Sous la direction du Docteur Angelo PACI

Gustave Roussy Cancer Campus Grand Paris

Service de Pharmacologie

114, rue Édouard-Vaillant 94805 Villejuif

JURY :

Président : Professeur Pascal SONNET

Membres : Docteur Jean-François GAMBIER
Docteur Julien HADOUX
Docteur Julien MORAGNY
Docteur Angelo PACI

Thèse n°3075
REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse n’auraient jamais pu voir le jour sans l’aide de plusieurs personnes que je souhaite tout particulièrement remercier.

En premier lieu je tiens à adresser toute ma gratitude à mon directeur de thèse et maître de stage, le Dr Angelo Paci, pour m’avoir accordé sa confiance et son appui dans la réalisation de ce projet.

J’adresse, en particulier, toute ma reconnaissance à Lionel Mercier, fin pédagogue, qui a toujours fait preuve de patience et de disponibilité à mon égard et sans qui ces recherches n’auraient pu aboutir.

Je tiens également à remercier les collaborateurs du service de pharmacologie de Gustave Roussy dans leur ensemble pour leur accueil et les connaissances qu’ils m’ont apporté durant ce stage. J’adresse également ma reconnaissance aux cliniciens du service d’endocrinologie dont le travail a permis de mener ce projet à bien.

Ma reconnaissance va également à mon jury dont chacun des membres a, à sa manière, contribué à ma formation et a inspiré le choix de ma carrière professionnelle à venir.
Je dédie cette thèse :

À ma chérie Chloé,

Tu as toujours été là pour moi et tu m’as réconforté lorsque mes projets n’aboutissaient pas, je te remercie pour ta relecture attentive et attentionnée. Enfin, merci pour avoir partagé avec moi ces longues journées de révisions qui ont ponctué nos études.

À mes parents,

Je vous remercie pour avoir cru en moi lors des moments de doute ainsi que pour votre soutien infaillible tout au long de mes études.

À mon frère Alexandre,

Pour ta joie de vivre et les moments de détente et de rire que nous avons partagés, je te souhaite le meilleur dans tes études qui débutent.

À Vincent,

Merci pour ton amitié sincère depuis toutes ces années.
TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS .................................................................................................. 6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .................................................................................. 8
INTRODUCTION .................................................................................................................... 10
OBJECTIFS ............................................................................................................................. 15
MATERIELS ET METHODES.................................................................................................. 16
   I) Méthode analytique développée ............................................................................... 16
      1) Pré-analytique : .................................................................................................... 16
      2) Analytique : méthode en électrospray positif ....................................................... 18
      3) Validation de la méthode développée : ................................................................. 18
   II) Échantillons de patients ........................................................................................... 19
RÉSULTATS ET DISCUSSION ............................................................................................. 21
   I) Méthode de dosage sérique de métabolites par UPLC-MS/MS : ............................... 21
   II) Étude clinique préliminaire : ..................................................................................... 25
      1) PHEO/PGL exploration du biomarqueur fumarate ............................................... 25
      2) PHEO/PGL exploration du biomarqueur succinate ............................................... 27
         a) Variabilité intra-individuelle et aspect dynamique du succinate ....................... 27
         b) Interprétation des concentrations en succinate par stratification de la cohorte.... 27
         c) Le succinate, un oncomarqueur diagnostic des mutations SDH-B ................... 29
         d) Le succinate, un oncomarqueur pronostic chez les patients SDH-B mutés ....... 30
      3) Oncomarqueurs du cycle de Krebs et perspectives .............................................. 33
ENVIRONNEMENTS ECONOMIQUE ET STRATEGIQUE ............................................... 36
   I) Analyse stratégique ..................................................................................................... 36
      1) Contexte ................................................................................................................. 36
      2) Analyse par matrice SWOT ................................................................................ 36
         a) Diagnostic interne : Dosage des biomarqueurs succinate et fumarate .......... 36
         b) Diagnostic externe : Environnement scientifique et hospitalier ................... 37
         c) Perspectives d’avenir : ...................................................................................... 38
II) Analyse pharmaco-économique ................................................................. 41
   1) Coûts directs : ........................................................................................................... 42
   2) Coûts indirects : ........................................................................................................ 45
   3) Récapitulatif des coûts : ........................................................................................... 45
   4) Facturation : .............................................................................................................. 46
   5) Analyse des coûts et bénéfices : ............................................................................... 46

CONCLUSION ......................................................................................................................... 48

ANNEXE : Épidémiologie des cancers $SDH$ mutés .......................................................... 50

BIBLIOGRAPHIE ................................................................................................................... 52

RÉSUMÉ ................................................................................................................................. 56
**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Abbr.</th>
<th>Signification</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>BHN</td>
<td>Acte de Biologie Hors Nomenclature</td>
</tr>
<tr>
<td>CoA</td>
<td>Coenzyme A</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ</td>
<td>Contrôle de Qualité</td>
</tr>
<tr>
<td>EDC</td>
<td>N-(3-dimethylamino propyl)-N’-ethylcarbodiimide</td>
</tr>
<tr>
<td>EI</td>
<td>Étalon Interne</td>
</tr>
<tr>
<td>ES+</td>
<td>Electrospray Positif</td>
</tr>
<tr>
<td>HGA</td>
<td>2-hydroxyglutarate</td>
</tr>
<tr>
<td>HIF</td>
<td>Facteur Induit par l’Hypoxie</td>
</tr>
<tr>
<td>HPLC</td>
<td>Chromatographie Liquide Haute Performance</td>
</tr>
<tr>
<td>IDH</td>
<td>Isocitrate déshydrogénase</td>
</tr>
<tr>
<td>LAM</td>
<td>Leucémie Aiguë Myéloïde</td>
</tr>
<tr>
<td>LC-MS/MS</td>
<td>Chromatographie Liquide Couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem</td>
</tr>
<tr>
<td>LogP</td>
<td>Coefficient de partage Octanol / Eau</td>
</tr>
<tr>
<td>LOQ</td>
<td>Limite de Quantification (Limit Of Quantification)</td>
</tr>
<tr>
<td>m/z</td>
<td>Rapport masse/charge</td>
</tr>
<tr>
<td>MRM</td>
<td>Monitoring de Réactions Multiples (Multiple Reaction Monitoring)</td>
</tr>
<tr>
<td>MS</td>
<td>Spectrométrie de Masse</td>
</tr>
<tr>
<td>MTBE</td>
<td>Méthyl tert-butyl éther</td>
</tr>
<tr>
<td>NABM</td>
<td>Nomenclature des Actes de Biologie Médicale</td>
</tr>
<tr>
<td>ns</td>
<td>non significatif statistiquement</td>
</tr>
<tr>
<td>O-BHA</td>
<td>O-benzylhydroxylamine</td>
</tr>
<tr>
<td>P</td>
<td>Valeur p (p-value), détermine la significativité statistique des résultats</td>
</tr>
<tr>
<td>PGL</td>
<td>Paragangliomes</td>
</tr>
<tr>
<td>PHD3</td>
<td>Prolyl 3-hydroxylase</td>
</tr>
<tr>
<td>PD</td>
<td>Progression de la Pathologie (Progressive Disease)</td>
</tr>
<tr>
<td>PHEO</td>
<td>Phéochromocytomes</td>
</tr>
<tr>
<td>pKa</td>
<td>-log (Constante d’acidité)</td>
</tr>
<tr>
<td>PR</td>
<td>Prélèvement(s)</td>
</tr>
<tr>
<td>PRes</td>
<td>Réponse Partielle (Partial Response)</td>
</tr>
<tr>
<td>ROC</td>
<td>Courbe sensibilité/spécificité (Receiver Operating Characteristic)</td>
</tr>
<tr>
<td>SD</td>
<td>Stabilisation de la Pathologie (Stable Disease)</td>
</tr>
<tr>
<td>SDH</td>
<td>Succinate déshydrogénase</td>
</tr>
<tr>
<td>SDH-x</td>
<td>Mutation génétique d’un gène codant pour la succinate déshydrogénase</td>
</tr>
<tr>
<td>Se</td>
<td>Sensibilité diagnostic</td>
</tr>
<tr>
<td>Sp</td>
<td>Spécificité diagnostic</td>
</tr>
<tr>
<td>SPE</td>
<td>Extraction en Phase Solide</td>
</tr>
<tr>
<td>SWOT</td>
<td>Forces Faiblesses Opportunités Menaces (Strenghts Weaknesses Opportunities Threats)</td>
</tr>
<tr>
<td>TEP</td>
<td>Tomographie à Émission de Positons</td>
</tr>
<tr>
<td>TMZ</td>
<td>Témozolomide</td>
</tr>
<tr>
<td>UPLC</td>
<td>Chromatographie Liquide Ultra Performante</td>
</tr>
<tr>
<td>%V</td>
<td>Pourcentage de Variation</td>
</tr>
</tbody>
</table>
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

Figure 1: Cycle de Krebs ................................................................. 13
Figure 2: Récapitulatif phases pré-analytique et analytique .................. 16
Figure 3: Réaction de dérivation ....................................................... 17
Figure 4: Transition MRM du succinate dérivé ................................... 18
Figure 5: Interactions π-π lors des échanges phase stationnaire - phase mobile .......... 21
Figure 6: Séparation chromatographique après dérivation du succinate et du méthylmalonate et du fumarate et du maléate sur colonne CSH Phenyl-Hexyl® ...................................................... 22
Figure 7: Chromatogrammes colonne CSH Phenyl-Hexyl®-UPLC-MS/MS .......... 23
Figure 8: Diagrammes en boîte des concentrations sériques en fumarate (µM) en fonction des statuts pathologique et mutationnel ................................................................. 26
Figure 9: Cinétique sérique du biomarqueur succinate (µM) par individu ............ 27
Figure 10: Diagrammes en boîte des concentrations sériques en succinate (µM) en fonction des statuts pathologique et mutationnel ................................................................. 29
Figure 11: Courbe ROC de l’oncomarqueur succinate visant à diagnostiquer les PHEO/PGL SDH-B mutés parmi les PHEO/PGL ................................................................. 30
Figure 12: Exemple de calcul des pourcentages de variation ....................... 31
Figure 13: Pourcentages de variation des concentrations en succinate en fonction de la réponse au Témozolomide chez les patients SDH-B mutés atteints de PHEO/PGL .......... 32
Figure 14: Diagrammes en boîte : comparaison des concentrations sériques en hydroxyglutarate et en succinate en fonction des mutations du cycle de Krebs ......................... 33
Figure 15: Répartition des coûts fixes liés au dosage .................................. 46
Figure 16: Analyse coût-bénéfice dans le cadre du dosage SDH .................. 47
Tableaux :

Tableau 1: Échantillonnage des patients.............................................................. 19
Tableau 2: Échantillonnage des PHEO/PGL traités par Témozolomide ............... 20
Tableau 3: Transitions MRM des molécules d’intérêt........................................... 21
Tableau 4: Récapitulatif des principaux paramètres de validation de la méthode selon les normes françaises de bioanalyses.......................................................... 23
Tableau 5: Récapitulatif des calculs visant à établir une corrélation entre les biomarqueurs succinate et hydroxyglutarate................................................................. 34
Tableau 6: Récapitulatif de l'analyse par matrice SWOT..................................... 40
Tableau 7: Montant de l'usure de la colonne chromatographique ...................... 42
Tableau 8: Liste des consommables, prix à l’unité et totaux............................... 43
Tableau 9: Amortissement annuel des machines................................................. 43
Tableau 10: Coût salarial du dosage pour l’établissement.................................... 44
Tableau 11: Récapitulatif des coûts liés au dosage............................................. 45
INTRODUCTION

Médecine de précision et oncologie

La médecine de précision permet à partir des caractéristiques génotypiques et moléculaires de chaque cancer de proposer un suivi et des thérapeutiques spécifiques. Le développement d’outils technologiques de pointes permet de caractériser de plus en plus précisément les tumeurs. Dans ce contexte, la stratification en différents sous-types tumoraux au sein d’une même pathologie a notamment permis le développement de thérapies ciblées (anticorps monoclonaux, inhibiteurs de tyrosine kinase,….) visant précisément une anomalie moléculaire. La découverte de telles thérapies a créé un lien, rationnellement indissociable, entre traitement de précision et signature tumorale. La médecine de précision a pour but d’éviter les protocoles thérapeutiques toxiques et inutiles en promulguant l’emploi de traitements efficaces propres à chaque tumeur. Il s’agit ici d’un concept de médecine prédictive qui avant même la mise en œuvre d’un protocole de soin permet de prédire statistiquement la marche thérapeutique la plus efficace (1). La signature tumorale peut être établie via des technologies de biologie analytique, telle que la spectrométrie de masse, autorisant le dosage de molécules traduisant l’existence d’anomalies tumorales. Ces molécules sont nommées biomarqueurs tumoraux ou oncomarqueurs. Les oncomarqueurs peuvent permettre de diagnostiquer un cancer et/ou une mutation associée tout en facilitant le suivi thérapeutique en objectivant, de manière précoce, l’efficacité d’un traitement à visée curative. Ainsi nous tenterons dans le cadre de ce travail de décrire, tout d’abord, le développement d’une méthode de dosage, en spectrométrie de masse, de molécules possédant des potentiels d’oncomarqueurs au sein des phéochromocytomes et paragangliomes, puis de confronter ces oncomarqueurs candidats à une réalité médicale via les dosages sériques de patients.

