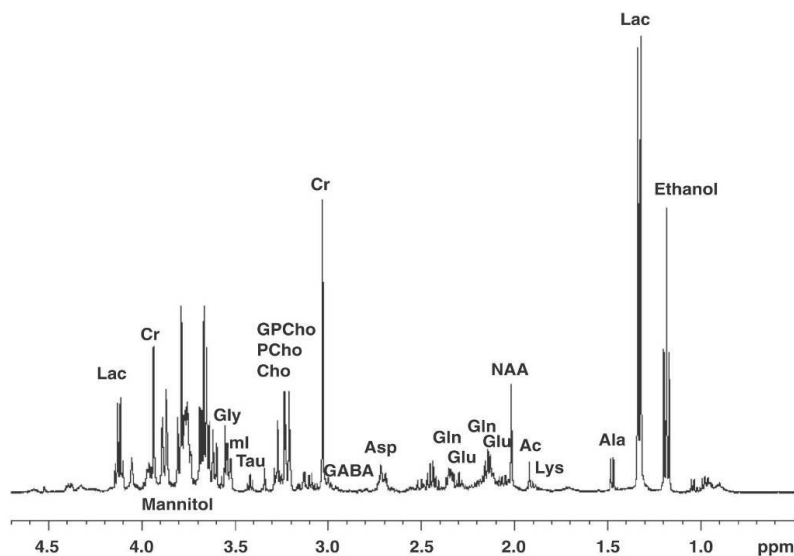


Figure 23.1. 1D ^1H HR-MAS CPMG spectrum of a human oligodendroglioma biopsy sample at 500 MHz. Characteristic metabolites are annotated. Experimental conditions: temperature 277 K, spinning speed 3.5 kHz, weight of biopsy specimen 15 mg, experiment time 10 minutes. All spectra presented in this chapter were acquired on an 11.7 T AVANCE III system (spectrometer hardware and software from Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

morphological features of a tissue under a microscope using appropriate staining agents and is currently the gold standard used to evaluate tissue characteristics, providing information pertaining to the nature of the tissue (e.g., the grade of a tumor). Histopathological diagnosis plays a fundamental role in defining a patient's prognosis and treatment and management. After surgical resection, the tissue specimens are immediately sent to the histopathology department for sampling and diagnostic purposes. At this point, a histopathologist selects the samples that are needed for histopathological diagnosis, routine biomolecular analysis, and immunohistochemical (IHC) and *in situ* hybridization (ISH) analysis with a morphological background. Samples selected for metabolic studies and future biomolecular analysis are snap-frozen and stored in a -80°C deep freezer located in the biobank of the hospital. All relevant data regarding the sample and the patient are also carefully documented for future use. At the present time, the most practical way of conducting an HR-MAS analysis of human tissue samples is to use samples available from the biobank of a hospital. In cases where the delay between sample collection and sample freezing needs to be kept very short (smaller than 5 minutes) to obtain relevant metabolic information (i.e., brain tissues), snap-freezing may be performed immediately in the operating room. For animal studies, working with tissue samples is less problematic because animals can be sacrificed and samples can be collected immediately. These considerations demonstrate that quality and reproducibility of human biopsy

samples depend significantly on the surgeon and on the nature of the surgical operation. One of the main parameters to control is the duration of ischemia (i.e., the amount of time during which tissue is left without blood perfusion). This time is critical because both the nature and the quantity of the metabolites detected by HR-MAS are strongly affected by the duration of ischemia. One effect of ischemia is that the amount of lactate increases significantly as a result of anaerobic glycolysis induced by hypoxia. Most tissue samples analyzed by HR-MAS show a large lactate peak. The duration of ischemia is also important for tissues used in certain histopathological analyses. However, ischemia has less influence on cellular structures than it has on metabolic profiles. To determine the total duration of tissue ischemia, two different phases of the surgical operation process need to be examined. The first phase is the removal of the tissue. To prevent excessive bleeding of the patient, the surgeon first clamps the veins and the arteries surrounding the tissue to be excised. This is a required step for many organs (e.g., colon, lung, ovary, kidney) but not for the brain. The associated duration of ischemia depends on the surgeon, the organ operated, and the complexity of the operation. The second phase during which ischemia occurs is after tissue removal. In routine surgery, removed tissue is often left standing in a recipient on the operating table at room temperature before storage in nitrogen. Although the duration of the first phase is strictly defined by the surgical process, the second ischemic delay can be reduced dramatically without adverse effects on the patient's health. While the sample is exposed to room temperature, enzymatic and chemical reactions are active and lead to biochemical degradation processes. Sample degradation is more rapid in some organs than in others. In particular, some metabolites of brain tissue are known to degrade at a faster rate than in many other tissues. For example, in brain specimens, *N*-acetyl aspartate (NAA) is rapidly transformed to acetate and aspartate at room temperature (43,44).

An example of a degradation study of a healthy lung biopsy specimen at 24°C is shown in Figure 23.2. The purpose of this experiment was to simulate the combined effects of 1) the second ischemic delay, and 2) the duration of sample rotation during HR-MAS on the metabolic profile of the lung. The first spectrum was recorded at 4°C with a fresh sample at $t = 0$. Between each successive experiment, the sample was taken out of the magnet and left standing at room temperature. These spectra show that the metabolic profile of the biopsy sample changed over time. In particular, the signal intensities for glucose (4.65 ppm), phosphorylcholine (3.22 ppm), choline (3.20 ppm), acetate (1.90 ppm), and alanine (1.48 ppm) increased significantly, whereas ascorbic acid (4.53 ppm) decreased. The fact that the apparent concentrations of most metabolites increase with natural sample degradation and with repeated cycles of sample spinning has been noted by several authors (45). This effect is most likely due to progressive degradation of tissue structure. In intact tissue, macromolecules such as enzymes and other relatively immobile and semisolid structures bind a certain amount of small molecules, notably polar metabolites. Because these molecules are much less mobile in a bound state than they are in solution (tissue water), they generate only very broad NMR signals that are virtually undetectable by common NMR methods, as are the macromolecule signals themselves. These signals at most may deform the spectrum baseline but do not permit detailed analysis. As tissue structure decomposes, these macromolecules and other

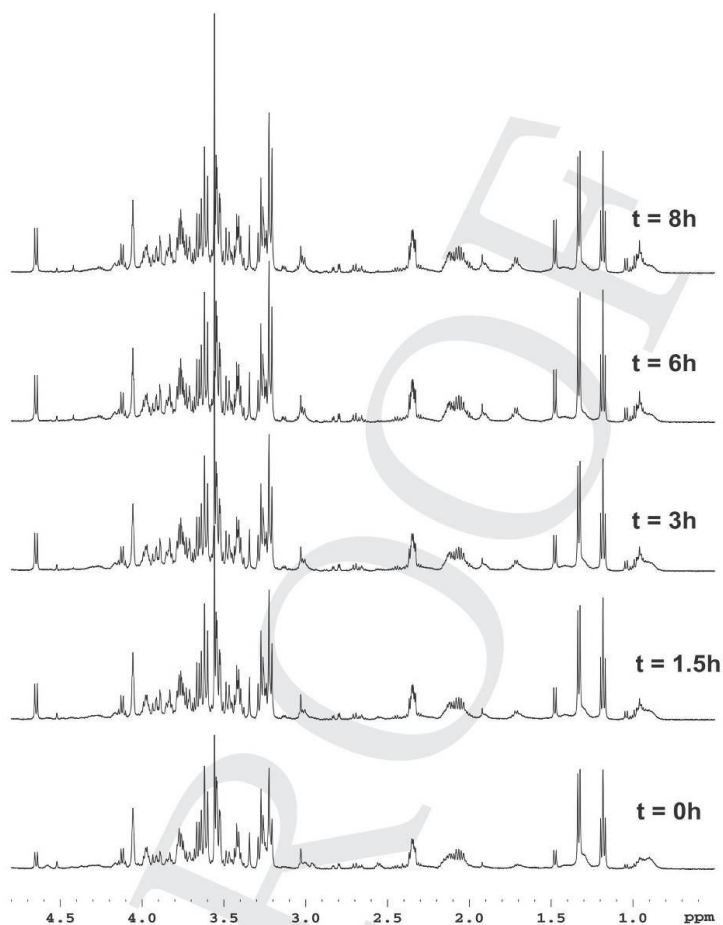


Figure 23.2. Degradation study of a control lung biopsy specimen performed at 24°C to simulate the second time of ischemia. Spectra were recorded at time 0, 1.5, 3, 6, and 8 hours. Between each experiment, the sample was taken out of the NMR instrument and kept at room temperature.

structures with reduced molecular mobility release bound metabolites into intracellular and extracellular water. Once dissolved, these metabolites are highly mobile and become NMR-visible, increasing the intensities of the metabolite peaks in question. Consequently, the further tissue degradation progresses, the more metabolite signals increase until no more molecules are released into solution.

To guarantee tissue sample integrity as much as possible and to reduce the duration of ischemia to a minimum, we have established the following protocol (Figure 23.3). For each type of surgery, a reference person present during the

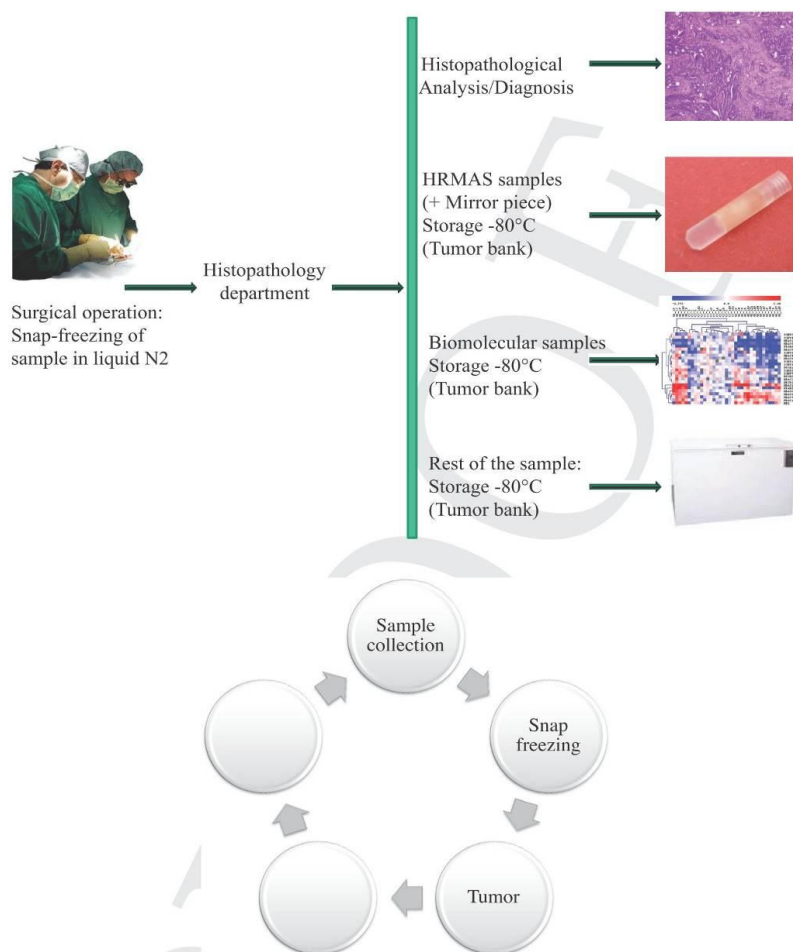


Figure 23.3. Optimized procedure for the collection of human tissues in a hospital.

surgical operation collects the surgical specimen and transfers it rapidly to the histopathology department where a pathologist subdivides it to generate individual specimens for

- 1) routine histopathological analysis which may be complemented with additional analyses, e.g., biomolecular analysis and/or ISH performed on tissues fixed with formol and embedded in paraffin;
- 2) biomolecular analysis based on frozen samples;
- 3) HR-MAS analysis;
- 4) research purposes.

For the HR-MAS study, two individual specimens are collected: one for the metabolic analysis itself and the other (the mirror sample) for a matched histological analysis. After this selection, the two samples for the HR-MAS study and the research samples are stored in a -80°C deep freezer. With this procedure, the tissue sample is continuously kept at low temperature after excision in the operating room. This procedure guarantees a high degree of sample integrity, which is essential not only for HR-MAS metabolic analysis but also for biomolecular analysis. At -80°C , samples can be stored for several years with minimum alteration (46). A variant of the above-described procedure consists of selecting the final, individual specimens directly in the operating room, snap-freezing them in liquid nitrogen, and keeping them at -80°C until analysis.

Because it is known that repeated cycles of sample freezing and thawing alter the structure of tissues (47–49), it is recommended to minimize the number of cycles (typically one or two) before HR-MAS analysis. The most common sources of contamination giving rise to signals detectable by NMR in tissue samples are 1) ethanol (peaks at 1.18 ppm and 3.65 ppm), which is used for sterilization of surgical instruments, and 2) optimum cutting temperature (OCT) cryoprotective embedding medium that contains soluble glycols and resins. OCT medium might be detectable in samples that were previously used, at least in part, for a histopathological study. The OCT signal is easily identified in 1D ^1H spectra because it gives rise to a large singlet at 3.70 ppm. Samples containing a large amount of either of these two compounds should be discarded from the analysis. When present in small quantities, their signals can be simply removed from the spectrum by digital processing.

The tissue sample collection procedures presented here describe the process as performed at the Strasbourg University Hospitals; as of this date, corresponding procedures from other clinical environments have not been described in the published literature. However, sample storage is very similar across laboratories active in this field (40,50).

2. Sample Preparation

To eliminate the risk of sample cross-contamination and cleaning issues, biopsy samples are now routinely prepared in disposable inserts. These inserts are made of polychlorotrifluoroethylene (PCTFE), marketed as Kelf (Daikin Industries, Osaka, Japan), and have an active volume of about 30 μL . This volume is sufficient to accommodate 15 to 20 mg of tissue and 10 μL D_2O . There is no need to use a buffer for biopsy studies because the physiological salts naturally present in biological tissues already provide sufficient buffering capacity. To prevent as much as possible sample degradation during the preparation procedure, samples should be prepared in the frozen state inside a cryostat regulated at -20°C (Figure 23.4). This type of equipment is routinely used in histopathology departments for the preparation of histological sections. The amount of specimen used for each sample (~ 15 mg) and the time required for preparation should be kept as constant as possible for all samples involved in a particular study, which is greatly facilitated by the use of biopsy punches. Because it is important to know the exact amount of tissue used in each analysis, the insert should be weighed before and after filling. Once the specimen is introduced and weighed, D_2O is added for the purpose of locking the

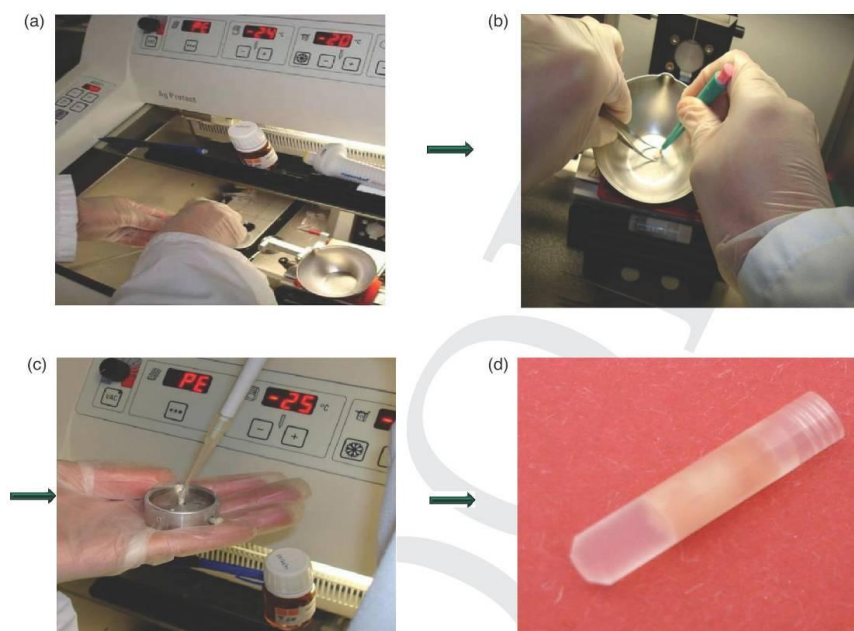


Figure 23.4. Biopsy sample preparation for HR-MAS studies: (a) Cryostat at -20°C . (b) Biopsy punch used to take the biopsy specimen. (c) Introduction of the biopsy specimen and D_2O into the insert. (d) Final insert closed with a transparent conical plug.

spectrometer during the NMR experiment. After the insert has been closed with a plug, it is stored back in the -80°C freezer. At the time of analysis, the insert is placed in a standard 4-mm ZrO_2 rotor of the type classically used for solid-state NMR studies (3). To obtain reproducible sample preparation, this task should be entrusted to a meticulous person who performs this preparation on a routine basis. The entire sample preparation process takes only 2 to 3 minutes for a trained person, minimizing sample degradation. At a later stage of development, automatic sample preparation procedures should be considered. Advantages of a disposable insert are that the tissue sample can be stored back in the -80°C freezer after HR-MAS analysis without the need for removing it from its recipient and that the rotor itself can be immediately reused for subsequent analyses. The biopsy specimen is available for histopathological analysis if needed. This is an important point because HR-MAS and histopathological analysis both can be performed on the same sample in cases where it is uncertain whether the mirror sample represents the same type of tissue that has been used for obtaining the metabolic data. At the present stage of development, histology on the very samples that have been used in HR-MAS experiments is not performed on a routine basis because cutting the insert to generate $5\text{-}\mu\text{m}$ slices suitable for histopathological analysis takes an extra amount of time. For this reason, the use of mirror samples cannot entirely be replaced by post-HR-MAS histology at this time.

