UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2020

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Validation d'une méthode de dosage simultané du succinate et du fumarate en dilution isotopique, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Application aux phéochromocytomes et aux paragangliomes héréditaires *SDHx*

Présentée et soutenue publiquement le 8 Décembre 2020 à 18h00
Au Pôle Recherche

Par Léo-Paul BANCEL

_____

JURY

Président :
Monsieur le Professeur Pascal PIGNY
Assesseurs :
Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU
Madame le Docteur Catherine CARDOT-BAUTERS
Madame le Docteur Lucie COPPIN
Directeur de thèse :
Madame le Docteur Anne-Frédérique DESSEIN

Laboratoire de Biochimie – UF Métabolisme Général et Maladies rares

_____

Table des matières

TABLE DES MATIERES **3**

TABLE DES ABREVIATIONS **5**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **7**

INTRODUCTION **9**

ÉPIDEMIOLOGIE 10

DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE 11

Classification *11*

Diagnostic biochimique *11*

Imagerie *12*

Traitement *13*

Suivi *14*

GENETIQUE 15

LES PHEOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES *SDHx*. 17

MECANISMES ONCOGENETIQUES 18

La succinate déshydrogénase (SDH) *18*

Structure 18

Régulation 20

Assemblage 20

SDH, HIF et tumorigenèse *21*

Structure des HIF 21

Régulation des HIF 21

HIF et oncogenèse 23

HIF et SDH 26

Autres mécanismes oncogéniques liés à un défaut d'activité de la SDH 27

OBJECTIF DU TRAVAIL **29**

MATERIELS ET METHODES **31**

PRINCIPES METHODOLOGIQUES 31

Dilution isotopique *31*

Chromatographie en phase gazeuse *32*

Spectrométrie de masse *32*

APPAREILLAGE ET PRINCIPE D'ANALYSE 33

Source et méthode d'ionisation *34*

Analyseur de masse triple quadripolaire *34*

Mode de détection, détecteur et traitement des données ... *36*
STANDARDS ET REACTIFS ... 36
Étalons internes ... *36*
Réactifs et solutions ... *37*
MODE OPERATOIRE ... 38
Choix de la matrice et étape préanalytique ... *38*
Extraction et dérivation ... *38*
Préparation de l'échantillon ... 38
Extraction liquide-liquide ... 38
Évaporation ... 39
Dérivation ... 39
Modalités d'injection, de séparation et d'analyse ... 40
Calcul de la concentration ... 41
ÉVALUATION DES PERFORMANCES DU SYSTEME ANALYTIQUE ... 41
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ... *42*
Domaine de mesure et linéarité ... *42*
UTILISATION DU SUCCINATE ET DU FUMARATE EN TANT QUE BIOMARQUEURS DES PPG *SDHx* ... 43
RESULTATS ... 45
ÉVALUATION DES PERFORMANCES DU SYSTEME ANALYTIQUE ... 45
Répétabilité ... *45*
Fidélité intermédiaire ... *46*
Limite de détection et limite de quantification ... *46*
Limite de linéarité et domaine de mesure ... *47*
UTILISATION DU SUCCINATE ET DU FUMARATE EN TANT QUE BIOMARQUEURS DES PPG *SDHx* ... 49
DISCUSSION ... 53
CONCLUSION ... 59
RÉFÉRENCES ... 61

Table des abréviations

ETC	Chaîne respiratoire
FIH-1	*Hypoxia-Inducible Factor Inhibitor*
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HDM	Histone-déméthylases
HIF	Facteur inductible par l'hypoxie
PHD	*Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein*
MS	Spectrométrie de masse
ODD	Domaine de dégradation oxygène-dépendant
PPG	Phéochromocytomes et paragangliomes
SDH	Succinate déshydrogénase
SDHx	Gènes SDHA, SDHB, SDHC, SDHD et SDHAF2
SIM	*Selected Ion Monitorin*g
TAD	Domaine de transactivation
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique
TET	*Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase*
pVHL	protéine Von Hippel-Lindau

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : Réaction enzymatique de la SDH. 19

Figure 2 : Structure et régulation de HIF-1A. 22

Figure 3 : Gènes cibles de HIF-1. 24

Figure 4 : Étalon interne correspondant au succinate obtenu par substitution des atomes d'hydrogène présents sur la chaîne carbonée par leur isotope stable : le deutérium. ... 31

Figure 5 : Représentation schématique d'un couplage GC-MS. 33

Figure 6 : Principe simplifié de l'ionisation par impact électronique. 34

Figure 7 : Représentation schématique de la trajectoire des ions dans un analyseur triple quadripolaire. 35

Figure 8 : Principe de fonctionnement d'un triple quadrupôle. 35

Figure 9 : Formules respectives des acides succinique-D4 et fumarique-^{13}C4 37

Figure 10 : Dérivation de l'acide succinique par le BSTFA. 39

Introduction

Les phéochromocytomes sont des tumeurs neuroendocrines dérivant des cellules chromaffines de la médullosurrénale (1). Les phéochromocytomes extra-surrénaliens sont nommés paragangliomes et se développent aux dépens des paraganglions sympathiques ou parasympathiques situés le long des axes vasculo-nerveux, principalement au niveau de la base du crâne, du cou, du thorax, de l'abdomen et du pelvis (2). *Les phéochromocytomes et les paragangliomes sont regroupés sous l'acronyme PPG.*

Les signes cliniques décrits au cours des PPG sont secondaires à un effet de masse et/ou à l'hypersécrétion de catécholamines. Cette hypersécrétion induit principalement une hypertension artérielle associée ou non à des crises paroxystiques, des céphalées, des sueurs et des palpitations.

Les PPG présentent le plus haut degré d'héritabilité des tumeurs endocriniennes. Ils peuvent s'inscrire dans le cadre de syndromes de prédisposition secondaires à l'atteinte d'un gène de susceptibilité parmi : *SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, FH, MDH2, VHL, EPAS1, RET, NF1, TMEM127, MAX, KIF1Bb, EGLN2, EGLN1*.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux PPG induits par la dysfonction d'une enzyme, la succinate déshydrogénase (SDH), secondaire à une mutation pathogène sur les gènes *SDHx* : *SDHA, SDHB, SDHC, SDHD et SDHAF2*. La SDH catalyse l'oxydation du succinate en fumarate : sa perte d'activité entraîne une accumulation cytosolique de succinate. Le succinate est un oncométabolite agissant principalement comme inhibiteur compétitif des prolyl-hydroxylases, une famille d'enzymes impliquées notamment dans la dégradation des facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF) : l'accumulation de succinate est à l'origine d'une stabilisation des HIF. La tumorigenèse est liée à l'activation par HIF de nombreux gènes favorisant l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire.

Épidémiologie

Les PPG ont une incidence annuelle estimée entre 2 et 8 nouveaux cas par million d'habitants (4–6). Une maladie métastatique est observée dans 5% à 20% des phéochromocytomes et 15% à 35% des paragangliomes (7–9). En 2011, à la demande de l'association Surrénales, une étude épidémiologique effectuée par l'équipe du Pr. Brigitte Delemer a évalué l'incidence annuelle en France des PPG à 3,8 nouveaux cas par million d'habitants : 22% étaient d'origine génétique et 19% des patients présentaient un PPG malin (10).

L'hypersécrétion de catécholamines, caractéristique des tumeurs fonctionnelles dérivant de la surrénale ou du système sympathique peuvent induire une hypertension, une tachycardie, ainsi que d'autres symptômes fonctionnels telles que des céphalées, des sueurs ou des palpitations s'inscrivant ou non en triade caractéristique (Triade de Ménard) (8,13–16).

Les syndromes de prédisposition représentent plus d'un tiers des PPG. Les mutations *SDHx* sont les plus fréquentes causes de formes héréditaires et sont retrouvée dans 25% des cas (21–25). De plus, les PPG *SDHx* sont responsables de 3% à 71% des maladies métastatiques chez les adultes et de 70% à 82% de celles des enfants (7,8,12,20). Avec une survie à cinq ans comprise entre 40% et 95% (12,17–19), ils correspondent à ceux, parmi l'ensemble des syndromes de prédisposition, dont la morbi-mortalité est la plus grande (19,20,25).

Diagnostic et prise en charge

Classification

L'OMS classifie les PPG en fonction de leur localisation anatomique (1,26).

- Les phéochromocytomes se développent au dépend de la surrénale.
- Les paragangliomes sont des phéochromocytomes extra-surrénaliens et sont divisés en deux sous-groupes en fonction de critères clinico-biologiques.
- Les paragangliomes dérivant du tissu parasympathique sont non fonctionnels. Ils se développent préférentiellement dans la région de la tête et du cou (8,25).
- Les paragangliomes sympathiques proviennent du tissu chromaffine des paraganglions et sont le plus souvent fonctionnels. Ils se développent préférentiellement au niveau de la base du crâne et du pelvis (8,25).
- Les PPG malins sont définis par la présence de métastases et tous les PPG ont un potentiel métastatique (1,25,26).

En 2017, l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) complète le système de classification de l'OMS en proposant un système de stadification TNM pour les PPG, prenant en compte, la localisation, la taille, l'envahissement ganglionnaire et la présence de métastases (27).

Diagnostic biochimique

La mise en évidence d'une hypersécrétion de catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) est la première étape diagnostique (28–31). Par conséquent, devant toute suspicion clinique, les sociétés savantes recommandent en première intention le dosage des métanéphrines (normétanéphrine, métanéphrine et 3-méthoxytyramine) plasmatiques ou urinaires (32,33), produits de dégradation des catécholamines reflétant la production globale par l'organisme. Une augmentation de trois à quatre fois la limite supérieure des valeurs de référence est très fortement évocatrice (28). Il est également important de noter qu'un résultat normal n'exclut pas la pathologie tumorale du fait du risque de faux négatif, notamment en cas de tumeur de petite taille ou de PPG non

sécrétant (28,33). La chromogranine A, marqueur sérique des tumeurs neuroendocrines, est dosée de manière conjointe pour aider au diagnostic (1,28,34).

Imagerie

L'indication de l'imagerie est posée dès que l'hyperproduction catécholaminergique est confirmée (1,25,33,35). Néanmoins il existe des situations où la recherche radiologique d'un phéochromocytome est réalisée de manière conjointe au dosage des métanéphrines, principalement chez les patients présentant un risque élevé de PPG (antécédents personnel ou familiaux, prédisposition génétique) (1,25,33,35). Même en l'absence de preuves biochimiques, l'imagerie reste indiquée en cas de forte suspicion clinique, en particulier dans les PPG de la tête et du cou, en raison de leur forte probabilité d'être non sécrétant (8,29,33).

Le scanner et l'IRM ont une sensibilité proche de 100% pour le diagnostic des tumeurs intra-surrénaliennes (36,37) mais ils sont susceptibles de manquer de précision pour la détection des tumeurs de petite taille, d'une rechute locale ou d'une maladie métastatique (36,38).

La tomographie à émission de positon (TEP) au ^{18}FDG, la TEP ^{68}Ga-DOTATOC et la scintigraphie au ^{123}I-MIBG ont une plus grande sensibilité diagnostique que la radiologie conventionnelle du fait de l'utilisation de traceurs radiopharmaceutiques. La scintigraphie au ^{123}I-MIBG (1,33,36,38–41) et le TEP ^{68}Ga-DOTATATE permettent également d'évaluer l'efficacité d'un traitement radiométabolique par ^{131}I-MIBG ou analogue de la somatostatine (1,33,36,38–41).

PHOTO 1 : *IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE MONTRANT LA PRESENCE DE MULTIPLES PARAGANGLIOMES BILATERAUX, SITUES AU NIVEAU DE LA BASE DU CRANE, ASSOCIES A UN PARAGANGLIOME TYMPANO JUGULAIRE DROIT. D'APRES BOEDEKER CC, PARAGANGLIOMAS AND PARAGANGLIOMA SYNDROMES.*

Traitement

La chirurgie est le traitement de première intention des PPG (1,33,42,43). Elle peut être délicate dans certaines situations, notamment dans le cas des paragangliomes de la tête et du cou se développant à proximité des nerfs crâniens (44). La radiothérapie ou la radiochirurgie peuvent constituer des alternatives au traitement chirurgical lorsque la balance bénéfice/risque est en défaveur de la chirurgie (1,32,33,45,46).

La manipulation de la tumeur pendant l'acte chirurgical peut entraîner une libération massive de catécholamines dans la circulation générale et ainsi mettre en jeu le pronostic

vital du patient. Pour cette raison, il est actuellement recommandé d'instaurer un blocage pharmaceutique alpha adrénergique préopératoire (1,33,47).

Dans le cas des PPG malins, un traitement locorégional palliatif peut être proposé dans l'optique de réduire le volume tumoral et ainsi limiter la sécrétion de catécholamines. Il peut être la modalité principale de prise en charge dans les formes lentement évolutives (1,32,33,48,49). En cas de progression rapide ou de masse tumorale importante, une radiothérapie métabolique au ^{131}I-MIBG ou analogue de la somatostatine peut être utilisée en complément du traitement locorégional (1,32,33,48,50–53).

Une chimiothérapie associant cyclophosphamide-vincristine-dacarbazine peut permettre la réduction de la masse tumorale et améliorer la qualité de vie des patients (54–56). Elle reste généralement indiquée en dernière intention. (32,33).

Suivi

Une surveillance à vie est indiquée chez tous les patients du fait du risque de récidive (1,32,33). Ce risque varie en fonction du caractère sporadique ou non de la tumeur et est fortement accru chez les patients portant une prédisposition génétique.

Dans le cas des PPG sporadiques, les patients doivent se voir proposer, au moins une fois par an, un examen clinique associé à un dosage des métanéphrines plasmatiques ou urinaires ; l'indication d'une imagerie est laissée à l'appréciation de l'équipe chargée du suivi (1,32,33).

Chez les patients portant une prédisposition génétique, il est recommandé de pratiquer annuellement un examen clinique, un dosage des métanéphrines et une imagerie. L'indication d'une imagerie fonctionnelle complémentaire doit être évaluée par une équipe multidisciplinaire expérimentée et adaptée aux situations individuelles (1,32,33).

Génétique

Les PPG familiaux, formant un groupe cliniquement hétérogène pouvant s'inscrire dans le cadre de syndromes tel que la maladie de von Hippel-Lindau (*VHL*), la néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (*RET*), la neurofibromatose de type 1 (*NF1*) et les syndromes de prédisposition familiale associés aux mutations *SDHx* (syndromes paragangliomas 1 à 5) (25,57–59).

Les études transcriptomiques ont permis de répartis les PPG en 3 groupes, en fonction des mécanismes impliqués dans la tumorigenèse (25).

Groupe 1 : Phéochromocytomes et paragangliomes pseudo-hypoxiques

Ce groupe est caractérisé par une réponse cellulaire à l'hypoxie inadaptée (pseudo-hypoxie), indépendante de la pression partielle en oxygène dans le microenvironnement (25). Cette situation de pseudo-hypoxie est secondaire à la stabilisation d'un groupe de facteurs de transcription, du fait de l'inhibition des mécanismes de leur dégradation : les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF). Les HIF sont impliqués dans la réponse cellulaire physiologique à l'hypoxie en favorisant l'angiogenèse, la prolifération et la survie cellulaire (25).

Les PPG pseudo-hypoxiques peuvent être divisés en deux sous-groupes (25).

1. *Les PPG pour lesquels les anomalies de régulation des HIF sont secondaires à une accumulation de dérivés du cycle de Krebs*

Ce sous-groupe comprend les formes de prédisposition aux PPG associées aux mutations *SDHx*, codant les sous-unités de la succinate déshydrogénase (SDH) SDHA, SDHB, SDHC et SDHD ou son facteur d'assemblage SDHAF2 (60–64). La SDH (complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale) catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et participe au fonctionnement du cycle de Krebs ou cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) ainsi que de la chaîne respiratoire (65).

Une minorité de PPG du groupe 1 sont liés à des mutations pathogènes dans le gène codant la fumarate hydratase (*FH*) (66). Cette enzyme catalyse l'hydratation du fumarate en malate.

