



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2024

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Détection des oncométabolites circulants par MRM chez les
patients porteurs de mutations SDHx**

Présentée et soutenue publiquement le 26 septembre 2024 à 16h
au Pôle Formation
Par Ronny LEFINT

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Pascal PIGNY

Assesseurs :

Madame le Docteur Catherine CARDOT BAUTERS

Madame le Docteur Lucie COPPIN

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Leo-Paul BANCEL

*Laboratoire d'Hormonologie, métabolisme, Nutrition, Oncologie
CHU de Lille*

TABLE DES MATIERES

Table des matières	3
Table des abréviations	5
Table des figures	7
Table des tableaux	9
1 Introduction	11
1.1 Épidémiologie	11
1.2 Clinique.....	12
1.3 Diagnostic et prise en charge	13
1.3.1 Diagnostic biochimique	13
1.3.2 Diagnostic radiologique.....	14
1.3.3 Prise en charge	15
1.4 La succinate déshydrogénase	16
1.4.1 Structure et fonctions	16
1.4.2 Mécanismes oncogénétiques.....	17
1.4.3 Corrélation phénotype-génotype.....	22
1.5 Diagnostic génétique	23
1.5.1 Séquençage et classification des variants	23
1.5.2 Problématique des variants de signification incertaine (VSI).....	24
1.6 Suivi des patients et des apparentés mutés	29
1.6.1 Patients	29
1.6.2 Apparentés mutés	29
1.7 Problématique du suivi	31
1.8 Perspectives d'amélioration du diagnostic et du suivi	31
2 Objectifs de la thèse	33
3 Matériel et méthode	35

3.1	Population	35
3.2	Analyse Génétique	38
3.3	Prélèvement et préparation des échantillons.....	38
3.4	Quantification succinate, du fumarate et de l'alpha-cétoglutarate	38
3.5	Évaluation des performances analytiques	40
3.5.1	Fidélité.....	40
3.5.2	Linéarité et domaine de mesure.....	41
4	Résultats	43
4.1	Évaluation des performances de la méthode	43
4.1.1	Répétabilité	43
4.1.2	Fidélité intermédiaire	43
4.1.3	Limites de détection de quantification	46
4.1.4	Linéarité et domaine de mesure.....	49
4.2	Utilisation du succinate, du fumarate et de l'alpha-cétoglutarate en tant que biomarqueurs	51
5	Discussion	59
5.1	Analyse critique des résultats de validation de méthode.....	59
5.2	Analyse critique des données de suivi longitudinal	60
6	Conclusion	67
7	Bibliographie.....	69

TABLE DES ABREVIATIONS

ARD1	<i>Arrest defective protein 1</i>
CGA	Chromogranine A
CV	Coefficient de Variation
DDM	Domaine de mesure
ENG	Endogline
FIH-1	<i>Hypoxia Inductible Factor Inhibitor</i>
HIF	<i>Hypoxia Inductible Factor</i>
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
IGF-2	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
IHC	Immunohistochimie
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KDM	<i>Histone lysine demethylase</i>
LEP	Leptine
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
LRP1	<i>LDL-receptor-related protein 1</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MMI	Membrane Mitochondriale Interne

NGS	Séquençage de Nouvelle Génération
PHD	<i>Prolyl Hydroxylase Domain protein</i>
PPG	Phéochromocytomes et paragangliomes
pVHL	protéine Von Hippel-Lindau
SDH	Succinate Déshydrogénase
SDHx	Gènes <i>SDHA</i> , <i>SDHB</i> , <i>SDHC</i> , <i>SDHD</i> et <i>SDHAF2</i>
SNP array	<i>Single Nucleotide Polymorphism array</i>
TDM	Tomodensitométrie
TEP	Tomographie par Émission de Position
TET	<i>Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase</i>
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor alpha</i>
TGF- β 3	<i>Transforming Growth Factor beta 3</i>
VEGF	Facteur de croissance endothéliale vasculaire
VSI	Variant de Significations Indéterminée