In addition to our laboratory, these sample preparation techniques have been implemented by numerous groups working in this field (40,50). However, slight variations can be found. Some authors, instead of adding pure D₂O to the biopsy sample, prefer a solution of phosphate-buffered saline (PBS) in D₂O (16). The advantage of this approach is twofold: 1) The liquid being in direct contact with tissue material is isoosmotic; this may be beneficial to tissue integrity by minimizing osmotic pressure. In this way, metabolite leakage from the tissue may be prevented or at least reduced. 2) The buffering capacity of the liquid surrounding the tissue is increased, facilitating the maintenance of constant, tissue-like pH. However, the overall salt content of the sample is increased with PBS/D₂O versus D₂O alone. This may result in a reduction of the sensitivity of the NMR experiment.

3. Data Acquisition

Before running an HR-MAS analysis of biopsy samples, one should ensure that the spectrometer is operational and meets certain specifications. First, the temperature existing inside the rotor should be calibrated precisely for the spinning speed to be used subsequently for tissue HR-MAS because samples are being heated owing to rotation (51). A calibration sample consisting of 100% MeOH or 99.8% MeOD/0.2% MeOH (52) allows high-precision temperature calibration. Because sample degradation is always of prime concern, low temperatures are mandatory, and a value of 4°C is typically chosen. This temperature ensures that tissue samples are not frozen during HR-MAS analysis.

The spinning speed is usually chosen to be as low as possible to prevent sample degradation secondary to the centrifugal forces induced by rotation. At 500-MHz measurement frequency (11.7T magnetic field), a spinning speed of 3,500 Hz (corresponding to 7 ppm) is adequate. This value is sufficiently high to prevent spinning side bands associated with the rotation to fall in the crucial 4.7- to 0.5-ppm region. For different magnetic fields or when using a wider chemical shift range for metabolite analysis, the spinning speed should be adjusted as needed. Although higher spinning speeds can be technically achieved, it is advisable to limit these to the minimum required because the risk of tissue alteration significantly increases with spinning speed. This effect not only may adversely influence the reproducibility of HR-MAS spectra, but also has detrimental consequences for tissue histology on samples that have undergone HR-MAS spectroscopy.

To obtain spectra with the required quality, the magic-angle setting (54.7 degrees) should be set precisely because it has a direct influence on the line shape of the samples (51). The standard procedure is to use a KBr sample and acquire ⁷⁹Br spectra. The intensity of the spinning side bands in the ⁷⁹Br spectrum is maximized by adjusting interactively the position of the stator. Once the magic angle is set, the quality of the shims should be checked by using a test sample containing 1% CHCl₃ in acetone-D₆. It is important to position the probe in the magnet in such a manner that the stator containing the radiofrequency coil is aligned either along the *X* or the *Y* axis of the shim system of the spectrometer. This procedure allows one to decrease the number of active shims and facilitates the shimming procedure. More information concerning the exact spinning angle adjustment procedure can be found elsewhere (51). Typical full width at half height (FWHH) values on the

Table 23.1. *Standard acquisition and processing parameters for a one-dimensional CPMG experiment used at a field strength of 500 MHz for a standard biopsy sample of 15 mg (pulse program, cpmgpr1d, and acquisition mode, baseopt)*

1-D CPMG	
Acquisition Parameters	
Temperature	4°C
Rotation speed	3,500 Hz
Relaxation delay	2 sec
Acquisition time	2.34 sec
90° pulse width	About 8 µsec
Receiver gain	128
Sweep width	14 ppm
Number of scans	128
Dummy scans	4
Number of points (real + imaginary)	32k
Length of CPMG	93 msec
Interpulse CPMG delay	286 µsec
Field strength used for water presaturation	50 Hz
Experiment time	10 min
Processing Parameters	
Number of points (complex)	64k
Exponential broadening	0.3 Hz
Baseline correction	Linear

Note. The parameters used for the acquisition of a simple “90° pulse-acquire” experiment (pulse program, *zgpr*) are identical except for the absence of CPMG-specific parameters (names of pulse programs and acquisition modes are given in italics as used in Bruker instruments; similar software is available for spectrometers from other manufacturers).

CHCl₃ line at 7.24 ppm should be less than 1 Hz. Once acceptable values have been obtained on the CHCl₃ test sample, biopsy specimens can be analyzed. If the probe is positioned along the *Y* axis of the shim system, only a small set of shims (*Z*, *Y*, *YZ*, *X2–Y2*) (51) has to be adjusted for each individual biopsy sample, by optimizing the FWHH of either the lactate resonance at 1.33 ppm or the alanine resonance at 1.48 ppm. The FWHH of each doublet peak should be inferior to about 1.5 Hz. At the present time, gradient-based methods (53–55) are not yet available for automatic shimming of samples spinning at the magic angle; however these methods are under development and should become available in the near future.

For metabolic analysis of tissue samples, 1D ¹H NMR data are typically recorded using either a CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) (41) sequence or an experiment employing a simple 90-degree pulse, both with water presaturation. A solvent signal suppression sequence frequently used in the field of biofluid metabolomics is 1D ¹H NOESY with presaturation, which also efficiently minimizes broad signals of exchangeable protons (typically urea contained in urine). However, the advantage of ¹H 1D CPMG over 1D ¹H NOESY is that the CPMG sequence reduces the broad signals originating from proteins and lipids contained in biopsy specimens. Without attenuation, lipid signals might easily dominate the tissue spectrum, obscuring metabolite signals of interest. Acquisition parameters of a typical ¹H 1D CPMG biopsy tissue experiment are presented in Table 23.1. The interpulse

delay between the 180-degree pulses of the CPMG pulse train is synchronized with sample rotation (ω_r), and is set to 286 μsec ($1/\omega_r = 1/3,500 = 286 \mu\text{sec}$) to eliminate signal losses owing to B_1 field inhomogeneity (56,57). The number of loops (i.e., 180-degree pulses) is typically set to 328, yielding a total CPMG pulse train length of 93 msec. This value is adequate to reduce the intensity of lipid signals to the level of the metabolites in most organs (i.e., brain, colon, kidney, and ovary). For samples originating from organs containing large amounts of lipids, such as breast, the length of the CPMG pulse train should be increased to 200 to 250 msec (58). Metabolite signal intensities are reduced owing to the presence of the CPMG sequence preceding data acquisition, and this attenuation depends on the length of the CPMG pulse train (i.e., effective echo delay [TE]). However, the signal attenuation secondary to a given echo delay decreases with increasing transverse relaxation time (T2) of the observed protons, where $T2 = 1/(LW*\pi)$, with LW being the intrinsic linewidth of the corresponding peak.

With our current protocol, the lines generated by virtually all metabolite molecules are relatively narrow (1 to 1.5 Hz), which indicates that the lower limit for T2 is approximately 210 msec. The “true” T2 values should be significantly higher because factors such as residual magnetic field inhomogeneity effects also contribute to the measured linewidth, FWHH. Therefore, no dramatic signal attenuation is to be expected for the metabolites in question when a relatively short CPMG pulse train is employed (e.g., the pulse train length of 93 msec mentioned previously). Because all metabolite resonances exhibit roughly similar linewidths, the signal attenuation secondary to the CPMG pulse train is similar for all metabolites (provided that the actually observed linewidths are not strongly influenced by residual magnetic field inhomogeneities). It is also implied that the relative metabolite concentrations would not be substantially affected by the length of the CPMG pulse train (i.e., pulse train effects would be within the narrow limits indicated by linewidth variations). The same argument holds for the determination of absolute concentrations provided that the spectrum of the metabolite in the reference solution is recorded under the same CPMG conditions that are applied to the tissue samples.

The data acquisition time for each FID is set to 2.34 seconds to provide adequate resolution, and the recycling delay is set to 2 seconds to obtain pseudoquantitative spectra within an acceptable measurement time. Significantly longer recycling delays would be needed to avoid any signal saturation secondary to incomplete longitudinal relaxation of the protons of many metabolites ($TR \geq 5*T1$, where T1 is the longitudinal relaxation time of the protons in question, and TR is the repetition time for each scan – the sum of the data acquisition time and the recycling delay). However, such delays would result in prohibitively long spectrum acquisition times. Saturation effects must be considered for exact determinations of absolute metabolite quantities based on this protocol.

Typically, 128 scans are acquired, resulting in a total measurement time of 10 minutes. These conditions provide an adequate signal-to-noise ratio and fast turnover and minimize tissue degradation effects; the latter become particularly significant when the overall sample spinning time exceeds 30 minutes. To automate the acquisition process as much as possible and to avoid unnecessary adjustments, the receiver gain of the spectrometer is kept at a constant value (Table 23.1). The only

parameter individually adjusted for each sample is the 90-degree pulse width. This parameter varies slightly among samples and can affect absolute quantification of metabolites. Further details concerning quantification are mentioned in Section 5 on data analysis and signal assignment.

In essence, the data acquisition protocol is common to virtually all laboratories analyzing human biopsy samples (40,50). Nonetheless, minor variations in experimental parameters have been reported. For example, although it is now accepted that low temperatures should be used for the acquisition of biopsy sample spectra, temperature values ranging from 1°C to 4°C have been published. The length of the CPMG pulse train varies between 50 msec and 250 msec, depending on the project described. This variation can be explained by the fact that this parameter is organ-dependent, and its optimal value depends on the amount of lipid present in the tissue. The exact values used for TR, the data acquisition time, and the interpulse delay of the CPMG pulse train also may differ slightly from the values presented in the protocol described.

4. Data Processing

All 1D ^1H CPMG spectra should be recorded in such a manner that only zero-phase order correction is necessary to phase the spectrum properly (Table 23.1). The first-order phase correction is close to zero for all spectra. This procedure generates spectra with fairly flat baselines and offsets close to zero. The FID is multiplied by an exponential weighting function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz before Fourier transformation (Table 23.1). At the present time, spectra are processed using an automatic baseline correction routine employing a simple linear correction to obtain a baseline level that is exactly at 0. ^1H spectra are referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm. TSP is an unreliable reference for chemical shift referencing because it can bind to various proteins or membranes in the sample, making its chemical shift sample dependent. In the event of the presence of contaminants such as OCT or ethanol at low concentrations, digital processing of the spectra can be used to set the intensity of the corresponding spectral regions to zero.

Although most laboratories use data processing methods very similar to those presented in this chapter (40,50), the reference compound, lactate, is replaced in some protocols with a different metabolite, such as alanine (1.48 ppm) or glucose (5.23 ppm) (59).

5. Data Analysis and Signal Assignment

Specific experiments used for the assignment of metabolites present in biopsy samples are primarily $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC, and DIPS12 sequences. Measurement times for each these experiments are typically 8 and 15 hours, respectively. Because the duration of these experiments is long, they are acquired on only a few samples that are representative of each class of tissues and exclusively for the purpose of signal assignment. Significant tissue degradation occurs during this long measurement time; therefore, ^1H CPMG experiments have to be completed before these signal assignment experiments. Further assignment methods are described in Chapter 24.

In addition, assignment of spectral resonances can be facilitated by using published literature values or specific databases (e.g., Human Metabolome Database (60) or Bruker Metabolic Database). For most biopsy samples, 35 to 45 metabolites are detected. Greater than 90% of the metabolites detected by ^1H HR-MAS NMR are common to all organs. Specific metabolites are more abundant in the brain (NAA, GABA), the adrenal gland (epinephrine) (28), or the prostate (citrate) (22). Quantification of metabolites in each sample is of paramount importance because metabolic profiling potentially reveals characteristic values for sets of metabolites for many healthy and cancerous tissues. With current technology, it is possible to detect by HR-MAS NMR approximately 35 to 45 metabolites in about 15 mg of tissue within an experimental time of about 10 minutes. This corresponds to a detection threshold of about 0.1 mmol metabolite per kg tissue. Because magnetic resonance is an intrinsically quantitative technique, it is possible to obtain exact absolute metabolite levels for each sample, provided that signal saturation effects are taken into consideration or are avoided altogether. The influence of acquisition parameters on signal intensities is discussed in Section 3 on data acquisition. The quantitation technique suggested in this protocol includes calibration by separately measuring the signal intensity of a reference solution containing a known amount of a metabolite, typically lactate, under exactly the same conditions used for the measurement of biopsy samples. We have found that the T1 values measured in these reference solutions were similar to the corresponding values in tissue samples (data not published). In cases where precise absolute quantitation is needed, correction for saturation has to be included as mentioned in Section 3. The fact that CPMG linewidths are also similar in reference solutions and in tissue indicates that any signal attenuation owing to the CPMG pulse train (effective TE) should be similar in both sample types. The recommended quantitation method with the aid of reference solutions provides a good approximation at this stage of development. In addition, a technique using an electronic reference signal for quantitation (Eretic [“electronic reference to access in vivo concentrations”] (61)) associated with a method based on pulse length measurements (PULCON [“pulse length based concentration”] (62)) is particularly powerful (63). The current state-of-the-art Eretic method is a digital version that does not require any additional hardware but only a dedicated program that digitally adds a synthetic reference signal to the NMR spectrum.

At the present time, only peaks that are well resolved in 1D CPMG spectra can be routinely quantified. However, using more sophisticated methods such as LCModel (LCModel Inc., Oakville, Canada) (64) or jMRUI (University of Lyon, Lyon, France) (65), it will eventually be possible to quantify larger sets of metabolites. These advanced techniques have the added advantage of taking into account the entire spectra of all metabolites in the quantitation process, which significantly reduces the probability of overestimating certain metabolite levels owing to “invisible” peaks that may lie under the resonances to be quantitated. This is a common problem in all biological 1D proton spectra. In addition, this software allows one to include model spectra of macromolecules and lipids. These compounds generate very broad resonances that effectively “deform” the baseline, even though CPMG protocols reduce their appearance. Current routine baseline correction methods neglect these effects, which may result in further overestimation of certain metabolite levels. Methods such as LCModel or jMRUI will be recommended for use in

clinical routine protocols once they are able to process large quantities of spectra rapidly and automatically. By and large, the data analysis and signal assignment techniques described in this chapter have found numerous applications in the field of biopsy sample HR-MAS NMR spectroscopy (40,50).

6. Statistical Analysis

In most cases, the spectral region between 4.7 ppm and 0.5 ppm of each 1D ^1H CPMG NMR spectrum is automatically subdivided into regions of 0.01 or 0.001 ppm width for automated statistical evaluation. This process is also known as “binning” or “bucketing.” If necessary, the region between 10 ppm and 5.2 ppm can also be used for the analysis. However, the region containing the residual water signal at approximately 5 ppm is systematically excluded. A large variety of manufacturers provide software platforms that can be used for binning; these platforms can be programmed by users or are programmed by the manufacturer to perform this task. Examples shown in this chapter are based on AMIX software (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

The widths of the bucketing regions can be adjusted to minimize effects of peak shifts owing to variations in pH or salt content. The choice between 0.01 ppm or 0.001 ppm bucketing depends on how well corresponding peaks in the spectra to be compared are aligned. The quality of peak alignment can be assessed easily by inspecting the stacked plots of the spectra to be included in a specific statistical evaluation. The peak integral within each individual bucket region is computed with the aid of AMIX or with a MatLab-based program and normalized with respect to the total integral of the entire spectral region included (typically 4.7 to 0.5 ppm). This procedure allows normalizing all metabolite signals of a given spectrum to tissue sample weight. If necessary, signals originating from contaminants or lipids can also be removed at this stage by excluding the corresponding spectral regions from the bucketing and normalization processes. The bucketing process generates an X data matrix with a number of columns corresponding to the number of buckets and a number of rows corresponding to the total number of samples used.