Les mutations pathogènes dans les gènes codant la SDH ou la FH provoquent un défaut d'activité de l'enzyme correspondante et entraînent une accumulation de leur substrat : le succinate ou le fumarate respectivement (67–72). Ces deux intermédiaires du TCA induisent l'oncogenèse par le biais de l'inhibition d'enzymes impliquées dans diverses voies de signalisation, notamment dans la dégradation des HIF (67–72) : ils sont qualifiés d'oncométabolites (72).

2. *Les PPG pour lesquels les anomalies de régulation des HIF sont secondaires aux mutations VHL et EPAS1*

La maladie de Von Hippel–Lindau est un syndrome caractérisé par l'apparition d'hémangioblastomes, de kystes, ainsi que par une prédisposition aux phéochromocytomes et aux tumeurs rénales (73,74). De transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète, elle est induite par l'inactivation du gène *VHL,* codant la protéine Von Hippel–Lindau (pVHL) permettant la dégradation des HIF et empêchant leur accumulation en situation normoxique (73–75).

Les mutations induisant une activation constitutionnelle de la protéine EPAS1 (HIF2A) entraînent le syndrome de Pacak-Zhuang (76,77).

<u>Groupe 2 : PPG associés à des anomalies de régulation de la voie Wnt.</u>

Caractérisé par une dérégulation de la voie de signalisation Wnt, ce groupe comprend les PPG sporadiques secondaire aux mutations somatiques du gène *CSDE1* ainsi que les PPG sporadiques induit par la formation d'un gène de fusion *UBTF-MAML3* (78).

<u>Groupe 3 : PPG associés à des anomalies de régulation des protéines kinases</u>

Au sein du groupe 3, les PPG présentant une mutation du gène *RET* sont les plus fréquents. Ces mutations sont responsables du syndrome MEN2 (néoplasie

endocrinienne multiple type 2), secondaire à l'activation de la voie des kinases RAS-RAF-MEK ou PI3K-AKT-mTOR (25,32,59,78).

Ce groupe comporte également les PPG avec mutations somatique ou germinales des gènes *NF1, TMEM127, MAX et HRAS* (25,32,59,78).

Les phéochromocytomes et paragangliomes *SDHx*.

Une dysfonction de la SDH est retrouvée dans de nombreux cancers : les paragangliomes et les phéochromocytomes, mais également les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), les adénomes hypophysaires et les carcinomes rénaux (57,79,80).

L'*Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) définit cinq syndromes liés aux mutations de gènes associés à la structure ou à l'assemblage de la SDH (sous-unité atteinte : SDHA, SDHB, SDHC, SDHD ou facteur d'assemblage : SDHAF2).

Le syndrome PARAGANGLIOMAS 1

Lié à *SDHD*, le mode de transmission du syndrome paragangliomas 1 (OMIM # 168000) est autosomique dominant, soumis à empreinte maternelle (62). De pénétrance complète, il est caractérisé par le développement de paragangliomes au niveau de la tête et du cou et par une prédisposition aux phéochromocytomes. La maladie survient principalement après 30 ans (15). Une maladie métastatique est retrouvée dans 8% à 26% des cas (81).

Le syndrome PARAGANGLIOMAS 2

Secondaire à une mutation sur le gène *SDHAF2*, le syndrome paragangliomas 2 (OMIM # 601650) de pénétrance complète est caractérisé par le développement de paragangliomes multiples dans la région de la tête et du cou (82).

Le syndrome PARAGANGLIOMAS 3

Les mutations sur le gène codant la sous unité SDHC entraînent le syndrome paragangliomas 3 (OMIM # 605373). Rare, il se manifeste principalement par la survenue

de paragangliomes parasympathiques. Vingt-cinq pourcent des patients développent des tumeurs multiples. Le risque de métastases est faible (9).

Le syndrome PARAGANGLIOMAS 4

Le syndrome paragangliomas 4 (OMIM # 115310) est lié à une mutation sur le gène *SDHB*. Le développement d'une maladie métastatique est observé chez 17% des patients. L'entrée dans la maladie se fait généralement dans la 4ème décennie (81).

Le syndrome PARAGANGLIOMAS 5

Les mutations sur le gène *SDHA* sont responsables du syndrome paragangliomas 5 (OMIM # 614165) de transmission autosomique dominante. Ce syndrome entraîne une prédisposition aux phéochromocytomes et aux paragangliomes. Le risque de métastases est évalué à 13 % (83).

Mécanismes oncogénétiques

Ce travail portant sur la quantification du succinate et du fumarate et son application aux PPG *SDHx*, nous présenterons ici la succinate déshydrogénase ainsi que les mécanismes oncogénétiques induits par son inactivation.

La succinate déshydrogénase (SDH)

Structure

La succinate déshydrogénase ou complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale (SDH) est une enzyme située au niveau de la membrane interne mitochondriale, au carrefour du cycle de l'acide citrique (TCA) et de la chaîne respiratoire (ETC). Au sein du TCA, la SDH catalyse l'oxydation du succinate en fumarate avec réduction conjointe du coenzyme Q permettant ainsi le transfert d'électrons au sein de l'ETC (72).

La SDH comporte 4 sous-unités. Il s'agit du seul complexe de la chaîne respiratoire codé uniquement par le génome nucléaire. Elle comporte une partie hydrophile, composée des

deux sous-unités SDHA et SDHB et une partie membranaire, hydrophobe, composée des sous-unités SDHC et SDHD (72,84).

La sous-unité SDHA contient le domaine catalytique de l'enzyme. Le cofacteur FAD nécessaire à l'oxydation du succinate est lié de manière covalente à SDHA. SDHB est constitué de centres fer/soufre (Fe/S) permettant le transfert des électrons fournis par la réaction d'oxydoréduction vers l'ubiquinone (72,84,85).

Le domaine membranaire comporte les deux sous-unités SDHC et SDHD. Il est relié au domaine catalytique par SDHB. Le domaine membranaire présente une structure héminique permettant la formation d'un site d'affinité pour l'ubiquinone (72,84,85).

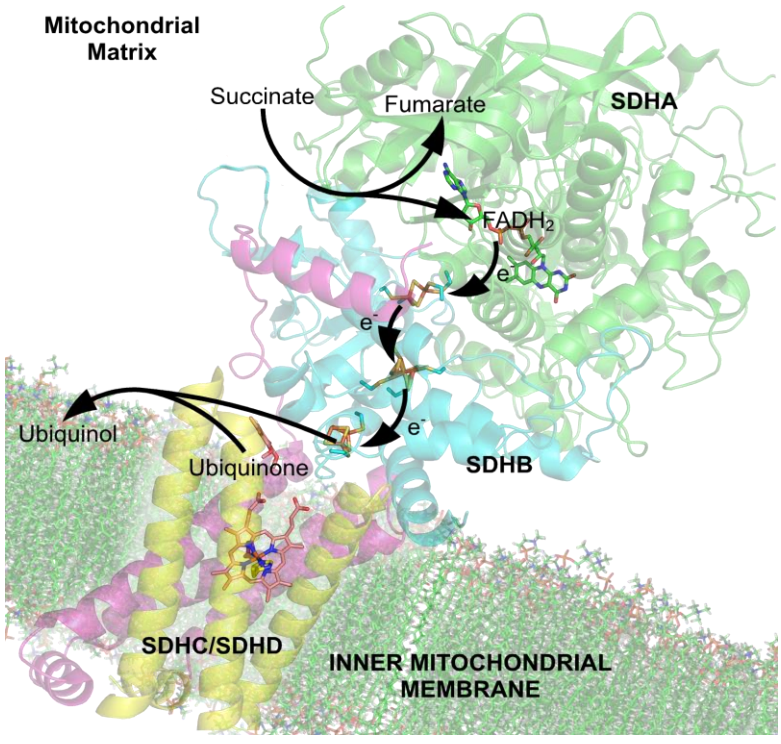


FIGURE 1 : REACTION ENZYMATIQUE DE LA SDH. D'APRES RICHARD WHEELER, ELECTRON CARRIERS OF THE SQR COMPLEX. FADH2, IRON-SULFUR CENTERS, HEME B, AND UBIQUINONE.

La réaction enzymatique de la SDH est initiée par la liaison du succinate au domaine catalytique de SDHA. L'oxydation du succinate s'accompagne d'une réduction du

cofacteur FAD, aboutissant à la libération de fumarate et de FADH2. Les électrons du FADH2 sont transférés au centre héminique par l'intermédiaire des centres fer/soufre afin de réduire l'ubiquinone en ubiquinol (72).

Régulation

L'activité de la SDH est régulée *via* des modifications post-traductionnelles de la sous-unité SDHA. SIRT3, responsable de la désacétylation des résidus lysine est la protéine principale de régulation du domaine catalytique. La perte de SIRT3 induit une diminution de l'activité de la SDH (86).

Assemblage

L'assemblage de la SDH est un processus complexe impliquant de multiples protéines. Six protéines présentées ci-après jouent un rôle particulièrement important.

Le gène *TCM62* code une protéine identifiée en 1998 et décrite comme étant essentielle pour l'assemblage de la SDH (87). Même si actuellement sa fonction exacte n'est pas encore définie, l'hypothèse actuelle est qu'elle joue un rôle de protéine chaperonne (88).

Le gène *FLXT1* code un transporteur de FAD permettant son importation du cytosol vers la matrice mitochondriale. Il participe à la formation du domaine catalytique de SDHA (64,72).

SDHAF1 est une protéine identifiée pour la première fois en 2009. Elle participerait à la formation des centres Fe/S (89,90).

SDHAF2 est un facteur d'assemblage associé à un syndrome de prédisposition aux paragangliomes. C'est également celui dont la structure et la fonction biochimique sont les mieux caractérisées. Il permet l'incorporation du FAD dans le domaine catalytique de la sous-unité SDHA (64,72).

SDHAF3 est un facteur d'assemblage découvert récente. L'hypothèse actuelle est qu'il participerait comme SDHAF1 à la formation des centres Fe/S (91).

SDHAF4 est une protéine chaperonne liant le complexe SDHA-FAD, empêchant ainsi l'oxydation spontanée du succinate en fumarate par le FAD. SDHAF4 facilite également la formation du dimère SDHA/SDHB (91).

SDH, HIF et tumorigenèse

La classification moléculaire des PPG inclut les mutations *SDHx* dans le groupe des PPG pseudo-hypoxiques, caractérisés par une anomalie de régulation des HIF secondaires à une accumulation de dérivés du cycle de Krebs (9)**.**

Structure des HIF

Les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF) permettent l'adaptation cellulaire à l'hypoxie. Au nombre de trois (HIF-1, HIF-2, HIF-3), ce sont des facteurs de transcription hétérodimériques constitués d'une sous-unité alpha (HIFA), localisée dans le cytoplasme, finement régulée en fonction de la concentration en oxygène dans le microenvironnement (68) et d'une sous-unité bêta exprimée de manière constitutive dans le compartiment nucléaire (HIFB).

HIF-1 est le premier membre à avoir été découvert. D'expression ubiquitaire, il est le principal représentant des HIF (94).

HIF-2 est le deuxième membre. Contrairement à HIF-1, son expression est limitée à certains types cellulaires. Une dérégulation de HIF-2 est retrouvée dans les PPG *SDHx* (95,96).

Enfin, HIF-3 est le membre dont la fonction est la moins connue. Il pourrait fonctionner comme un dominant négatif, se liant à HIF-1A pour empêcher la formation d'un hétérodimère fonctionnel.

Régulation des HIF

Les mécanismes de régulation de HIF-1 et HIF-2 reposant sur les mêmes principes, nous ne décrirons ici que la régulation d'HIF-1.

- Régulation oxygène dépendante

La régulation négative de HIF-1A implique les protéines : *Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein* (HPD) 1 et 3 ainsi que l'*Hypoxia-Inducible Factor Inhibitor* (FIH-1). L'expression de HIF-1A est finement régulée *via* un domaine de dégradation oxygène-dépendant (ODD), hydroxylé de manière constitutionnelle en condition normoxique sur les prolines P402 et P564 par les HPD 1 et 3 (69,94,97). L'hydroxylation du domaine ODD permet l'interaction entre HIF-1A et la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL), gène suppresseur de tumeur et composant de reconnaissance d'un complexe protéique possédant une activité E3 ubiquitine ligase. L'ubiquitinylation de la sous-unité alpha entraîne sa dégradation par le protéasome. Le domaine ODD de HIF-1A peut également être O-acétylé par la protéine ARD1 sur la lysine K532, favorisant l'interaction pVHL/HIF-1A et renforçant ainsi sa dégradation (68).

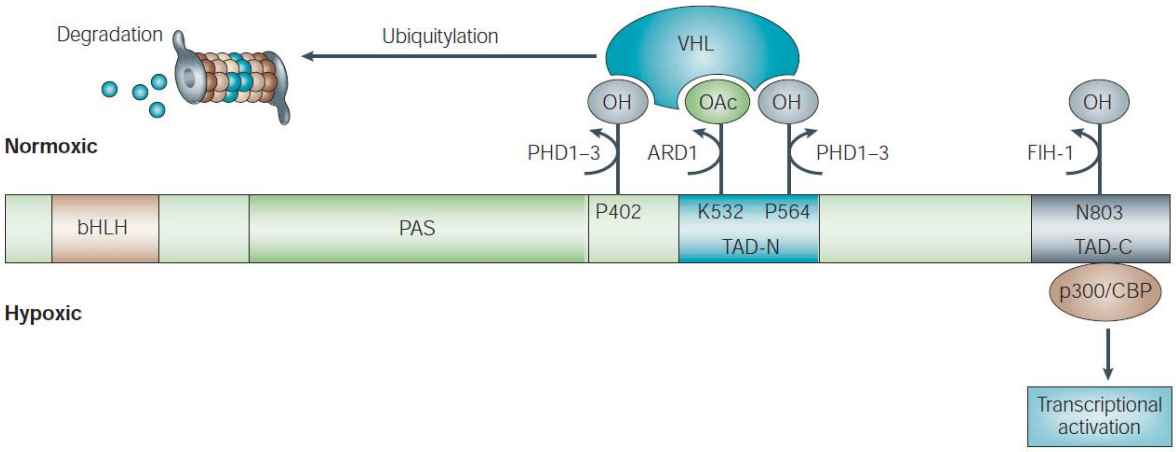


FIGURE 2 : STRUCTURE ET REGULATION DE HIF-1A. D'APRES GREGG L. SEMENZA

HIF-1A possède également deux domaines de transactivation (TAD) portant l'activité transcriptionnelle : l'un est localisé en NH2-terminal (N-TAD) et l'autre en COOH-terminal (C-TAD). N-TAD contient le domaine ODD et C-TAD permet l'interaction entre HIF-1A et deux coactivateurs, la *CREB-binding protein* (CBP) et l'histone acétyltransférase p300. Dans des conditions normoxiques, FIH-1 hydroxyle l'asparagine N-803 du domaine C-TAD. En empêchant l'interaction de la CBP et de p300 avec le domaine de transactivation, elle inhibe ainsi l'activité transcriptionnelle de HIF-1A (69,94,97).

Les protéines HPH 1 et 3 et FIH-1 sont des enzymes oxygène dépendantes : elles perdent leur activité lorsque que la pression partielle en oxygène dans le microenvironnement est insuffisante (69,94,97). Ainsi en conditions hypoxiques, l'inhibition des protéines HPH 1-3 entraîne l'absence d'hydroxylation du domaine ODD de HIF-1A et empêche sa reconnaissance par pVHL, bloquant ainsi son adressage au protéasome et sa dégradation. De même, pour le domaine C-TAD, la diminution de l'activité de la protéine FIH-1 lève l'inhibition de l'activité traductionnelle de HIF-1A par le recrutement des protéines CBP et p300 (69,94,97).

La stabilisation de HIF1-A autorise son adressage au compartiment nucléaire. La dimérisation avec la sous-unité bêta conduit à la formation d'un facteur de transcription fonctionnel permettant l'activation des gènes de réponse à l'hypoxie (69).

- Régulation oxygène-indépendante

Il existe d'autres mécanismes indépendants de l'oxygène régulant leurs niveaux d'expression.

La voie PDK1/AKT/mTOR, stimulée par divers facteurs de croissance, est impliquée dans la prolifération, la croissance, ainsi que la survie cellulaire. L'activation de la voie induit la traduction de nombreuses protéines, incluant les HIF (69,94,97).