Phéochromocytomes et paragangliomes

Les phéochromocytomes (PHEO) et les paragangliomes (PGL) sont des tumeurs neuroendocrines rares, majoritairement bénignes. Leur incidence cumulée est d’environ 1/100 000 habitants/an (2). Selon l’OMS, on nomme paragangliome une tumeur qui se développe aux dépens du système nerveux parasympathique ou sympathique extra-surrénalien, et phéochromocytome une tumeur de la médullosurrénale (3). PHEO et PGL sont des tumeurs de forte parenté, et leur distinction est donc fonction de la localisation tumorale.
Ces tumeurs primaires peuvent être multiples et/ou malignes, elles sont dites « fonctionnelles » lorsqu’elles sécrètent des catécholamines (adrénaline, noradrénaline). Les patients atteints de PHEO/PGL peuvent avoir une symptomatologie variable, elle dépend du caractère fonctionnel de la tumeur et de la présence d’éventuelles métastases. Les symptômes sont, la plupart du temps, d’ordre adrénergique et peuvent associer notamment hypertension artérielle, céphalées, tachycardie et douleurs abdominales (4). Les localisations tumorales secondaires, métastatiques, sont principalement osseuses, hépatiques et pulmonaires. L’envahissement tumoral conduit ainsi à une diversité symptomatologique conséquente. La thérapeutique mise en œuvre peut donc aller du traitement symptomatique (antihypertenseurs, β-bloquants…etc), à l’exérèse chirurgicale accompagnée de radiothérapie et/ou de chimiothérapie.

Ces tumeurs primaires peuvent avoir une présentation syndromique, familiale ou sporadique. Les formes syndromiques et familiales sont toutes deux héréditaires, la forme syndromique associe cependant de multiples tumeurs neuroendocrines (notamment des cancers médullaires de la thyroïde et des phéochromocytomes), tandis que la forme familiale est restreinte à un type tumoral (PHEO et/ou PGL). Enfin la forme sporadique implique des mutations ponctuelles de cellules neuroendocrines sans caractère héréditaire. Un individu développe, à un moment de sa vie, une mutation au sein d’une ou plusieurs cellules. Ces mutations ne sont donc pas germinales et ne sont par conséquent pas transmissibles. Les formes familiales dites SDH mutées ont un risque de malignité élevé. Ainsi, nous nous intéresserons dans le cadre de notre étude aux formes familiales possédant des mutations de type SDH-x dont la proportion parmi les PHEO/PGL est d’environ 10% (5), soit une soixantaine de nouveaux cas de PHEO/PGL SDH mutés par an en France. La mutation SDH-x peut être définie comme une mutation d’une des sous-unités du complexe protéique formant l’enzyme SDH ou succinate déshydrogénase (enzyme du cycle de Krebs). Cette enzyme, dont la localisation est mitochondriale, se compose de plusieurs sous-unités codées par des gènes, non-mitochondriaux, présents sur les chromosomes 1, 5 et 11. Les sous-unités A et B sont catalytiques, les sous-unités C et D permettent l’ancrage de l’enzyme à la membrane mitochondriale et enfin la sous-unité AF2 est un cofacteur nécessaire à la réaction enzymatique. Nous aborderons le rôle de cette enzyme au sein de la machinerie cellulaire un peu plus loin dans ce mémoire. La mutation impliquée dans une forme familiale de PHEO/PGL SDH mutée peut donc être de type SDH-A, SDH-B, SDH-C, SDH-D ou SDH-AF2 suivant qu’elle implique l’une ou l’autre des sous-unités. Les mutations SDH provoquent un
dysfonctionnement de l’enzyme aboutissant à une diminution de son activité. Nous nous attacherons tout particulièrement, dans le cadre de ce travail, à la mutation SDH-B qui est associée à de sombres facteurs pronostiques. En effet, une mutation SDH-B est retrouvée dans 40% des PHEO/PGL malins avec une survie médiane de 42 mois à compter du diagnostic de la première métastase contre 244 mois chez les patients non SDH-B mutés (4).

Traditionnellement, le diagnostic des PHEO/PGL est réalisé par l’intermédiaire de dosages biologiques et d’examens d’imagerie médicale. Les métabolites de l’adrénaline et de la noradrénaline que sont respectivement la métanéphrine et la normétanéphrine sont produits principalement par les cellules tumorales neuroendocrines, et ce, indépendamment des concentrations sanguines en adrénaline et en noradrénaline. Ces métabolites sont à ce titre des marqueurs tumoraux de choix. La chromogranine A est également un biomarqueur efficace, il s’agit d’une glycoprotéine ubiquitaire des cellules neuroendocrines localisée au sein de granules sécrétaires. Cette dernière informe sur le caractère fonctionnel des tumeurs. L’imagerie, notamment à type de scintigraphie osseuse et de TEP-scan, vient compléter le diagnostic biologique en permettant la localisation et la description des tumeurs. Avec la découverte dans les années 2000 des mutations de type SDH-x, le conseil génétique a pris une part importante dans le diagnostic poussé des PHEO/PGL. La découverte d’une mutation, par exemple, de type SDH-x permet de classifier les PHEO/PGL et ainsi d’explorer le comportement de ces cancers en termes d’évolution et de réponses aux thérapeutiques dans le but de créer, à terme, une standardisation de la prise en charge de chaque sous-catégorie de PHEO/PGL. Une étude récente a soulevé la possibilité d’une efficacité du Témozolomide (TMZ), un cytotoxique alkylant, dans la prise en charge des phéochromocytomes et paragangliomes SDH-B mutés (6). Toutefois à l’heure actuelle aucun biomarqueur spécifique des cancers SDH mutés n’est utilisé en routine. Le développement d’un tel biomarqueur pourrait permettre le diagnostic et le pronostic précoce des cancers SDH mutés en permettant d’appréhender la physiopathologie moléculaire, il s’agit du sujet du présent mémoire. Les cancers SDH mutés ne sont pas restreints aux seuls PHEO et PGL mais s’étendent à d’autres types de cancers comme les carcinomes à cellules rénales dont l’incidence est de 15/100 000 habitants par an (7) avec une proportion SDH mutés d’environ 4% (8), soit approximativement 440 nouveaux cas par an en France (9). Les recherches menées au sein des PHEO/PGL SDH mutés ont ainsi vocation à s’articuler autour d’une oncologie translationnelle abritant tant l’endocrinologie que la néphrologie.
**Métabolites du cycle de Krebs et oncologie**

Le cycle de Krebs ou cycle de l’acide citrique est chez l’homme une étape de métabolisation énergétique de premier plan (production indirecte d’ATP), il est en effet l’interface mitochondrial terminal de plusieurs voies métaboliques. Décrit depuis de nombreuses années (10), il est toutefois longtemps resté lointain de toute réalité médicale. Depuis peu, la présence de mutations dans des gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs a été corrélée à l’apparition de certains cancers (11). Après de multiples confirmations, l’association entre dysfonction du cycle de Krebs et cancers a été replacée dans un contexte oncologique nommé effet Warburg ou hypothèse de Warburg (12) ; les cellules tumorales privilégient un métabolisme énergétique passant par une fermentation lactique plutôt que par une phosphorylation oxydative physiologique via le cycle de Krebs. Ce glissement énergétique favoriserait, via divers facteurs de transcriptions, les processus d’angiogenèse et de prolifération. L’une des hypothèses physiopathologiques est l’inhibition de la dégradation du facteur induit par l’hypoxie (HIF) par le succinate. HIF, en temps normal dégradé par les protéasomes, serait stabilisé indirectement par le succinate qui posséderait des propriétés d’oncométabolite (13) . Le dysfonctionnement de certaines enzymes du cycle de Krebs serait ainsi un élément déclencheur de l’effet Warburg. Il convient de distinguer deux types d’études : les études de métabolomique qui visent à dresser une carte complète du métabolome (14,15) en donnant les proportions relatives de chacun des métabolites ; et les études de dosage de métabolites qui ont pour objectif de quantifier précisément un ou plusieurs métabolites endogènes sans rechercher l’exhaustivité (16–18). La LC-MS est une des technologies analytiques les plus sensibles et les plus polyvalentes, elle s’impose de plus en plus comme un standard du dosage des métabolites endogènes et des analyses du métabolome. Il existe toutefois une grande variabilité d’échantillons ce qui nécessite de multiples méthodes d’analyse, de séparation et de purification.

**Figure 1: Cycle de Krebs**
Le regain d’intérêt pour les acides carboxyliques du cycle de Krebs a conduit au développement de méthodes de spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide permettant l’exploration de matériels tumoraux (14,16,17) et de sérum (15). Le dosage quantitatif du D-2-hydroxyglutarate, un métabolite dérivé du cycle de Krebs en LC-MS est décrit depuis 2004 (18). L’adaptation de ce dosage au sérum de patients a permis depuis 2013 de corréler en pratique clinique les taux de D-2-hydroxyglutarate et les mutations de l’isocitrate déshydrogénase (Figure 1) dans les leucémies aigues myéloïdes, tant au niveau diagnostic que pronostic (19,20). A l’instar des cancers mutés \( IDH \), des mutations de la succinate déshydrogénase (Figure 1) sont également incriminées dans plusieurs cancers dont les phéochromocytomes, les paragangliomes, les carcinomes à cellules rénales, les tumeurs stromales gastro-intestinales et les adénomes hypophysaires (cf Annexes).

L’exploration des mutations \( SDH \) via les ratios de certains métabolites du cycle de Krebs comme le succinate et le fumarate ont montré un intérêt diagnostic et pronostic lors de l’étude de tumeurs issues de phéochromocytomes et de paragangliomes. L’augmentation du succinate a été décelée uniquement dans les mutations de type \( SDH-x \) et les ratios succinate/fumarate étaient environ 400 fois plus haut chez les mutés \( SDH-x \) que chez les autres patients. D’autre part les tumeurs métastatiques montrent des ratios plus hauts que dans les tumeurs \( SDH-B \) non métastatiques (16). Bien que des méthodes validées permettant le dosage des acides carboxyliques du cycle de Krebs au sein de tumeurs existent, la littérature scientifique ne décrit aucune méthode permettant le dosage sérique ou plasmatique du succinate et du fumarate. Aucune étude n’a pour l’heure décrit de corrélation entre réponse à un traitement et activité fonctionnelle de l’enzyme SDH.
**OBJECTIFS**

Notre objectif principal est assez général, il s’agit de l’exploration des taux circulants du succinate et du fumarate au sein d’une cohorte de patients atteints de phéochromocytomes (PHEO) et de paragangliomes (PGL) mutés *SDH* et mutés sporadiquement. Notre objectif regroupe également l’investigation des réponses au Témozolomide parmi les patients atteints de PHEO/PGL *SDH* mutés via les oncomarqueurs précités.

Cet objectif s’articule autour de deux hypothèses :

- **Hypothèse biologique** : les mutations de l’enzyme SDH induisent des variations des concentrations sériques en succinate et en fumarate. Par extension le niveau d’expression des mutations est également corrélé aux concentrations de ces oncomarqueurs ; plus la concentration en succinate augmente tandis que la concentration en fumarate diminue et plus l’expression de la mutation est conséquente.

- **Hypothèse clinique** : les mutations *SDH* dont l’expression fonctionnelle est particulièrement importante répondent tout particulièrement au Témozolomide.

Notre objectif secondaire est l’analyse de l’impact de différentes mutations du cycle de Krebs (mutations *SDH* et *IDH*) sur les biomarqueurs succinate, fumarate et HGA. Une modification des concentrations d’un des métabolites peut-elle impacter d’autres métabolites de ce même cycle ?