Data sets are imported into a statistics program for analysis (e.g., SIMCA P 11.0 software from Umetrics AB, Umeå, Sweden). First, data are preprocessed to give equal weight to metabolites present at high and low concentrations. Then, data are first analyzed using principal component analysis (PCA) (66,67). This unsupervised multivariate data reduction routine serves to evaluate the quality of the data quickly and to identify possible outliers. In the typical case of a two-group study, the two groups first should be subjected to independent PCA analyses. Outliers in each group might be due to incorrect spectral referencing, poor data quality (e.g., because of suboptimal shims, phase errors), or occasionally the presence of contaminating signals (e.g., chemical impurities, electronic “parasites”) that were not removed at an earlier stage of spectrum processing. This procedure is very useful for identifying samples that are contaminated with ethanol or fixing agents. Spectra from these contaminations usually appear unmistakably in the score plot of the first two principal components. The spectra of these outliers should be inspected visually and either corrected or removed from the analysis. After PCA analysis, a supervised partial least square discriminant analysis (PLS-DA) (67–69) is usually

employed to build a statistical model that optimizes the separation between the two groups. The number of components of the PLS-DA model is determined by cross-validation. The class membership of each sample is iteratively predicted, using the results to generate a goodness of fit measure, Q^2 , for the overall model. The maximum theoretical value for Q^2 is equal to 1 for perfect prediction. However, a Q^2 value superior to 0.5 is generally considered to be a decent predictor. Because in practice PLS-DA models are often built using a relatively small number of samples compared with the number of variables, an extensive cross-validation of the model is mandatory to avoid overfitting of the data (70).

The combination of PCA and PLS-DA has become the universally used standard approach to this type of analysis (40,50). However, more sophisticated statistical methods such as hierarchical cluster analysis, K-nearest neighbor analysis, or neural networks are also in use (71). Further details of statistical methods can be found in Chapters 4 through 10.

7. Sample Reproducibility in High-Resolution Magic Angle Spinning

When studying cohorts of humans by tissue HR-MAS, it is essential to ensure a high level of reproducibility for all samples belonging to a specific group, for all groups. This includes separate validation for control (healthy) and diseased tissues because the two might behave slightly differently with respect to reproducibility. While setting up a statistical model, detailed histopathological results should be available for all samples to ascertain the exact characteristics of the tissue type in question. The contribution of histopathologists is crucial at all stages of the study. In this section, we present two examples of reproducibility studies based on different human tissues.

7.1. Epilepsy

Thirty-seven 1D ^1H CPMG spectra of healthy human cerebral cortex were obtained from patients with epilepsy who had undergone surgical removal of the hippocampus (Figure 23.5). This set of spectra shows convincingly that the protocol described in this chapter can be used to obtain highly reproducible brain tissue spectra. Because no normalization with respect to sample weight was applied for the display of these spectra, the globally constant signal intensities across all spectra indicate that the weight of biopsy specimens was rather constant. Sample contamination by ethanol is visible in some spectra (peaks at 1.18 ppm and 3.65 ppm). Because these contaminations were not very large, the corresponding spectral regions were simply set to zero in all the spectra for statistical evaluation. The corresponding PCA analysis is shown in Figure 23.6. Only the first two principal components of the PCA model are shown because they account for the largest variability in the sample. In this example, the first and the second component (PC1 and PC2) account for 18% and 14% of the variability. Most of the spectra fell within the Hotelling T2 ellipse shown, with a confidence level of 95%. Only two data points fell outside the T2 ellipse. The corresponding outlier spectra showed slightly abnormal intensities at 2.19 ppm and 3.5 ppm, which probably explain the nontypical behavior of the two points in the PCA plot.

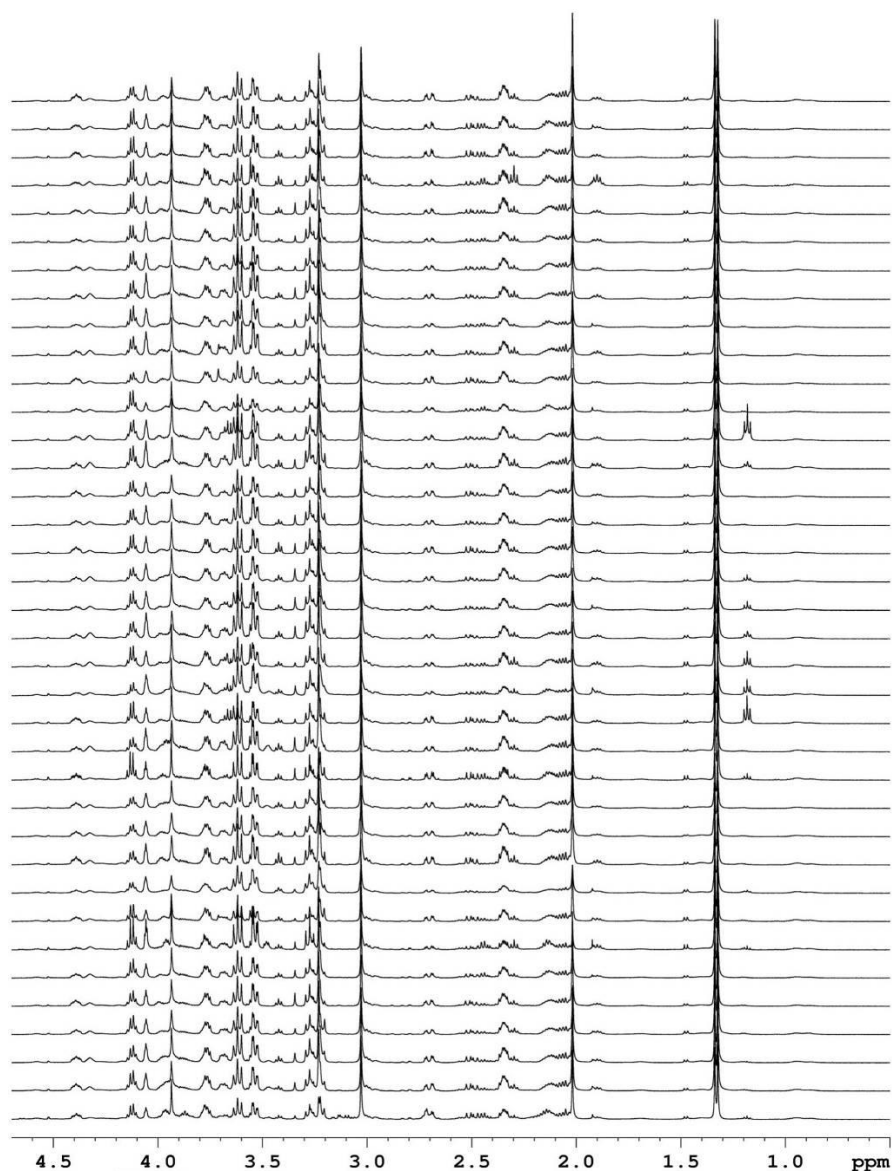


Figure 23.5. Stacked plot of 1D ¹H HR-MAS CPMG spectra of healthy human cortex biopsy specimens originating from 37 different patients.

7.2. Normal Kidney Tissue and Renal Cell Carcinoma

1D ¹H CPMG spectra of healthy kidney and renal cell carcinoma biopsy samples were acquired, originating from 20 different patients. Clear or conventional renal cell carcinomas represent 75% to 80% of renal cell carcinomas, the latter accounting for about 90% of adult renal tumors (72–74). From each patient, one healthy

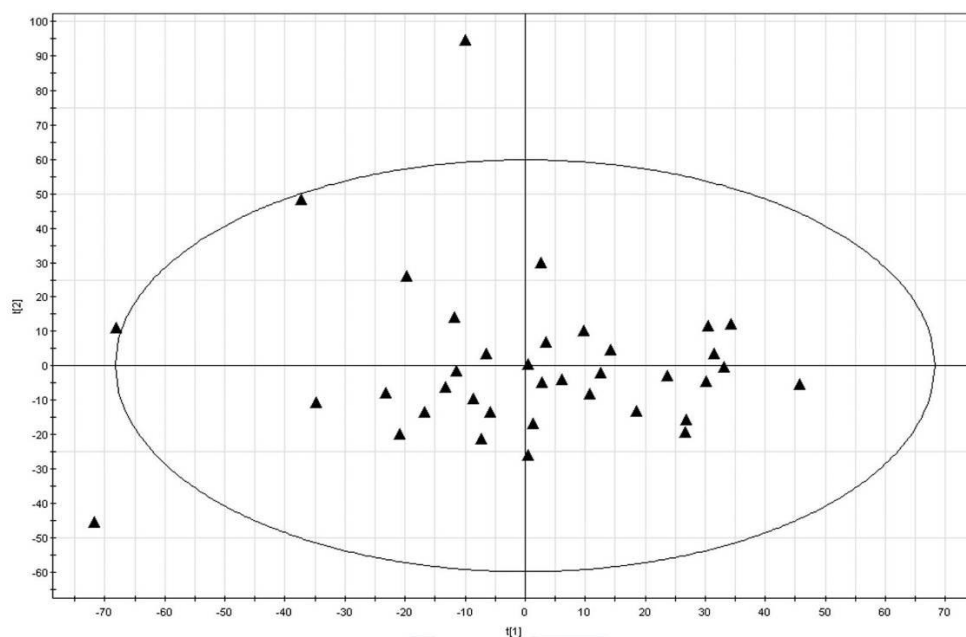


Figure 23.6. PCA analysis of the spectra shown in Figure 23.5 corresponding to 37 healthy human cortex biopsy specimens (spectral region corresponding to the ethanol resonances set to zero).

and one cancerous biopsy specimen were taken. The data presented in Figure 23.7 show the reproducibility of these spectra across the patient cohort (ethanol contamination is observable for several samples). Visual inspection of these spectra immediately reveals the existence of differences in metabolic signatures between control and clear renal cell carcinoma tissues. The cancerous samples are clearly characterized by a conspicuously intense lipid peak at 0.9 ppm. Table 23.2 presents detailed assignments of metabolites detected in healthy kidney tissue.

To ascertain further the reproducibility of the method, the average concentration of selected metabolites was evaluated for the 20 healthy human kidney samples presented in Figure 23.7. Metabolite concentrations were obtained from each spectrum by simply integrating the areas under individual peaks representing the resonances of the metabolites being analyzed. Only metabolites presenting at least one resonance with sufficient spectral resolution were selected for this analysis. A more robust but also more time-consuming protocol using the software LCMoDel (64) or jMRUI (65) would lead to more reliable results (see Section 5 on data analysis and signal assignment). Nevertheless, the results presented in Table 23.3 show very reasonable standard deviations for the metabolite concentrations evaluated.

The corresponding PCA analysis of these two sets of spectra, based on 0.01 ppm bucketing, is shown in Figure 23.8. Only the first two principal components of the PCA model are shown because they account for the largest variability in the sample. For the cancerous tissue samples (Figure 23.8(a)), PC1 and PC2 account for 19% and 9% of the variability. This data set is unusually large and contains 139

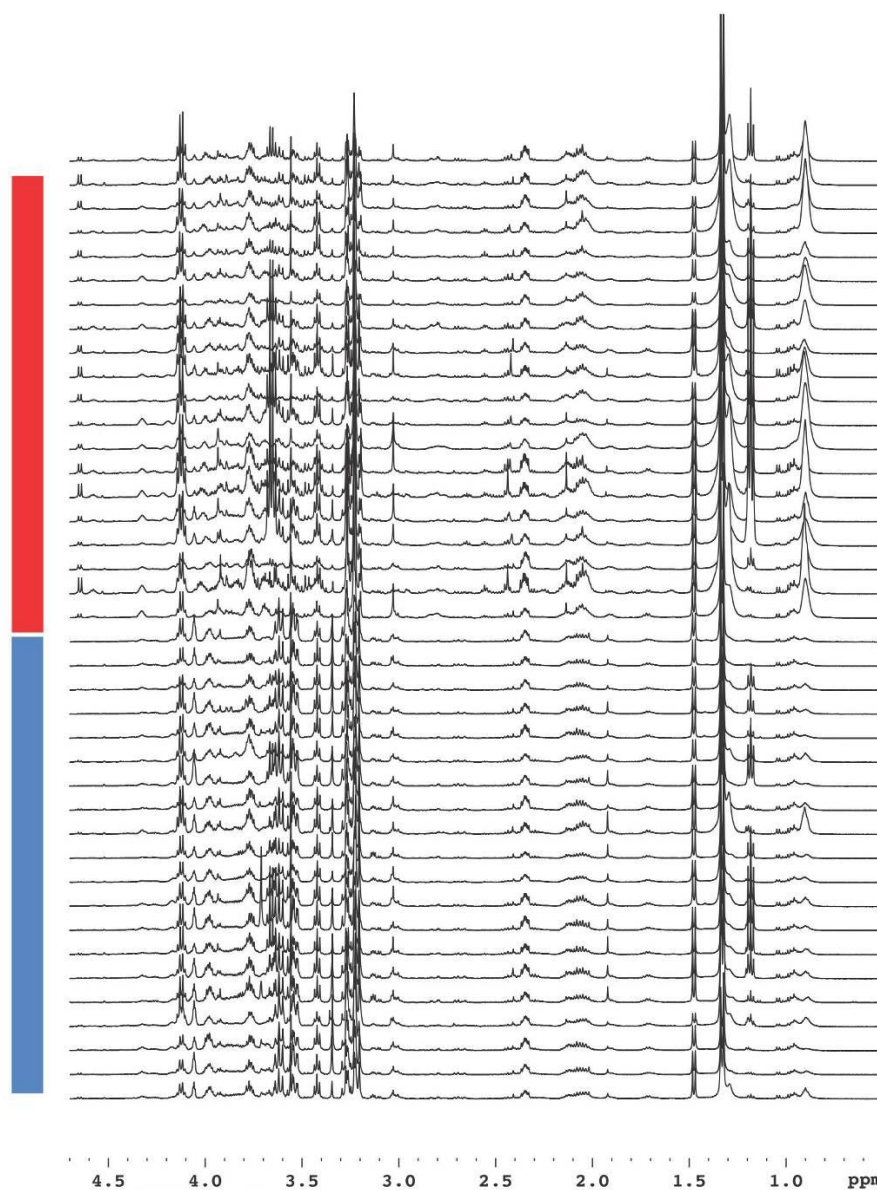


Figure 23.7. Stacked plot of 1D HR-MAS CPMG spectra of control kidney biopsy samples (*blue*) and clear renal cell carcinoma tissue (*red*).

spectra. As in the previous example (Section 7.1 on epilepsy), most of these spectra fell within the Hotelling T2 ellipse. Only four data points fell slightly outside the T2 ellipse. For the corresponding control tissues (Figure 23.8(b)), PC1 and PC2 account for 19% and 14% of the variability (119 spectra; 9 outside the T2 ellipse).