Les *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) régulent également positivement l'activité des HIF en augmentant leur synthèse, ainsi que leur activité transcriptionnelle en favorisant le recrutement des protéines CBP et p300 au niveau du domaine C-TAD (69,94,97).

Enfin les protéines P53 et Hsp90 sont impliquées par divers mécanismes dans la régulation des HIF (69,94,97).

HIF et oncogenèse

Les HIF sont des facteurs de transcription permettant l'adaptation cellulaire à l'hypoxie. Leur dérégulation induit l'activation de nombreux gènes impliqués dans la

néoangiogenèse, la glycolyse, la survie, la prolifération et la migration, favorisant aussi bien la tumorigenèse que le développement de métastases.

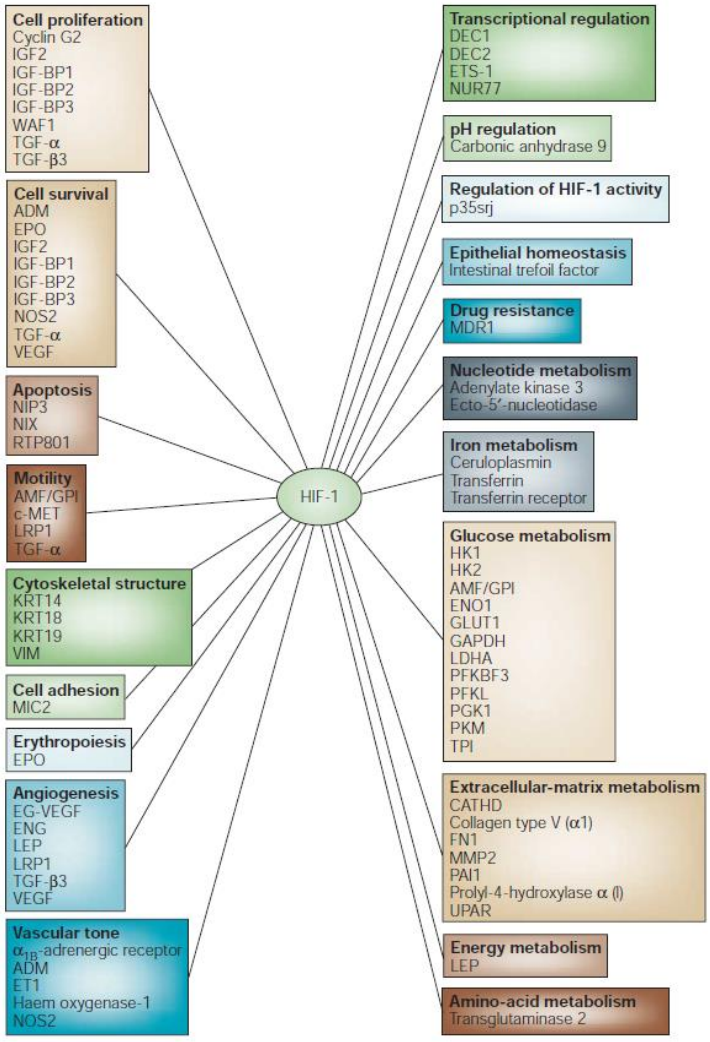


FIGURE 3 : GENES CIBLES DE HIF-1. D'APRES GREGG L. SEMENZA

- HIF et néoangiogenèse

La néoangiogenèse est essentielle au développement tumoral en majorant l'apport en éléments nécessaires au métabolisme cellulaire. Cette néovascularisation permet de pallier l'inadéquation entre les besoins et les apports induits par la prolifération cellulaire rapide. La capacité des cellules tumorales à induire l'angiogenèse est un processus complexe, secondaire à une dérégulation de la balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques. HIF induit principalement l'expression du VEGF, ses deux récepteurs FLT-1 et FLK-1 et les angiopoïétines ANGPT1 et ANGPT2 (94,98).

- HIF et métabolisme

L'effet Warburg est un phénomène décrit par Otto Warburg dans les années 1930. Il est caractérisé par une transition métabolique au sein des cellules tumorales, qui favorisent la respiration anaérobique à la phosphorylation oxydative (respiration aérobie) (99). La glycolyse anaérobie est caractérisée par un catabolisme accéléré du glucose (mécanisme glycolytique) et permet la production d'intermédiaires nécessaires aux cellules en phase proliférative *via* la voie des pentoses phosphates, ou la voie de Warburg-Dickens-Horecker. Ces deux voies permettent notamment la synthèse des nucléotides, des acides gras et de certains acides aminés.

Ainsi les HIF favorisent l'effet Warburg en régulant positivement l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glycolytique, notamment les transporteurs GLUT-1 et GLUT-3, l'hexokinase et la phosphofructokinase (94,100).

- HIF et prolifération

En modulant positivement l'activité du pro-oncogène *c-Myc* impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (68,94,95,101), la voie des HIF joue un rôle central dans la croissance tumorale.

- HIF et migration cellulaire

La survenue de métastases est la résultante d'une multitude d'étapes permettant l'invasion des cellules tumorales dans les tissus avoisinants. La dérégulation des HIF

favorise le développement de métastases par le biais de facteurs régulant la migration cellulaire, notamment la E-cadhérine, les lysyl oxydases (LOX), CXCR4 (94,102,103).

La E-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire anti-prolifération empêchant l'action de la β-caténine, coactivateur de la voie signalisation pro-prolifération Wnt. Les HIF régulent négativement l'action de la E-cadhérine en augmentant le potentiel métastatique tumoral (94,102,103).

L'induction par les HIF des protéines de remodelage matriciel LOX et de CXCR4, un récepteur de chimiokine, favorise également la survenue de métastases (94,102,103).

HIF et SDH

- Un défaut d'activité de la SDH entraîne une accumulation de succinate

L'inactivation initiale de la SDH entraîne une accumulation initiale de succinate dans la matrice mitochondriale. Dans un second temps, la majoration du gradient entre la matrice et l'espace intermembranaire entraîne un efflux du succinate *via* SLC25A10 (92,104) (*solute carrier family 25, mitochondrial dicarboxylate transporter*).

La présence de porines (*voltage-dependent anion channel*, VDAC) sur la membrane externe mitochondriale permet la sortie du succinate vers le cytosol, qui, toujours suivant le gradient de concentration, emprunte le transporteur SLC13A5 (105) (*solute carrier family 13, sodium-dependent dicarboxylate transporte*r) et s'accumule dans le microenvironnement tumoral.

Le succinate entraîne, par le biais de divers mécanismes, une altération de nombreuses voies de signalisation, favorisant ainsi l'angiogenèse, la migration, l'invasion et la survie cellulaire.

- L'accumulation de succinate induit une situation de pseudo hypoxie

Le succinate est un inhibiteur des prolyl hydroxydases PHD 1 et 3 (104). Il stabilise ainsi les HIF à la suite d'une mauvaise reconnaissance du domaine ODD par la protéine pVHL et conduit à une situation de pseudo hypoxie (68,69,97). La dérégulation des HIF induit la tumorigenèse.

Autres mécanismes oncogéniques liés à un défaut d'activité de la SDH

- Inhibition des histones déméthylases et des Tet methylcytosine dioxygenase

L'inhibition des hydroxylases par le succinate ne se résume pas qu'aux HPH 1 et 3. Il bloque également l'activité d'autres dioxygénases dont certaines ont un rôle connu dans la tumorigenèse : les histone-déméthylases (HDM) et les TET 1 et 3 (*ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*) (106,107). Ces deux familles d'enzymes occupent une place centrale dans la régulation épigénétique de l'ADN.

L'inactivation de ces enzymes induit un profil d'hyperméthylation, retrouvé dans les PPG *SDHx* (108). Ce phénotype particulier est caractérisé par une méthylation des gènes impliqués dans la régulation positive de la SDH et la régulation du cycle cellulaire (109,110).

- Activation des récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G sont une grande famille de protéines impliquées dans la transduction du signal à travers les membranes cellulaires. GPR91 ou SUCRN1 est un récepteur couplé aux protéines G capable de fixer le succinate (111). L'interaction succinate/GPR91 induit l'activation des MAP kinases ERK1/2 (92,111,112).

La voie de signalisation ERK1/2 est connue pour favoriser la survie cellulaire en activant les protéines anti-apoptotiques BCL2, BCL-xL et MCL1 et en inhibant les protéines pro-apoptotiques BAD, BIM, BMF et PUMA (92,111,112). Outre leurs signaux anti-apoptotiques, ERK1/2 activent de nombreuses protéines impliquées dans la différenciation, la survie, la migration, et l'angiogenèse (113).

L'inactivation de la SDH induit donc l'oncogenèse selon un mécanisme paracrine, indépendamment de la voie des HIF.

- La SDH, effecteur de l'apoptose

L'induction de l'apoptose induit une dissociation des sous-unités catalytiques, SDHA et SDHB, du reste de la protéine. L'activité de SDHA reste conservée : elle catalyse de manière spontanée l'oxydation du succinate en fumarate. La solubilisation du complexe

dans la matrice empêche le transfert d'électrons vers l'ubiquinone. L'oxygène devient alors le dernier accepteur d'électrons, conduisant ainsi à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) induisant la mort cellulaire par stress oxydatif (114,115). Un défaut d'activité de la SDH limite la production de ROS, réduisant ainsi l'efficacité d'un éventuel signal pro-apoptotique (92,114–116).

Objectif du travail

Les PPG liés aux mutations SDH représentent un défi diagnostique important. En effet ils sont associés à un risque élevé de récidive, et la survenue de métastases est fréquente engageant le pronostic à long terme et complexifiant la prise en charge (2,3).

Actuellement, le suivi des patients *SDHx* est basé sur l'examen clinique, l'imagerie, le dosage des métanéphrines et de la chromogranine A. Cependant, les tumeurs non fonctionnelles rendent le diagnostic biochimique difficile. Les examens d'imagerie sont coûteux du fait de la multiplicité des localisations. Ils nécessitent parfois le recours à des traceurs radiopharmaceutiques et peuvent manquer de sensibilité pour la détection des tumeurs de petite taille, en cas de rechute locale ou pour la détection de métastases.

Le diagnostic des mutations *SDHx* a été grandement facilité du fait du développement des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS). Elles présentent néanmoins certaines limitations. Si la mauvaise détection des grands réarrangements est palliée par l'utilisation d'algorithmes spécifiques ou d'une technique de MLPA, le défi le plus important reste la classification des variants de signification indéterminée. Ces variants ne peuvent être interprétés dans l'état actuel des connaissances et leur imputabilité repose principalement sur l'histoire clinique, les études de ségrégation, l'anatomopathologie, les bases de données génétiques et les logiciels de prédiction (120).

Les difficultés inhérentes au diagnostic et au suivi des PPG *SDHx* ont motivé la recherche de nouveaux marqueurs tumoraux spécifiques. L'étude spectroscopique par résonance magnétique nucléaire a permis de détecter *in vivo* une élévation du succinate chez les patients *SDHx* atteints de PPG (118). Les études métabolomiques ont mis en évidence une élévation *in vitro* du rapport succinate /fumarate (119) ainsi qu'une augmentation du succinate plasmatique (117).

Au vu de ces résultats, le succinate et le fumarate pourraient constituer des marqueurs prometteurs, utilisables à la fois pour le diagnostic et le suivi des PPG *SDHx*. Dans cette optique, nous proposons une méthode de dosage simultané du succinate et du fumarate sérique en dilution isotopique, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Matériels et méthodes

Nous proposons de réaliser la quantification du succinate et du fumarate plasmatique par spectrométrie de masse avec une approche en dilution isotopique, en intégrant une méthode séparative par chromatographie en phase gazeuse.

Principes méthodologiques

Dilution isotopique

La dilution isotopique est une méthode analytique permettant la quantification de substances chimiques. Son principe repose sur l'ajout à l'échantillon d'un étalon interne marqué en quantité connue (dilution). Les isotopes habituellement utilisés pour réaliser le marquage sont le deutérium, le carbone ^{13}C, l'azote ^{15}N ou l'oxygène ^{18}O en lieu et place de l'hydrogène, du ^{12}C, du ^{14}N ou du ^{16}O, respectivement. Dans la mesure où il ne s'agit pas d'un marquage radioactif, il n'y a pas de contraintes liées à l'utilisation de ces molécules marquées. Le marquage isotopique consiste à alourdir la molécule d'intérêt, afin de permettre la différenciation par spectrométrie de masse de la molécule native non marquée et de son étalon interne marqué. La concentration est déterminée à partir du rapport des signaux de l'analyte à quantifier dans l'échantillon biologique et de l'étalon interne marqué ajouté en concentration connue.

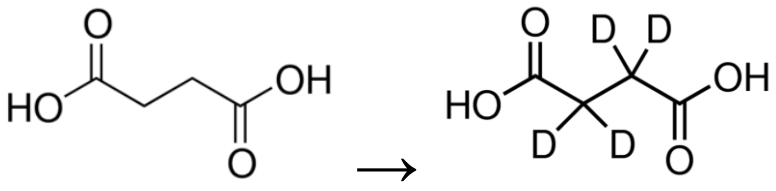


FIGURE 4 : ÉTALON INTERNE CORRESPONDANT AU SUCCINATE OBTENU PAR SUBSTITUTION DES ATOMES D'HYDROGENE PRESENTS SUR LA CHAINE CARBONEE PAR LEUR ISOTOPE STABLE : LE DEUTERIUM.

Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une méthode séparative permettant l'analyse de composés volatiles, que ceux-ci soient volatiles d'emblée ou rendus volatiles par le biais d'une dérivation.

La phase mobile est composée d'un gaz vecteur inerte. La phase stationnaire est composée d'un polymère ou d'un liquide reposant sur un support solide : le tout forme la colonne. La colonne est placée dans un four dont la température est étroitement contrôlée.

Les composés volatiles, portés par le gaz vecteur, sont injectés dans la colonne et interagissent avec la phase stationnaire. La vitesse d'élution d'un composé dépend de sa volatilité et de son affinité avec la phase stationnaire. Dans des conditions chromatographiques fixées, chaque composé est caractérisé par son temps de rétention. La chromatographie en phase gazeuse permet ainsi de séparer les composants d'un mélange complexe et constitue une technique de choix pour l'analyse des liquides biologiques.

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) permet l'identification et la quantification de composés en fonction de leur rapport masse/charge (*m/z*).

Une molécule n'est analysable en spectrométrie de masse qu'à partir du moment où elle se trouve sous forme ionisée. L'ionisation (et la fragmentation) des molécules est réalisée au niveau de la source de l'appareillage. Une fois à l'intérieur de l'analyseur, les ions fragments obtenus sont soumis à un champ électrique permettant leur séparation en fonction de leur rapport *m/z*. Le spectre de masse d'une molécule correspond aux intensités des différents rapports *m/z* des différents ions fragments de la molécule. Chaque molécule possède un spectre de masse qui lui est propre. L'identification est réalisée par comparaison du spectre de masse obtenu aux bibliothèques de spectres disponibles, en intégrant en plus le temps de rétention obtenue grâce à l'étape chromatographique.

Les techniques de spectrométrie de masse reposant sur des principes d'ionisation et d'identification différentes, nous ne présentons ici que la méthode que nous avons employée.

Appareillage et principe d'analyse

L'appareil utilisé dans ce travail combine un chromatographe en phase gazeuse Bruker Scion 433 et un spectromètre de masse triple quadripole Bruker EVO-Q.

PHOTO 2 : BRUKER SCION 433-GC COUPLE A UN SPECTROMETRE DE MASSE BRUKER EVO Q QUADRIPOLE MS/MS.