Pour atteindre nos objectifs, il est nécessaire de mettre au point une méthode analytique quantitative par LC-MS/MS, fiable et reproductible, permettant d’explorer l’activité de l’enzyme succinate déshydrogénase (SDH) via le dosage du succinate et du fumarate au sein d’échantillons sériques de patients.

Notre travail s’inscrivant dans un contexte plus large ; nous avons également comme objectif, plus lointain, la mise en place d’un recrutement prospectif de cancers mutés *SDH* parmi les patients atteints de carcinomes rénaux et de tumeurs stromales gastro-intestinales en collaboration avec les services cliniques de Gustave Roussy (*cf Annexes*).
I) Méthode analytique développée

La méthode UPLC-MS/MS de biologie analytique développée et validée, permet le dosage de trois métabolites du cycle de Krebs : succinate, fumarate et 2-hydroxyglutarate. Elle nécessite plusieurs étapes exposées ci-dessous (16).

Figure 2: Récapitulatif phases pré-analytique et analytique

1) Pré-analytique :

La première étape est la purification des échantillons sériques, elle permet de sélectionner les entités chimiques de même structure, ici des acides carboxyliques. Nous utilisons pour ce faire une extraction en phase solide par échange d’anion (cartouches SPE Phenomenex Strataxa®) qui sépare par adsorption/élution pKa dépendantes les acides carboxyliques d’autres molécules.

Une fois purifiés, les échantillons sont mis en présence d’un agent de dérivation en milieu aqueux. Ceci permet de faciliter la séparation chromatographique des métabolites, leur ionisation et leur fragmentation dans le cadre d’une acquisition en spectrométrie de masse en tandem. La dérivation est une réaction chimique permettant d’augmenter la masse molaire des molécules (Figure 3). La méthode développée inclue ainsi un agent de dérivation, l’O-BHA (O-benzylhydroxylamine hydrochloride - Sigma Aldrich) ainsi qu’un catalyseur, l’EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N’-ethylecarbodiimide - Sigma Aldrich) selon la méthode de dérivation publiée (17). La réaction de dérivation, notamment au niveau des groupements carboxyles du succinate (Figure 3), est réalisée à pH 5 afin que 80% des groupements acides soient préalablement activés par l’EDC. L’O-BHA a été choisi pour son pKa de 5, afin de favoriser la réaction de dérivation. L’O-BHA doit-être ajouté en large excès en raison d’une
réaction parasite avec l’eau (17). D’autre part, les métabolites présentant des liaisons carbonyles réagissent avec une molécule supplémentaire d’O-BHA.

**Figure 3: Réaction de dérivation**

Une extraction en phase liquide/liquide par le methyl-tert-butyl éther ou MTBE (Fluka Analytical) est par la suite nécessaire afin de séparer l’excès d’agents de dérivation des métabolites dérivés avant toute injection en spectrométrie de masse. Cette séparation fait intervenir la variation des coefficients de partage, le métabolite dérivé tend à rejoindre la phase organique constituée de MTBE tandis que l’agent de dérivation seul tend à rejoindre la phase aqueuse.

Chacune des étapes pré-analytiques est réalisée sur les échantillons à doser ainsi que sur des mélanges de concentrations connues en métabolites. Ces mélanges aqueux comprennent une gamme de calibration en neuf points et cinq contrôles de qualité (CQs), ils sont préparés à partir de poudre commerciales de métabolites (sodium fumarate dibasique - Sigma Aldrich, succinate disodique - Kosher, L-2-hydroxyglutarate de sodium- Sigma Aldrich). Les pesées sont indépendantes entre CQs et points de gamme. La gamme de calibration permet au spectromètre de masse de faire correspondre une concentration en métabolite à un signal détecté tandis que les CQs valident la gamme de calibration.

La gamme de calibration, les CQs ainsi que les échantillons patients sont tous mis en présence d’un étalon interne (EI) dès l’étape de purification afin d’affranchir la méthode de certaines variabilités pré-analytiques liées aux manipulations (imprécisions liées à l’erreur humaine ainsi qu’à la méthode elle-même). Nous utilisons un étalon interne pour chaque métabolite dosé : succinate, hydroxyglutarate et fumarate (succinate $^{13}$C$_4$ - Sigma Aldrich, (RS)-2-hydroxyglutarate de sodium $^2$H$_3$ - Cambridge Isotope Laboratories, fumarate disodique $^{13}$C$_2$ - Cambridge Isotope Laboratories). L’emploi d’étalons internes revêt une importance toute particulière au cours de la première étape de purification (SPE), les rendements d’élation varient notamment en fonction de la constitution du prélèvement et en fonction du métabolite. Le rapport de la concentration en analyte sur la concentration de son étalon interne permet, par exemple, de corriger la variabilité de l’élation.
2) Analytique : méthode en électrospray positif

La séparation chromatographique est assurée par l’intermédiaire d’une colonne UPLC : CSH Phenyl-Hexyl® (1,7 µm - 2,1 x 50 mm - Acquity Waters) et de phases mobiles spécifiques (Eau + 0,1% Acide formique et Acétonitrile + 0,1 % Acide formique - Sigma Aldrich) combinées via un gradient d’élution (0 min à 2,25 min : 80/20 v/v à 59/41 v/v).

Au moyen du spectromètre de masse nous recherchons, dans un premier temps, le rapport masse charge (m/z) de l’analyte appelé ion parent puis, après avoir fractionné ce dernier, son fragment nommé ion fils (Figure 4). Chaque injection nécessite un volume de 5µL (boucle d’injection partielle). Les analyses sont effectuées sur un système Waters Acquity UPLC (pompe binaire, injecteur automatique thermostaté, four à colonne thermostaté, logiciel de pilotage et de traitement des données) couplé à un XEVO TQ-MS® Waters.

Figure 4: Transition MRM du succinate dérivé

Les signaux d’intensités variables liés à chacune des transitions énergétiques ion parent vers ion fils sont, par la suite, corrélés avec les concentrations de la gamme d’étalonnage via une droite d’étalonnage pondérée mathématiquement en 1/x après correction par les étalons internes (logiciel TargetLynx® - Waters).

3) Validation de la méthode développée :

La phase de validation a nécessité trois opérateurs différents ainsi que quatre journées d’analyse différentes réalisées selon une procédure opératoire standardisée. L’analyse des paramètres de validation (logiciel Validation Manager®) a été effectuée par l’intermédiaire des concentrations des contrôles de qualité et des points de gamme : calcul des pourcentages de déviation entre concentrations obtenues et attendues puis calcul de la fidélité et de la linéarité de la méthode selon les recommandations en vigueur (21,22).
II) Échantillons de patients

Les échantillons biologiques à analyser sont issus d’une collecte rétrospective et d’une collecte prospective. Les bio-banques de Gustave Roussy ont permis de collecter rétrospectivement des sérums de patients atteints de paragangliomes et de phéochromocytomes dont les mutations sont sporadiques ou héréditaires (principalement des mutations héréditaires SDH-B : Chromosome 1 - NC_000001.11). Le recrutement des patients a été effectué de manière systématique, lorsqu’un prélèvement sérique issu d’un patient atteint de PHEO/PGL était disponible, celui-ci était collecté dans le cadre d’un consentement éclairé du patient. Nos échantillons patients accumulés de manières rétrospectives et non dérivés sont conservés à -80°C pendant une année au maximum. D’autre part une étude d’impact des cancers SDH mutés nous a permis de justifier la collecte prospective d’échantillons; toutefois cette collecte s’est avérée lente et seule une minorité des échantillons en est donc issu. Des prélèvements séraux ont été choisis dans le cadre du rétrospectif et du prospectif afin de prévenir tout effet exhausteur ou inhibiteur lors de la détection LC-MS/MS, ces effets peuvent en effet faire varier les concentrations mesurées. Certains anticoagulants utilisés dans les plasmas ont été décrits comme possédant de tels effets (23). Le sang total a quant à lui été écarté car lors de sa conservation, le métabolisme des éléments circulants persiste (24).

Notre échantillonnage est enrichi de patients témoins issus d’une population indemne de cancer, aucun génotypage n’a été mené chez ces patients. Nous disposons également de prélèvements de patients atteints de leucémies aigues myéloïdes (LAM) et mutés pour une autre enzyme du cycle de Krebs : l’isocitrate déshydrogénase (IDH), mutation de type IDH-2. Cette mutation aboutissant à une dysrégulation du cycle par accumulation de 2-hydroxyglutarate, il était intéressant de détecter nos biomarqueurs chez ces patients afin de confirmer leur spécificité diagnostic dans le cadre des mutations du cycle de Krebs touchant l’enzyme SDH. Le Tableau 1 (ci-dessous) montre la répartition des patients en fonction des pathologies et mutations soit en termes d’individus soit en termes de prélèvements (PR) séraux.

Tableau 1: Échantillonnage des patients

<table>
<thead>
<tr>
<th>Mutations</th>
<th>Pathologies</th>
<th>PHEO / PGL</th>
<th>LAM</th>
<th>Patients sains</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Types</td>
<td>SDH-B</td>
<td>SDH-C</td>
<td>SDH-D</td>
<td>Sporadique</td>
</tr>
<tr>
<td>Patients</td>
<td>PR</td>
<td>Patient</td>
<td>PR</td>
<td>Patient</td>
</tr>
<tr>
<td>Nombre</td>
<td>9</td>
<td>16</td>
<td>1</td>
<td>1</td>
</tr>
<tr>
<td>PR : Prélèvement(s)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
Le génotypage des patients a été effectué sur de l’ADN génomique, au moins à deux reprises et sur deux prélèvements distincts. La recherche de mutation SDH est une décision clinique influencée par la forme des PHEO/PGL qui peut ou non laisser présager d’une mutation. Seul un certain type de patient ayant un certain type de réponse clinique a ainsi été génotypé. Les patients IDH-2 mutés ont été choisis rétrospectivement selon le critère de choix suivant : la concentration en (D)-2-HGA par analyse LC-MS/MS (20) était supérieure à 2 µM (cut-off traduisant une mutation de l’enzyme IDH). La cohorte de patients est donc constituée de 18 patients atteints de PHEO / PGL pour lesquels on dispose de 37 prélèvements ; de 7 patients atteints de LAM pour lesquels on dispose de 8 prélèvements ; de 15 patients indemnes de cancers pour lesquels on dispose d’un prélèvement par individu.

Les phéochromocytomes et paragangliomes sont traités de manière symptomatique en cas d’évolution lente (contrôle de l’hypertension artérielle principalement), les cures de chimiothérapies, notamment par Témozolomide (TMZ), ne sont instaurées qu’en cas d’évolution significative à type d’invasion métastatique (principalement osseuse). Le TMZ est administré en monothérapie, par voie orale, à une dose comprise entre 150 et 200 mg/m² et ce pendant 5 jours tous les 28 jours (jusqu’à 6 cycles). Parmi les patients atteints de PHEO / PGL, 9 ont été traités par l’agent alkylant Témozolomide (TMZ). La réponse à ce traitement a été objectivée cliniquement par des examens d’imagerie de type TEP-Scan et scintigraphie osseuse. Trois types de réponses sont possibles : la stabilisation de la pathologie (SD : Stable Disease), la réponse partielle (PRes : Partial Response) et la progression de la pathologie (PD : Progressive Disease). Les statuts SD et PRes sont considérés comme des réponses au traitement tandis que le statut PD est considéré comme une non-réponse. Le Tableau 2, ci-dessous, montre la répartition de la cohorte en fonction de la réponse au Témozolomide (TMZ), un même patient peut avoir été répondeur à un moment puis non répondeur par la suite dans un contexte d’échappement thérapeutique. L’imagerie est réalisée dans un laps de temps d’environ 2 mois à partir de la première prise du TMZ. Enfin, les prélèvements ont été effectués au moment de la caractérisation de l’évolution par imagerie, dans un intervalle en mois de [-1 ; +1].