Table 23.2. ^1H and ^{13}C resonance assignment of metabolites present in healthy human kidney biopsy specimens

Metabolites	Group	^1H Chemical shift (ppm)	^{13}C Chemical shift (ppm)
Acetate	CH_3	1.92	25.97
Alanine	βCH_3	1.48	18.81
	αCH	3.78	53.22
Arginine	αCH_2	1.70	26.75
	αCH_2	1.92	30.15
	δCH_2	3.21	43.27
Ascorbate	$\text{CH}_2(\text{OH})$	4.02	72.12
	C_4H	4.52	81.25
Asparagine	CH	4.00	54.15
	CH_2	2.94	37.43
	CH_2	2.84	37.35
Aspartate	CH_2	2.70	39.17
	CH_2	2.80	39.17
	CH_2	3.90	54.93
Choline	$\text{N}-(\text{CH}_3)$	3.21	56.75
	CH_2	3.52	69.96
	CH_2	4.06	58.27
Creatine	CH_3	3.03	39.64
	CH_2	3.93	56.36
Ethanolamine	CH_2	3.80	60.57
	CH_2	3.13	44.18
Fatty acids (a)	CH_2	1.29	34.53
	CH_2	1.31	25.36
Fatty acids (b)	CH_2	2.03	27.35
	CH_2	2.80	28.16
	CH	5.33	130.51
	CH	5.33	132.2
Fatty acids	CH_3	0.90	16.96
	$\text{CH}_2\text{-CO}$	2.25	36.43
Fatty acids (a) (b)	(n) CH_2	1.29	32.4
Fatty acids (c)	CH_2	1.60	27.3
GABA	CH_2	2.30	–
α -Glucose	C_4H	3.43	72.58
	C_1H	5.23	94.44
	CH	3.84	59.12
β -Glucose	$\text{C}_3\text{H}, \text{C}_5\text{H}$	3.47	78.44
	C_6H	3.75	63.44
	C_6H	3.89	63.44
	C_1H	4.65	98.7
Glutamate	CH_2	2.05	29.74
	CH_2	2.34	35.95
	CH	3.76	57.2
Glutamine	CH_2	2.14	29.52
	CH_2	2.44	33.48
	CH_2	3.77	57.38
Glycerol	$1,3\text{CH}_2\text{OH}$	3.56	65.09
	$1,3\text{CH}_2\text{OH}$	3.65	65.09
	CHOH	3.78	74.85
Glycerophosphocholine	$\text{N}-(\text{CH}_3)_3$	3.23	56.75
	αCH_2	4.32	62.19
	βCH_2	3.69	68.5

(continued)

Table 23.2 (continued)

Metabolites	Group	¹ H Chemical shift (ppm)	¹³ C Chemical shift (ppm)
Glycine	CH ₂	3.56	44.09
Isoleucine	CH ₃	0.94	13.79
	CH ₃	1.01	17.29
	CH ₂	1.51	27.30
	CH	3.65	62.34
Lactate	CH ₃	1.33	22.7
	CH	4.12	71.11
Leucine	CH ₃	0.95	23.43
	CH ₃	0.91	24.52
	CH	1.70	26.78
	CH ₂	1.70	42.37
Lysine	CH	3.73	56.06
	CH ₂	1.43	24.21
	CH ₂	1.71	29.10
	CH ₂	1.89	32.56
Methionine	CH ₃	2.12	16.61
	CH ₂	2.18	32.72
	CH ₂	2.64	31.50
	CHNH ₂	3.85	56.84
<i>Myo</i> -inositol	C ₃ H	3.27	77.00
	C ₁ H, C ₃ H	3.54	73.84
	C ₄ H, C ₆ H	3.61	75.06
	C ₂ H	4.06	74.85
Phenylalanine	CH _{2,6}	7.30	131.81
	C ₄	7.37	131.49
Phosphocholine	N(CH ₃) ₃	3.22	56.52
	CH ₂	3.60	68.98
	CH ₂	4.16	60.60
Phosphoethanolamine	CH ₂	3.98	63.05
	CHNH ₂	3.22	43.35
Proline	CH ₂	3.32	48.83
	CH ₂	3.41	48.83
	CH	4.10	64.39
	All HS	3.35	76.32
Serine	CH	3.84	59.12
	CH	3.97	62.88
Taurine	CH ₂ -NH ₃	3.26	50.13
	CH ₂ -SO ₃	3.42	38.06
Threonine	CH	3.60	63.04
	CH	4.24	68.67
	CH ₃	1.32	22.30
Tyrosine	CH	3.92	58.72
	CH _{3,5}	6.87	118.50
	CH _{2,6}	7.16	133.37
Valine	CH ₃	0.98	19.16
	CH ₃	1.04	20.65
	CH	2.30	31.94

Note. The nomenclature used for fatty acids is defined by Martínez-Bisbal et al. (15).

Table 23.3. *Average concentrations and standard deviations of selected metabolites present in healthy human kidney biopsy specimens*

Metabolites	Average concentration (mmol*kg ⁻¹)	Standard deviation
Acetate	0.46	0.12
Alanine	1.69	0.31
Ascorbate	0.20	0.06
Asparagine	6.08	0.95
Aspartate	0.71	0.18
Choline	0.70	0.14
Ethanolamine	0.67	0.15
Glutamate	2.43	0.53
Glutamine	0.46	0.10
Glycine	3.50	0.52
Lactate	7.15	1.83
Lysine	1.10	0.16
<i>Myo</i> -inositol	3.94	1.21
<i>Scyllo</i> -inositol	2.62	1.14
Taurine	2.71	0.35
Valine	0.21	0.04

8. Metabolic Tissue Profiling by High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

The purpose of clinical metabolic tissue profiling is to gain information on the metabolic pathways active in different tissues and for different pathologies and to establish correlations between the patients' metabolic data and their clinical evolution. This is particularly important for pathologies and patients where a discrepancy exists between histopathological diagnosis and clinical evolution. Some promising results for human brain tumors have appeared more recently in the literature (14). These results show that for some intermediate oligodendroglioma and glioblastoma cases, metabolic results are better correlated with the evolution of the patient than the corresponding histopathological data. These results are preliminary and need to be confirmed by complementary studies; however, they already open very interesting perspectives. As a first step, being able to differentiate healthy tissue from apparently healthy tissue infiltrated by cancer cells is an important issue; this is not only interesting from a biological point of view but also for possible applications such as real-time metabolic analysis of tissues in the context of a surgical operation (83). This type of application, if validated clinically, could be of great importance in the case of brain surgery because it would allow the surgeon to delineate exactly the tumorous part of the tissue. Figures 23.8 and 23.9 illustrate the potential of future applications of the procedures described in this chapter to tissue metabolic profiling. Simple PLS-DA analysis of the kidney data (Figure 23.8) proves that distinction between healthy and cancerous kidney tissues can be readily achieved. The PLS-DA score plot of the two principal components shows clear separation between the two sets of data (Figure 23.9). Numerous results published in the literature prove that this methodology can be successfully applied to several different organs. Particularly promising results have been obtained for prostate (22,75,76), breast

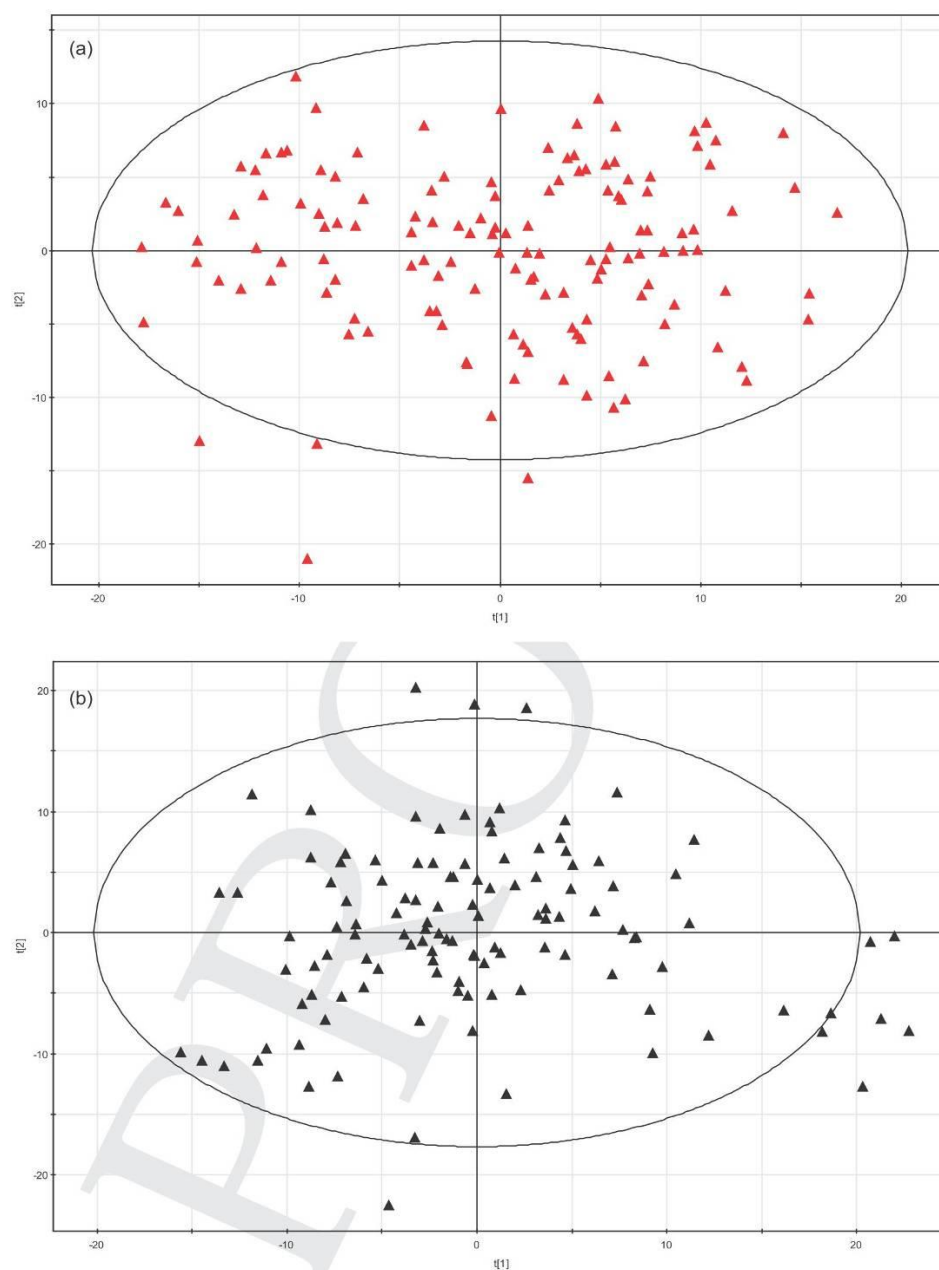


Figure 23.8. Principal component analysis of control (a) and clear cell adenocarcinoma (b) kidney tissue, based on 1D HR-MAS CPMG spectra (see also Figure 23.7).

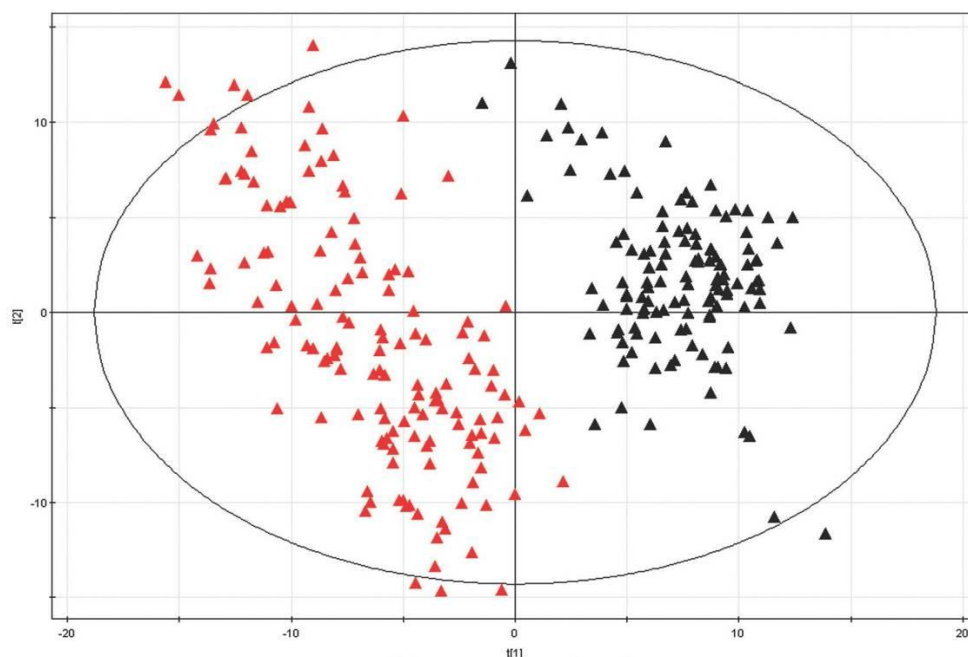


Figure 23.9. PLS-DA analysis of control kidneys (*black triangles*) and clear renal cell carcinoma kidney biopsy specimens (*black boxes*) (see also Figures 23.7 and 23.8).

(16,58,77), brain (13,15,78), kidney (26,27), colon (32,34,79,80), and cervical cancers (30,81,82).

9. Conclusion

Standardization of protocols for reliable tissue metabolic profiling of human biopsy samples can be achieved in such a way to be compatible with the constraints of a hospital environment. For this purpose, numerous precautions must be taken during the whole chain of events between sample collection and statistical data analysis. Because this type of tissue analysis involves human samples, the participation of physicians and other medical personnel is crucial to the success of the procedure. The modifications of standard medical protocols that are required for robust metabolic profiling by HR-MAS are minor and should be easily implemented in many hospitals. One of the future axes of development will be the full automation of the HR-MAS measurement process. This development not only will save time and manpower but also will ensure better reproducibility of HR-MAS data. Full automation will also allow hospital laboratory personnel to perform these analyses independently. The development of refrigerated HR-MAS sample changers greatly facilitates this task. This also applies to future developments regarding automatic tuning and matching of the HR-MAS probe and automatic gradient shimming of the sample (53,55). At a later stage, dedicated robots could be envisaged to automate

the sample preparation process. Finally, when reliable statistical models representative of different tumor types and organs have been developed, these should become an integral part of medical HR-MAS spectrometers, making it possible to evaluate specific biopsy specimens in a fully automatic mode.

Acknowledgments

This work is part of the CARMeN project and was supported by grants from University Hospitals of Strasbourg, University of Strasbourg, Bruker BioSpin, Région Alsace, Oséo, Communauté Urbaine de Strasbourg, and Conseil Départemental du Bas-Rhin. The technical assistance of Dr. J. Raya, Mrs. H. Kada and Mrs. T. Tong is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- (1) Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades, R. G., Removal of dipolar broadening of Nuclear Magnetic Resonance spectra of solids by specimen rotation, *Nature* 1958, 183, 1802.
- (2) Lowe, I. J., Free induction decays of rotating solids, *Phys. Rev. Lett.* 1959, 2, 285.
- (3) Lippens, G.; Bourdonneau, M.; Dhalluin, C.; Warras, R.; Richert, T.; Seetharaman, C.; Boutillon, C.; Piotta, M., Study of compounds attached to solid supports using High Resolution Magic Angle Spinning NMR, *Curr. Org. Chem.* 1999, 3, 147.
- (4) Filtch, W. L.; Dettre, G.; Holmes, C. P.; Shoolery, J.; Keifer, P. A., High-Resolution ^1H NMR in Solid-Phase Organic Synthesis, *J. Org. Chem.* 1994, 59, 7955.
- (5) Anderson, R. C.; Jarema, M. A.; Shapiro, M. J.; Stokes, J. P.; Zilliox, M., Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry: MAS CH Correlation in Solvent-Swollen Resin, *J. Org. Chem.* 1995, 60, 2650.
- (6) Keifer, P. A., Influence of resin structure, tether length and solvent upon the High resolution ^1H NMR spectra of solid-phase synthesis resin, *J. Org. Chem.* 1996, 61, 1558.
- (7) Daskocilova, D.; Tao, D.; Schneider, B., Effects of macroscopic spinning upon linewidth of NMR signals of liquids in magnetically inhomogeneous systems, *Czech. J. Phys. B.* 1975, 25, 202.
- (8) Elbayed, K.; Furrer, J.; Raya, J.; Hirschinger, J.; Bourdonneau, M.; Richert, T.; Piotta, M., Origin of the residual NMR linewidth of a peptide bound to a resin under magic angle spinning, *Journal of Magnetic Resonance* 1999, 136, 127.
- (9) Cheng, L. L.; Lean, C. L.; Bogdanova, A.; Wright Jr, S. C.; Ackerman, J. L.; Brady, T. J.; Garrido, L., Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning, *Magnetic Resonance in Medicine* 1996, 36, 653.
- (10) Cheng, L. L.; Ma, M. J.; Becerra, L.; Ptak, T.; Tracey, I.; Lackner, A.; González, R. G., Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94, 6408.
- (11) Cheng, L. L.; Chang, I. W.; Louis, D. N.; Gonzalez, R. G., Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens, *Cancer Research* 1998, 58, 1825.