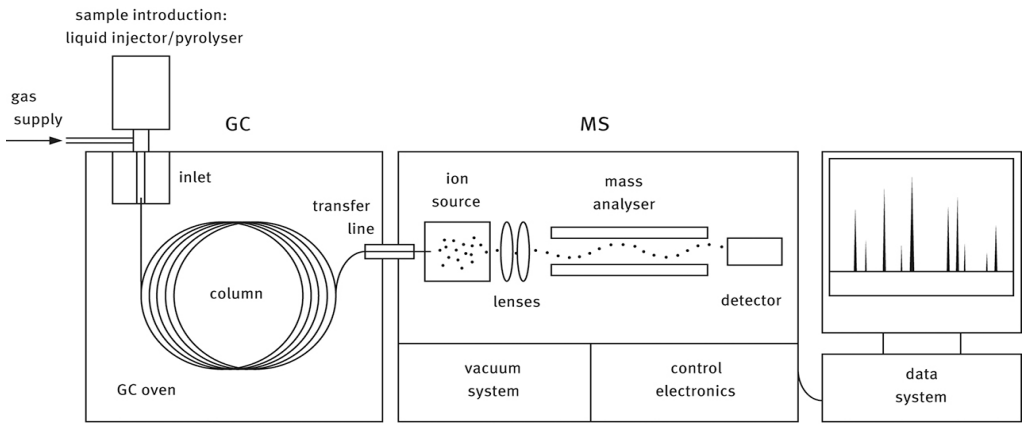


FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN COUPLAGE GC-MS. TIRÉ DE PHYSICAL SCIENCES REVIEWS, VOLUME 4, ISSUE 6, 20180010, EISSN 2365-659X.

Source et méthode d'ionisation

La méthode d'ionisation que nous avons utilisée repose sur l'impact électronique (EI) en mode positif à +70eV. L'EI est un mode d'ionisation qui consiste à soumettre les composés à analyser à un faisceau d'électrons. Ce procédé conduit à l'arrachement d'un ou plusieurs électrons de la molécule cible par suite du transfert d'énergie fourni par la collision avec le faisceau. Celui-ci entraîne la formation d'un ion radical M+ correspondant à la molécule M qui peut se fragmenter. Comme il s'agit d'un mode d'ionisation dur, de nombreux fragments sont générés.

La collision de la molécule M avec un électron issu du faisceau entraîne l'arrangement d'un électron et la production du radical ionisé correspondant M+. Les ions ainsi formés sont dirigés alors vers l'analyseur.

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2\ e^- \rightarrow \text{ fragments}$$

FIGURE 6 : PRINCIPE SIMPLIFIE DE L'IONISATION PAR IMPACT ELECTRONIQUE.

Analyseur de masse triple quadripolaire

Le Bruker EVO-Q quadripôle MS/MS est équipé d'un analyseur triple quadripolaire. Un analyseur triple quadripolaire (TQMS) consiste en deux quadripôles disposés en tandem (Q1 et Q3) séparés par une cellule de collision (q2).

Un quadripôle est constitué de quatre cylindres métalliques disposés en parallèle. Les paires opposées sont soumises à une tension continue et une tension périodique, conduisant à la formation d'un champ électrique alternatif. Le champ électrique impose une trajectoire oscillante aux ions pénétrant dans le quadripôle.

Si les tensions et la fréquence imposées à l'ion sont telles que la trajectoire qu'il adopte le fait entrer en contact avec un cylindre (ion non résonant), il perdra sa charge et ne sera plus conduit par le quadripôle vers l'analyseur. La trajectoire de l'ion est définie par l'équation de Mathieu et dépend principalement du champ alternatif, de la masse (*m*) et

de la charge (*z*) de l'ion. En paramétrant le champ électrique, le triple quadripôle permet donc la sélection des ions en fonction de leur rapport *m/z* car, pour une tension donnée, seuls les ions d'un rapport *m/z* donné atteindront le détecteur (ions résonants). Le balayage de tension permet le balayage de rapport *m/z*.

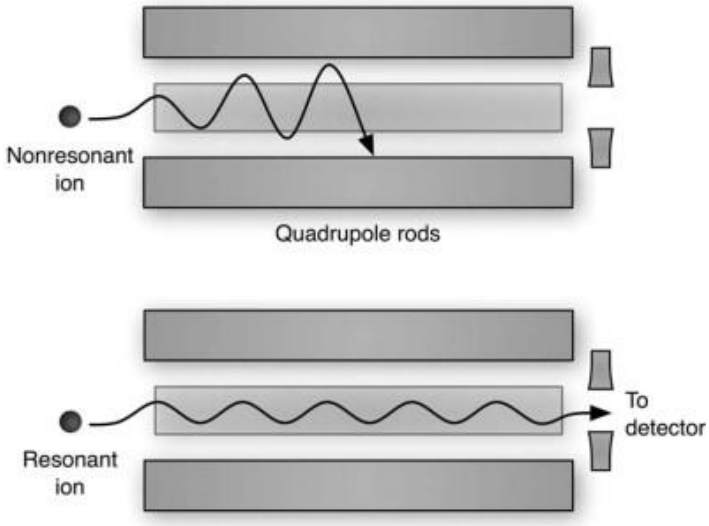


FIGURE 7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TRAJECTOIRE DES IONS DANS UN ANALYSEUR TRIPLE QUADRIPOLAIRE. D'APRES ERIC STAUFFER, JULIA A. DOLAN ET COLLABORATEURS

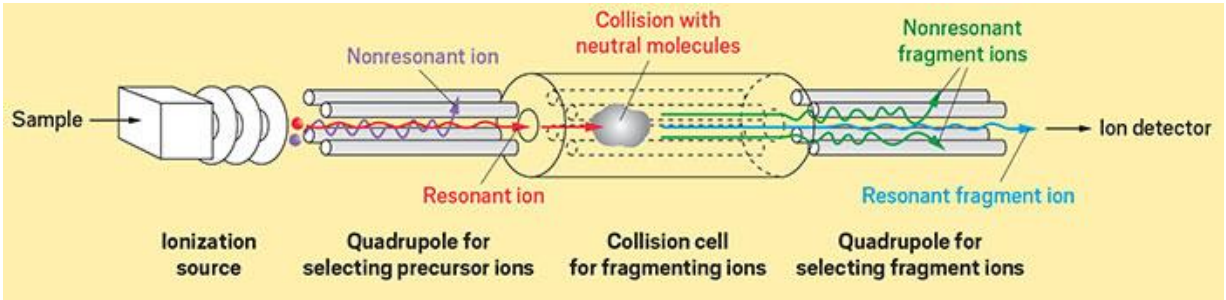


FIGURE 8 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN TRIPLE QUADRUPOLE. D'APRES CELIA HENRY ARNAUD

Un TQMS fonctionne selon le même principe que l'analyseur de masse simple quadripôle et possède une plus grande résolution en raison de sa double sélectivité. Cette dernière est permise par la possibilité de sélectionner un ion parent dans le Q1 et un ion fils dans le Q3, fragment de l'ion parent formé lors de son entrée dans la cellule de collision.

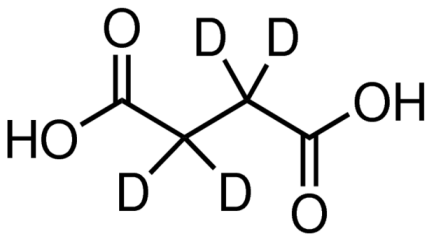
Mode de détection, détecteur et traitement des données

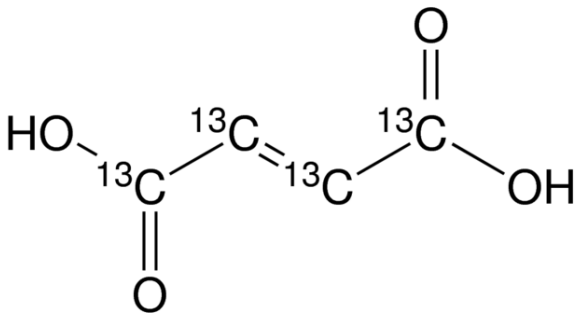
Le mode de détection que nous avons choisi est le *Selected Ion Monitorin*g (SIM). Il s'agit d'un mode de sélection des masses dans lequel la plage des rapports *m/z* détectés est très restreinte, donc plus sélective. L'avantage de ce mode de détection est qu'il permet une nette augmentation de la sensibilité. Le détecteur permet l'acquisition des rapports *m/z* préalablement sélectionnés. Le signal transmis est traité informatiquement.

Standards et réactifs

Étalons internes

Une solution d'étalons internes a été réalisé à partir d'acide succinique marqué quatre fois au deutérium en position 2 et 3 (*Succinic acid-D_4, Sigma-Aldrich®, référence fournisseur 293075, PM 122,11 g/mol*) et d'acide fumarique marqué où les 4 atomes de ^{12}C sont remplacés par du ^{13}C (*Fumaric acid-$^{13}C_4$, Sigma-Aldrich®, référence fournisseur 606074, PM 120,04 g/mol*). Après pesée exacte, les deux poudres ont été dissoutes dans de l'eau pour préparations injectables (PPI) afin d'obtenir une solution d'étalons internes à une concentration de 1mM pour le succinate-D_4 et le fumarate-$^{13}C_4$.





Acide succinique-D4 Acide fumarique-$^{13}C_4$

FIGURE 9 : FORMULES RESPECTIVES DES ACIDES SUCCINIQUE-D4 ET FUMARIQUE-$^{13}C4$

Réactifs et solutions

HCl 2,4N – Solution préparée à partir d'acide chlorhydrique 37%, (Normapur®) dilué dans de l'eau ultra pure (ELGA, LabWater).

NaCl 0,9% (≥99%, Sigma-Aldrich®)

BSTFA + 1% TMCS (Sigma-Aldrich®)

Acétate d'éthyle (≥99,5%, Normapur®)

Chloroforme (99,0-99,4% stabilisé, Normapur®)

Mode opératoire

Choix de la matrice et étape préanalytique

Succinate et fumarate sont dosés sur sérum. En effet, ce sont des acides organiques. Dans la mesure où, au sein de notre laboratoire, le profil des acides organiques sanguins (dans les rares cas où il n'est pas réalisable sur urine) est analysé sur sérum, nous avons fait le choix de conserver la même matrice.

Les prélèvements sont adressés sur glace au laboratoire, et pris en charge le plus rapidement possible. Les tubes secs sont décantés et congelés à -20°C jusqu'à l'analyse.

Extraction et dérivation

Le succinate et le fumarate sérique sont extraits selon une méthode d'extraction liquide-liquide permettant la séparation des acides organiques dissous par transfert entre deux phases.

Préparation de l'échantillon

Un ml de sérum est introduit dans un tube en verre. Sont ajoutés successivement 30 µL de la solution d'étalons internes à 1 mM et 200 µL d'HCl 2,4 N (acidification et déprotéinisation de l'échantillon). La solution est ensuite saturée en NaCl puis agitée jusqu'à homogénéisation.

Extraction liquide-liquide

Deux ml d'acétate d'éthyle sont ajoutés à la solution. Après une minute d'agitation, le tube est centrifugé (2000g à 4°C) pendant 5 minutes pour permettre la séparation des phases. La phase organique est récupérée dans un nouveau tube en verre à l'aide d'une pipette pasteur.

Cette étape d'extraction est répétée trois fois.

Évaporation

Les phases organiques collectées sont évaporées sous un flux d'azote à l'aide d'un évaporateur à aiguilles thermostaté à 37°C. Ceci permet d'obtenir un extrait sec.

Dérivation

La dérivation au BSTFA consiste en la substitution de l'hydrogène d'un groupe alcool, phénol ou acide carboxylique par un groupement triméthylsilyle [-Si(CH_3)$_3$]. Les groupements greffés rendent les molécules extraites (plus) volatiles : cette étape est indispensable pour permettre la séparation par chromatographie en phase gazeuse.

L'extrait sec est repris dans 100 µL de chloroforme 100 µL de BSTFA + 1% TMCS. Le tube est agité pendant 1 minute puis fermé hermétiquement à l'aide d'un bouchon adapté scellé au Parafilm. Le tout est incubé pendant 45 minutes à 80°C. À la fin de l'incubation, la réaction est stoppée et les vapeurs sont condensées par centrifugation à froid (2000g, 4°C) pendant 5 minutes.

Le contenu du tube en verre est transféré dans un vial adapté à l'injecteur de l'appareil.

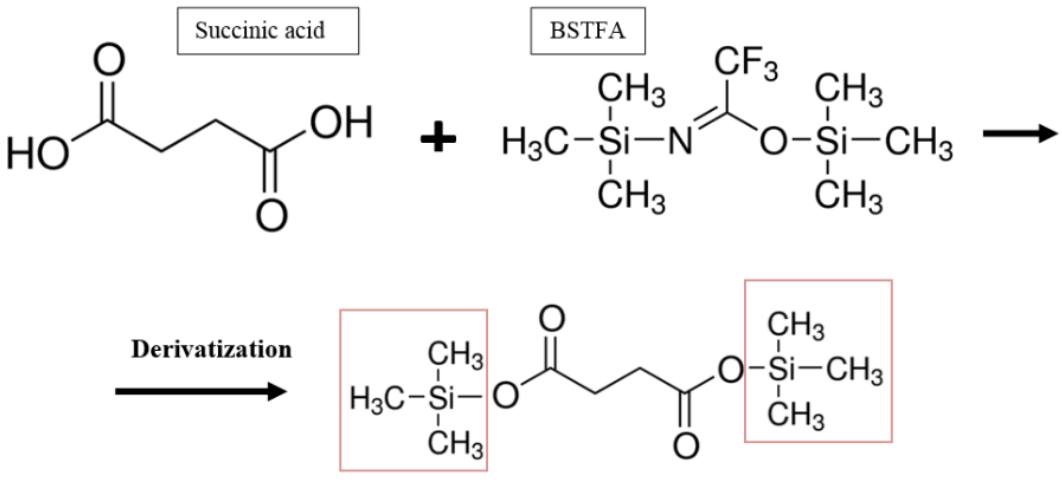


FIGURE 10 : DERIVATION DE L'ACIDE SUCCINIQUE PAR LE BSTFA. D'APRES LAURYNAS JARUKAS ET COLLABORATEURS

Modalités d'injection, de séparation et d'analyse

Le paramétrage de l'appareil est optimisé pour l'analyse et la quantification du succinate et du fumarate. Les différents réglages sont détaillés ci-dessous.

Injection :

Mode : Split 1/10
Volume d'injection : 1 µl
Température d'injection : 250°C

Colonne :

Colonne : Agilent VF-5MS 30m ×0.25mm×0.25µm
Composition : 95% diméthyl/5% phényl-polysiloxane
Gaz vecteur : Hélium N60
Débit du gaz vecteur : constant 1 ml/min
Mode d'acquisition : SIM

Four :

Température initiale : 100°C
Température finale : 280°C
Température de la ligne de transfert : 280°C

Plateaux de température (séparation chromatographique) :

Température (C°)	Montée (C°/min)	Plateau (min)	Temps cumulé (min)
100.0	0.0	2.00	2.00
130.0	5.0	0.00	8.00
280.0	30.0	10.00	23.00

Ions et temps de rétention :

Métabolite	Temps de rétention	Ion quantifiant	Ion qualifiant
Succinique	8,46 minutes	247	129
Succinique-D4	8,46 minutes	251	132
Fumarique	9 minutes	245	217
Fumarique-$^{13}C_4$	9 minutes	249	220

Calcul de la concentration

La concentration de l'analyte d'intérêt dans l'échantillon biologique est obtenue en rapportant la surface de son pic à celle du pic de l'étalon interne correspondant, selon la formule :

$$[C] = \frac{A}{A_{EI}} \times [EI]$$

avec [C] la concentration de l'analyte, [A] l'aire de l'analyte, [A_{EI}] l'aire de l'étalon interne et [EI] la concentration de l'étalon interne en solution.

Évaluation des performances du système analytique

Le développement d'une méthode de dosage en santé humaine implique une vérification des performances du système analytique, permettant ainsi de démontrer son aptitude à fournir des résultats fiables. Cette démarche est définie sous le terme "validation de méthode" et doit répondre à un ensemble de critères, dont les modalités pratiques sont précisées dans le document « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale ». Nous ne présentons ici que quelques critères fondamentaux de la partie analytique d'une validation de méthode.

Afin de se placer au plus près des conditions d'analyse et de s'affranchir d'un éventuel effet matrice, les essais ont été réalisés à partir de pools témoins préparés à partir d'un grand nombre de sérums collectés au sein du laboratoire juste avant leur élimination.

Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)

Les tests de fidélité permettent d'évaluer la capacité de la méthode à donner des résultats identiques. La détermination de la fidélité comprend la répétabilité et la reproductibilité ou fidélité intermédiaire, évaluées par l'écart type et le coefficient de variation.