**Tableau 2:** Échantillonnage des PHEO/PGL traités par Témozolomide

<table>
<thead>
<tr>
<th>Pathologie</th>
<th>PHEO / PGL</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Evolution</td>
<td>SD</td>
</tr>
<tr>
<td>Nombre de Patients</td>
<td>2</td>
</tr>
<tr>
<td>Nombre de PR</td>
<td>3</td>
</tr>
</tbody>
</table>

PR : Prélèvement(s) – SD : Stable Disease – PRes : Partial Response – PD : Progressive Disease
RÉSULTATS ET DISCUSSION

I) Méthode de dosage sérique de métabolites par UPLC-MS/MS :

La méthode de biologie analytique développée devait, afin d’être validée, franchir certaines limites ; parmi ces dernières figurent la séparation chromatographique des molécules de même transition m/z. En effet, la spectrométrie de masse en tandem ne peut séparer les molécules possédant la même transition MRM ; c’est le cas de l’étalon interne (EI) du succinate vis-à-vis du fumarate ainsi que vis à vis à vis du méthylmalonate, et c’est également le cas du fumarate vis-à-vis du maléate (Tableau 3). Le méthylmalonate et le maléate ne sont pas des molécules du cycle de Krebs, mais elles peuvent être retrouvées au niveau endogène. La dite séparation doit donc être effectuée, dans le temps, par l’intermédiaire de la chromatographie. À défaut de séparation nous ne pourrions quantifier précisément nos métabolites puisqu’une concentration correspondrait, en réalité, à la somme des concentrations des molécules de même m/z.

Tableau 3: Transitions MRM des molécules d’intérêt

<table>
<thead>
<tr>
<th>Analytes</th>
<th>Parent (m/z)</th>
<th>Fils (m/z)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>fumarate</td>
<td>327</td>
<td>204</td>
</tr>
<tr>
<td>maléate</td>
<td>327</td>
<td>204</td>
</tr>
<tr>
<td>fumarate EI (13C2)</td>
<td>329</td>
<td>206</td>
</tr>
<tr>
<td>succinate</td>
<td>329</td>
<td>206</td>
</tr>
<tr>
<td>méthylmalonate</td>
<td>329</td>
<td>206</td>
</tr>
<tr>
<td>succinate EI (13C4)</td>
<td>333</td>
<td>209</td>
</tr>
<tr>
<td>HGA</td>
<td>359</td>
<td>236</td>
</tr>
<tr>
<td>HGA EI (2H3)</td>
<td>361</td>
<td>238</td>
</tr>
</tbody>
</table>

L’étape de développement chromatographique a donc été particulièrement critique. L’utilisation d’une colonne CSH - Phenyl-Hexyl® pourvue d’une silice greffée par des phényls ainsi que de l’O-BHA, agent de dérivation muni de groupements phényls, nous a permis d’exploiter des interactions moléculaires complexes de type π-π favorisant de ce fait la séparation de nos molécules d’intérêt (Figure 5).

Figure 5: Interactions π-π lors des échanges phase stationnaire - phase liquide
La méthode que nous avons développée est ainsi une adaptation sérique de la méthode sur tumeurs publiée par Bo Tan en 2014 (17). Elle permet une utilisation « quotidienne » des biomarqueurs SDH (succinate et fumarate) en clinique tout en augmentant de ce fait les perspectives d’avenir de ces oncomarqueurs. Notre méthode apporte, en sus, une avancée chromatographique en permettant la séparation du succinate et du Malonate ainsi que la séparation du fumarate et du maléate pouvant interférer avec la quantification des oncomarqueurs SDH (Figure 6).

![Figure 6: Séparation chromatographique après dérivation du succinate et du méthylmalonate et du fumarate et du maléate sur colonne CSH Phenyl-Hexyl®](image)

La Figure 7 présente les chromatogrammes des métabolites issus du cycle de Krebs dosables au niveau sérique via notre méthode ; soit le succinate, le fumarate et le 2-hydroxyglutarate (ainsi que leurs étalons internes respectifs). Notre développement de méthode a volontairement été restreint aux métabolites pour lesquels nous avions un intérêt, à savoir ceux permettant d’explorer les mutations SDH et IDH.
Figure 7: Chromatogrammes colonne CSH Phenyl-Hexyl® - UPLC-MS/MS
L'axe des abscisses représente le temps d’élution en minute de chaque métabolite, ce temps est indiqué au dessus de chaque pic. Succède au nom du métabolite : l’intensité de son signal ainsi que sa transition, Métabolite - Signal - (transition MRM). Les concentrations des métabolites sont de 12µg/mL, les concentrations des étalons internes choisies afin d’optimiser la méthode de dosage sont de : 25µg/mL pour HGA EI, 5 µg/mL pour succinate EI et 12.5 µg/mL pour fumarate EI.

Tableau 4: Récapitulatif des principaux paramètres de validation de la méthode selon les normes françaises de bioanalyses (21,22)

<table>
<thead>
<tr>
<th>Fidélité Intermédiaire (n=16)</th>
<th></th>
<th>Répétabilité: (n=6)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>(% de variation)</td>
<td>succinate</td>
<td>fumarate</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ1</td>
<td>5,8</td>
<td>6,6</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ2</td>
<td>3,2</td>
<td>6,5</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ3</td>
<td>3,6</td>
<td>4,2</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ4</td>
<td>2,0</td>
<td>4,4</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ5</td>
<td>2,6</td>
<td>2,7</td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Exactitude: (n=16)</th>
<th></th>
<th>Stabilité: (n=20)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>(% de variation)</td>
<td>succinate</td>
<td>fumarate</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ1</td>
<td>5,5</td>
<td>8,4</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ2</td>
<td>3,1</td>
<td>6,2</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ3</td>
<td>3,3</td>
<td>4,2</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ4</td>
<td>1,9</td>
<td>4,2</td>
</tr>
<tr>
<td>CQ5</td>
<td>2,4</td>
<td>2,7</td>
</tr>
</tbody>
</table>

| Linéarité - gamme en 9 points - (n=4) | succinate | fumarate | HGA |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Carry Over (n=10) | absent | absent | absent |
Les résultats présentés dans le Tableau 4 concernant la fidélité intermédiaire, l’exactitude et la linéarité (pondération 1/x) ont été obtenus à partir du logiciel Validation Manager®. La répétabilité a été déterminée par réinjection à 6 reprises de chaque Contrôle de Qualité (CQ) et la stabilité a été déterminée par réinjection des CQs après des intervalles de 24h et 72h passés à température ambiante dans le passeur d’échantillons du système –UPLC-MS/MS. L’intervalle de dosage est établi à partir du premier CQ et du dernier CQ, la limite de quantification est calculée à partir de l’équation de la courbe de calibration et le Carry-Over est déterminé par l’intermédiaire d’un blanc passé après le plus haut point de gamme. La méthode a été évaluée sur quatre journées différentes, lors d’une journée la gamme en 9 points était réalisée à une reprise et les 5 contrôles à quatre reprises. La fidélité intermédiaire, l’exactitude et la répétabilité montrent des % de variation < 15% et sont donc validées. La méthode est validée selon les normes en vigueur (21,22) pour des résultats compris entre 0,72 et 101,6 µM pour le succinate, 1,15 et 103,4 µM pour le fumarate et 1,03 à 81,0 µM pour HGA. Les échantillons patients, dont les concentrations en métabolites excèdent les intervalles de dosage, devront donc être dilués au préalable afin que les résultats puissent être validés.

L’étude de stabilité montre une dégradation rapide des métabolites dérivés à température ambiante, la réaction de dérivation doit donc être réalisée au plus proche de l’injection dans le système UPLC-MS/MS et ce sous 24h. L’étude de Bo Tan (17) démontre une stabilité des échantillons dérivés pendant deux semaines à -20°C, nous n’avons pas vérifié cette information car elle ne présente pas à l’heure actuelle d’intérêt dans le cadre de nos dosages.
II) Étude clinique préliminaire :

La valeur de certaines concentrations en biomarqueurs s’est avérée inférieure aux limites de quantification (LOQ) de notre méthode de dosage, c’est notamment le cas pour les biomarqueurs fumarate et 2-hydroxyglutarate. Dans le cadre de cette étude préliminaire, nous avons décidé d’exploiter l’ensemble des résultats. Il s’agit d’une limite conséquente puisqu’en dessous de 1,15 µM pour le fumarate et de 1,03 µM pour le HGA, nous ne pouvons certifier la précision de notre quantification. Les concentrations en succinate ont en revanche été détectées dans la fourchette de quantification de notre méthode. Cette limite est liée à la sensibilité de notre méthode, elle n’a pu être augmentée à l’heure actuelle. Ceci donne toutefois des indications sur les concentrations sériques du fumarate qui n’avaient pu être décrites jusqu’alors.

Par ailleurs, les résultats présentés ci-dessous ont montrés qu’il existait une variabilité intra-individuelle importante. Ces observations ont motivé le choix d’analyse des données de la cohorte par prélèvement et non par patient. Les statistiques qui seront décrites sont donc basées sur un nombre de prélèvement et non sur un nombre de patient ; ceci tend à conforter statistiquement, mais de manière artificielle, les différences constatées. Il s’agit ici d’un parti pris sans lequel nous n’aurions pu analyser les données par strate de patients.

1) PHEO/PGL exploration du biomarqueur fumarate

La Figure 8 (ci-dessous) montre qu’aucune différence significative des concentrations en fumarate n’a pu être observée entre les PHEO/PGL SDH-B mutés, les PHEO/PGL sporadiques et les patients contrôles (patients sains). Ceci va à l’encontre de notre rationnel, une mutation SDH devrait conduire à une diminution de la concentration en fumarate puisqu’il existe un défaut de conversion du succinate vers le fumarate. Ces résultats peuvent être dus au biais induit par la limite de quantification. L’étude de Richter (16) avait montré en 2014 une diminution du fumarate au sein des tumeurs SDH mutées issues de patients atteints de PHEO/PGL ; nous ne sommes cependant pas en mesure de reproduire ces résultats au niveau sérique. Les concentrations sériques en métabolite sont le reflet du métabolisme d’un ensemble de cellules, il est donc probable que la masse tumorale de chaque patient puisse influer sur les concentrations retrouvées. Ainsi, l’une des hypothèses expliquant la divergence des résultats entre les niveaux sériques et tumoraux pourrait s’articuler autour du nombre de cellule relarguant les métabolites. Les concentrations en métabolite étant directement
impactées par la masse tumorale, il serait ainsi délicat de détecter une diminution globale de la production d’un métabolite car celle-ci pourrait être contrebalancée et masquée par un nombre de cellule plus important. Les présents résultats devraient être rapportés à la masse tumorale de chaque patient afin de confirmer notre hypothèse. Toutefois, nous ne sommes pas à même de réaliser cette corrélation pour le moment.

Figure 8: Diagrammes en boîte des concentrations sériques en fumarate (µM) en fonction des statuts pathologique et mutationnel
Les boîtes des diagrammes montrent les 25ème et 75ème percentiles, la médiane est indiquée par un trait à l’intérieur de chaque boîte, les moustaches décrivent les minima et les maxima, enfin la présence éventuelle de points indique les valeurs aberrantes au sein d’une strate. Les statistiques ont été effectuées par l’intermédiaire de tests non-paramétriques de Mann-Whitney réalisés sur le nombre de prélèvements disponibles pour chaque strate, plusieurs prélèvements peuvent donc être issus d’un même patient.
2) PHEO/PGL exploration du biomarqueur succinate

a) Variabilité intra-individuelle et aspect dynamique du succinate

Comme abordé précédemment, il semble exister une grande variabilité intra-individuelle des concentrations en biomarqueurs du cycle de Krebs au niveau sérique. La Figure 9 illustre cette variabilité en présentant la cinétique de trois patients pour lesquels nous disposons de multiples prélèvements. On note que les concentrations sériques en succinate sont plus élevées chez les deux mutés SDH-B que chez le patient sporadique (SPO). Les concentrations peuvent varier du simple au double chez un même patient, il semblerait que le biomarqueur succinate revête un aspect dynamique. Nous explorerons ce dernier dans la suite de ce rapport.

![Figure 9: Cinétique sérique du biomarqueur succinate (µM) par individu](image)

Graphique réalisé à partir de 12 prélèvements issus de 3 patients.

b) Interprétation des concentrations en succinate par stratification de la cohorte

L’exploration du biomarqueur succinate par stratification de notre cohorte montre des différences statistiquement significatives entre les patients sains, les patients PHEO/PGL SDH-B mutés et les patients PHEO/PGL mutés sporadiquement (Figure 10).

La comparaison des patients SDH-B mutés et des patients SPO (Figure 10) semble montrer qu’il existe une expression sérique de la dysfonction enzymatique. La mutation de l’enzyme SDH induit un défaut de synthèse du succinate en fumarate, le succinate s’accumule alors au sein des cellules tumorales avant d’être relargué dans la circulation générale. Les deux populations comparées sont atteintes de PHEO/PGL, un processus propre à la mutation...