- (12) Cheng, L. L.; Anthony, D. C.; Comite, A. R.; Black, P. M.; Tzika, A. A.; Gonzalez, R. G., Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy, *Neuro-Oncology* 2000, 2, 87.
- (13) Tzika, A. A.; Cheng, L. L.; Goumnerova, L.; Madsen, J. R.; Zurakowski, D.; Astrakas, L. G.; Zarifi, M. K.; Scott, R. M.; Anthony, D. C.; Gonzalez, R. G.; Black, P. M., Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Neurosurgery* 2002, 96, 1023.
- (14) Erb, G.; Elbayed, K.; Piotta, M.; Raya, J.; Neuville, A.; Mohr, M.; Maitrot, D.; Kehrl, P.; Namer, I. J., Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics, *Magnetic Resonance in Medicine* 2008, 59, 959.
- (15) Martínez-Bisbal, M. C.; Martí-Bonmati, L.; Piquer, J.; Revert, A.; Ferrer, P.; Llácer, J. L.; Piotta, M.; Assemat, O. Celda, B., ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas, *NMR in Biomedicine* 2004, 17, 191.
- (16) Sitter, B.; Lundgren, S.; Bathen, T. F.; Halgunset, J.; Fjosne, H. E.; Gribbestad, I. S., Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters, *NMR in Biomedicine* 2006, 19, 30.
- (17) Sitter, B.; Sonnewald, U.; Spraul, M.; Fjosne, H. E.; Gribbestad, I. S., High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue, *NMR in Biomedicine* 2002, 15, 327.
- (18) Gribbestad, I. S.; Sitter, B.; Lundgren, S.; Krane, J.; Axelson, D., Metabolite composition in breast tumors examined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Anticancer Research* 1999, 19, 1737.
- (19) Borgan, E.; Sitter, B.; Lingjærde, O. C.; Johnsen, H.; Lundgren, S.; Bathen, T. F.; Sørli, T.; Børresen-Dale, A.; Gribbestad, I. S., Merging transcriptomics and metabolomics – advances in breast cancer profiling, *BMC Cancer* 2010, 10, 128.
- (20) Moestue, S. A.; Borgan, E.; Huuse, E. M.; Lindholm, E. M.; Sitter, B.; Børresen-Dale, A. L.; Engebraaten, O.; Mælandsmo, G. M.; Gribbestad, I. S., Distinct choline metabolic profiles are associated with differences in gene expression for basal-like and luminal-like breast cancer xenograft models, *BMC Cancer* 2010, 10, 433.
- (21) Sitter, B.; Bathen, T. F.; Singstad, T. E.; Fjøsne, H. E.; Lundgren, S.; Halgunset, J.; Gribbestad, I. S., Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy, *NMR in Biomedicine* 2010, 23, 424.
- (22) Swanson, M. G.; Vigneron, D. B.; Males, R. G.; Kurhanewicz, J.; Tabatabai, Z. L.; Schmitt, L.; Carroll, P. R.; James, J. K.; Hurd, R. E.; Swanson, M. G., Proton HR-MAS Spectroscopy and Quantitative Pathologic Analysis of MRI/3D-MRSI-Targeted Postsurgical Prostate Tissues, *Magnetic Resonance in Medicine* 2003, 50, 944.
- (23) Cheng, L. L.; Wu, C.-L.; Smith, M. R.; Gonzalez, R. G., Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS ¹H NMR spectroscopy at 9.4 T, *FEBS Letters* 2001, 494, 112.
- (24) Swindle, P.; Ramadan, S.; Stanwell, P.; McCredie, S.; Russell, P.; Mountford, C., Proton magnetic resonance spectroscopy of the central, transition and peripheral zones of the prostate: Assignments and correlation with histopathology, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2008, 21, 423.
- (25) Van Asten, J. J. A.; Cuijpers, V.; Hulsbergen-Van De Kaa, C.; Soede-Huijbregts, C.; Witjes, J. A.; Verhofstad, A.; Heerschap, A., High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy for metabolic assessment of cancer presence and Gleason score in human prostate needle biopsies, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2008, 21, 435.

- (26) Moka, D.; Vorreuter, R.; Schicha, H.; Spraul, M.; Humpfer, E.; Lipinsky, M.; Foxall, P. J. D.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., Magic Angle Spinning Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Analysis of Intact Kidney Tissue Samples, *Anal. Commun.* 1997, 34, 107.
- (27) Tate, A. R.; Foxall, P. J. D.; Holmes, E.; Moka, D.; Spraul, M.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of ^1H magic angle spinning (MAS) NMR spectra, *NMR in Biomedicine* 2000, 13, 64.
- (28) Imperiale, A.; Elbayed, K.; Moussallieh, F. M.; Neuville, A.; Piotto, M.; Bellocq, J. P.; Lutz, P.; Namer, I. J., Metabolomic pattern of childhood neuroblastoma obtained by ^1H -high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy, 2011, *Pediatr Blood & Cancer* 56, 24.
- (29) Mountford, C. E.; Delikatny, E. J.; Dync, M.; Holmes, K. T.; Mackinnon, W. B.; Ford, R.; Hunter, J. C.; Truskett, I. D.; Russell, P., Uterine cervical punch biopsy specimens can be analyzed by ^1H MRS, *Magnetic Resonance in Medicine* 1990, 13, 324.
- (30) Mahon, M. M.; Cox, I. J.; Dina, R.; Soutter, W. P.; McIndoe, G. A.; Williams, A. D.; DeSouza, N. M., ^1H magnetic resonance spectroscopy of preinvasive and invasive cervical cancer: In vivo-ex vivo profiles and effect of tumor load, *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2004, 19, 356.
- (31) Dave, U.; Taylor-Robinson, S. D.; Walker, M. M.; Mahon, M.; Puri, B. K.; Thursz, M. R.; Desouza, N. M.; Cox, I. J., In vitro ^1H -magnetic resonance spectroscopy of Barrett's esophageal mucosa using magic angle spinning techniques, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004, 16, 1199.
- (32) Piotto, M.; Moussallieh, F. M.; Dillmann, B.; Imperiale, A.; Brigrand, C.; Bellocq, J. P.; Elbayed, K.; Namer, I. J., Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning ^1H magnetic resonance spectroscopy, *Metabolomics* 2009, 5, 292.
- (33) Chan, E. C. Y.; Koh, P. K.; Mal, M.; Cheah, P. Y.; Eu, K. W.; Backshall, A.; Cavill, R.; Nicholson, J. K.; Keun, H. C., Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS), *Journal of Proteome Research* 2009, 8, 352.
- (34) Seierstad, T.; Røe, K.; Sitter, B.; Halgunset, J.; Flatmark, K.; Ree, A. H.; Olsen, D.; Gribbestad, I. S.; Bathen, T. F., Principal component analysis for the comparison of metabolic profiles from human rectal cancer biopsies and colorectal xenografts using high-resolution magic angle spinning ^1H magnetic resonance spectroscopy, *Molecular Cancer* 2008, 7, 33.
- (35) Lindon, J. C.; Beckonert, O. P.; Holmes, E.; Nicholson, J. K., High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: Application to biomedical studies, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2009, 55, 79.
- (36) Bathen, T. F.; Sitter, B.; Sjobakk, T. E.; Tessem, M.-B.; Gribbestad, I. S., Magnetic resonance metabolomics of intact tissue: A biotechnological tool in cancer diagnostics and treatment evaluation, *Cancer Research* 2010, 70, 6692.
- (37) DeFeo, E. M.; Cheng, L. L., Characterizing human cancer metabolomics with ex vivo ^1H HRMAS MRS, *Technology in Cancer Research and Treatment* 2010, 9, 381.
- (38) Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts, *Nature Protocols* 2007, 2, 2692.
- (39) Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Keun, H. C.; Craig, A.; Pearce, J. T. M.; Bruce, S. J.; Hardy, N.; Sansone, S. A.; Antti, H.; Jonsson, P.; Daykin, C.; Navarange, M.; Beger, R. D.; Verheij, E. R.; Amberg, A.; Baunsgaard, D.; Cantor, G. H.; Lehman-McKeeman, L.; Earll, M.; Wold, S.; Johansson, E.;

- Haselden, J. N.; Kramer, K.; Thomas, C.; Lindberg, J.; Schuppe-Koistinen, I.; Wilson, I. D.; Reily, M. D.; Robertson, D. G.; Senn, H.; Krotzky, A.; Kochhar, S.; Powell, J.; Van Der Ouderaa, F.; Plumb, R.; Schaefer, H.; Spraul, M., Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses, *Nature Biotechnology* 2005, 23, 833.
- (40) Beckonert, O.; Coen, M.; Keun, H. C.; Wang, Y.; Ebbels, T. M.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues, *Nature Protocols* 2010, 5, 1019.
- (41) Carr, H. Y.; Purcell, E. M., Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments, *Phys. Rev.* 1954, 94, 630.
- (42) Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K.; Burger, P. C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B. W.; Kleihues, P., The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta Neuropathologica* 2007, 114, 97.
- (43) D'Adamo, Jr., A. F.; Peisach, J.; Manner, G.; Weiler, C. T., N acetyl aspartate amidohydrolase: purification and properties, *Journal of Neurochemistry* 1977, 28, 739.
- (44) D'Adamo, Jr., A. F.; Smith, J. C.; Woiler, C., The occurrence of N-acetylaspartate amidohydrolase (aminoacylase II) in the developing rat, *Journal of Neurochemistry* 1973, 20, 1275.
- (45) Opstad, K. S.; Bell, B. A.; Griffiths, J. R.; Howe, F. A., An assessment of the effects of sample ischaemia and spinning time on the metabolic profile of brain tumour biopsy specimens as determined by high-resolution magic angle spinning (1)H NMR, *NMR in Biomedicine* 2008, 21, 1138.
- (46) Jordan, K. W.; He, W.; Halpern, E. F.; Wu, C.-L.; Cheng, L. L., Evaluation of tissue metabolites with high resolution magic angle spinning mr spectroscopy human prostate samples after three-year storage at -80°C , *Biomarker Insights* 2007, 2007, 147.
- (47) Waters, N. J.; Garrod, S.; Farrant, R. D.; Haselden, J. N.; Connor, S. C.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K., High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: Optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition, *Analytical Biochemistry* 2000, 282, 16.
- (48) Wu, C. L.; Taylor, J. L.; He, W.; Zepeda, A. G.; Halpern, E. F.; Bielecki, A.; Gonzalez, R. G.; Cheng, L. L., Proton high-resolution magic angle spinning NMR analysis of fresh and previously frozen tissue of human prostate, *Magnetic Resonance in Medicine* 2003, 50, 1307.
- (49) Middleton, D. A.; Bradley, D. P.; Connor, S. C.; Mullins, P. G.; Reid, D. G., The effect of sample freezing on proton magic-angle spinning NMR spectra of biological tissue, *Magnetic Resonance in Medicine* 1998, 40, 166.
- (50) Sitter, B.; Bathen, T. F.; Tessem, M. B.; Gribbestad, I. S., High-resolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2009, 54, 239.
- (51) Piotto, M.; Elbayed, K.; Wieruszkeski, J. M.; Lippens, G., Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe, *Journal of Magnetic Resonance* 2005, 173, 84.
- (52) Findeisen, M.; Brand, T.; Berger, S., A ^1H -NMR thermometer suitable for cryoprobes, *Magnetic Resonance in Chemistry* 2007, 45, 175.
- (53) Sukumar, S.; Johnson, M. O. N.; Hurd, R. E.; Zijl, P. C., Automated Shimming for Deuterated Solvents Using Field Profiling, *J. Magn. Reson.* 1997, 125, 159.
- (54) Zijl, P. C. M. v.; Sukumar, S.; Johnson, M. O. N.; Webb, P.; Hurd, R.E., Optimized shimming for high-resolution NMR using three-dimensional image-based field mapping, *J. Magn. Reson.* 1994, 111, 203.
- (55) Weiger, M.; Speck, T.; Fey, M., Gradient shimming with spectrum optimisation, *Journal of Magnetic Resonance* 2006, 182, 38.

- (56) Elbayed, K.; Dillmann, B.; Raya, J.; Piotto, M.; Engelke, F., Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR, *Adv. Magn. Reson.* 2005, 174, 2.
- (57) Piotto, M.; Bourdonneau, M.; Furrer, J.; Bianco, A.; Raya, J.; Elbayed, K., Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under magic angle spinning: Effect of radial B1 inhomogeneities, *J. Magn. Reson.* 2001, 149, 114.
- (58) Bathen, T. F.; Jensen, L. R.; Sitter, B.; Fjøsne, H. E.; Halgunset, J.; Axelson, D. E.; Gribbestad, I. S.; Lundgren, S., MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status, *Breast Cancer Research and Treatment* 2007, 104, 181.
- (59) Hong, Y. S.; Coen, M.; Rhode, C. M.; Reily, M. D.; Robertson, D. G.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., Chemical shift calibration of 1HMAS NMR liver tissue spectra exemplified using a study of glycine protection of galactosamine toxicity, *Magnetic Resonance in Chemistry* 2009, 47, S47.
- (60) Wishart, D. S.; Tzur, D.; Knox, C.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Young, N.; Cheng, D.; Jewell, K.; Arndt, D.; Sawhney, S.; Fung, C.; Nikolai, L.; Lewis, M.; Coutouly, M. A.; Forsythe, I.; Tang, P.; Shrivastava, S.; Jeroncic, K.; Stothard, P.; Amegbey, G.; Block, D.; Hau, D. D.; Wagner, J.; Miniaci, J.; Clements, M.; Gebremedhin, M.; Guo, N.; Zhang, Y.; Duggan, G. E.; MacInnis, G. D.; Weljie, A. M.; Dowlatabadi, R.; Bamforth, F.; Clive, D.; Greiner, R.; Li, L.; Marrie, T.; Sykes, B. D.; Vogel, H. J.; Querengesser, L., HMDB: The human metabolome database, *Nucleic Acids Research* 2007, 35, D521.
- (61) Akoka, S.; Barantin, L.; Trierweiler, M., Concentration Measurement by proton NMR using the ERETIC method, *Anal. Chem.* 1999, 71 (13), 2554.
- (62) Wider, G.; Dreier, L., Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128, 2571.
- (63) Martinez-Bisbal, M. C.; Monleon, D.; Assemat, O.; Piotto, M.; Piquer, J.; Llacer, J. L.; Celda, B., Determination of metabolite concentrations in human brain tumour biopsy samples using HR-MAS and ERETIC measurements, *NMR Biomed* 2009, 22, 199.
- (64) Provencher, S. W., Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra, *Magnetic Resonance in Medicine* 1993, 30, 672.
- (65) Fauvelle, F.; Dorandeu, F.; Carpentier, P.; Foquin, A.; Rabeson, H.; Graveron-Demilly, D.; Arvers, P.; Testylier, G., Changes in mouse brain metabolism following a convulsive dose of soman: A proton HRMAS NMR study, *Toxicology* 2010, 267, 99.
- (66) Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1987, 2, 37.
- (67) Ebbels, T. M. D.; Cavill, R., Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2009, 55, 361.
- (68) Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L., PLS-regression: A basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001, 58, 109.
- (69) Tenenhaus, M., *La régression PLS: Théorie et Pratique.*, Editions Technip, Paris, France 1998.
- (70) Westerhuis, J. A.; Hoefsloot, H. C. J.; Smit, S.; Vis, D. J.; Smilde, A. K.; Velzen, E. J. J.; Duijnhoven, J. P. M.; Dorsten, F. A., Assessment of PLS-DA cross validation, *Metabolomics* 2008, 4, 81.
- (71) Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K., Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 2001, 39, 1.
- (72) Motzer, R. J.; Bander, N. H.; Nanus, D. M., Medical progress: Renal-cell carcinoma, *New England Journal of Medicine* 1996, 335, 865.
- (73) Vogelzang, N. J.; Stadler, W. M., Kidney cancer, *Lancet* 1998, 352, 1691.