La répétabilité permet d'estimer la justesse des résultats obtenus en l'absence de variation des conditions analytiques (opérateur, matériel, temporalité). En pratique, elle a été déterminée à partir de 8 extractions du même échantillon, sur trois niveaux de concentration. Le niveau 1 correspond au pool témoin dilué au cinquième. Le niveau 2 correspond au pool témoin extrait pur. Le niveau 3 correspond au pool témoin pur surchargé en succinate et fumarate par ajout d'un faible volume d'une solution témoin très fortement concentrée (spike).

La fidélité intermédiaire permet d'évaluer les résultats obtenus lors d'essais indépendants en faisant varier au moins une condition analytique. Des échantillons préparés de manière similaire à ceux utilisés pour l'essai de répétabilité ont été extraits 10 fois. Seules ont été évaluées la variabilité du processus dans le temps et la variabilité liée au matériel, la variabilité inter-opérateur n'a pas été évaluée.

Domaine de mesure et linéarité

La détermination de la limite de détection (LOD) et de quantification permettra de définir la plus petite concentration de l'analyte détectable ou quantifiable.

La limite de détection correspond à la plus petite concentration détectable par la méthode. En deçà, il est impossible d'affirmer avec un bon niveau de confiance que l'espèce chimique soit présente dans l'échantillon.

La limite de quantification correspond à la plus faible concentration quantifiable, autrement dit à la plus petite concentration pour laquelle les tests de répétabilités donnent un coefficient de variation inférieur à 15%.

Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ) peuvent être estimées par la méthode des blancs. En ce qui concerne la limite de détection, sa valeur estimée est égale à la moyenne des blancs plus cinq fois la valeur de l'écart-type des blancs. La limite de quantification est, quant à elle, égale à la moyenne des blancs plus dix fois l'écart type.

Pour ce faire, 10 blancs (NaCl seul) ont été extraits et le bruit de fond intégré.

$$LOD = M_{blanc} + 5\times\sigma_{blanc} \qquad LOQ = M_{blanc} + 10\times\sigma_{blanc}$$

avec M_{blanc} la moyenne des blancs et σ_{blanc} l'écart type des blancs.

Enfin la linéarité permet d'évaluer la réponse instrumentale du système analytique. La détermination de la linéarité permet de s'assurer que la méthode fournit une mesure proportionnelle à la concentration. Elle s'évalue à l'aide de la pente et du coefficient de détermination de la droite de corrélation. Pour ce faire, des solutions salines de concentration 0, 1, 2, 5, 10 µM ont été constituées, extraites et analysées. Les courbes de linéarité sont déterminées à partir des concentrations mesurées.

Utilisation du succinate et du fumarate en tant que biomarqueurs des PPG *SDHx*

Dans l'optique d'initier la réflexion quant à l'utilisation de ces deux métabolites comme biomarqueurs, le succinate et fumarate ont été quantifiés chez 7 patients porteurs d'une mutation *SDHx* (groupe *SDHx*). Les concentrations obtenues et le rapport succinate sur fumarate (S/F) ont été comparés à celles d'un groupe témoin (groupe WT).

Le groupe *SDHx* (n = 7) est composé de 6 patients *SDHD* et 1 patient *SDHA*. Parmi ces 7 patients, 5 présentaient un paragangliome évolutif au moment du prélèvement, un était en rémission et un était un sujet apparenté *SDHA* n'ayant jamais développé de PPG.

Le groupe WT est composé de 13 patients dont 4 présentant un PPG évolutif au moment du prélèvement, 3 en rémission et 6 sujets n'ayant jamais développé de PPG. Aucun d'entre eux ne présente de mutation *SDHx*.

Résultats

Évaluation des performances du système analytique

Répétabilité

La répétabilité permet d'estimer la justesse des résultats obtenus en l'absence de variation des conditions analytiques (opérateur, matériel, temporalité). Les résultats des différents essais sont présentés ci-dessous.

	Niveau 1		Niveau 2		Niveau 3	
Extrait	**Succinique**	**Fumarique**	**Succinique**	**Fumarique**	**Succinique**	**Fumarique**
1	1,87	0,48	10,7	3,11	27,8	20,2
2	1,89	0,48	10,7	2,80	27,3	20,1
3	1,77	0,46	10,6	2,83	27,6	20,7
4	1,69	0,48	10,4	2,87	28,0	20,2
5	1,79	0,46	10,4	3,11	27,4	21,1
6	1,83	0,46	10,5	3,10	27,6	20,7
7	1,85	0,45	10,4	2,84	27,5	20,7
8	1,86	0,46	10,3	3,05	27,5	20,1
Moyenne	**1,82**	**0,47**	**10,5**	**2,96**	**27,6**	**20,5**
Ecart type	**0,067**	**0,012**	**0,14**	**0,141**	**0,23**	**0,38**
CV	**3,70%**	**2,56%**	**1,36%**	**4,76%**	**0,82%**	**1,86%**

En l'absence de recommandations spécifiques sur la quantification du succinate et du fumarate, nous avons adopté le coefficient de variation habituellement admis pour les méthodes utilisant la spectrométrie de masse. Nous avons considéré qu'un coefficient de variation <15% était acceptable pour définir le caractère répétable de la méthode.

Les valeurs des coefficients de variation obtenus lors des essais sont bien en-deçà de l'objectif fixé : la méthode satisfait aux exigences de répétabilité aussi bien pour le dosage du succinate que pour celui du fumarate.

Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire permet d'évaluer la fidélité des mesures lorsque l'un des paramètres analytiques varie, notamment le manipulateur, la temporalité ou le matériel.

Au même titre que pour la répétabilité, le coefficient de variation maximal habituellement utilisé pour la fidélité intermédiaire est de 15%. Les résultats des différents essais figurent dans le tableau ci-dessous.

	Niveau 1 (µM)		Niveau 2 (µM)		Niveau 3 (µM)	
Extrait	**Succinique**	**Fumarique**	**Succinique**	**Fumarique**	**Succinique**	**Fumarique**
1	2,90	0,59	9,49	2,95	18,4	10,7
2	2,89	0,60	10,3	2,66	20,1	10,7
3	2,66	0,56	8,93	2,96	18,3	9,79
4	2,80	0,57	9,67	2,84	19,7	11,3
5	2,63	0,57	10,3	2,93	19,8	11,4
6	2,65	0,57	9,31	2,82	19,3	11,5
7	2,56	0,56	9,05	2,76	19,2	11,4
8	2,50	0,57	9,57	2,88	19,1	11,3
9	2,51	0,58	8,81	2,92	19,0	11,4
10	2,69	0,60	8,73	2,83	18,3	11,4
Moyenne	**2,68**	**0,58**	**9,42**	**2,86**	**19,1**	**11,1**
Ecart type	**0,144**	**0,015**	**0,564**	**0,094**	**0,65**	**0,535**
CV	**5,37%**	**2,59%**	**5,99%**	**3,30%**	**3,38%**	**4,83%**

Les valeurs des coefficients de variation obtenus sont bien en-deçà des objectifs analytiques fixés, la technique est jugée reproductible.

Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection correspond à la plus petite concentration détectable par la méthode. La limite de quantification correspond à la plus faible concentration quantifiable, autrement dit à la plus petite concentration pour laquelle les tests de répétabilités donnent un coefficient de variation inférieur à 15%.

	Blanc (µM)	
Extrait	**Succinique**	**Fumarique**
1	0,054	0,006
2	0,049	0,008
3	0,056	0,008
4	0,055	0,007
5	0,053	0,008
6	0,060	0,008
7	0,055	0,008
8	0,053	0,008
9	0,059	0,007
10	0,056	0,007
Moyenne	**0,055**	**0,008**
Ecart type	**0,0032**	**0,0007**
CV	**5,81%**	**8,88%**

A partir de ces résultats, nous avons pu déterminer la LOD et la LOQ des deux composés dans nos conditions expérimentales :

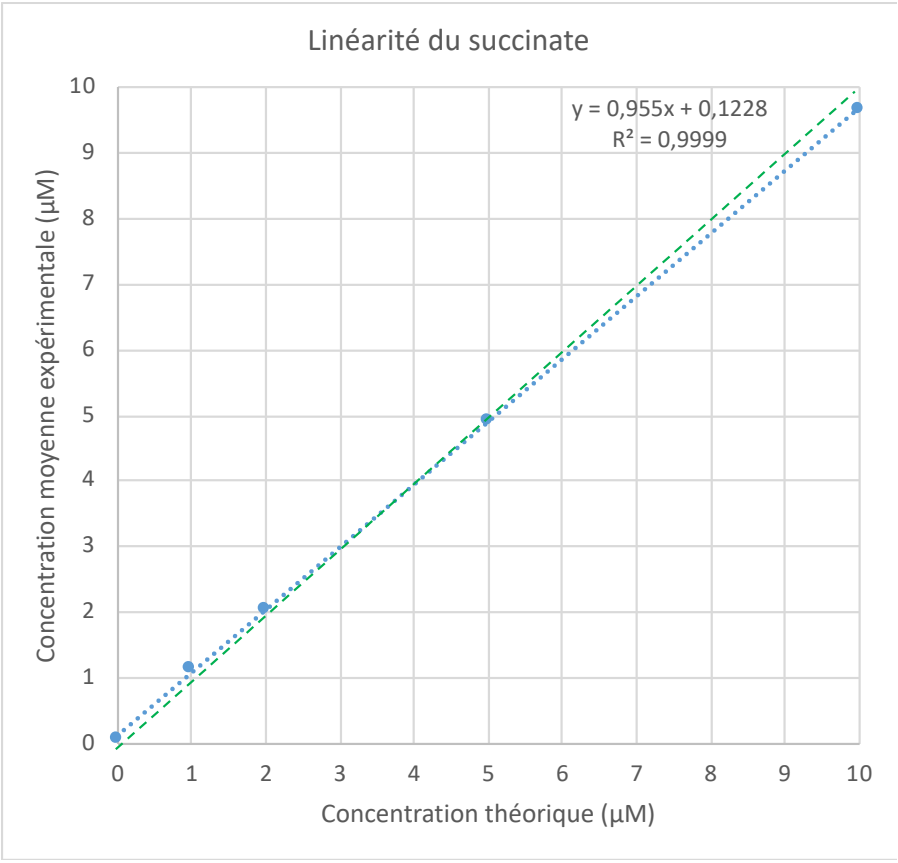
- Pour le succinate, LOD et LOQ sont respectivement égales à 0,071 et 0,087 µM
- Pour le fumarate, LOD et LOQ sont respectivement égales à 0,011 et 0,014 µM

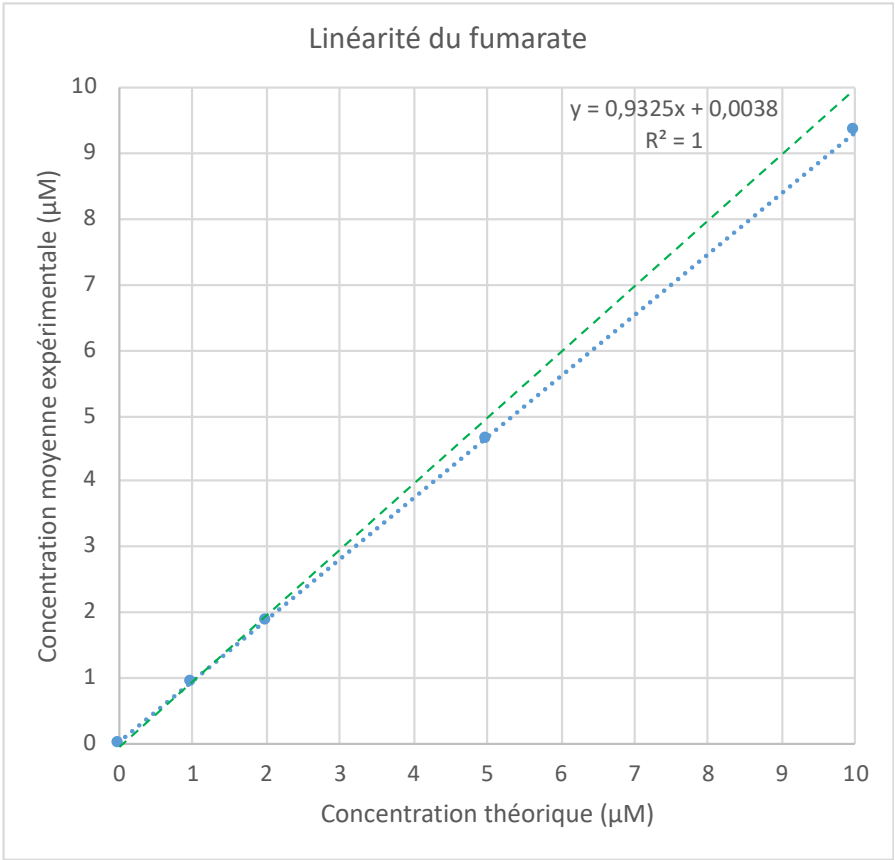
La LOQ constitue la limite inférieure de notre domaine de mesure.

Limite de linéarité et domaine de mesure

La détermination de la linéarité permet de s'assurer que la méthode fournit une mesure proportionnelle à la concentration. Elle s'évalue à l'aide de la pente et du coefficient de détermination de la droite de corrélation. Les résultats sont présentés ci-après. Sous réserve d'une imprécision lors de la pesée du fumarate, amenant des résultats légèrement plus bas qu'attendus, la méthode se révèle linéaire jusqu'à 10 µM.

La linéarité et la limite de quantification nous permettent de déterminer pour la méthode un domaine de mesure compris entre 0,014 et 10 µM pour le fumarate et entre 0,087 et 10 µM pour le succinate.


Linéarité du succinate
y = 0,955x + 0,1228
R² = 0,9999
Concentration moyenne expérimentale (µM)
Concentration théorique (µM)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10


Linéarité du fumarate
y = 0,9325x + 0,0038
R² = 1
Concentration moyenne expérimentale (µM)
Concentration théorique (µM)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

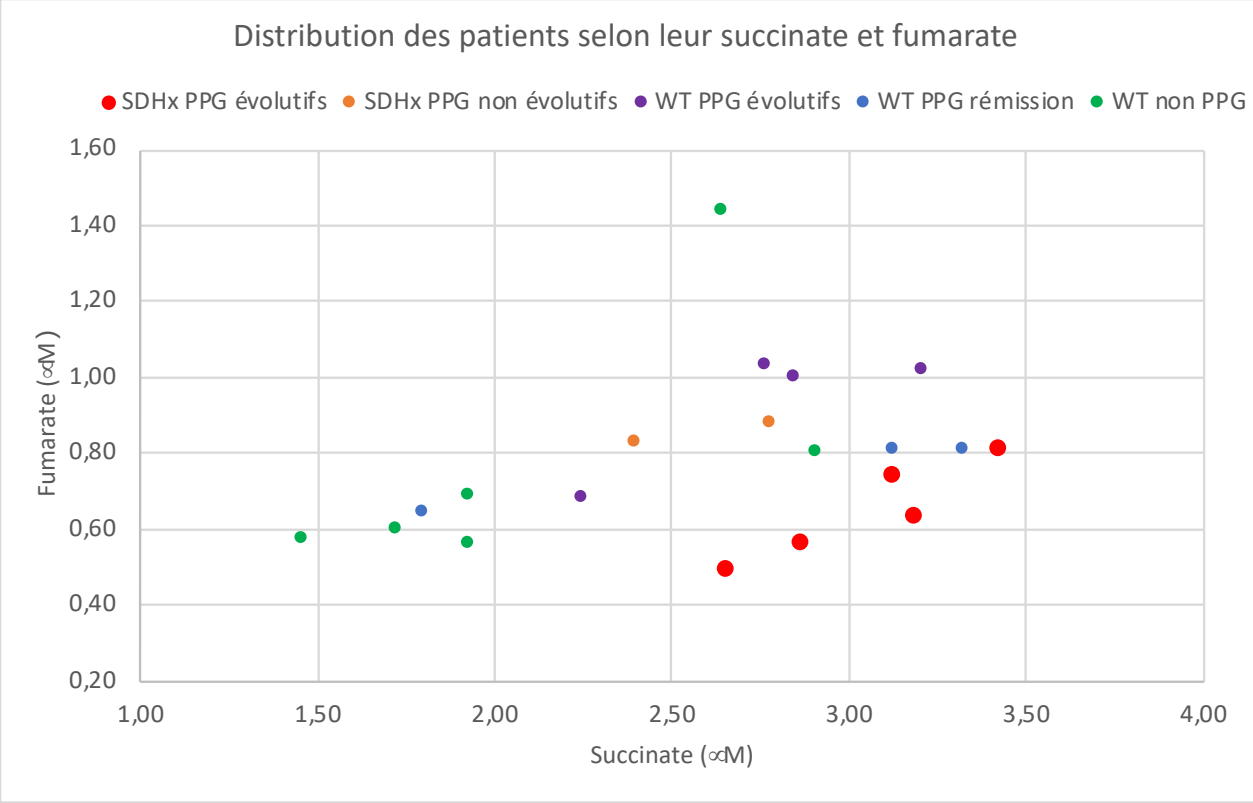
Utilisation du succinate et du fumarate en tant que biomarqueurs des PPG *SDHx*