Des différences ont également été constatées entre PHEO/PGL SDH-B mutés et patients sains (Figure 10), ceci pourrait amener à réaliser un suivi des familles porteuses de mutations SDH-B. Les porteurs de mutations SDH peuvent développer des PHEO/PGL à différents instants de leurs vies, ceci pourrait permettre de dépister de manière précoce une dysfonction métabolique chez ces individus. La physiopathologie des cancers SDH n’est toutefois pas clairement élucidée, le déficit enzymatique pourrait préexister à l’apparition des PHEO/PGL. La réalisation d’une étude sur des patients SDH mutés indemnes de cancers constituerait une avancée dans l’investigation de la physiopathologie de ces cancers. En l’état actuel des connaissances, le test sérique du succinate pourrait permettre de détecter l’expression d’une mutation SDH-B mais ne pourrait permettre d’objectiver la présence d’un cancer. Il n’est pas exclu que des patients mutés puissent présenter un déficit de l’enzyme SDH au sein de groupe de cellules (se traduisant par une augmentation des concentrations sériques en succinate) sans pour autant être atteints de cancer. Une des hypothèses concernant le mécanisme de tumorigénèse des PHEO/PGL repose sur les propriétés pro-apoptotiques de PHD3 (Prolyl 3-hydroxylase) sur les cellules pro-génitrices neurales durant le développement. Les mutations SDH-x, notamment, aboutiraient à l’inhibition de PHD3 permettant aux cellules progénitrices d’échapper à une mort cellulaire programmée et leur conférant ainsi la possibilité de se développer, plus tard, en tumeurs (4).

La Figure 10 montre également, dans une moindre mesure, une différence significative entre les patients PHEO/PGL SPO et les patients sains. Cette différence pourrait être due à la présence de tumeurs chez les patients SPO ; les cellules tumorales étant plus active métaboliquement que les cellules normales ceci aboutirait à un relargage plus important de métabolites dont fait partie le succinate.

Au sein de notre cohorte, les patients SDH-C et SDH-D mutés étaient largement sous-représentés par rapport aux patients SDH-B, il est ainsi impossible de conclure sur une éventuelle élévation du biomarqueur succinate lorsque des sous-unités de l’enzyme SDH, autre que la B, sont touchées par une mutation.
Figure 10: Diagrammes en boîte des concentrations sériques en succinate (µM) en fonction des statuts pathologique et mutationnel

Les boîtes des diagrammes montrent les 25ème et 75ème percentiles, la médiane est indiquée par un trait à l’intérieur de chaque boîte, les moustaches décrivent les minima et les maxima, enfin la présence éventuelle de points indique les valeurs aberrantes au sein d’une strate. Les statistiques ont été effectuées par l’intermédiaire de tests non-paramétriques de Mann-Whitney réalisés sur le nombre de prélèvements disponibles pour chaque strate, plusieurs prélèvements peuvent donc être issus d’un même patient.

c) Le succinate, un oncomarqueur diagnostic des mutations SDH-B

L’analyse ROC (Figure 11) vise à approximer le cut-off ou seuil sérique à partir duquel un patient atteint de PHEO/PGL peut être diagnostiqué biologiquement comme SDH-B muté. Il s’agit ici de réaliser une simulation dans le cadre d’un diagnostic de mutation par l’intermédiaire de l’oncomarqueur succinate. On note que la plupart des PHEO/PGL SDH-B mutés ont des concentrations en succinate supérieures à 7 µM tandis que les autres PHEO/PGL (SPO, SDH-C et SDH-D) ont des concentrations inférieures à 7 µM. La simulation montre que l’oncomarqueur succinate peut s’avérer relativement fiable quant au diagnostic d’une mutation SDH-B. Bien que seule une confirmation génétique, sur deux prélèvements distincts, puisse établir avec certitude un diagnostic de mutation, le succinate pourrait permettre un pré-screening des patients à génotyper et ainsi pallier partiellement les délais d’obtention des résultats de génotypage des PHEO/PGL.
La courbe sensibilité/spécificité ou courbe ROC décrit le seuil pour lequel le compromis sensibilité/spécificité est optimal. Le cut-off « optimal » a été établi par analyse des likelihood ratios associés à chaque valeur de concentration en succinate. L’analyse ROC a été effectuée sur l’ensemble des prélèvements de la cohorte de PHEO/PGL (SPO, SDH-B, SDH-C et SDH-D), soit 16 prélèvements SDH-B pour 21 prélèvements contrôles.

d) Le succinate, un oncomarqueur pronostic chez les patients SDH-B mutés

Comme abordé précédemment le succinate possède un aspect dynamique, la question de l’étude de cet aspect au sein des PHEO/PGL SDH-B mutés s’est donc posée. Nous avons, pour ceci, défini un modèle clinique d’approximation visant à étudier simultanément l’ensemble des résultats de la cohorte. Nous avons donc étudié la réponse clinique des patients traités par Témozolomide par l’intermédiaire de l’imagerie médicale (TEP-scan et scintigraphie osseuse) en fonction des concentrations sériques en succinate. Afin d’apprécier l’impact des statuts évolutifs sur la cinétique du succinate, il était nécessaire de standardiser les variations du succinate au cours du temps chez chaque patient. En effet, une concentration fictive de 30 µM qui au cours du temps décroît jusqu’à 25 µM aura subi une variation de 5 µM qui, bien qu’important, ne représente qu’une variation de 17% de la concentration initiale de 30 µM. Si l’on imagine un second cas fictif avec une concentration initiale de 6 µM qui au cours du temps décroît à 1 µM, la variation est identique pourtant celle-ci représente 83 % de la concentration initiale. D’où la nécessité d’utiliser un outil mathématique visant à standardiser les variations des concentrations en succinate. Nous avons pour cela utilisé le % de variation (%V), son calcul est illustré en Figure 12. Chaque pourcentage de variation reflète la variation d’une concentration (Cₙ) vers une autre (Cₙ₊₁).

Pour un patient disposant de 7 prélèvements, 6 pourcentages de variation (%V) sont donc
disponibles selon la logique du calcul des intervalles tel que : n (%V) = n-1 (prélèvement). Un pourcentage de variation négatif traduit une diminution de la concentration en succinate tandis qu’un pourcentage de variation positif traduit une élévation de la concentration en succinate.

![Image](image.png)

**Figure 12: Exemple de calcul des pourcentages de variation**

C : Concentration en succinate (µM) ; %V : Pourcentage de variation.

La cinétique représentée est celle d’un patient atteint de PHEO/PGL muté sporadiquement.

Il a été associé à chaque pourcentage de variation un statut évolutif par l’intermédiaire de l’imagerie : pathologie stable (SD), pathologie en réponse partielle (PRes) ou pathologie en progression (PD). Les statuts SD et PRes ont été regroupés sous l’item réponse au Témozolomide (TMZ+), tandis que le statut PD a été inclut dans l’item non-réponse au Témozolomide (TMZ-). Chaque patient atteint de PHEO/PGL *SDH-B* mutés et traités par Témozolomide a donc été analysés selon la méthodologie présentée.

L’exploration de la cinétique de l’oncomarque succinate chez les patients *SDH-B* mutés atteints de PHEO/PGL (Figure 13) montre une tendance à l’augmentation des concentrations en succinate lors d’une non-réponse au Témozolomide. On observe, à contrario, une diminution des concentrations lors d’une réponse. Ces résultats, bien que statistiquement inexploitables, sont encourageants puisqu’ils vont dans le sens d’une étude récente qui avait soulevé la possibilité d’une efficacité du Témozolomide dans la prise en charge de certains PHEO/PGL *SDH-B* mutés (6). Les résultats présentés ne peuvent expliquer pour quelle raison physiopathologique certains PHEO/PGL *SDH-B* mutés répondent au Témozolomide mais ils pourraient indiquer un impact direct ou indirect de la thérapeutique sur le déficit enzymatique SDH (tendance à la normalisation des concentrations en succinate). Afin de vérifier ces
hypothèses, il serait nécessaire d’une part d’augmenter la taille de notre échantillon SDH-B traités par TMZ et d’autre part de réaliser une étude similaire impliquant d’autres thérapeutiques. Bien que le mécanisme pharmacologique du TMZ sur les tumeurs SDH-B puisse ne pas cibler directement l’enzyme SDH, l’oncomarqueur succinate pourrait être un marqueur de suivi thérapeutique de ces PHEO/PGL et pourrait potentiellement permettre d’estimer de manière précoce, à l’instar du HGA avec les mutations IDH, la réponse à une thérapeutique curative.

Aucun élément en faveur d’une réponse au Témozolomide chez les patients dont l’expression fonctionnelle de la mutation SDH-B serait particulièrement marquée n’a en revanche été retrouvé. Une concentration initiale en succinate élevée ne semble pas présager d’une réponse au traitement.

**Figure 13: Pourcentages de variation des concentrations en succinate en fonction de la réponse au Témozolomide chez les patients SDH-B mutés atteints de PHEO/PGL**

Les carrés de couleur représentent la moyenne des pourcentages de variations tandis que les barres représentent l’erreur type des moyennes ou SEM (Standard Error of the Mean).
3) **Oncomarqueurs du cycle de Krebs et perspectives**

Le suivi sérique des mutations SDH s’inscrit dans un contexte plus large qui vise à étudier le métabolome du cycle de Krebs dans son ensemble. Il apparaît ainsi intéressant de mettre en relation l’ensemble des données dont nous disposons, concernant à la fois les mutations de l’enzyme SDH mais aussi les mutations de l’enzyme IDH. Les mutations des enzymes du cycle de Krebs ne semblent pas déstabiliser ce dernier. En effet les patients IDH-2 mutés possédant des concentrations élevées en hydroxyglutarate ne montraient pas d’élévation conséquente des concentrations en succinate. De même, les mutés SDH-B présentant des concentrations élevées en succinate ne semblent pas montrer d’élévation particulière des concentrations en hydroxyglutarate (Figure 14). L’absence d’élévation du succinate dans le cadre d’une mutation IDH-2 serait un argument en faveur de la spécificité de l’oncomarqueur succinate vis-à-vis des mutations SDH-B. Nous ne pouvons cependant que formuler des hypothèses, certaines concentrations en hydroxyglutarate étant en dessous de notre seuil de détection.

**Figure 14: Diagrammes en boîte : comparaison des concentrations sériques en hydroxyglutarate et en succinate en fonction des mutations du cycle de Krebs**

Les boîtes des diagrammes montrent les 25ème et 75ème percentiles, la médiane est indiquée par un trait à l’intérieur de chaque boîte, les moustaches décrivent les minima et les maxima. Une valeur aberrante a été exclue du graphique pour des raisons visuelles : il s’agissait d’un patient IDH-2 dont la concentration en HGA s’élevait à 204,92 µM. Les statistiques ont été effectuées par l’intermédiaire de tests non-paramétriques de Mann-Whitney réalisés sur le nombre de prélèvements disponibles pour chaque strate, plusieurs prélèvements peuvent donc être issus d’un même patient.

Le dosage en simultané, et au sein d’un même prélèvement, de l’hydroxyglutarate et du succinate permet d’employer des calculs statistiques de corrélation afin de mesurer l’impact de l’élévation d’un métabolite sur l’autre (Tableau 5). Bien que le cycle de Krebs ne semble
pas, dans son ensemble, déséquilibré par la mutation d’une de ses enzymes, il semblerait que l’élévation d’un des métabolites du cycle puisse intervenir sur d’autres métabolites de ce même cycle. Les tests de corrélation effectués permettent de dégager trois pistes principales. Il pourrait exister chez les patients SDH-B une corrélation entre l’élévation des concentrations en succinate et l’élévation des concentrations en hydroxyglutarate, l’élévation du succinate pourrait induire une élévation de l’hydroxyglutarate. De même chez les patients IDH-2, l’augmentation de la concentration en hydroxyglutarate pourrait induire une élévation de la concentration en succinate. Il semblerait en revanche que les mécanismes régulant le cycle de Krebs dépendent du déficit enzymatique (IDH ou SDH) car lorsque nous poolons les données issues des patients SDH-B mutés avec celles issues des patients IDH-2 mutés aucune corrélation n’est retrouvée. Les résultats présentés doivent être soumis à caution, il ne s’agit là que d’hypothèses s’appuyant sur des statistiques.