- (74) Allan, J. P.; Amnon, Z.; Arie, S. B., The changing natural history of renal cell carcinoma, *Journal of Urology* 2001, *166*, 1611.
- (75) Cheng, L. L.; Wu, C. L.; Smith, M. R.; Gonzalez, R. G., Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS ¹H NMR spectroscopy at 9.4 T, *FEBS Letters* 2001, *494*, 112.
- (76) Tomlins, A. M.; Foxall, P. J. D.; Lindon, J. C.; Lynch, M. J.; Spraul, M.; Everett, J. R.; Nicholson, J. K., High resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance analysis of intact prostatic hyperplastic and tumour tissues, *Analytical Communications* 1998, *35*, 113.
- (77) Cheng, L. L.; Chang, I. W.; Smith, B. L.; Gonzalez, R. G., Evaluating Human Breast Ductal Carcinomas with High-Resolution Magic-Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance* 1998, *135*, 194.
- (78) Barton, S. J.; Howe, F. A.; Tomlins, A. M.; Cudlip, S. A.; Nicholson, J. K.; Bell, B. A.; Griffiths, J. R., Comparison of in vivo ¹H MRS of human brain tumours with ¹H HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 1999, *8*, 121.
- (79) Jordan, K. W.; Nordenstam, J.; Lauwers, G. Y.; Rothenberger, D. A.; Alavi, K.; Garwood, M.; Cheng, L. L., Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy, *Diseases of the Colon and Rectum* 2009, *52*, 520.
- (80) Tessem, M. B.; Selns, K. M.; Sjurson, W.; Tranø, G.; Giskeødegård, G. F.; Bathen, T. F.; Gribbestad, I. S.; Hofslie, E., Discrimination of patients with microsatellite instability colon cancer using ¹H HR MAS MR spectroscopy and chemometric analysis, *Journal of Proteome Research* 2010, *9*, 3664.
- (81) Delikatny, E. J.; Russell, P.; Hunter, J. C.; Hancock, R.; Atkinson, K. H.; Van Haften-Day, C.; Mountford, C. E., Proton MR and human cervical neoplasia: Ex vivo spectroscopy allows distinction of invasive carcinoma of the cervix from carcinoma in situ and other preinvasive lesions, *Radiology* 1993, *188*, 791.
- (82) Sitter, B.; Bathen, T.; Hagen, B.; Arentz, C.; Skjeldestad, F. E.; Gribbestad, I. S., Cervical cancer tissue characterized by high-resolution magic angle spinning MR spectroscopy, *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2004, *16*, 174.
- (83) Piotto, M., Moussallieh, F. M., Neuville, A., Bellocq, J. P., Elbayed, K. & Namer, I. J., Towards real-time metabolic profiling of a biopsy specimen during a surgical operation by ¹H high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, 2012, *6*, 22.

ANNEXE 5

Piotto M, Moussallieh FM, Dillmann B, Imperiale A, Neuville A, Brigand C, Bellocq JP, Elbayed K, Namer IJ.

Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning 1H magnetic resonance spectroscopy.

Metabolomics. 2009;5:293-301.

Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning ^1H magnetic resonance spectroscopy

M. Piotto · F.-M. Moussallieh · B. Dillmann ·
A. Imperiale · A. Neuville · C. Brigand · J.-P. Bellocq ·
K. Elbayed · I. J. Namer

Received: 21 October 2008 / Accepted: 10 December 2008 / Published online: 24 December 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Colorectal cancer is one of the most frequent and most lethal forms of cancer in the western world. The aim of this study is to characterize by ^1H high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy (HRMAS) the metabolic fingerprint of both tumoral and healthy tissue samples obtained from a cohort of patients affected by primary colorectal adenocarcinoma. By analyzing HRMAS data using multivariate statistical analysis (PLS-DA), the two types of tissues could be discriminated with a high level of confidence. The identification of the metabolites at the origin of this discrimination revealed that adenocarcinomas are richer in taurine, glutamate, aspartate, and lactate whereas healthy tissues contain a higher amount of myo-inositol and β -glucose. The statistical model resulting from the PLS-DA analysis was subsequently used to perform a blind test on tumoral and healthy colon

biopsies. The results of the classification showed that the HRMAS analysis has very high sensitivity and specificity.

Keywords Colorectal cancer · Biopsies · HRMAS · Statistical analysis · Taurine · Myo-inositol

1 Introduction

Colorectal cancer is one of the most frequent cancers in the western world (Jemal et al. (2007); Libutti et al. (2008)). The most common colon cancer is adenocarcinoma which is a malignant epithelial tumor that originates from the glandular epithelium of the colorectal mucosa. Patient prognosis is based on several parameters like the clinical stage of the disease, the histological type and grade of the tumor (Cusack et al. (1996)) and the analysis of oncogenes and molecular markers (Fearon et al. (1990); Leichman et al. (1997)). In order to develop more efficient diagnostic and prognostic tools, current research focuses on both the genetic and the molecular basis of the disease.

^1H high resolution magic angle spinning (HRMAS) is a nuclear magnetic resonance (NMR) technique (Andrew et al. (1958); Lippens et al. (1999); Lowe (1959)) that allows the characterization of the metabolic phenotypes of intact cells, tissues and organs, under both normal and pathological conditions (Cheng et al. (1997); Cheng et al. (1998); Cheng et al. (2000); Martínez-Bisbal et al. (2004); Martínez-Granados et al. (2006); Sitter et al. (2002); Sjøbakk et al. (2008); Tzika et al. (2002)). HRMAS allows the assessment of cellular metabolic networks that are directly related to specific genetic information and to the regulation of specific gene transcripts. Several human gynecological, neurological, and urological malignancies have been studied by HRMAS with promising results.

M. Piotto (✉)
Bruker BioSpin, 34 rue de l'industrie, 67166 Wissembourg,
France
e-mail: martial.piotto@bruker.fr

M. Piotto · F.-M. Moussallieh · B. Dillmann · K. Elbayed
Institut de Chimie, Université Louis Pasteur, 4 rue Blaise Pascal,
67000 Strasbourg, France

F.-M. Moussallieh · B. Dillmann · A. Imperiale ·
I. J. Namer (✉)
Department of Biophysics and Nuclear Medicine, University
Hospitals of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France
e-mail: Izzie.Jacques.NAMER@chru-strasbourg.fr

A. Neuville · J.-P. Bellocq
Department of Pathology, University Hospitals of Strasbourg,
67098 Strasbourg, France

C. Brigand
Department of Digestive Surgery, University Hospitals
of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France

The aim of the present study is to characterize by ^1H HRMAS the metabolic fingerprint of both tumoral and healthy tissue biopsy samples obtained from a cohort of patients affected by primary colorectal adenocarcinoma. One of the objectives of the project is to develop and validate in a clinical set-up a statistical metabolic model capable of achieving a reliable classification of cancerous versus healthy biopsies. In order to obtain reliable statistical results, the study was performed on a relatively large cohort of patients ($n = 44$).

The study of the metabolic content of colon biopsies by magnetic resonance has been the topic of only a few papers in the literature. In fact, the study presented in this manuscript is, to our knowledge, the first one involving the direct comparison of the metabolic content of healthy and cancerous human colon biopsies using intact biopsy samples.

2 Materials and methods

2.1 Patient population

This study involves the use of human colon biopsies obtained from the Tumor bank of the University Hospitals of Strasbourg, France. Between March 2007 and December 2007, 44 patients (26 men, 18 women; mean age: 68 ± 12 years, age range: 45–90 years) with histologically proven colorectal adenocarcinoma were prospectively selected. All patients underwent a surgical resection of the primary lesion and a radical lymphadenectomy. Neither neo-adjuvant chemotherapy nor radiotherapy were performed prior to the operation. For the HRMAS analysis, two specimens containing respectively tumoral and healthy tissue were obtained from each patient. For four patients, only the healthy or the tumoral biopsy was available. The total number of biopsies was therefore equal to 84. Tissue specimens were collected with minimum ischemic delays after resection (average time 50 ± 25 min) and snap-frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C . All tissue samples exhibited a viable tumor/necrosis ratio and were quantitatively and qualitatively adequate to perform a correct HRMAS analysis.

2.2 HRMAS analysis

2.2.1 Rotor preparation

Each biopsy sample was prepared at -10°C by introducing 15 to 20 mg of biopsy into a disposable 30 μl Kelf insert. To provide a lock frequency for the NMR spectrometer, 10 μl of D_2O containing 1% w/w TSP were also added to the insert. The insert was then sealed tightly with a conical plug and stored at -80°C until the HRMAS analysis. The

insert insures that the entire biopsy sample is detected by the radio-frequency coil of the probe and that no leaks occur during the HRMAS analysis. Shortly before the HRMAS analysis, the insert was placed into a standard 4 mm ZrO_2 rotor and closed with a cap. The ensemble was then inserted into a HRMAS probe pre-cooled at 3°C . All HRMAS experiments were performed at 3°C and were started immediately after the temperature inside the probe had reached the equilibrium condition (5 min). Upon completion of the HRMAS analysis (20 min), the insert was taken out of the rotor and stored back at -80°C . This methodology prevents sample cross-contamination and allows storing all the biopsies in a reliable matter. A considerable amount of time is also saved by eliminating the cleaning process of the rotor. Furthermore, complementary NMR analysis can be performed at a later stage on any of the stored biopsy inserts.

2.2.2 Data acquisition

HRMAS spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz. This instrument is installed at the Hautepierre university hospital in Strasbourg and is dedicated to the analysis of biopsies by HRMAS. It is operated by qualified scientific and medical personnel in the context of the CARMEN project which aims at the creation of an extensive metabolic database covering most current human tumors. The spectrometer is equipped with a 4 mm double resonance (^1H , ^{13}C) gradient HRMAS probe. A Bruker Cooling Unit (BCU) is used to regulate the temperature at 3°C by cooling down the bearing air flowing into the probe. All NMR experiments were conducted on samples spinning at 3,502 Hz in order to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest. For each biopsy sample, a one-dimensional proton spectrum using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence was acquired (Bruker *cpmgpr1d* pulse sequence). This sequence allows a better observation of the metabolites by reducing the intensity of lipid signals in the spectrum. The inter-pulse delay between the 180° pulses of the CPMG pulse train was synchronized with the sample rotation and set to 285 μs ($1/\omega_r = 1/3502 = 285 \mu\text{s}$) in order to eliminate signal losses to B_1 field inhomogeneities (Elbayed et al. (2005); Piotto et al. (2001)). The number of loops was set to 328 giving the CPMG pulse train a total length of 93 ms. In order to quantify, in an absolute manner, the amount of metabolites present in each sample, a calibrated Eretic signal (Akoka et al. (1999)) was included in all the 1D experiments. The Lorentzian Eretic signal was added digitally in the spectrum after data acquisition and processing. This procedure allows obtaining an Eretic signal which is perfectly in phase with the NMR signals and

which does not compromise the quality of the baseline. Using a standard solution of known concentration of lactate, the amplitude of the Eretic signal was calibrated to correspond to 0.62 μmol of protons. In order to accurately calculate the metabolite concentration in each biopsy, a correction factor taking into account the difference in pulse widths between the standard lactate sample and the different biopsies was also applied (Wider and Dreier (2006)). The CPMG experiment was acquired with the following parameters: sweep width 14.2 ppm, number of points 32 k, relaxation delay 2 s and acquisition time 2.3 s. A total of 128 FID were acquired resulting in an acquisition time of 10 min. All spectra were recorded in such a manner that only a zero phase order correction was necessary to properly phase the spectrum. The FID was multiplied by an exponential weighting function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. All spectra were processed using automatic base line correction routines. ^1H spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm.

In order to confirm resonance assignments, two-dimensional homonuclear and heteronuclear experiments were also recorded on eight samples. 2D DIPS12 spectra (Shaka et al. (1988)) were acquired with a 170 ms acquisition time, a 60 ms mixing time, a 14.2 ppm spectral width and a 1.5 s relaxation delay. Thirty-two transients were averaged for each of the 512 increments during t_1 , corresponding to a total acquisition time of 8 h. Data were zero filled to a $2\text{ k} * 1\text{ k}$ matrix and weighted with a shifted square sine bell function prior to Fourier transformation. 2D ^1H - ^{13}C HSQC experiments using echo-antiecho gradient selection for phase-sensitive detection (Davis et al. (1992)) were acquired using a 73 ms acquisition time with GARP ^{13}C decoupling and a 1.5 s relaxation delay. A total of 116 transients were averaged for each of 256 t_1 increments, corresponding to a total acquisition time of 15 h. Two 1 ms sine-shaped gradient pulses of strength 40 and 10.05 G/cm were used in the experiment. Data were zero-filled to a $2\text{ k} * 1\text{ k}$ matrix and weighted with a shifted square sine bell function before Fourier transformation.

2.2.3 Multivariate statistical analysis

The spectral region between 4.7 and 0.5 ppm of each 1D CPMG NMR spectrum was automatically binned into regions of 0.01 ppm using the AMIX 3.8 software (Bruker GmbH, Germany). This procedure minimizes the effect of peak shifts due to pH variations. The peak integral within each 0.01 ppm region was computed and normalized with respect to the total integral of the spectrum in the 4.7–0.5 ppm region. This process generated an X data matrix containing 421 columns (chemical shifts) and 84 rows (corresponding to healthy and tumoral biopsies of 44

patients). Data sets were then imported into the SIMCA P 11.0 software (Umetrics AB, Umeå, Sweden) and pre-processed using unit variance scaling of the X columns by weighing each integral region by $1/SD_k$, where SD_k represents the standard deviation of the k th column in the X matrix. This procedure gives equal weight to metabolites present in high and low concentrations while minimizing the contribution from noise.

The X matrix was analyzed using principal component analysis (PCA) within the SIMCA P 11.0 software package. This procedure allows to quickly evaluate the quality of the data and to identify possible outliers. After the PCA analysis, Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) (Tenenhaus (1998)) was conducted in order to build a statistical model that optimizes the separation between the two classes of patients. The number of components of the PLS-DA model was determined by cross-validation. The class membership of each sample was iteratively predicted, using the results to generate a goodness of fit measure ($Q^2 = 1 - \text{PRESS}/\text{SS}$) for the overall model. PRESS is the predicted squared sum of error and represents the squared differences between observed and predicted Y values when each sample is kept out of model development and SS is the residual sum of squares of the previous dimension. Since PLS-DA models are usually built using a relatively small number of samples compared to the number of variables, an extensive cross-validation of the model is mandatory to avoid overfitting of the data (Westerhuis et al. (2008)). The maximum theoretical value for Q^2 is equal to 1 for a perfect prediction. However, a Q^2 value superior to 0.5 is generally considered to be a decent predictor. In order to validate the model, a circular validation procedure was performed. The class labels of the biopsies (cancerous versus healthy) in the Y column matrix were randomly permuted and for each permutation, a new statistical model was computed along with its Q^2 value. This procedure was repeated for a large number of permutations and the Q^2 value were plotted as a function of the number of permutations in the Y matrix. A model was considered as valid if the regression line obtained by circular permutation showed a negative slope and if all the estimated Q^2 were smaller than the original one. This feature proves that none of the models computed on the permuted Y matrix are better than the model computed using the original Y matrix.