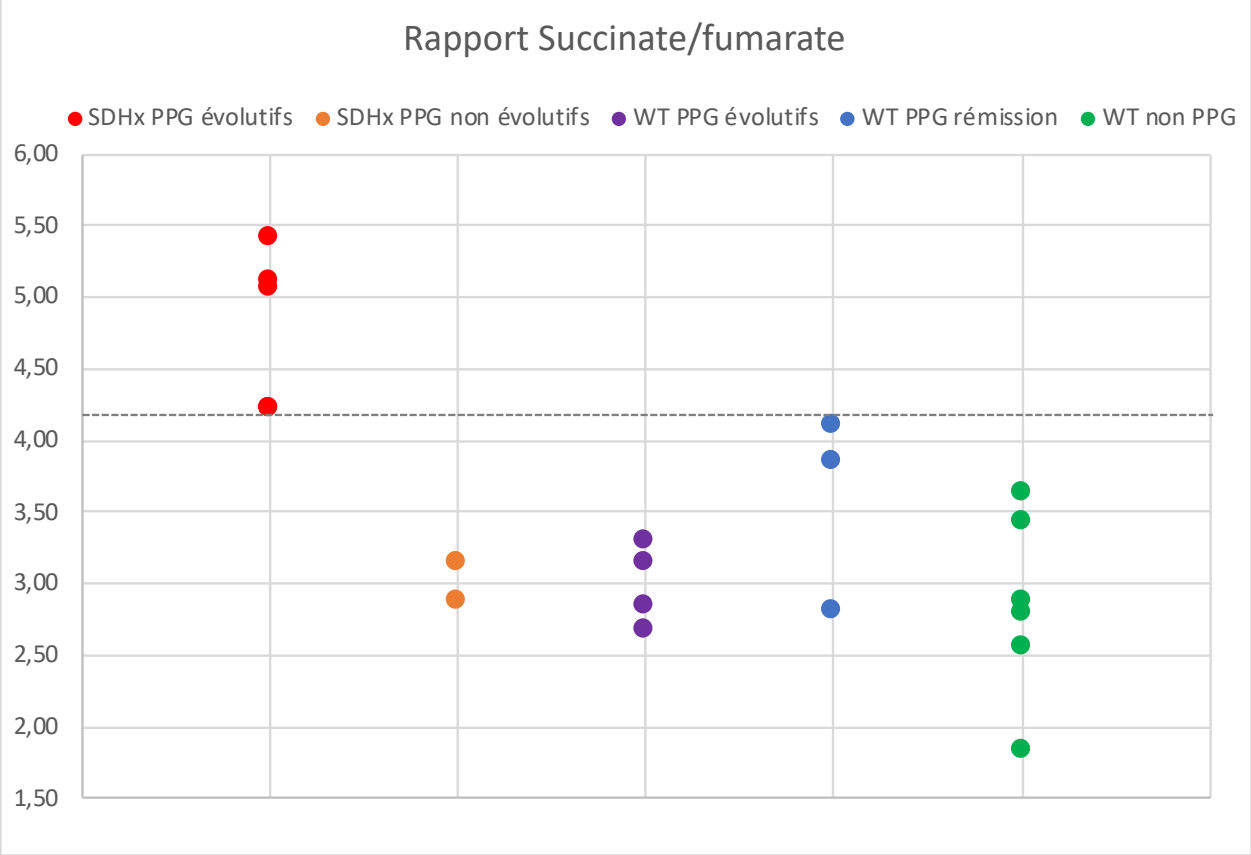
Dans l'optique d'initier la réflexion quant à l'utilisation de ces deux métabolites comme biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi des PPG *SDHx*, succinate et fumarate ont été quantifiés chez 7 patients porteurs d'une mutation *SDHx* (groupe *SDHx*) et 13 patients ne présentant pas de mutation *SDHx* (groupe WT). Les concentrations obtenues et le rapport succinate sur fumarate (S/F) sont présentées pour chaque patient testé, individuellement ou graphiquement. Les patients ont été regroupés en sous-groupes, selon le caractère évolutif ou non de leur PPG. Au vu du faible échantillonnage de chaque sous-groupe, la médiane a été calculée pour chaque paramètre, afin de mettre en évidence et discuter les tendances entre les sous-groupes.

Patient	PPG évolutif	Succinique (µM)	Fumarique (µM)	Rapport S/F
***SDHx*-1** ●	oui	2,66	0,49	5,43
***SDHx*-2** ●	oui	3,43	0,81	4,23
***SDHx*-3** ●	oui	3,13	0,74	4,23
***SDHx*-4** ●	oui	3,19	0,63	5,06
***SDHx*-5** ●	oui	2,87	0,56	5,13
***SDHx*-6** ●	non	2,40	0,83	2,89
***SDHx*-7** ●	non	2,78	0,88	3,16
WT-1 ●	oui	2,25	0,68	3,31
WT-2 ●	oui	2,85	1,00	2,85
WT-3 ●	oui	2,77	1,03	2,69
WT-4 ●	oui	3,21	1,02	3,15
WT-5 ●	rémission	1,80	0,64	2,81
WT-6 ●	rémission	3,33	0,81	4,11
WT-7 ●	rémission	3,13	0,81	3,86
WT-8 ●	non	2,65	1,44	1,84
WT-9 ●	non	1,46	0,57	2,56
WT-10 ●	non	2,91	0,80	3,64
WT-11 ●	non	1,93	0,69	2,80
WT-12 ●	non	1,73	0,60	2,88
WT-13 ●	non	1,93	0,56	3,45

Groupe	Médiane des concentrations (mM)		Rapport S/F
	Succinate	Fumarate	
***SDHx* (n=7)**	**2,87**	**0,74**	**4,24**
• **PPG évolutifs (n=5)**	3,13	0,63	5,08
• **absence de maladie évolutive (n=2)**	2,59	0,86	3,03
WT (n=13)	**2,65**	**0,80**	**2,88**
• **PPG évolutif (n=4)**	2,81	1,01	3,00
absence de maladie évolutive (n=9)	1,93	0,69	2,88
• ***rémission (n=3)***	*3,13*	*0,81*	*3,84*
• ***pas de PPG (n=6)***	*1,93*	*0,65*	*2,86*

Si on compare les résultats obtenus dans l'ensemble du groupe *SDHx* et du groupe WT, les médianes des concentrations du succinate et du fumarate sériques sont similaires entre les 2 groupes (2,87 *vs* 2,65 µM pour le succinate et 0,74 *vs* 0,80 µM pour le fumarate respectivement). En revanche, la différence entre les rapports des concentrations est importante (4,24 *vs* 2,88).





Si on considère individuellement les résultats, les patients *SDHx* qui présentent un PPG évolutif sont ceux pour lesquels le rapport succinate/fumarate est le plus élevé, qu'ils soient confrontés aux patients *SDHx* sans maladie évolutive ou à l'ensemble des patients WT. Les patients des groupes WT et *SDHx* ne présentant pas de maladie évolutive ont des concentrations sériques de succinate et de fumarate qui diffèrent, néanmoins leur rapport succinate/fumarate reste similaire.

Sous réserve de la petite taille de notre échantillon, le rapport succinate/fumarate pourrait constituer un marqueur d'évolutivité pour les patients *SDHx*, son augmentation témoignant d'une activité tumorale, et sa diminution d'une rémission de la pathologie.

Discussion

Les PPG présentent le plus haut degré d'héritabilité des tumeurs endocriniennes et s'inscrivent généralement dans le cadre de syndromes de prédisposition.

Les mutations SDHA SDHB SDHC SDHD et SDHAF2, responsables des syndromes paragangliomas 1 à 5, sont les plus fréquentes et représentent la majorité des PPG malins. La multiplicité des gènes susceptibles d'induire une dysfonction de la SDH rend la corrélation génotype/phénotype difficile et l'absence de marqueurs diagnostiques et pronostiques spécifiques font des PPG *SDHx* un vrai défi clinique.

L'inactivation de la SDH entraîne *in vitro* et *in vivo* une accumulation de succinate. Le succinate constitue donc un candidat de choix dans le cadre de la recherche de biomarqueurs diagnostiques et pronostiques des mutations *SDHx*.

Dans ce travail nous proposons une nouvelle méthode de quantification du succinate et du fumarate sériques par dilution isotopique. L'étape de validation d'un certain nombre de critères de qualité analytique est indispensable pour évaluer la fiabilité du processus analytique. En effet l'obtention de résultats fiables, répétables et reproductibles constitue le socle d'une interprétation juste des résultats dans la perspective d'une corrélation ultérieure avec le phénotype clinique.

Bien que les études métabolomiques publiées se soient préférentiellement portées sur la recherche d'une accumulation isolée du succinate dans les PPG *SDHx*, nous avons choisi ici d'envisager le dosage simultané du succinate et du fumarate. Ce choix repose sur le fait que lorsque l'activité d'une enzyme est réduite voire abolie, il en résulte une accumulation des substrats d'amont associée à une diminution des produits d'aval. La quantification des deux métabolites permet le calcul d'un rapport produit/substrat, qui témoigne indirectement de l'activité de la SDH et permet d'objectiver l'existence d'une dysfonction de l'enzyme. De plus ce double dosage n'implique pas une augmentation du temps technique ou matériel car l'usage de la spectrométrie de masse autorise une extraction et une quantification simultanée des deux métabolites.

L’utilisation de la dilution isotopique a été démocratisée du fait des progrès en spectrométrie de masse, de l’amélioration de l’accessibilité à des appareils de plus en plus sensibles et de la possibilité d’accéder à un coût raisonnable à des étalons internes marqués. Le couplage à une méthode séparative robuste telle que la chromatographie en phase gazeuse augmente grandement la performance de la méthode.

Une alternative aurait été l’utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). En effet, la LC/MS est utilisée en routine de laboratoire pour la séparation et la quantification d’un grand nombre de composés organiques, de petites molécules et de médicaments, pour lesquelles elle montre d'excellentes performances analytiques. Si elle possède une sensibilité supérieure à la GC/MS, la LC/MS est comparativement davantage sujette aux interférences induites par l'effet matrice ou la présence de composés interférents, entraînant une plus grande variabilité de formation des ions produits et susceptibles de réduire la robustesse de la méthode.

D’un point de vue théorique, il est actuellement impossible d’affirmer la supériorité de la d’une approche sur l’autre pour la quantification du succinate et du fumarate. Nous avons fait le choix d’une méthode de quantification par dilution isotopique en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) à la fois du fait de l'existence d’une base bibliographique importante et d’une expertise propre au laboratoire quant à son utilisation pour la quantification des acides organiques. En pratique, le fait d’utiliser conjointement la dilution isotopique et un mode de détection *SIM* pour l’acquisition des données offre à notre méthode une sensibilité suffisante.

La méthode de quantification du succinate et du fumarate a été adaptée à partir de méthodes utilisées en routine diagnostique par l’UF Métabolisme Général et Maladies rares du CHU de Lille. Ces méthodes ont fait leurs preuves quant à leur efficacité pour l’extraction et la quantification des acides organiques (dont le succinate et le fumarate) à partir d’un mélange complexe tel que les urines ou le sérum. Du fait de l'expérience du laboratoire, le processus analytique est bien maîtrisé. Néanmoins quelques contraintes propres au dosage du succinate et du fumarate pourraient en limiter la mise en place de la méthode en pratique courante.

1) La prise d’essai de 1 ml, volume nécessaire pour obtenir une bonne sensibilité de détection, impose le prélèvement d’un tube sec correctement rempli afin de garantir un volume de sérum adéquat (dosage initial et contrôle éventuel). Cette condition peut être limitante chez les patients avec un abord veineux difficile.
2) Un envoi rapide dans la glace, dans l’optique d’une décantation et d’une congélation rapide, a été choisi afin limiter l’activité mitochondriale lymphocytaire et une potentielle dégradation spontanée du succinate et du fumarate lors du transport. Ces précautions permettent de limiter les sources possibles d'interférences mais impose une bonne articulation entre le service clinique et le laboratoire de biologie médicale.

Ces éléments sont bien sûr susceptibles d’être adaptés par la suite, mais cette adaptation impliquerait la réalisation de tests supplémentaires à l’aide d’échantillons prélevés chez des patient présentant un PPG *SDHx* actif, afin de vérifier que la modification des paramètres n’affecte ni la sensibilité (pour la réduction de la prise d’essai) ni la fiabilité du test (pour les conditions d’acheminement, de prise en charge et de conservation).

Du point de vue des performances analytiques, notre méthode de dosage du succinate et du fumarate répond aux critères analytiques fondamentaux requis.

En ce qui concerne l’évaluation de la fidélité, les différents essais pratiqués ont retrouvé des valeurs bien en dessous du seuil retenu de 15% aussi bien en termes de répétabilité que de fidélité intermédiaire, et ce pour les 3 niveaux de concentration étudiés. De plus, les essais de répétabilité et de reproductibilité ont été effectués sur une matrice sérique, ce qui nous permet de nous affranchir d’un éventuel effet matrice : nous sommes en droit d’attendre le même niveau de performance chez les patients.

L'étude de la linéarité et de la limite inférieure de quantification (LOQ) nous a permis de définir un domaine de mesure de la méthode. Il est établi à [0,087-10 µM] pour le succinate, et [0,014-10 µM] pour le fumarate. Au vu des concentrations mesurées chez les différents patients et témoins que nous avons eu l’opportunité d’étudier au cours de ce travail, et en l’absence de valeurs de référence clairement définies dans la littérature

(à notre connaissance), ce domaine de mesure paraît adapté pour la recherche d'une accumulation de succinate et d'une diminution du fumarate. Il convient néanmoins de préciser que notre étude de linéarité comporte un biais. En effet, les solutions étalons permettant de comparer les valeurs mesurées aux valeurs théoriques ne respectent pas la matrice prévue dans le mode opératoire de la méthode. La quantification du succinate et du fumarate étant encore expérimentale, il n'existe actuellement pas de sérum à disposition avec une concentration théorique connue pouvant faire office de solution de référence. Ce biais de matrice ne nous permet pas de garantir une linéarité identique de la méthode dans le sérum. En nous basant sur les résultats des essais de répétabilité/fidélité intermédiaire obtenus à partir du pool témoin surchargé, nous pouvons extrapoler une limite supérieure de linéarité à 20 µM pour le succinate. Là encore, l'expérience d'une cohorte de patients plus large avec des concentrations de succinate peut-être supérieures nous permettrait de confirmer l'adéquation de notre domaine de mesure aux besoins diagnostiques, ou la nécessité de le réévaluer en utilisant une autre approche.

Au cours de ce travail, nous n'avons pas vérifié l'impact éventuel de l'hémolyse, de l'ictère ou de la lactescence, interférences connues, fréquentes et habituellement recherchées lors de l'évaluation des performances d'une méthode. Hémolyse, ictère et lactescence peuvent être associés à une double interférence, à la fois technique et biologique. Au niveau technique d'abord, les modalités d'extraction et la spécificité d'analyse du succinate et du fumarate de la méthode que nous utilisons sont telles que la qualité du résultat ne peut être analytiquement affectée par la présence éventuelle de bilirubine ou d'acides gras. Quant à l'hémoglobine, elle est précipitée et éliminée dès la première étape du processus d'extraction avec les autres protéines de l'échantillon. Il n'y a pas de justification technique à rechercher une telle interférence. D'un point de vue biologique, la présence de bilirubine ou d'acides gras et les processus pathologiques associés ne sont pas propre à interférer de manière directe avec la transformation du succinate en fumarate. Enfin, étant donné l'abondance du succinate et du fumarate au niveau intracellulaire, il conviendrait de vérifier si le relargage de ces métabolites dans le cadre d'une hémolyse est susceptible de perturber l'interprétation du résultat.