L’interprétation globale des dosages du succinate et de l’hydroxyglutarate au sein des patients SDH-B mutés et IDH-2 mutés tend à montrer que le cycle de Krebs pourrait prévenir son déséquilibre par l’intermédiaire de divers mécanismes qui semblent dépendre du type de déséquilibre enzymatique. Ces mécanismes impliquent probablement les enzymes du cycle de Krebs dont certaines peuvent catalyser des réactions réversibles.

**Tableau 5: Récapitulatif des calculs visant à établir une corrélation entre les biomarqueurs succinate et hydroxyglutarate**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Test de normalité (D’Agostino - Pearson)</th>
<th>Patients SDH-B</th>
<th>Patients IDH-2</th>
<th>Patients SDH-B et IDH-2</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Négatif</td>
<td>Positif</td>
<td>Négatif</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Test de corrélation Succinate - HGA</th>
<th>Patients SDH-B</th>
<th>Patients IDH-2</th>
<th>Patients SDH-B et IDH-2</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Corrélation non-paramétrique de Spearman</td>
<td>Coefficient de corrélation de Pearson</td>
<td>Coefficient de corrélation de Spearman</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,0015</td>
<td>0,0403</td>
<td>0,6260</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Résumé de la Valeur p</th>
<th>Patients SDH-B</th>
<th>Patients IDH-2</th>
<th>Patients SDH-B et IDH-2</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>☆☆</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>0,7412</td>
<td>0,7286</td>
<td>0,1048</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Conclusion</th>
<th>Patients SDH-B</th>
<th>Patients IDH-2</th>
<th>Patients SDH-B et IDH-2</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Corrélation</td>
<td></td>
<td></td>
<td>Absence de Corrélation</td>
</tr>
</tbody>
</table>

La normalité des groupes d’échantillons a été testée afin de choisir le type de test corrélation à appliquer. Le coefficient de corrélation compris entre 0 et 1 indique que deux variables tendent à croître et à décroître ensemble, plus r est proche de 1 et plus la corrélation est forte. La valeur P indique, lorsqu’elle est inférieure ou égale à 0,05, que l’hypothèse selon laquelle la corrélation est le fruit du hasard peut être rejetée. Lorsque la valeur P est inférieure ou égale à 0,05, il existe trois explications :

- un changement de la variable X induit un changement de la variable Y ;
- un changement de la variable Y induit un changement de la variable X ;
- le changement d’une tierce variable induit un changement des variables X et Y.

Les statistiques ont été réalisées sur 24 prélèvements issus de 17 patients, la corrélation porte sur 24 résultats de dosage du métabolite hydroxyglutarate (µM) et sur 24 résultats de succinate (µM).
Nous n’avons pas pu conclure sur l’utilité du fumarate en tant que biomarqueur SDH, il est donc apparu inutile de tenter de corrêler ce dernier avec les autres métabolites du cycle de Krebs dosés au niveau sérique. L’un des écueils de la présente étude est la limite de quantification, il n’est pas exclu que la méthode de dosage du fumarate et de l’hydroxyglutarate ait pu interférer avec les résultats. Ceux relatifs au fumarate et à l’hydroxyglutarate, devront donc être corroborés par l’intermédiaire d’une méthode de dosage plus sensible permettant de quantifier précisément les taux sériques en dessous des 1 µM. Le biomarqueur succinate apparaît en revanche prometteur, ses concentrations sériques étant plus élevées que les deux autres métabolites précités, tous les résultats du succinate ont pu être validés analytiquement. Il reste néanmoins indispensable de s’affranchir des limites statistiques rencontrées en augmentant la taille de notre échantillon par l’intermédiaire d’une collecte prospective de prélèvements. Les résultats obtenus pour le succinate permettent, toutefois, de formuler des hypothèses non négligeables compte tenu de la faible incidence des phéochromocytomes et paragangliomes. Les données colligées relatives au succinate vont dans le sens de l’étude de Richter et al (16) qui a notamment permis de montrer une élévation des concentrations en Succinate au sein tumeurs SDH mutés. Il serait ainsi intéressant de corrêler les taux tumoraux et les taux sériques dans le cadre d’une étude clinique prospective.

Une autre perspective envisageable dans le cadre de la méthode de dosage développée est l’exploration de cancers tels que les fibromes utérins, les léiomyomes et les carcinomes papillaires à cellules rénales pouvant impliquer des mutations de la Fumarate Hydratase (11), une autre enzyme du cycle de Krebs. Nous formulons l’hypothèse que de telles mutations pourraient, à l’instar du succinate et des mutations SDH-B, induire une élévation de la concentration sérique du fumarate par défaut de conversion de ce dernier en malate.
I) Analyse stratégique

1) Contexte

Les avancées scientifiques en termes de biologie moléculaire ont permis l’essor du génotypage et ont révolutionné l’approche de certaines pathologies, parmi ces pathologies figurent les phéochromocytomes et paragangliomes. C’est en effet au début des années 2000 que les premières mutations des gènes SDH-x furent décrites. Elles permirent de mettre à jour la part d’hérédité liée aux PHEO/PGL (25). Il existe trois techniques principales permettant d’explorer les PHEO/PGL SDH mutés, le génotypage qui donne une information sur les gènes codant pour l’enzyme SDH, l’immunohistochimie qui donne une information sur les sous-unités protéiques de l’enzyme SDH et enfin le dosage du substrat et du produit de l’enzyme SDH qui donne une information sur son activité enzymatique. C’est dans ce contexte qu’il apparaît judicieux de définir les perspectives d’avenir de la méthode de dosage de biomarqueurs que nous avons mis au point, nous utilisons pour ce faire une matrice SWOT dont l’intérêt est ici de dégager les contextes dans lesquels le dosage de ces biomarqueurs pourrait être utilisé. Nous ne pouvons aborder ici précisément l’intérêt diagnostic ou pronostic des biomarqueurs dosés étant donné le faible recul scientifique dont nous disposons. Cette analyse est menée afin de dégager l’intérêt de nos dosages pour les patients, nous ne traiterons donc pas des aspects économiques connexes dans cette partie.

2) Analyse par matrice SWOT

a) Diagnostic interne : Dosage des biomarqueurs succinate et fumarate

Forces :

- Le dosage de biomarqueurs est réalisé sur des prélèvements sanguins, aucune chirurgie n’est nécessaire, le prélèvement est donc peu contraignant.
- La prise d’essai utilisée dans le cadre du dosage est relativement faible, seul 100 à 200 µL de sérum sont mis en jeu dans le cadre de ce dosage.
- Les biomarqueurs circulants évoluent en même temps que les pathologies. Nos biomarqueurs sont à priori issus de sécrétions tumurales (ex : en cas d’exérèse de la tumeur les concentrations en biomarqueur devraient donc diminuer).

36
• Le dosage peut être adapté à d’autres type de prélèvements, notamment le prélèvement de tissus tumoraux (16) mais aussi aux milieux de culture cellulaire (élaboration de modèles intracellulaires de pharmacologie préclinique permettant l’évaluation de nouvelles thérapeutiques).

Faiblesses :
• La technique de dosage nécessite des compétences et un appareillage spécifique, le dosage sur sérum n’est disponible, à notre connaissance, qu’au sein de Gustave Roussy.

b) Diagnostic externe : Environnement scientifique et hospitalier

Opportunités :
• Au sein des hôpitaux spécialisés comme Gustave Roussy, le prélèvement de sérums dans le but de doser des oncomarqueurs est fréquent et standardisé en raison de nombreux protocoles d’essais cliniques. La collecte et la gestion des prélèvements sont réalisés par un centre de ressource biologique (CRB) dans le but, notamment, de faciliter les recherches rétrospectives d’échantillons.
• Les circuits d’acheminement des prélèvements entre hôpitaux français sont particulièrement développés et respectent scrupuleusement la chaîne du froid.
• L’exérèse chirurgicale des PHEO/PGL est très complexe en raison d’une hypervascularisation des tumeurs, les taux de mortalité péri-opératoire sont de 3% (26).
• Les patients SDH mutés ont globalement une maladie qui débute plus tôt, moins de 35 ans (27), ainsi qu’une médiane de survie plus faible, 42 mois à compter du diagnostic de la première métastase (28), comparés aux patients non mutés. Le génotypage n’est cependant pas systématisé, il s’agit d’une décision qui revient au clinicien. Cette dernière est influencée par le jeune âge au diagnostic, l’histoire familiale, la multiplicité des tumeurs et leur malignité. Toutefois parmi les patients ne présentant aucun de ces critères, une mutation SDH a été identifiée dans 16% des cas (27).
• L’une des hypothèses physiopathologiques évoquées dans l’apparition de PHEO/PGL chez les mutés SDH-x est l’inhibition de facteurs apoptotiques par le succinate (29).
Menaces :

- Les laboratoires d’analyse traditionnels ne disposent pas de l’appareillage et des compétences nécessaires afin de réaliser le dosage. Ceci peut freiner le développement de la technique et limiter le transfert en routine.
- Les techniques d’immunohistochimie permettent d’explorer, au sein de matériels tumoraux, l’expression des sous-unités protéiques de l’enzyme SDH (30) et pourraient donc être transférées, dans un avenir proche, en routine dans les laboratoires d’anatomie pathologique et concurrencer de ce fait notre dosage.
- D’autres biomarqueurs existent déjà en routine clinique et permettent le suivi des PHEO/PGL comme la Chromogranine A (sérum), les normétanéphrines (urine) et les métanéphrines (urine).

c) Perspectives d’avenir :

Forces/Opportunités

La gravité des cancers SDH mutés pourrait s’amenuiser par la détection précoce des mutations, il suffit pour ce faire de quelques prélèvements prescrits à des moments définis. Les informations obtenues ne nécessiteraient pas d’exérèse tumorale et pourraient permettre l’optimisation du suivi, notamment via la mise en place d’un screening systématique permettant d’orienter, en cas de positivité, vers un génotypage.

La prise d’essai relativement faible permet de mener des études rétrospectives par l’intermédiaire de prélèvements préexistants puisqu’elle ne représente qu’environ 1/100ème du volume d’un prélèvement standard. Les pathologies étudiées étant rares, le recrutement des patients est concentré dans les centres spécialisés comme Gustave Roussy.

Les hypothèses physiopathologiques ne peuvent être explorées faute de moyens techniques, le dosage sérique du succinate pourrait permettre des avancées dans l’élucidation des mécanismes d’oncogenèse d’autant que les biomarqueurs ont un aspect en général dynamique permettant de refléter l’évolution ou la rémission des pathologies.

Le génotypage n’est pas systématique et certains patients passent ainsi entre les mailles du filet sans être diagnostiqués en tant que SDH mutés. La connaissance d’une mutation permet au conseil génétique d’étendre les consultations à la famille du patient et favorise ainsi le diagnostic précoce des PHEO/PGL héréditaires. Le dosage serait un outil de screening.
supplémentaire pour les cliniciens, leur permettant ainsi d’affiner la décision de génotypage ou non génotypage de leurs patients.

**Faiblesses/Opportunités**

Le manque d’informations disponibles sur les biomarqueurs dosés pourrait être solutionné par la conduite d’études rétrospectives menées à partir de prélèvements de sérums préexistants conservés à -80°C.

La technicité du dosage peut être surmontée par l’exploitation du circuit d’acheminement des prélèvements entre hôpitaux. Ceci permettrait à quelques centres de référence de réaliser les dosages pour d’autres hôpitaux et de renforcer ainsi la validation et la standardisation de l’analyse.

**Forces/Menaces**

Les biomarqueurs dont le dosage est disponible en routine (chromogranine A, métanéphrines, normétanéphrines) explorent les PHEO/PGL au sens large mais ne donnent pas d’informations sur d’éventuelles mutations de l’enzyme SDH, ces biomarqueurs ne sont donc pas en concurrence avec les métabolites explorés dans le cadre de notre étude.

Bien que l’immunohistochimie SDH possède une longueur d’avance celle-ci nécessite d’être réalisée sur des tumeurs dont l’exérèse est particulièrement complexe, le dosage de biomarqueurs établi sur des prélèvements sanguin a donc, à ce titre, un avantage.