3 Results and discussions

3.1 Spectral assignment

Representative HRMAS CPMG magnetic resonance spectra of adenocarcinomas and healthy tissues originating from the

same patient are presented in Fig. 1. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature (Martínez-Bisbal et al. (2004)). 2D DIPS12 and HSQC spectra were also used to confirm some assignments. A total of about 30 different metabolites were identified from these spectra (Table 1). The respective metabolic content of healthy and cancerous biopsies can be directly inferred from Fig. 1 since the intensity of each

spectrum was normalized with respect to the amplitude of the Eretic signal and the weight of biopsy present in each sample. Figure 1 tends to show that adenocarcinomas are characterized by a higher level of taurine while healthy tissues contain a larger amount of myo-inositol. It is important to emphasize that since both biopsies were obtained simultaneously from the same patient, the direct comparison of their metabolic content is extremely reliable since the time of

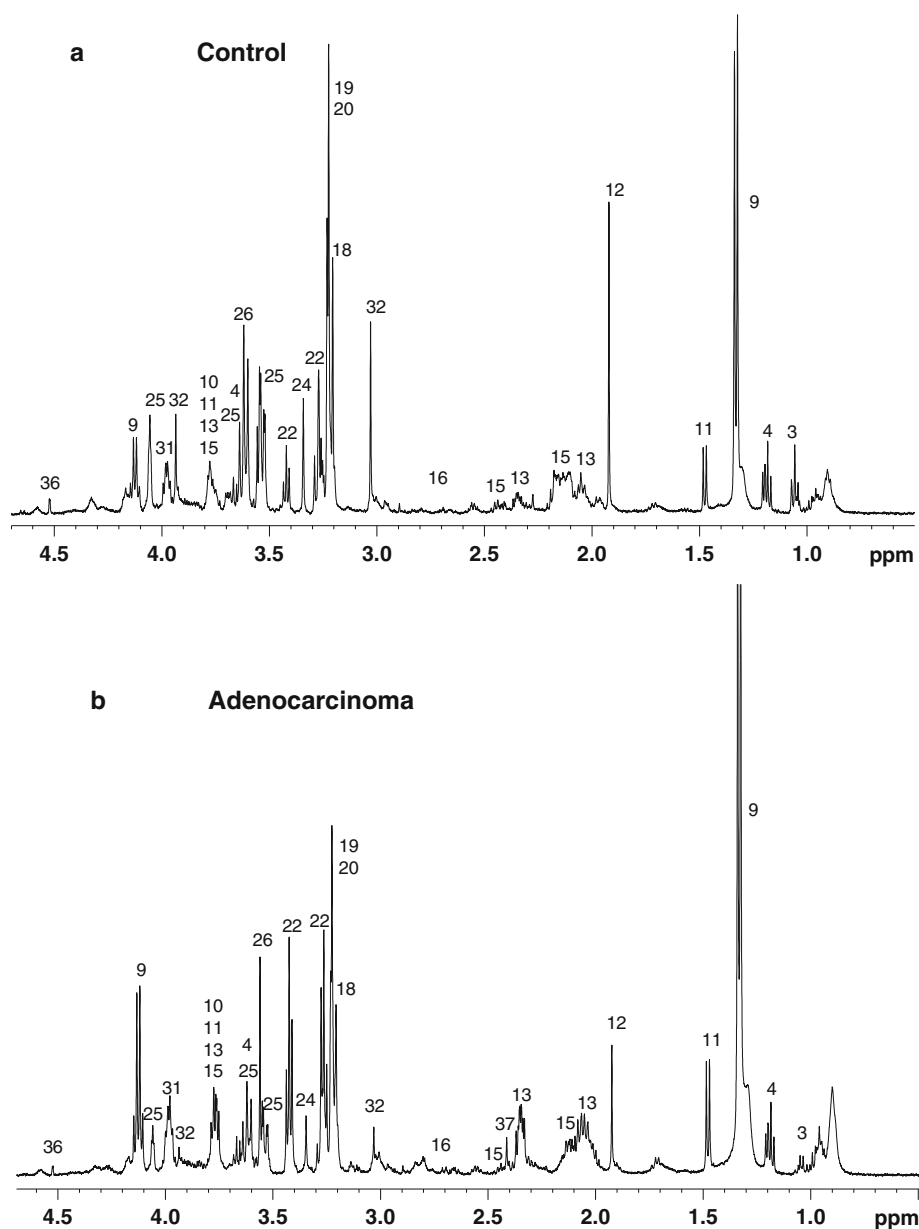


Fig. 1 Representative 1D ^1H CPMG HRMAS spectra of healthy (a) and adenocarcinoma (b) colorectal tissues originating from the same patient. For display purposes, the amplitude of the lactate peak at 1.33 ppm has been cut. Partial metabolite assignment in the

4.7–0.5 ppm region is indicated. The numbers refer to the metabolites listed in Table 1. The Eretic peak at 10.3 ppm, which is not shown in this plot, is a synthetic Eretic peak that is used for the absolute quantification of the metabolites

Table 1 ^1H resonance assignments of the metabolites present in cancerous and healthy human colons. The nomenclature used for fatty acids is defined in the publication of Martínez-Bisbal (Martínez-Bisbal et al. (2004))

Metabolites	Group	^1H chemical shift (ppm)	^{13}C chemical shift
1 Isoleucine	δCH_3	0.93	13.77
	γCH_3	1.00	17.37
	γCH_2	1.48	27.13
	αCH	3.67	62.25
2 Leucine	δCH_3	0.95	23.36
	$\delta'\text{CH}_3$	0.96	24.61
	γCH	1.71	26.69
	βCH_2	1.71	42.40
3 Valine	αCH	3.73	56.06
	γCH_3	0.98	19.14
	$\gamma'\text{CH}_3$	1.04	20.56
4 Ethanol	βCH	2.27	31.77
	CH_3	1.17	19.49
5 Fatty acids (a)	CH_2OH	3.65	60.15
	(2) CH_2	1.28	34.46
6 Fatty acids (b)	(1) CH_2	1.29	25.35
	(2) CH_2	2.04	27.39
7 Fatty acids (a) (b)	CH_2	2.80	28.05
	(n) CH_2	1.28	32.24
8 Fatty acids (c)	(2) CH_2	1.58	27.31
	(1) CH_2	2.25	36.06
9 Lactate	CH_3	1.33	22.65
	CH	4.12	71.05
10 Lysine	γCH_2	1.46	24.19
	δCH_2	1.71	29.14
	βCH_2	1.90	32.50
	ϵCH_2	3.01	41.84
11 Alanine	βCH_3	1.47	18.80
	αCH	3.78	53.18
12 Acetate	CH_3	1.92	25.97
13 Glutamate	βCH_2	2.06	29.69
	γCH_2	2.34	35.93
	αCH	3.76	57.19
14 Methionine	ϵCH_2	2.12	16.50
	βCH_2	2.14	NA
15 Glutamine	γCH_2	2.44	33.37
	αCH_2	3.77	NA
	$\beta\text{CH}_2(\text{u})$	2.70	39.15
16 Aspartic acid	$\beta\text{CH}_2(\text{d})$	2.80	39.15
	αCH	3.90	54.81
17 Phosphoethanolamine	$-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	3.22	43.21
	$-\text{CH}_2-\text{O}-$	3.98	62.94
18 Choline	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3.21	NA
	βCH_2	3.52	69.84

Table 1 continued

Metabolites	Group	^1H chemical shift (ppm)	^{13}C chemical shift
19 Phosphorylcholine	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3.22	56.49
	βCH_2	3.61	69.03
	αCH	4.18	60.59
20 Glycerophosphocholine	$-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	3.23	NA
	αCH_2	4.29	56.36
21 Arginine	βCH_2	1.91	30.17
	δCH_2	3.22	43.23
22 Taurine	$-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	3.26	50.07
	$-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$	3.42	38.07
23 Proline	γCH_2	2.00	26.45
	$\beta\text{CH}_2(\text{u})$	2.07	31.70
	$\beta\text{CH}_2(\text{d})$	2.35	31.70
	$\delta\text{CH}_2(\text{u})$	3.33	48.75
	$\delta\text{CH}_2(\text{d})$	3.41	48.75
24 Scyllo-Inositol	αCH	4.13	63.81
	All Hs	3.34	76.25
25 Myo-Inositol	C5H	3.27	76.96
	C1H, C3H	3.54	73.80
	C4H, C6H	3.62	75.05
	C2H	4.05	74.90
26 Glycine	αCH	3.56	44.10
	βCH	4.26	68.55
27 Threonine	αCH	3.59	63.14
	βCH	4.26	68.55
	γCH_2	3.56	65.10
28 Glycerol	1,3 $\text{CH}_2\text{OH}(\text{u})$	3.65	65.10
	1,3 $\text{CH}_2\text{OH}(\text{d})$	3.65	65.10
	$-\text{CH}(\text{OH})-$	3.78	74.82
29 β -Glucose	C6H(u)	3.73	63.53
	C6H(d)	3.89	63.53
	C1H	4.65	NA
30 α -Glucose	C1H	5.23	NA
	αCH	3.84	59.08
31 Serine	βCH	3.97	62.90
	CH_3	3.03	39.67
32 Creatine	CH_2	3.93	56.32
	αCH	4.00	53.94
33 Asparagine	CH 3,5	6.88	118.34
	CH 2,6	7.18	133.32
34 Tyrosine	CH 2,6	7.32	131.82
	C4	7.40	131.69
35 Phenylalanine	C4H	4.53	NA
	$(\alpha,\beta\text{CH}_2)$	2.40	NA

ischemia is identical for both samples. The nature and the concentration of the metabolites present in each biopsy can therefore be reliably compared.

3.2 Statistical analysis

PCA analysis of the CPMG data applied to the 4.7–0.5 ppm chemical shift range and using the entire patient population was not able to discriminate adenocarcinomas from healthy tissues in a statistically significant manner. A few outliers were however identified by this analysis. In this type of studies, outliers can occur because of erroneous spectrum referencing, sample pollution due to the fixing medium (o.c.t. compound, Tissue-Tek, Sakura) employed by the pathologists or an unusual amount of lipids. In our study, 12 biopsies out of a total of 84 were removed, leaving a cohort of 72 biopsies. PLS-DA analysis of the CPMG data was initially performed on the same population of 72 biopsies. As for the PCA analysis, buckets within the 4.7–0.5 ppm range were initially used. Biopsies were classified in a Y column matrix as being either adenocarcinomas (value of 0) or healthy tissues (value of 1). The analysis generated a two component PLS-DA model characterized by a faithful representation of the Y data ($R^2Y = 0.80$) and, more importantly, by a very good cumulative confidence criterion of prediction ($Q^2 = 0.68$). The score plot of the PLS-DA model (Fig. 2a) showed a very clear separation of the two sets of biopsies. The loading plot (Fig. 2b) of the PLS-DA model revealed a statistically significant elevation of taurine, glutamate, aspartate, and lactate in adenocarcinomas compared to healthy tissues. Conversely, the metabolic signature of normal colon tissue consisted of a higher concentration of myo-inositol and β -glucose. The assessment of the metabolites responsible for this classification can lead to the detection of pathological biomarkers of tumor metabolism. It is necessary to stress that the discriminant power of each metabolite is linked to its relative difference in concentration between each groups (tumor versus healthy tissue) for each clinical variable considered (i.e., histological classification). Therefore, a metabolite present in subtle concentration in one group but completely absent in the second group, will play a major role in discriminant analysis. Conversely, a metabolite detected in high concentration in both groups will be less significant in the clustering process (inconsistent relative difference).

Since the initial PLS-DA model using the entire set of biopsies gave extremely promising results, a second PLS-DA model was built using only a subset of the available biopsies. More precisely, only the first 50 biopsies of our sample set, corresponding to 27 tumoral cases and 23 controls, were used to build a new model. Moreover, since the most discriminant metabolites appeared consistently to be, in a decreasing order of importance, taurine, myo-inositol, glutamate, and aspartate only these metabolites were used for model development. This choice resulted in an X matrix containing only 30 columns, thereby decreasing considerably the risk of overfitting the data. The resulting

PLS-DA model was characterized by a R^2Y of 0.83 and a Q^2 of 0.80. The score and the loading plot of the new PLS-DA model are shown in Fig. 3a, b respectively. The detailed analysis of these plots shows that the average position of the different patients is similar to the model using the whole set of patients (Fig. 2a). The PLS-DA model was validated by circular validation (Fig. 3c). The remaining 22 colon biopsies (14 tumoral cases and 8 controls) were then used as a test set and subjected to a blind classification process using the previously determined statistical model. The outcome of the PLS-DA classification process is presented in Fig. 4. A visual inspection of the score plot shows that the 14 cancerous patients and the 8 healthy patients are classified in the correct region. This result is very promising and shows that the HRMAS analysis has very good sensitivity and specificity. Following this classification process, a new PCA analysis was performed on the whole biopsy cohort ($n = 72$) using only data points corresponding to taurine, myo-inositol, glutamate, and aspartate. The PCA results showed this time a clear differentiation between the two groups of biopsies (data not shown). This result is extremely important since PCA alone is rarely capable of separating biological samples in an accurate way. This feature proves the high discriminating power of taurine, myo-inositol, glutamate, and aspartate in healthy and tumoral colon tissues. Since the weight of biopsy present in each sample is accurately known, the Eretic peak can be used to quantify the resolved taurine peak at 3.42 ppm by simple integration. The average taurine concentration of cancerous and healthy biopsy samples was found to be 4.5 ± 1.7 mmol/kg and 2.0 ± 0.6 mmol/kg, respectively. This result is clearly in agreement with the conclusions of the statistical analysis.

The results presented in this manuscript were finally compared to related studies published in the literature. In 1996, Moreno and Arús (Moreno and Arús (1996)) compared the metabolic content of tumoral colon biopsies ($n = 16$) with normal mucosa biopsies ($n = 10$) using extraction techniques and high resolution liquid state ^1H NMR. They found that colon tumors were characterized by a higher level of taurine, glutamate, aspartate, lactate, spermine, putrescine, glutathione, and glycerophosphoethanolamine. Colon tumors were also associated with a significant decrease in myo- and scyllo-inositol. The results presented in our manuscript agree to a large extent with the results obtained by Moreno and Arús. In our spectra of intact biopsies, taurine, glutamate, aspartate, and lactate are clearly present in higher concentrations in adenocarcinomas while myo-inositol and β -glucose are detected in higher concentrations in healthy tissues. Spermine and putrescine are however not detected in our HSQC spectra. Like Moreno and Arús, we find that, among these metabolites, taurine and myo-inositol are the most promising biomarkers. More recently, Seierstad (Seierstad et al. (2008)) reported a HRMAS study of human

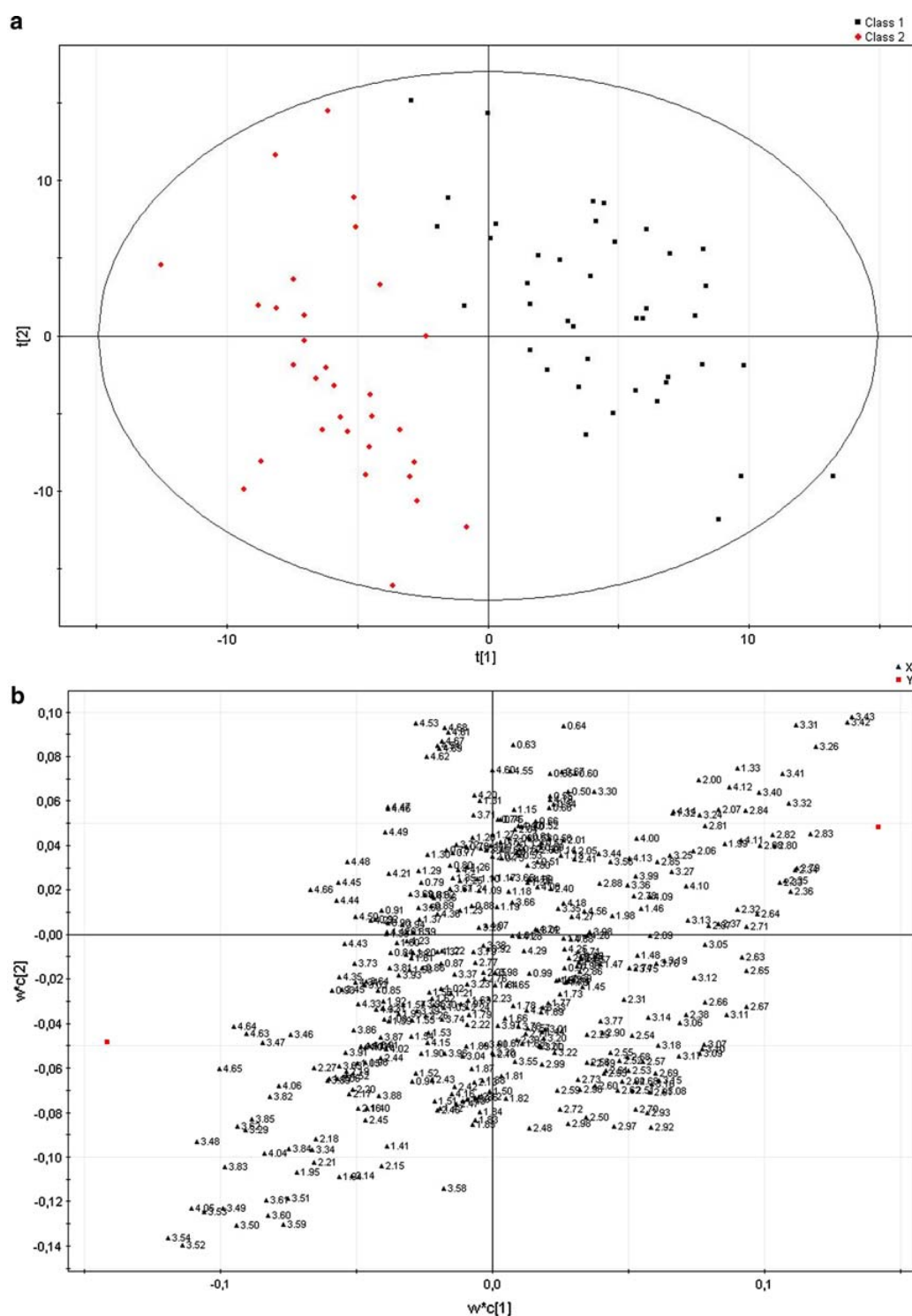
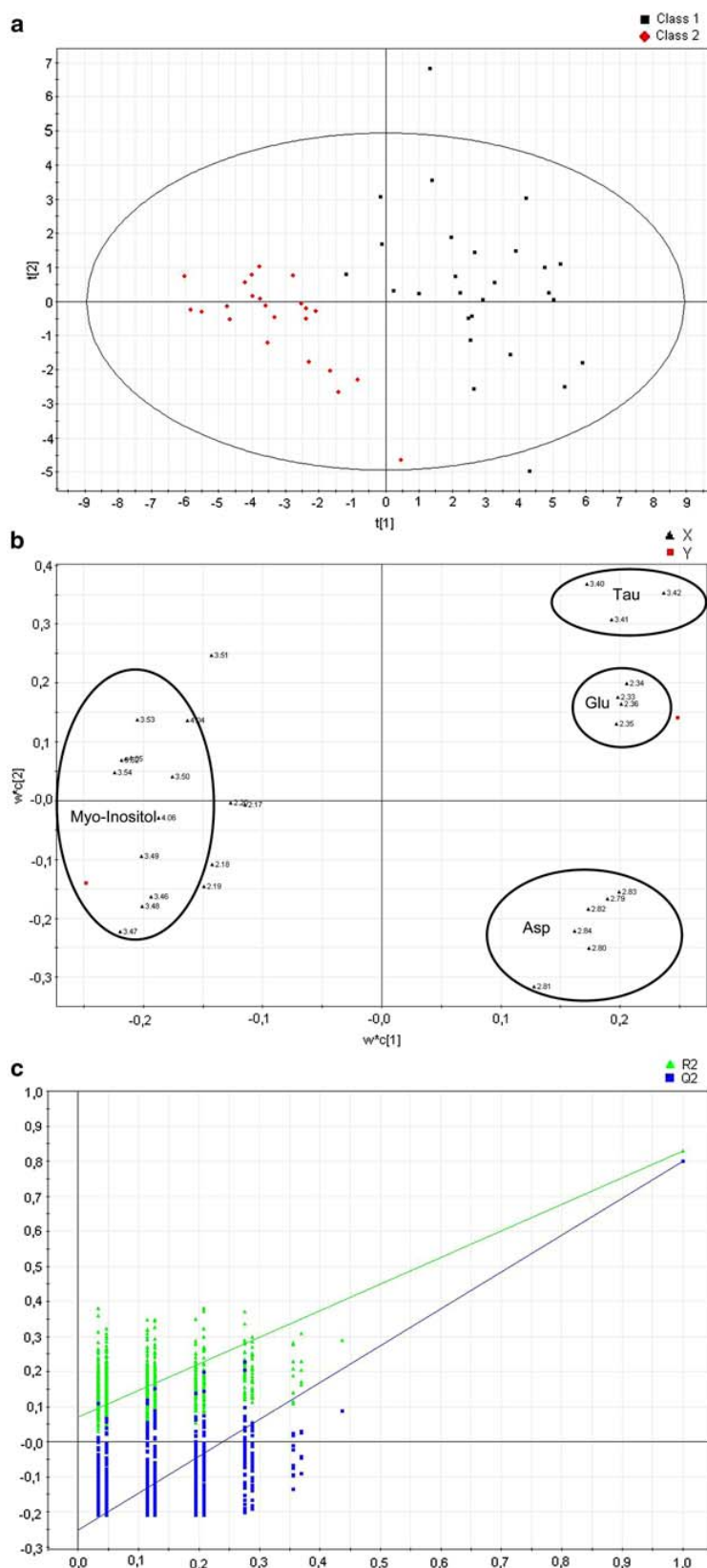