Dans l'optique d'une future étude portant sur l'indication du dosage combiné du succinate et du fumarate dans le diagnostic et le suivi des PPG *SDHx*, ces deux métabolites ont été quantifiés chez 20 patients : 7 patients porteurs d'une mutation *SDHx* (groupe *SDHx*) et 13 patients dépourvus de mutation *SDHx* (groupe WT). Le rapport succinate/fumarate ($R_{S/F}$) a été également calculé. Cette étude préliminaire est loin d'être assez puissante pour conclure sur la base de critères statistiques pertinents. Toutefois elle permet d'initier la réflexion sur les variations susceptibles d'être observées et d'émettre des hypothèses quant à l'utilisation conjointe de ces deux biomarqueurs en pratique clinique.

De manière intéressante, parmi l'ensemble des patients étudiés, c'est au sein du seul sous-groupe de patients porteurs de mutations *SDHx* et présentant un PPG évolutif qu'une augmentation de succinate et une diminution du fumarate sont mises en évidence, conduisant à une augmentation nette du rapport succinate/fumarate. Les résultats que nous obtenons corroborent les données actuelles de la littérature en objectivant une augmentation du succinate chez les patients *SDHx*. Toutefois le différentiel des concentrations observées entre les différents sous-groupes reste faible pour le succinate. Ceci nous laisse supposer que la recherche de la seule augmentation du succinate comme marqueur des mutations *SDHx* pourrait ne pas suffire à elle seule, notamment lorsqu'elle est appliquée au dépistage des sujets apparentés ainsi qu'au suivi des patients porteurs d'une prédisposition génétique. Ainsi la détermination du rapport succinate/fumarate nous paraît indispensable pour fournir une interprétation précise et pallier aux variations non spécifiques du succinate.

Au cours de cette étude préliminaire, nous avons également observé que le rapport succinate/fumarate était similaire entre l'ensemble du groupe WT et les patients porteurs d'une mutation *SDHx* sans maladie évolutive. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les patients avec une prédisposition induite par une mutation *SDHx* hétérozygote, ne présentent pas de dysfonction mitochondriale systémique et que seule la perte d'hétérozygotie initiant la tumorigenèse entraîne un défaut d'activité de la SDH.

Cette étude préliminaire a pour objectif d'orienter la réflexion quant à l'utilisation du succinate, du fumarate et du rapport des deux concentrations comme biomarqueurs des

phéochromocytomes et paragangliomes *SDHx*. Le rapport succinate/fumarate semble être le marqueur le plus discriminant des mutations *SDHx*. Le fait que son augmentation soit observée uniquement chez les patients présentant un PPG évolutif permet de proposer une application pour le diagnostic des mutations *SDHx* chez les patients présentant un PPG évolutif, ainsi que pour le suivi des patients porteurs de la prédisposition génétique.

Actuellement le diagnostic d'un des syndromes de prédisposition paragangliomas repose sur l'identification d'une mutation pathogène sur l'un des gènes codant la SDH. En cas de découverte d'un variant de signification inconnue, son imputabilité se fonde principalement sur l'histoire clinique du patient, les études de ségrégation, l'anatomopathologie, les bases de données génétiques et les logiciels de prédiction (120). Ainsi, le calcul du rapport succinate/fumarate pourrait constituer un argument supplémentaire dans la classification des variants de signification inconnue et pourrait ainsi limiter l'utilisation d'investigations plus poussées (activité enzymatique de la SDH ou études du transcriptome sur coupe tumorale).

Enfin, le suivi des patients porteurs d'un syndrome de prédisposition repose sur l'examen clinique, le dosage des métanéphrines et de la chromogranine A. L'imagerie est plus souvent indiquée mais peut manquer parfois de sensibilité notamment en cas de tumeur de petite taille, de localisation multiple, une rechute locale ou la découverte de métastases. Une ascension du rapport succinate/fumarate précédemment normal chez un patient porteur d'une mutation *SDHx* permettrait de détecter de manière précoce, une rechute ou le développement de métastases métachrones. De même, chez les sujets apparentés n'ayant jamais développé de PPG, une ascension du rapport marquerait l'entrée dans la maladie.

Au vu des données de la littérature, la méthode de dosage que nous proposons présente un avantage dans la mesure où la quantification associée du fumarate permet le calcul du rapport succinate/fumarate, reflet de l'activité de la SDH et sensibilise ainsi le test en permettant de mieux individualiser les patients porteurs d'une mutation *SDHx* et présentant un PPG évolutif.

Conclusion

Les phéochromocytomes et les paragangliomes sont des tumeurs neuroendocrines caractérisées par une présentation clinique et une localisation polymorphe. La présence de tumeurs multiples ou malignes, signe le plus souvent leur intégration dans un syndrome de prédisposition familiale engageant le pronostic à moyen et long terme. Les mutations des gènes de susceptibilité SDHA, SDHB, SDHC, SDHD et SDHAF2 sont les plus fréquentes et responsables d'une grande morbi-mortalité du fait de leurs risques de récidive ou de malignité. Ainsi, la découverte d'une mutation *SDHx* conditionnera le suivi du patient et conduira au dépistage des apparentés. Le suivi reste un élément essentiel dans la prise en charge des PPG *SDHx* et peut parfois être limité dans la détection précoce des lésions asymptomatiques ou des récidives. Cette limitation a motivé la recherche de nouveaux biomarqueurs spécifiques des PPG *SDHx*.

Dans cette optique, nous proposons ici une méthode de quantification simultanée du succinate et du fumarate en dilution isotopique, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'évaluation des performances du système analytique s'est révélée tout à fait satisfaisante et permet l'obtention de résultats fiables.

L'étude préliminaire réalisée chez quelques patients *SDHx* et non *SDHx* met en évidence le fait que le rapport des concentrations succinate/fumarate combiné au dosage du succinate soit plus prometteur que la recherche isolée d'une accumulation de succinate : nous proposons que l'intérêt de ce ratio soit évalué de manière plus poussée dans le diagnostic et le suivi des PPG *SDHx*.

Références

1. Chen H, Sippel RS, O'Dorisio MS, Vinik AI, Lloyd RV, Pacak K. *The North American Neuroendocrine Tumor Society Consensus Guideline for the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors: Pheochromocytoma, Paraganglioma, and Medullary Thyroid Cancer.* Pancreas. 2010;39(6):775-83.

2. Manger WM, Gifford RW. *Pheochromocytoma*. J Clin Hypertens Greenwich Conn.2002;4(1):62-72.

3. Bryant J, Farmer J, Kessler LJ, Townsend RR, Nathanson KL. *Pheochromocytoma: the expanding genetic differential diagnosis*. J Natl Cancer Inst. 2003;95(16):1196-204.

4. Berends AMA, Buitenwerf E, de Krijger RR, Veeger NJGM, van der Horst-Schrivers ANA, Links TP, et al. *Incidence of pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma in the Netherlands: A nationwide study and systematic review*. Eur J Intern Med. 2018;51:68-73.

5. Stenström G, Svärdsudd K. *Pheochromocytoma in Sweden 1958-1981. An analysis of the National Cancer Registry Data*. Acta Med Scand. 1986; 220(3):225-32.

6. Beard CM, Sheps SG, Kurland LT, Carney JA, Lie JT. *Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979.* Mayo Clin Proc. 1983;58(12):802-4.

7. King KS, Prodanov T, Kantorovich V, Fojo T, Hewitt JK, Zacharin M, et al. *Metastatic pheochromocytoma/paraganglioma related to primary tumor development in childhood or adolescence: significant link to SDHB mutations*. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2011;29(31):4137-42.

8. O'Riordain DS, Young WF, Grant CS, Carney JA, van Heerden JA. *Clinical spectrum and outcome of functional extraadrenal paraganglioma*. World J Surg. 1996;20(7):916-21; discussion 922.

9. Crona J, Taïeb D, Pacak K. *New Perspectives on Pheochromocytoma and Paraganglioma: Toward a Molecular Classification*. Endocr Rev. 2017;38(6):489-515.

10. Houdelet-Guerinot V, Flament J-B, Patey M, Gaillard D, Schvartz C, Cuperlier A, et al. *Incidence of phaechromocytoma and functional paraganglioma in Marne-Ardennes region, a twenty-year study*. :1

11. Timmers HJLM, Brouwers FM, Hermus ARMM, Sweep FCGJ, Verhofstad A a. J, Verbeek ALM, et al. *Metastases but not cardiovascular mortality reduces life expectancy following surgical resection of apparently benign pheochromocytoma*. Endocr Relat Cancer. 2008;15(4):1127-33.

12. Khorram-Manesh A, Jansson S, Wängberg B, Nilsson O, Tisell L-E, Ahlman H. *Mortality associated with pheochromocytoma: increased risk for additional tumors*. Ann N Y Acad Sci. 2006;1073:444-8.

13. Neumann HPH, Young WF, Eng C. *Pheochromocytoma and Paraganglioma*. N Engl J Med. 08 2019;381(6):552-65.

14. Farrugia F-A, Charalampopoulos A. *Pheochromocytoma*. Endocr Regul. 2019;53(3):191-212.

15. Benn DE, Gimenez-Roqueplo A-P, Reilly JR, Bertherat J, Burgess J, Byth K, et al. *Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes*. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(3):827-36.

16. Lenders JW, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Phaeochromocytoma. The Lancet. 20 août 2005;366(9486):665-75.

17. Nomura K, Kimura H, Shimizu S, Kodama H, Okamoto T, Obara T, et al. *Survival of patients with metastatic malignant pheochromocytoma and efficacy of combined cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine chemotherapy*. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(8):2850-6.

18. Stolk RF, Bakx C, Mulder J, Timmers HJLM, Lenders JWM. *Is the excess cardiovascular morbidity in pheochromocytoma related to blood pressure or to catecholamines?* J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(3):1100-6.

19. Goffredo P, Sosa JA, Roman SA. *Malignant pheochromocytoma and paraganglioma: a population level analysis of long-term survival over two decades.* J Surg Oncol. 2013;107(6):659-64.

20. Turkova H, Prodanov T, Maly M, Martucci V, Adams K, Widimsky J, et al. *Characteristics and outcomes of metastatic sdhb and sporadic pheochromocytoma/paraganglioma: an national institutes of health study*. Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol. 2016;22(3):302-14.

21. Welander J, Andreasson A, Juhlin CC, Wiseman RW, Bäckdahl M, Höög A, et al. *Rare germline mutations identified by targeted next-generation sequencing of susceptibility genes in pheochromocytoma and paraganglioma*. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(7):E1352-1360.

22. Crona J, Nordling M, Maharjan R, Granberg D, Stålberg P, Hellman P, et al. *Integrative genetic characterization and phenotype correlations in pheochromocytoma and paraganglioma tumours*. PloS One. 2014;9(1):e86756.

23. Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M, Nau V, et al. *Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant phaeochromocytomas*. Cancer Res. 2003;63(17):5615-21.

24. Neumann HPH, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, et al. *Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma*. N Engl J Med. 9 mai 2002;346(19):1459-66.

25. Crona J, Taïeb D, Pacak K. *New Perspectives on Pheochromocytoma and Paraganglioma: Toward a Molecular Classification*. Endocr Rev. 2017;38(6):489-515.

26. Lam AK-Y. *Update on Adrenal Tumours in 2017 World Health Organization (WHO) of Endocrine Tumours*. Endocr Pathol. 2017;28(3):213-27.

27. Roman-Gonzalez A, Jimenez C. *Malignant pheochromocytoma-paraganglioma: pathogenesis, TNM staging, and current clinical trials*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2017;24(3):174-83.

28. Eisenhofer G, Peitzsch M. *Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma*. Clin Chem. 2014;60(12):1486-99.

29. Eisenhofer G, Huynh TT, Hiroi M, Pacak K. *Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma*. Rev Endocr Metab Disord. 2001;2(3):297-311.

30. Eisenhofer G, Pacak K, Huynh T-T, Qin N, Bratslavsky G, Linehan WM, et al. *Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in phaeochromocytoma*. Endocr Relat Cancer. 2011;18(1):97-111.

31. Eisenhofer G, Huynh T-T, Pacak K, Brouwers FM, Walther MM, Linehan WM, et al. *Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome*. Endocr Relat Cancer. 2004;11(4):897-911.

32. Plouin PF, Amar L, Dekkers OM, Fassnacht M, Gimenez-Roqueplo AP, Lenders JWM, et al. *European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a phaeochromocytoma or a paraganglioma*. Eur J Endocrinol. 2016;174(5):G1-10.

33. Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo A-P, Grebe SKG, Murad MH, et al. *Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(6):1915-42.

34. van Duinen N, Steenvoorden D, Kema IP, Jansen JC, Vriends AHJT, Bayley JP, et al. *Increased urinary excretion of 3-methoxytyramine in patients with head and neck paragangliomas*. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(1):209-14.

35. Castinetti F, Kroiss A, Kumar R, Pacak K, Taieb D. *15 years of paraganglioma: imaging and imaging-based treatment of pheochromocytoma and paraganglioma*. Endocr Relat Cancer. 2015;22(4):T135-145.

36. Jalil ND, Pattou FN, Combemale F, Chapuis Y, Henry JF, Peix JL, et al. *Effectiveness and limits of preoperative imaging studies for the localisation of pheochromocytomas and paragangliomas: a review of 282 cases*. *French Association of Surgery (AFC), and The French Association of Endocrine Surgeons (AFCE)*. Eur J Surg Acta Chir. 1998;164(1):23-8.

37. Ganguly A, Henry DP, Yune HY, Pratt JH, Grim CE, Donohue JP, et al. *Diagnosis and localization of pheochromocytoma. Detection by measurement of urinary norepinephrine excretion during sleep, plasma norepinephrine concentration and computerized axial tomography (CT-scan)*. Am J Med. 1979;67(1):21-6.

38. Janssen I, Blanchet EM, Adams K, Chen CC, Millo CM, Herscovitch P, et al. *Superiority of [68Ga]-DOTATATE PET/CT to Other Functional Imaging Modalities in the Localization of SDHB-Associated Metastatic Pheochromocytoma and Paraganglioma*. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2015;21(17):3888-95.

39. Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Höllt V, Schulz S, Steinke R, et al. *Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy*. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(11):5150-7.

40. Timmers HJLM, Chen CC, Carrasquillo JA, Whatley M, Ling A, Eisenhofer G, et al. *Staging and functional characterization of pheochromocytoma and paraganglioma by 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) positron emission tomography*. J Natl Cancer Inst. 2 mai 2012;104(9):700-8.

41. Shulkin BL, Koeppe RA, Francis IR, Deeb GM, Lloyd RV, Thompson NW. *Pheochromocytomas that do not accumulate metaiodobenzylguanidine: localization with PET and administration of FDG*. Radiology.1993;186(3):711-5.

42. Castinetti F, Qi X-P, Walz MK, Maia AL, Sansó G, Peczkowska M, et al. *Outcomes of adrenal-sparing surgery or total adrenalectomy in phaeochromocytoma associated with multiple endocrine neoplasia type 2: an international retrospective population-based study*. Lancet Oncol. 2014;15(6):648-55.

43. Walz MK, Alesina PF, Wenger FA, Deligiannis A, Szuczik E, Petersenn S, et al. *Posterior retroperitoneoscopic adrenalectomy--results of 560 procedures in 520 patients. Surgery*. 2006;140(6):943-8; discussion 948-950.

44. Moore MG, Netterville JL, Mendenhall WM, Isaacson B, Nussenbaum B. *Head and Neck Paragangliomas: An Update on Evaluation and Management*. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 2016;154(4):597-605.

45. Vogel J, Atanacio AS, Prodanov T, Turkbey BI, Adams K, Martucci V, et al. *External beam radiation therapy in treatment of malignant pheochromocytoma and paraganglioma*. Front Oncol. 2014;4:166.