**Faiblesses/Menaces**

La technicité du dosage et de son développement implique que seul un nombre limité de laboratoire est en mesure de le réaliser. Néanmoins la technique ne peut être gardée confidentielle car la publication scientifique est une des stratégies de Gustave Roussy permettant à l’établissement de rester sur le devant de la scène internationale et de subventionner ainsi ses recherches futures.
<table>
<thead>
<tr>
<th>Diagnostic interne</th>
<th>Forces</th>
<th>Faiblesses</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>Dosage à partir de prélèvements sanguins: facilité de prélèvement</td>
<td>Peu d'informations disponibles sur les biomarqueurs closés</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Volume ce la prise d'essai faible</td>
<td>La technique nécessite un appareillage et des compétences spécifiques</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Les biomarqueurs circulants sont le reflet dynamique d'une pathologie</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Dosage adaptable à des prélèvements tumoraux</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Diagnostic externe</th>
<th>Opportunités</th>
<th>Perspectives Forces/Opportunités</th>
<th>Perspectives Faiblesses/Opportunités</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>Existence de prélèvements conservés par des centres de ressources biologiques.</td>
<td>Augmenter la médiane de survie des cancers SDH par prélèvement sanguin et dosage de biomarqueurs</td>
<td>Il est nécessaire de combler le manque d'informations en utilisant des études rétrospectives réalisées à partir de prélèvements préexistants</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Circuits François d'acheminement des prélèvements de bonne qualité</td>
<td>Utilisation de prélèvements préexistants car un faible volume suffit</td>
<td>Exploitation du circuit d'acheminement des prélèvements afin de réaliser les dosages dans certains laboratoires possédant l'appareillage et les compétences nécessaires.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>L'exérèse chirurgicale des tumeurs est complexe</td>
<td>Explor les hypothèses physiopathologiques par simple prélèvements sanguins</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Les patients SDH mutés ont des cancers plus tôt et décèdent plus tôt</td>
<td>Améliorer le génotypage des patients en éblant les patients SDH mutés potentiels</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Le génotypage n'est pas systématisé et des patients échappent à celui-ci</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Le succinate est impliqué dans certaines hypothèses physiopathologique</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Menaces</td>
<td>Perspectives Forces-Menaces</td>
<td>Perspectives Faiblesses-Menaces</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>-------------------</td>
<td>-----------------</td>
<td>-----------------</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Les laboratoires d'analyse traditionnels n'ont pas les compétences et l'appareillage nécessaire au dosage</td>
<td>Les biomarqueurs actuellement disponibles ne permettent pas d'explorer l'enzyme SDH, il n'y a donc pas de concurrence</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>La technique d'immunohistochimie s'installe dans le cadre de l'exploration de l'enzyme SDH</td>
<td>Le dosage du succinate ne nécessite pas d'exérèse tumorale contrairement à l'immunohistochimie, ce qui offre de plus grandes perspectives</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Il existe d'autres biomarqueurs de PHED/PGL</td>
<td>La technicité du dosage peut créer une demande plus importante pour les laboratoires en capacité de réaliser cette analyse et permettre une spécialisation de quelques laboratoires tout en améliorant, de ce fait, la validation et la standardisation du dosage.</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
II) **Analyse pharmaco-économique**

L'activité innovante de biologie est habituellement appelée "activité hors nomenclature". Ce caractère "hors nomenclature" signifie que l'assurance maladie n'a pas encore intégré ces actes dans la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM). Depuis le 31 juillet 2015, les actes de biologie hors nomenclature (BHN), auxquels appartient le dosage de cette étude, sont financés dans un premier temps par des crédits gouvernementaux généraux accordés à la recherche puis, dans la mesure où ces actes présentent un bénéfice pour les patients, par la collectivité sur la base de l’activité réelle (31). Afin que perdure un tel dosage, il est donc nécessaire que les coûts et bénéfices qu’il implique soient recensés. Cette analyse pharmaco-économique s’inscrit ainsi dans le cadre de la circulaire ministérielle 39897 datée du 31 juillet 2015 (31).

L'étude économique s'est placée du point de vue de l'hôpital, estimant les coûts réels des dosages. Cette étude se veut exhaustive et comprend donc les coûts directs (matériels, consommables, amortissement des machines, salaires horaire) et les coûts indirects (frais de structure et frais de gestion générale). Certaines des valeurs dégagées se basent sur des hypothèses qui seront détaillées.

Le dosage n’est pour l’heure qu’en phase de recherche et n’est donc pas encore facturé, toutefois si les résultats des patients se montraient concluants l’hôpital serait en mesure de facturer la prestation selon les tarifications en vigueur (31). Le dosage développé nécessite deux salariés, un manipulateur (technicien) et un validateur (pharmacien-biologiste) œuvrant au service de Pharmacologie. Les dosages sont répartis en série, lors d’une série plusieurs dosages sont rendus pour plusieurs échantillons. Une série comprend un coût fixe et des coûts variables dépendants du nombre d’échantillons à doser. Les coûts fixes par série se composent des salaires et de la préparation d’une gamme et de ses contrôles de qualité tandis que les coûts variables sont fonction du nombre de patients à doser lors d’une série.

Les montants, que ce soit en termes de coûts ou de facturation, présentés sont tous hors taxes. En effet, sont exonérés de la TVA les travaux d'analyses de biologie médicale c'est-à-dire, tous les examens biologiques destinés à faciliter la prévention, le diagnostic ou le traitement des maladies humaines, effectués dans les laboratoires qui fonctionnent dans les conditions prévues par les articles L. 6212-1 et suivants du CSP.
Nous définissons tout au long de cette étude pharmaco-économique un coût par série et un coût par échantillon. Le coût par série est lié à l’injection de 9 points de gamme et de 5 CQs injectés à deux reprises (cf. 1) Méthode analytique développée). Soit 19 injections, indispensables au dosage, mais indépendantes du nombre d’échantillon à doser.

1) Coûts directs :

Matériels

Le matériel utilisé n’est pas spécifique au dosage (ex : pipettes) et est d’ores et déjà amorti par le service. Il existe toutefois une exception à cette affirmation : la colonne chromatographique et ses précolonnes. Celles-ci ne peuvent être soumises à un amortissement classique étant donné leur longévité. La pratique et les recommandations du constructeur nous ont permis d’estimer que la durée de vie d’une colonne et de ses 3 précolonnes avant détérioration était de 5000 injections.

Tableau 7: Montant de l'usure de la colonne chromatographique

<table>
<thead>
<tr>
<th>Prix d'achat (€)</th>
<th>Nombre d'injections avant détérioration</th>
<th>Montant de l'usure par injection (€)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Colonne UPLC + 3 précolonnes</td>
<td>1307</td>
<td>5000</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Étant donné le faible montant de l’usure par injection nous avons donc choisi de reporter l’usure de la colonne dans la partie « Consommables » de notre étude.

Consommables

Le Tableau 8 présente la liste des consommables ainsi que leurs prix, nous ne détaillerons pas les calculs réalisés étant donné le protocole complexe suivi. Les calculs vont toutefois de la consommation des poudres mères permettant la réalisation de la gamme et des contrôles de qualité jusqu’à la consommation des phases mobiles et des solutions de rinçage de l’appareillage UPLC-MS/MS (fonction du débit et des pourcentages relatifs de chaque phase). Certains consommables n’apparaissent pas étant donné leur non spécificité vis-à-vis du dosage et leur haute fréquence d’utilisation quelle que soit la production du service. Nous avons choisis de les incorporer dans les frais de structure (c’est notamment le cas des embouts de pipette). Les prix indiqués sont les prix catalogues et les prix après négociation (rabais fournisseur de 20 à 90%).
### Tableau 8: Liste des consommables, prix à l’unité et totaux

<table>
<thead>
<tr>
<th>Eléments</th>
<th>Fournisseurs</th>
<th>Prix négociés (€)</th>
<th>Prix catalogues (€)</th>
<th>/ unité</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>isopropanol</td>
<td>Fluka Analytical</td>
<td>0,029</td>
<td>0,036</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>acétonitrile</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>0,011</td>
<td>0,108</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>eau LC-MS/MS</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>0,003</td>
<td>0,030</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>pyridine</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>0,148</td>
<td>0,185</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>acide chlorhydrique à 37%</td>
<td>AnalaR NORMAPUR</td>
<td>0,017</td>
<td>0,021</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>méthanol</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>0,019</td>
<td>0,023</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>acide formique</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>1,968</td>
<td>2,460</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>methyl-tert-butyl éther</td>
<td>Fluka Analytical</td>
<td>0,048</td>
<td>0,060</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>acétate d’ammonium</td>
<td>Fluka Analytical</td>
<td>0,003</td>
<td>0,003</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>fumarate</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>0,001</td>
<td>0,001</td>
<td>/mg</td>
</tr>
<tr>
<td>succinate</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>0,002</td>
<td>0,003</td>
<td>/mg</td>
</tr>
<tr>
<td>L-hydroxyglutarate</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>2,912</td>
<td>3,640</td>
<td>/mg</td>
</tr>
<tr>
<td>isotope fumarate</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>5,816</td>
<td>7,270</td>
<td>/mg</td>
</tr>
<tr>
<td>isotope succinate</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>4,288</td>
<td>5,360</td>
<td>/mg</td>
</tr>
<tr>
<td>isotope HGA</td>
<td>Cambridge Isotope Laboratories</td>
<td>6,320</td>
<td>7,900</td>
<td>/mg</td>
</tr>
<tr>
<td>O-benzylhydroxylamine</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>0,005</td>
<td>0,007</td>
<td>/mg</td>
</tr>
<tr>
<td>réactif EDC</td>
<td>Sigma Aldrich</td>
<td>6,944</td>
<td>8,680</td>
<td>/mL</td>
</tr>
<tr>
<td>tube 4 mL</td>
<td>VWR</td>
<td>0,336</td>
<td>0,336</td>
<td>/tube</td>
</tr>
<tr>
<td>cartouches SPE</td>
<td>Phenomenex</td>
<td>1,617</td>
<td>1,617</td>
<td>/cartouche</td>
</tr>
<tr>
<td>vials 200µL + Bouchons</td>
<td>Macherey Nagel</td>
<td>0,185</td>
<td>0,185</td>
<td>/vial</td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>Fixe : Coût Total consommables par série de dosage</th>
<th>Négocié</th>
<th>Catalogue</th>
<th>Rabais global</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>80,76 €</td>
<td>126,40 €</td>
<td>36 %</td>
</tr>
</tbody>
</table>

| Variable : Coût Total consommables par échantillon | 4,38 € | 5,06 € | 13 % |

### Machines

Nous utilisons ici un amortissement linéaire, les machines déjà amorties par le service ne sont pas prise en compte (ex : centrifugeuse).

### Tableau 9: Amortissement annuel des machines

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>Prix d'achat (€)</th>
<th>Date d'achat</th>
<th>Durée amortissement (an)</th>
<th>Amortissement Annuel (€)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>SpeedVac</td>
<td>15 000</td>
<td>2012</td>
<td>7</td>
<td>2 143</td>
</tr>
<tr>
<td>LC-MS/MS + maintenance</td>
<td>400 000</td>
<td>2011</td>
<td>7</td>
<td>57 143</td>
</tr>
</tbody>
</table>

|                |                |              |                          | 59 286                   |
Nous ne pouvons prédire le nombre de patients pour lesquels nous aurons à réaliser notre dosage qui n’en est pour l’heure qu’en phase de recherche. Afin de rapporter l’amortissement des machines à un montant par injection, nous avons choisi d’approximer selon le calcul suivant, basé sur un dosage similaire à celui développé. Il nous est en effet impossible de connaître précisément le nombre d’injections et évaporations réalisés avec l’appareillage LC-MS/MS et l’appareillage Speedvac® (part recherche + part dosage de routine).

Le dosage utilisé pour l’approximation est le dosage du HGA, en moyenne 30 patients sont dosés par semaine (une série de dosage/semaine), le nombre de jours travaillés par le personnel est de 249/an (lors des congés annuels au moins un membre de chaque catégorie professionnelle est présent). La réalisation d’un dosage monopolise l’appareillage durant une journée. Ceci nous donne le calcul suivant :

$$\text{Amortissement annuel} = \frac{\text{Amortissement annuel} \times \text{Fréquence d’occupation de la machine pour HGA}}{\text{Nombre de dosage LC-MS/MS} \times \text{Nombre de dosage HGA annuel}}$$

Concernant le coût lié aux machines, chaque point injecté coûte 5,29 €.