Fig. 2 Two component PLS-DA model obtained when classifying the entire cohort of colorectal biopsies ($n = 72$) according to histopathological criteria and using the 4.7–0.5 ppm spectral region. The PLS-DA model is characterized by the following parameters: $R^2Y = 0.80$ and $Q^2 = 0.68$. The high Q^2 value indicates good predictive capabilities for the model. **a** PLS-DA score plot. Cancerous

and healthy colons are represented by black squares and red rhombs, respectively. **b** PLS-DA loading plot. Each point (chemical shift in ppm) represents the center of a single bucket corresponding to an interval of 0.01 ppm in the HRMAS spectrum. These buckets are associated with one or more metabolite resonances

Fig. 3 Two component PLS-DA model obtained when classifying a subset of the cohort of colorectal biopsies (27 tumoral cases and 23 controls) according to histopathological criteria and using only the most important discriminant variables determined in the previous model (taurine, glutamate, aspartate, and myo-inositol regions). The PLS-DA model is characterized by the following parameters: $R^2Y = 0.83$ and $Q^2 = 0.80$. **a** PLS-DA score plot. Cancerous and healthy colons are represented by black squares and red rhombs, respectively. **b** PLS-DA loading plot. Each point (chemical shift in ppm) represents the center of a single bucket corresponding to an interval of 0.01 ppm in the HRMAS spectrum. **c** Model validation using 999 permutations. The regression line represents the correlation coefficient between the original Y (histopathological classification) and the permuted Y versus the cumulative Q^2 . A negative slope of regression line suggests that there is no model overfit. Q^2 and R^2Y are represented by blue squares and green squares, respectively



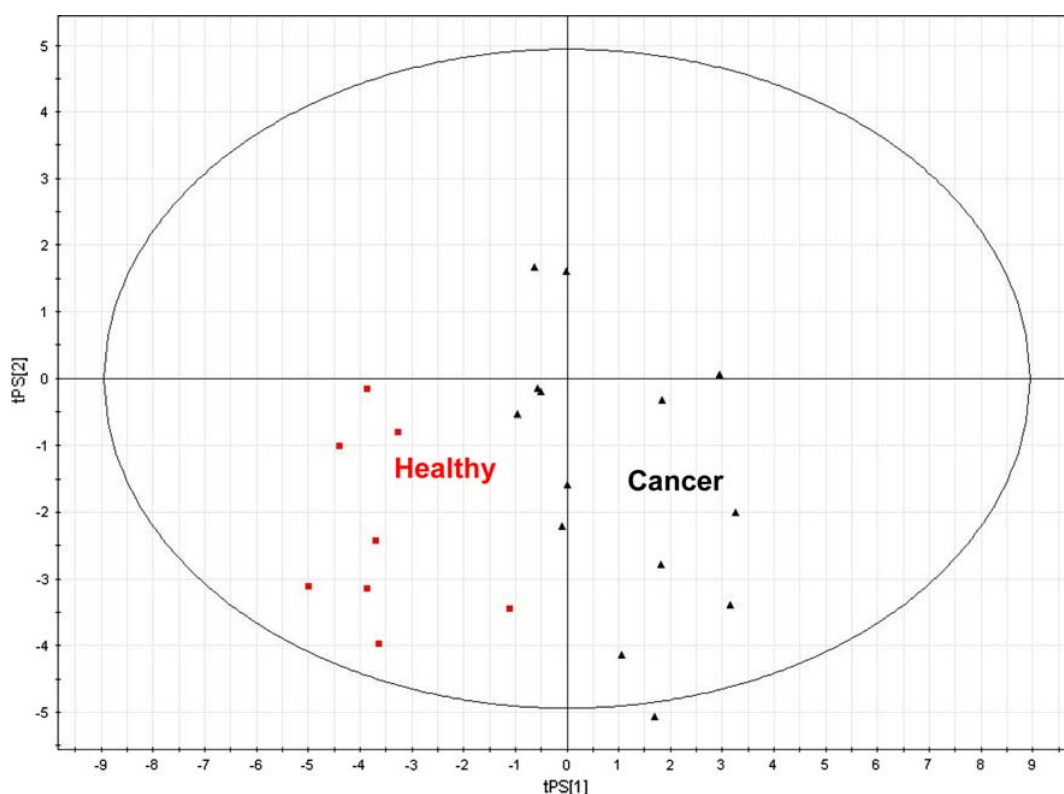


Fig. 4 Blind test classification of colon biopsies (14 tumoral cases and 8 controls) using the metabolic model presented in Fig. 3. Cancerous and healthy colons are represented by black triangles and red squares, respectively

rectal cancer biopsies and colorectal xenografts. The aim of their study was to identify the most appropriate human rectal xenograft model for preclinical magnetic resonance spectroscopy studies. They made no attempts at differentiating tumor from healthy human colon samples. However, the results they published are clearly in agreement with those presented here. The metabolites they identified are similar to the ones reported in Table 1 and colon tumors are characterized by a higher level of taurine.

Our results are therefore in agreement with previous studies already published in the literature. The strength of our approach is clearly to work on intact colon biopsies with an analytical technique (HRMAS) capable of delivering some information as to the nature of the tissue in a reasonable amount of time (ca. 20 min).

4 Concluding remarks

In conclusion, our results show that adenocarcinomas can be separated with a good specificity and sensibility from healthy colorectal biopsies solely on the basis of their metabolic content. An elevated amount of taurine, glutamate aspartate, and lactate in a colorectal biopsy is highly

symptomatic of an adenocarcinoma. Conversely, a high amount of myo-inositol and β -glucose is a signature of a healthy tissue. Our HRMAS study is one of the first ones to actually use a PLS-DA metabolic model to classify tumoral and healthy colon biopsies. The next crucial step will be to investigate if a metabolic analysis can discriminate between different patient populations within the cancer group—the purpose being the identification of possible markers of unfavorable patient evolution (i.e., appearance of precocious metastasis or local recurrence). Such monitoring requires a careful longitudinal follow-up of patients and this will be the object of our next study.

Acknowledgments This work is part of the CARMEN project and was supported by grants from Région Alsace, Oséo, Communauté Urbaine de Strasbourg, Conseil Départemental du Bas-Rhin, Bruker BioSpin, University Louis Pasteur and University Hospitals of Strasbourg. The technical assistance of Dr. J. Raya, Mrs. H. Kada, and Mrs. T. Tong is gratefully acknowledged.

References

- Akoka, S., Barantin, L., & Trierweiler, M. (1999). Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry*, 71(13), 2554–2557. doi:10.1021/ac981422i.

- Andrew, E. R., Bradbury, A., & Eades, R. G. (1958). Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature*, *183*, 1802–1803. doi:10.1038/1831802a0.
- Cheng, L. L., Anthony, D. C., Comite, A. R., et al. (2000). Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro-Oncology*, *2*(2), 87–95. doi:10.1215/15228517-2-2-87.
- Cheng, L. L., Chang, I. W., Louis, D. N., & Gonzalez, R. G. (1998). Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Research*, *58*(9), 1825–1832.
- Cheng, L. L., Ma, M. J., Becerra, L., et al. (1997). Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(12), 6408–6413. doi:10.1073/pnas.94.12.6408.
- Cusack, J. R., Giacco, G. G., Cleary, K., et al. (1996). Survival factors in 186 patients younger than 40 years old with colorectal adenocarcinoma. *Journal of the American College of Surgeons*, *183*, 105–112.
- Davis, A. L., Keeler, J., Laue, E. D., & Moskau, D. (1992). Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego Calif)*, *98*(1), 207–216.
- Elbayed, K., Dillmann, B., Raya, J., Piotto, M., & Engelke, F. (2005). Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *Advances in Magnetic Resonance*, *174*, 2–26. doi:10.1016/j.jmr.2004.11.017.
- Fearon, E., Cho, K. R., Nigro, J., et al. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, *247*, 49–56. doi:10.1126/science.2294591.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., et al. (2007). Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians, *57*, 43–66.
- Leichman, C. G., Lentz, H. J., Danenberg, K., et al. (1997). Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicted for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted infusion of 5-fluorouracil and weekly leucovorin. *Journal of Clinical Oncology*, *15*, 3223–3229.
- Libutti, S. K., Saltz, L. B., & Tepper, J. E. (2008). Principles and practice in oncology. In V. T. De Vita, T. S. Lawrence, & S. A. Rosenberg (Eds.), *Colon cancer in cancer* (pp. 1232–1285). Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Lippens, G., Bourdonneau, M., Dhalluin, C., et al. (1999). Study of compounds attached to solid supports using high resolution magic angle spinning NMR. *Current Organic Chemistry*, *3*, 147–169.
- Lowe, I. J. (1959). Free induction decays of rotating solids. *Physical Review Letters*, *2*, 285–287. doi:10.1103/PhysRevLett.2.285.
- Martínez-Bisbal, M. C., Martí-Bonmatí, L., Piquer, J., et al. (2004). ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR in Biomedicine*, *17*(4), 191–205. doi:10.1002/nbm.888.
- Martínez-Granados, B., Monleon, D., Martínez-Bisbal, M. C., et al. (2006). Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, *19*(1), 90–100. doi:10.1002/nbm.1005.
- Moreno, A., & Arús, C. (1996). Quantitative and qualitative characterization of ¹H NMR spectra of colon tumors, normal mucosa and their perchloric acid extracts: Decreased levels of myo-inositol in tumours can be detected in intact biopsies. *NMR in Biomedicine*, *9*(1), 33–45. doi:10.1002/(SICI)1099-1492(199602)9:1<33::AID-NBM391>3.0.CO;2-G.
- Piotto, M., Bourdonneau, M., Furrer, J., et al. (2001). Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under magic angle spinning: Effects of Radial B1 inhomogeneities. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.)*, *149*, 114–118. doi:10.1006/jmre.2001.2287.
- Seierstad, T., Røe, K., Sitter, B., et al. (2008). Principal component analysis for the comparison of metabolic profiles from human rectal cancer biopsies and colorectal xenografts using high-resolution magic angle spinning ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Molecular Cancer*, *7*, 1–13. doi:10.1186/1476-4598-7-33.
- Shaka, A. J., Lee, C. J., & Pines, A. (1988). Iterative schemes for bilinear operators: Application to spin decoupling. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif.)*, *77*, 274–293.
- Sitter, B., Sonnewald, U., Spraul, M., Fjosne, H. E., & Gribbestad, I. S. (2002). High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR in Biomedicine*, *15*(5), 327–337. doi:10.1002/nbm.775.
- Sjøbakk, T. E., Johansen, R., Bathen, T. F., et al. (2008). Characterization of brain metastases using high-resolution magic angle spinning MRS. *NMR in Biomedicine*, *21*(2), 175–185. doi:10.1002/nbm.1180.
- Tenenhaus, M. (1998). La régression PLS: Théorie et Pratique. Paris.
- Tzika, A. A., Cheng, L. L., Goumnerova, L., et al. (2002). Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Neurosurgery*, *96*(6), 1023–1031.
- Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., et al. (2008). Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, *4*(1), 81–89. doi:10.1007/s11306-007-0099-6.
- Wider, G., & Dreier, L. (2006). Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(8), 2571–2576. doi:10.1021/ja055336t.

Métabolomique par spectroscopie RMN à haute résolution en rotation à l'angle magique (HRMAS) appliquée à la pathologie tumorale surrénalienne**(HRMAS NMR based metabolomics applied to the tumoral adrenal disease)****Résumé**

La spectroscopie RMN à haute résolution (HR) en rotation à l'angle magique (Magic Angle Spinning, MAS) permet la caractérisation métabolomique tissulaires à partir de faibles quantités de matériel. Nous avons caractérisé par spectroscopie RMN HRMAS le profil métabolomique du neuroblastome de l'enfant et des principales tumeurs surrénaliennes chez l'adulte. Nos résultats se situent parmi les premières explorations par spectrométrie RMN HRMAS de la surrénale. Concernant le neuroblastome, le profil métabolomique tumoral a été comparé à celui de la médullosurrénale normale. La relation entre le phénotype métabolomique et des facteurs pronostiques établis en clinique a été étudiée. L'évolution clinique des patients a été enfin corrélée au profil métabolomique. Chez l'adulte, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'adénome, du corticosurréalome et du phéochromocytome. Le métabolome tumoral a été ainsi comparé au profil sécrétoire biologique et génétique tumoral.

Nos résultats montrent que la spectroscopie RMN HRMAS est une méthode très prometteuse pour l'étude du profil métabolomique de la surrénale et de ses principales pathologies tumorales.

Abstract

¹H-high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance (HRMAS NMR) spectroscopy is one of the most innovative technologies for a global study of metabolism analyzing intact tissue samples. We have assessed the metabolic profile of the normal adrenal and its principal primary tumors in children and adult. Our study represents one of the first applications of HRMAS NMR spectroscopy to adrenal pathology. Firstly, we have analyzed the pediatric neuroblastoma. The tumoral metabolic profile was compared to that of normal adrenal medulla. Thereafter, the relationship between tumoral metabolomic phenotype and selected established prognostic factors was studied. Patient clinical course was finally correlated to tumoral metabolomic profile. In adults subjects we have established the metabolic profile of adenoma, adrenal cortical carcinoma and pheochromocytoma. Tumor metabolome was correlated to hormonal secretion and patient's genetic profile.

Finally, our findings show that HRMAS NMR spectroscopy is a very promising method for the study of metabolomic profile of tumors originating from the adrenal gland in children and adult subjects.