46. Dupin C, Lang P, Dessard-Diana B, Simon J-M, Cuenca X, Mazeron J-J, et al. *Treatment of head and neck paragangliomas with external beam radiation therapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2014;89(2):353-9.

47. Pacak K. *Preoperative management of the pheochromocytoma patient. J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(11):4069-79.

48. Hamidi O, Young WF, Iñiguez-Ariza NM, Kittah NE, Gruber L, Bancos C, et al. *Malignant Pheochromocytoma and Paraganglioma: 272 Patients Over 55 Years. J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(9):3296-305.

49. Rednam SP, Erez A, Druker H, Janeway KA, Kamihara J, Kohlmann WK, et al. *Von Hippel-Lindau and Hereditary Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndromes: Clinical Features, Genetics, and Surveillance Recommendations in Childhood*. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2017;23(12):e68-75.

50. Kong G, Grozinsky-Glasberg S, Hofman MS, Callahan J, Meirovitz A, Maimon O, et al. *Efficacy of Peptide Receptor Radionuclide Therapy for Functional Metastatic Paraganglioma and Pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab. 2017;102(9):3278-87.

51. Van Essen M, Krenning EP, Kooij PP, Bakker WH, Feelders RA, de Herder WW, et al. *Effects of therapy with [177Lu-DOTA0, Tyr3]octreotate in patients with paraganglioma, meningioma, small cell lung carcinoma, and melanoma*. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med. 2006;47(10):1599-606.

52. Gonias S, Goldsby R, Matthay KK, Hawkins R, Price D, Huberty J, et al. *Phase II study of high-dose [131I]metaiodobenzylguanidine therapy for patients with metastatic pheochromocytoma and paraganglioma*. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2009;27(25):4162-8.

53. Loh KC, Fitzgerald PA, Matthay KK, Yeo PP, Price DC. *The treatment of malignant pheochromocytoma with iodine-131 metaiodobenzylguanidine (131I-MIBG): a comprehensive review of 116 reported patients*. J Endocrinol Invest. 1997;20(11):648-58.

54. Huang H, Abraham J, Hung E, Averbuch S, Merino M, Steinberg SM, et al. *Treatment of malignant pheochromocytoma/paraganglioma with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine: recommendation from a 22-year follow-up of 18 patients*. Cancer. 2008;113(8):2020-8.

55. Averbuch SD, Steakley CS, Young RC, Gelmann EP, Goldstein DS, Stull R, et al. *Malignant pheochromocytoma: effective treatment with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine*. Ann Intern Med. 1988;109(4):267-73.

56. Niemeijer ND, Alblas G, van Hulsteijn LT, Dekkers OM, Corssmit EPM. *Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine and dacarbazine for malignant paraganglioma and pheochromocytoma: systematic review and meta-analysis*. Clin Endocrinol (Oxf). 2014;81(5):642-51.

57. Favier J, Amar L, Gimenez-Roqueplo A-P. *Paraganglioma and phaeochromocytoma: from genetics to personalized medicine*. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(2):101-11.

58. Dahia PLM. *Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity*. Nat Rev Cancer. 2014;14(2):108-19.

59. Cascón A, Pita G, Burnichon N, Landa I, López-Jiménez E, Montero-Conde C, et al. *Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma in Spanish patients*. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(5):1701-5.

60. Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, et al. *Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma*. Am J Hum Genet. 2001;69(1):49-54.

61. Niemann S, Müller U. *Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3*. Nat Genet. 2000;26(3):268-70.

62. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, et al. *Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma*. Science. 2000;287(5454):848-51.

63. Burnichon N, Brière J-J, Libé R, Vescovo L, Rivière J, Tissier F, et al. *SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. Hum Mol Genet*. 2010;19(15):3011-20.

64. Hao H-X, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephoure N, Bayley J-P, Kunst H, et al. *SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma*. Science. 2009;325(5944):1139-42.

65. Rasheed MRHA, Tarjan G. *Succinate Dehydrogenase Complex: An Updated Review*. Arch Pathol Lab Med. 2018;142(12):1564-70.

66. Castro-Vega LJ, Buffet A, De Cubas AA, Cascón A, Menara M, Khalifa E, et al. *Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas*. Hum Mol Genet. 2014;23(9):2440-6.

67. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. *Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase*. Cancer Cell. 2005;7(1):77-85.

68. Masoud GN, Li W. *HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy*. Acta Pharm Sin B. 2015;5(5):378-89.

69. Ben Lassoued A, Beaufils N, Dales J-P, Gabert J. *Hypoxia-inducible factor-1α as prognostic marker*. Expert Opin Med Diagn. janv 2013;7(1):53-70.

70. Pasini B, Stratakis CA. *SDH mutations in tumorigenesis and inherited endocrine tumours: lesson from the phaeochromocytoma-paraganglioma syndromes*. J Intern Med. 2009;266(1):19-42.

71. Kantorovich V, King KS, Pacak K. *SDH-related pheochromocytoma and paraganglioma*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. juin 2010;24(3):415-24.

72. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. *Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease*. Mitochondrion. 2010;10(4):393-401.

73. Hes FJ, van der Luijt RB, Janssen ALW, Zewald RA, de Jong GJ, Lenders JW, et al. *Frequency of Von Hippel-Lindau germline mutations in classic and non-classic Von Hippel-Lindau disease identified by DNA sequencing, Southern blot analysis and multiplex ligation-dependent probe amplification*. Clin Genet. 2007;72(2):122-9.

74. Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. *Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene.* Science. 1993;260(5112):1317-20.

75. Jochmanová I, Yang C, Zhuang Z, Pacak K. *Hypoxia-inducible factor signaling in pheochromocytoma: turning the rudder in the right direction*. J Natl Cancer Inst. 2013;105(17):1270-83.

76. Pacak K, Jochmanova I, Prodanov T, Yang C, Merino MJ, Fojo T, et al. *New syndrome of paraganglioma and somatostatinoma associated with polycythemia.* J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 mai 2013;31(13):1690-8.

77. Zhuang Z, Yang C, Lorenzo F, Merino M, Fojo T, Kebebew E, et al. *Somatic HIF2A gain-of-function mutations in paraganglioma with polycythemia*. N Engl J Med. 2012;367(10):922-30.

78. Fishbein L, Leshchiner I, Walter V, Danilova L, Robertson AG, Johnson AR, et al. *Comprehensive Molecular Characterization of Pheochromocytoma and Paraganglioma.* Cancer Cell. 2017;31(2):181-93.

79. Carney JA, Sheps SG, Go VL, Gordon H. *The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma*. N Engl J Med. 1977;296(26):1517-8.

80. Boikos SA, Pappo AS, Killian JK, LaQuaglia MP, Weldon CB, George S, et al. *Molecular Subtypes of KIT/PDGFRA Wild-Type Gastrointestinal Stromal Tumors: A Report From the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic*. JAMA Oncol. 2016;2(7):922-8.

81. Van Hulsteijn LT, Dekkers OM, Hes FJ, Smit JWA, Corssmit EPM. *Risk of malignant paraganglioma in SDHB-mutation and SDHD-mutation carriers: a systematic review and meta-analysis*. J Med Genet. 2012;49(12):768-76.

82. Casey R, Garrahy A, Tuthill A, O'Halloran D, Joyce C, Casey MB, et al. *Universal genetic screening uncovers a novel presentation of an SDHAF2 mutation*. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(7):E1392-1396.

83. Bausch B, Schiavi F, Ni Y, Welander J, Patocs A, Ngeow J, et al. *Clinical Characterization of the Pheochromocytoma and Paraganglioma Susceptibility Genes SDHA, TMEM127, MAX, and SDHAF2 for Gene-Informed Prevention*. JAMA Oncol. 2017;3(9):1204-12.

84. Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, et al. *Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation*. Science. 2003;299(5607):700-4.

85. Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, et al. *Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II*. Cell. 2005;121(7):1043-57.

86. Finley LWS, Haas W, Desquiret-Dumas V, Wallace DC, Procaccio V, Gygi SP, et al. *Succinate Dehydrogenase Is a Direct Target of Sirtuin 3 Deacetylase Activity*. PLOS ONE. 2011;6(8):e23295.

87. Dibrov E, Fu S, Lemire BD. *The Saccharomyces cerevisiae TCM62 gene encodes a chaperone necessary for the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase (complex II)*. J Biol Chem. 1998;273(48):32042-8.

88. Klanner C, Neupert W, Langer T. *The chaperonin-related protein Tcm62p ensures mitochondrial gene expression under heat stress*. FEBS Lett. 2000;470(3):365-9.

89. Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, Horvath R, Klopstock T, Lochmüller H, et al. *SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy*. Nat Genet. 2009;41(6):654-6.

90. Shi Y, Ghosh MC, Tong W-H, Rouault TA. *Human ISD11 is essential for both iron-sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis*. Hum Mol Genet. 2009;18(16):3014-25.

91. Moosavi B, Berry EA, Zhu X-L, Yang W-C, Yang G-F. *The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics*. Cell Mol Life Sci. 1 oct 2019;76(20):4023-42.

92. Moosavi B, Zhu X-L, Yang W-C, Yang G-F. *Molecular pathogenesis of tumorigenesis caused by succinate dehydrogenase defect*. Eur J Cell Biol. 2020;99(1):151057.

93. Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, et al. *Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations*. Hum Mol Genet. 2005;14(15):2231-9.

94. Rankin E, Giaccia A. *The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. Cell Death Differ*. 2008;15(4):678-85.

95. Pollard PJ, El-Bahrawy M, Poulsom R, Elia G, Killick P, Kelly G, et al. *Expression of HIF-1alpha, HIF-2alpha (EPAS1), and their target genes in paraganglioma and pheochromocytoma with VHL and SDH mutations*. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(11):4593-8.

96. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze C, Hörstrup JH, Warnecke C, et al. *Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2α in distinct cell populations of different organs*. FASEB J. 2003;17(2):271-3.

97. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. *Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia*. Yale J Biol Med. 2007;80(2):51-60.

98. Dvorak HF. *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy*. J Clin Oncol. 2002;20(21):4368-80.

99. Bayley J-P, Devilee P. *Warburg tumours and the mechanisms of mitochondrial tumour suppressor genes. Barking up the right tree?* Curr Opin Genet Dev. 2010;20(3):324-9.

100. Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. *Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation*. Mol Cell Biol. 2003;23(24):9361-74.

101. Gordan JD, Bertout JA, Hu C-J, Diehl JA, Simon MC. *HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity*. Cancer Cell. avr 2007;11(4):335-47.

102. Evans AJ, Russell RC, Roche O, Burry TN, Fish JE, Chow VWK, et al. *VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snai*l. Mol Cell Biol. 2007;27(1):157-69.

103. Esteban MA, Tran MGB, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, et al. *Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor*. Cancer Res. 1 2006;66(7):3567-75.

104. Favier J, Amar L, Gimenez-Roqueplo AP. *Paraganglioma and phaeochromocytoma: from genetics to personalized medicine*. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(2):101-11.

105. Markovich D. *Sodium-sulfate/carboxylate cotransporters (SLC13).* Curr Top Membr. 2012;70:239-56.

106. Salminen A, Kauppinen A, Hiltunen M, Kaarniranta K. *Krebs cycle intermediates regulate DNA and histone methylation: epigenetic impact on the aging process*. Ageing Res Rev. 2014;16:45-65.

107. Laukka T, Mariani CJ, Ihantola T, Cao JZ, Hokkanen J, Kaelin WG, et al. *Fumarate and Succinate Regulate Expression of Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes*. J Biol Chem. 2016;291(8):4256-65.

108. Letouzé E, Martinelli C, Loriot C, Burnichon N, Abermil N, Ottolenghi C, et al. *SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma*. Cancer Cell. 2013;23(6):739-52.

109. Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Pacak K, Neuzil J. *Mitochondrial Complex II: At the Crossroads*. Trends Biochem Sci. 2017;42(4):312-25.

110. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. *Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis*. Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg. 2016;1857(8):1086-101.

111. Gilissen J, Jouret F, Pirotte B, Hanson J. *Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function*. Pharmacol Ther. 2016;159:56-65.

112. Cook SJ, Stuart K, Gilley R, Sale MJ. *Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling*. FEBS J. 2017;284(24):4177-95.

113. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. *MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene*. 2007;26(22):3279-90.

114. Murphy MP. *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J. 1 2009;417(1):1-13.

115. Grimm S. *Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis*. Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg. 2013;1827(5):565-72.

116. Slane BG, Aykin-Burns N, Smith BJ, Kalen AL, Goswami PC, Domann FE, et al. *Mutation of Succinate Dehydrogenase Subunit C Results in Increased O2·−, Oxidative Stress, and Genomic Instability*. Cancer Res. 2006;66(15):7615-20.

117. Hobert JA, Mester JL, Moline J, Eng C. Elevated Plasma Succinate Among PTEN, SDHB and SDHD Mutation Positive Individuals. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. juin 2012;14(6):616.

118. Lussey-Lepoutre C, Bellucci A, Morin A, Buffet A, Amar L, Janin M, et al. *In Vivo Detection of Succinate by Magnetic Resonance Spectroscopy as a Hallmark of SDHx Mutations in Paraganglioma*. Clin Cancer Res. 2016;22(5):1120-9.

119. Lendvai N, Pawlosky R, Bullova P, Eisenhofer G, Patocs A, Veech RL, et al. *Succinate-to-fumarate ratio as a new metabolic marker to detect the presence of SDHB/D-related paraganglioma: initial experimental and ex vivo findings*. Endocrinology. 2014;155(1):27-32.

120. ANPGM • Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire. *Réseau TENGEN des laboratoires d'oncogénétique, tumeurs endocrines rares GTE-DHOS-INCA paragangliomes et pheochromocytomes*. 2015

AUTEUR : **Nom : BANCEL** **Prénom : Léo-Paul**

Date de soutenance : **8 décembre 2020**

Titre de la thèse :

Validation d'une méthode de dosage simultané du succinate et du fumarate en dilution isotopique, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Application aux phéochromocytomes et aux paragangliomes héréditaires *SDHx*

Thèse - Médecine - Lille 2020

Cadre de classement : *Biologie médicale*

DES + spécialité : *Biologie médicale*

Mots-clés : succinate - fumarate - phéochromocytome - paragangliome - SDH - spectrométrie de masse - chromatographie en phase gazeuse

Contexte : Les syndromes *Paragangliomas* sont caractérisés par la présence d'une mutation constitutionnelle, pathogène, sur les gènes *SDHA, SDHB, SDHC, SDHD* ou *SDHAF2* (gènes *SDHx*). L'inactivation de l'un des gènes *SDHx* conduit une accumulation de succinate. L'objectif de ce travail a été de développer une méthode de quantification du succinate et du fumarate, respectivement substrat et produit de la SDH et potentiels biomarqueurs des mutations *SDHx*.

Méthode : Nous proposons une nouvelle méthode de dosage du succinate et du fumarate sériques en dilution isotopique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Après avoir évalué les performances du système analytique, nous avons comparé les concentrations sériques obtenues chez des patients porteurs d'une mutation *SDHx* (présentant une maladie active ou non) à un groupe contrôle (WT).

Résultats : Les critères de validation de la méthode ont été respectés. Nous avons pu observer que les patients avec une maladie active présentent un rapport succinate/fumarate supérieur au groupe WT. De manière intéressante les patients mutés sans phéochromocytome ou paragangliome actif présentent un rapport similaire au groupe témoin.

Conclusion : Notre méthode s'avère robuste et pourra ainsi être utilisée dans le cadre d'une future étude évaluant l'utilisation du succinate et du fumarate sériques comme biomarqueur des mutations *SDHx*. L'étude préliminaire nous a permis d'orienter la réflexion quant à leur utilisation, mettant particulièrement l'accent sur l'intérêt de la détermination du rapport succinate/fumarate. Ce rapport pourrait être appliqué au dépistage des sujets apparentés mutés, une élévation signant l'entrée dans la maladie, mais également dans le suivi des patients traités en permettant la détection précoce d'une rechute ou l'apparition de métastases.

<u>Composition du Jury</u> :

Président :	**Monsieur le Professeur Pascal PIGNY**
Assesseurs :	**Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU**
	Madame le Docteur Catherine CARDOT-BAUTERS
	Madame le Docteur Lucie COPPIN
Directeur de thèse :	**Madame le Docteur Anne-Frédérique DESSEIN**