Nous avons ici deux types de coût :

**Variable :** Coût des machines par échantillon :  5,29 €

**Fixe :** Coût des machines par série de dosage :  100,53 € (19 injections hors échantillons)

**Salaires :**

**Tableau 10: Coût salarial du dosage pour l’établissement**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Catégorie de personnel</th>
<th>Coût salarial horaire 2015 (€)</th>
<th>Temps passé pour 1 dosage (h)</th>
<th>Coût pour une série (€)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Technicien de laboratoire</td>
<td>32,8</td>
<td>5</td>
<td>164,0</td>
</tr>
<tr>
<td>Pharmacien</td>
<td>99,4</td>
<td>1,5</td>
<td>149,2</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td>313,2</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Nous approximons ici le coût salarial, en effet nous ne tenons pas compte du temps de travail dévolu au dosage de chaque échantillon, celui-ci étant lissé dans le calcul du temps passé pour la réalisation de l’ensemble du dosage (gamme de calibration et contrôles de qualité).

2) Coûts indirects :

Le coût indirect représente la part du coût total d’un dosage lié aux frais de structure et de gestion générale. Il est défini par rapport au coût direct. D’après la comptabilité analytique de Gustave Roussy, la part de ces frais indirects s’élève à 33% de l’ensemble des dépenses (soit 33% du coût direct).

3) Récapitulatif des coûts :

Tableau 11: Récapitulatif des coûts liés au dosage

<table>
<thead>
<tr>
<th>Consommables (tubes, cartouches, solvants…etc)</th>
<th></th>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Coût total négocié par série de dosage (€)</td>
<td>80,76</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Coût total négocié par échantillon (€)</td>
<td>4,38</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Machines (LC-MS/MS + Speedvac®)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Coût total par série de dosage (€)</td>
<td>100,53</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Coût total par échantillon (€)</td>
<td>5,29</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Salaires</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Coût total par série de dosage (€)</td>
<td>313,16</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Coût indirect (frais de structure + frais de gestion générale)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Coût total par série de dosage (€)</td>
<td>163,17</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Coût total par échantillon (€)</td>
<td>3,19</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Total par série de dosage (€)</td>
<td>657,62</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Total par échantillon (€)</td>
<td>12,86</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
La Figure 15 montre que la majeure partie des coûts du dosage sont liés aux salaires ainsi qu’aux frais de structure et de gestion générale.

![Figure 15: Répartition des coûts fixes liés au dosage](image)

4) Facturation :

La facturation du dosage dépend de la cotation de l’acte correspondant au référentiel NABM (Nomenclature des Actes de Biologie Médicale). Nous cotons l’acte en BHN300, le BHN hors taxe vaut 0,27 centimes d’euros, 300 est le coefficient multiplicatif. Soit un dosage facturé 81 euros par patient.

5) Analyse des coûts et bénéfices :

Nous avons exprimés les coûts fixes ainsi que le coût par échantillon de notre dosage, ceci permet d’obtenir l’équation de droite suivante : \( y = 13x + 658 \) où \( x \) est le nombre d’échantillon par série de dosage, 658 le coût fixe par série et 13 le coût du dosage par échantillon (Tableau 11). L’équation affine se base sur les coûts après négociation. De cette équation découle la Figure 16 présentant les coûts et bénéfices liés au dosage SDH et au nombre d’échantillons dosés par série. Nous remarquons ainsi que le dosage génère un bénéfice pour Gustave Roussy à partir de 10 patients par série de dosage. Une série de dosage composée de 30 patients produit un bénéfice de 1387 € hors taxe pour Gustave Roussy.
Figure 16: Analyse coût-bénéfice dans le cadre du dosage SDH

$\text{Prix} = f(\text{nombre d'échantillons par série de dosage})$
CONCLUSION

Le développement de méthode analytique en spectrométrie de masse en tandem a permis d’obtenir une méthode validée (21,22) de dosage en simultané de trois biomarqueurs issus du cycle de Krebs : le succinate, le 2-hydroxyglutarate et le fumarate (Tableau 4). La confrontation de ces oncomarqueurs candidats au contexte médical, via les dosages sériques de patients, a soulevé des limites. Parmi ces dernières figurent les faibles concentrations retrouvées en fumarate, celles-ci sont inférieures aux limites de quantification de la méthode et ne nous permettent donc pas d’exploiter pleinement les résultats, notamment s’agissant du ratio décrit dans la littérature (16).

Les échantillons sériques analysés (n=52), provenant de 11 patients atteints de phéochromocytomes et/ou de paragangliomes mutés pour SDH ainsi que de 7 patients atteints de phéochromocytomes et/ou de paragangliomes de formes sporadiques, tendent à montrer l’intérêt du biomarqueur sérique succinate chez les patients SDH-B mutés comparativement aux données de 15 patients « sains ». Les concentrations sériques en succinate sont en effet significativement supérieures chez les patients SDH-B mutés comparées aux concentrations des patients présentant des formes sporadiques (Figure 10). Ces résultats sont en adéquation avec l’étude de Richter réalisée sur du matériel tumoral (16). Ils pourraient conduire, s’ils étaient confortés par une étude de plus grande ampleur, à l’utilisation du succinate sérique en tant qu’oncomarqueur des phéochromocytomes et/ou paragangliomes SDH-B mutés en permettant, notamment, un pré-screening des patients à génotyper. En effet, certains patients SDH-B mutés échappent au génotypage en raison d’une présentation clinique atypique (4), or ces patients ont un risque de malignité élevée (27).

Une variabilité intra-individuelle des concentrations en succinate a également été constatée et mérite d’être explorée. Elle pourrait être liée à l’évolution des phéochromocytomes et paragangliomes comme le suggère notre étude préliminaire (Figure 13). Ceci serait une perspective intéressante dans le cadre du suivi des patients présentant des mutations héréditaires de type SDH-B mais aussi dans le cadre du suivi des familles des patients en permettant potentiellement la détection d’une dysfonction métabolique de manière précoce. Le suivi dynamique des PHEO/PGL serait un pas vers une médecine de précision des cancers SDH mutés et permettrait d’envisager une extension de ce biomarqueur à d’autres formes de cancers SDH mutés tels que les carcinomes à cellules rénales et les tumeurs stromales gastro-intestinales.
Enfin, l’étude pharmaco-économique a montré les coûts mis en jeu par le dosage sérique du succinate. Ce dernier pourrait, si les résultats cliniques exposés tendaient à être confortés, devenir un acte biologique de routine pour les laboratoires disposant des infrastructures adéquates dans le contexte de la modification du financement des actes innovants de biologie médicale (31).
ANNEXE : Épidémiologie des cancers SDH mutés

Incidence générale des pathologies pouvant impliquer une mutation SDH

<table>
<thead>
<tr>
<th>Pathologies</th>
<th>Incidence Nombre de nouveaux cas/100 000 personnes/an</th>
<th>Localité de l'incidence</th>
<th>Sources</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Paragangliomes, Phéochromocytomes</td>
<td>1</td>
<td>États-Unis</td>
<td>Bravo et al (2)</td>
</tr>
<tr>
<td>Tumeurs stromales gastro-intestinales</td>
<td>0,85 à 1</td>
<td>France</td>
<td>Monges et al (32)</td>
</tr>
<tr>
<td>Carcinomes à cellules rénales</td>
<td>15,4</td>
<td>France</td>
<td>Guide HAS (7)</td>
</tr>
<tr>
<td>Adénomes hypophysaires</td>
<td>1,4</td>
<td>États-Unis</td>
<td>Loiseau et al (33)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Nombre de nouveaux cas par an rapporté à la population Française des pathologies pouvant impliquer une mutation SDH

<table>
<thead>
<tr>
<th>Pathologies</th>
<th>Incidence Nombre de nouveaux cas/100 000 personnes/an</th>
<th>Nombre de nouveaux cas/an en France</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Paragangliomes, Phéochromocytomes</td>
<td>1</td>
<td>658</td>
</tr>
<tr>
<td>Tumeurs stromales gastro-intestinales</td>
<td>0,85 à 1</td>
<td>559</td>
</tr>
<tr>
<td>Carcinomes à cellules rénales</td>
<td>15,4</td>
<td>10 123</td>
</tr>
<tr>
<td>Adénomes hypophysaires</td>
<td>1,4</td>
<td>902</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Estimation du nombre annuel de nouveaux cas mutés SDH en France par pathologies

<table>
<thead>
<tr>
<th>Pathologies</th>
<th>Nombre de nouveaux cas/an en France</th>
<th>Proportion SDH</th>
<th>Mutation SDH majoritaire</th>
<th>Sources</th>
<th>Nombre de cas SDH/an en France</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Paragangliomes, Phéochromocytomes</td>
<td>658</td>
<td>10,0 %</td>
<td>SDH-B</td>
<td>Orphanet (5)</td>
<td>66</td>
</tr>
<tr>
<td>Tumeurs stromales gastro-intestinales</td>
<td>559</td>
<td>1,9 %</td>
<td>SDH-B</td>
<td>Miettinen et al (34)</td>
<td>42</td>
</tr>
<tr>
<td>Carcinomes à cellules rénales</td>
<td>10 123</td>
<td>4,4 %</td>
<td>SDH-B</td>
<td>Ricketts et al (8)</td>
<td>445</td>
</tr>
<tr>
<td>Adénomes hypophysaires</td>
<td>902</td>
<td>0,3 %</td>
<td>SDH-B/SDH-A</td>
<td>Gill et al (35)</td>
<td>3</td>
</tr>
</tbody>
</table>


ABSTRACT

Title:

EXPLORATION OF SERUM BIOMARKERS FROM KREBS CYCLE IN A PHEOCHROMOCYTOMA AND PARAGANGLIOMA SUCCINATE DEHYDROGENASE MUTATED CONTEXT

Mutations in genes encoding the enzymatic subunits of the Succinate Dehydrogenase (SDH) are involved in the appearance of pheochromocytomas and/or paragangliomas presenting a high risk of malignancy. In this preliminary study, we explore serum biomarkers from Krebs cycle that may indicate a mutation in genes encoding the SDH enzyme.

In this context, we report a validated tandem mass spectrometric method that allows the simultaneous determination of three serum biomarkers from citric acid cycle: succinic acid, fumaric acid and 2-hydroxyglutaric acid. We include with our analytical method a pharmaco-economic study identifying the costs and benefits of such an assay.

Serum samples (n=52) from 11 patients with PHEO/PGL SDH mutated, 7 patients with sporadic forms of PHEO/PGL and from 15 cancer-free control patients were analyzed. Data may suggest an interest of the succinate biomarker in patients with SDH-B subunit mutation of the SDH enzyme. Indeed, succinate serum concentrations of SDH-B mutated patients were significantly higher than concentrations of patients with sporadic forms and than concentrations of control patients.

Keywords: tandem mass spectrometry, succinic acid, fumaric acid, biomarkers, Succinate Dehydrogenase (SDH), Temozolomide, paraganglioma, pheochromocytoma
BAILLEUX Dorian

EXPLORATION SÉRIQUE DE BIOMARQUEURS ISSUS DU CYCLE DE KREBS DANS LE CADRE DE PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES SUCCINATE DÉSHYDROGÉNASE MUTÉS

Thèse pour le diplôme d’état de docteur en pharmacie
Université de Picardie Jules Verne
2015-2016

Mots clefs : spectrométrie de masse en tandem, succinate, fumarate, biomarqueurs, Succinate Déshydrogénase (SDH), Témozolomide, paragangliomes, phéochromocytomes

RÉSUMÉ

Les mutations des gènes codant pour les sous-unités enzymatiques de la Succinate Déshydrogénase (SDH) sont impliquées dans l’apparition de phéochromocytomes (PHEO) et paragangliomes (PGL) présentant un risque de malignité élevé. Nous explorons, dans le cadre de cette étude préliminaire, des biomarqueurs sériques issus du cycle de Krebs pouvant traduire la présence d’une mutation au sein des gènes codant pour l’enzyme SDH.

Dans ce contexte, nous rapportons une méthode validée de spectrométrie de masse en tandem permettant le dosage sérique en simultané de trois biomarqueurs du cycle de Krebs : le succinate, le fumarate et le 2-hydroxyglutarate. À la méthode analytique se joint une étude pharmaco-économique recensant les coûts et bénéfices d’un tel dosage.

Les échantillons sériques analysés (n=52) , provenant de 11 patients atteints de PHEO/PGL mutés pour SDH ainsi que de 7 patients atteints de PHEO/PGL de formes sporadiques et de 15 patients contrôles indemnes de cancer, tendent à montrer l’intérêt du biomarqueur sérique succinate chez les patients dont la sous-unité SDH-B de l’enzyme SDH est mutée. En effet, les concentrations sériques en succinate, des patients SDH-B mutés, sont significativement supérieures aux concentrations des patients présentant des formes sporadiques et aux concentrations des patients contrôles.