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : IRM et scintigraphie de paragangliomes de la tête et du cou	14
Figure 2 : Réaction enzymatique du complexe SDH.	17
Figure 3 : Structure et régulation de HIF-1 α	18
Figure 4 : Stabilisation des HIF et induction transcriptionnelle.	19
Figure 5 : Gènes activés transcriptionnellement par HIF-1.....	21
Figure 6 : Immunohistochimie anti-SDHB sur coupe tumorale.	26
Figure 7 : Tests disponibles évaluant la pathogénicité des variants.	28
Figure 8 : Suivi des porteurs d'une mutation <i>SDHx</i> en fonction de l'âge.	30
Figure 9 : Détermination calculatoire des limites de quantification.	41
Figure 10 : Détermination calculatoire des limites de détection.....	42
Figure 11 : Courbe d'Horwitz permettant de calculer la limite de quantification du succinate.	47
Figure 12 : Courbe d'Horwitz permettant de calculer la limite de quantification du fumarate.	48
Figure 13 : Courbe d'Horwitz permettant de calculer la limite de quantification de l'alpha-cétoglutarate.	48
Figure 14 : Détermination de la linéarité du succinate.	49
Figure 15 : Détermination de la linéarité du fumarate.	50
Figure 16 : Détermination de la linéarité de l'alpha-cétoglutarate.	50
Figure 17 : Évolution du ratio succinate/fumarate en fonction du temps au sein du groupe Régression.....	52
Figure 18 : Évolution du ratio succinate/fumarate au sein du groupe Stabilité.	53
Figure 19 : Évolution du ratio succinate/fumarate au sein du groupe Progression....	54

Figure 20 : Évolution du ratio succinate/AKG au sein du groupe Régression.	55
Figure 21 : Évolution du ratio succinate/AKG au sein du groupe Stabilité.....	56
Figure 22 : Évolution du ratio succinate/AKG au sein du groupe Progression.	57
Figure 23 : Évolution du ratio succinate/AKG moyen au sein du groupe Stabilité avec et sans retrait de valeurs aberrantes.....	62
Figure 24 : Suivi longitudinal des ratios succinate/fumarate au sein des groupes Stabilité et Progression.	64

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques des groupes d'évolutivité.....	37
Tableau 2 : Temps de rétentions et transitions du succinate, fumarate et alpha-cétoglutarate.	39
Tableau 3 : Essais de répétabilité sur 4 niveaux de concentration.	44
Tableau 4 : Essais de fidélité intermédiaire sur 4 niveaux de concentration.	45
Tableau 5: Série de 10 blancs réactifs utilisés pour la détermination calculatoire des limites de détection et de quantification.	46
Tableau 6 : Moyennes des ratios succinate/fumarate (S/F) et succinate/AKG (S/AKG) au sein des groupes Régression, Stabilité et Progression.....	51
Tableau 7 : Ratios succinate/AKG après retrait d'une valeur aberrante au temps T1 dans le groupe Stabilité.....	62

1 INTRODUCTION

Les phéochromocytomes et paragangliomes (PPG) sont des tumeurs neuroendocrines dérivant de la médullo-surrénale ou des ganglions des systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Environ un tiers des PPG sont associés à un syndrome de prédisposition génétique dont les plus connus sont la néoplasie endocrinienne multiple de type 2, la maladie de Von Hippel Lindau, la neurofibromatose de type 1 et le syndrome paragangliome-phéochromocytome héréditaire (PGL) (1–4).

Ici, nous nous intéresserons au syndrome PGL, syndrome de prédisposition aux PPG secondaires à la présence d'une mutation germinale pathogène sur l'un des gènes codant pour l'une des sous-unités de la succinate déshydrogénase (SDH) : *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* ou de son facteur d'assemblage : *SDHAF2*. Nous regrouperons ces mutations sous le terme mutations *SDHx*. Les mutations *SDHx* induisent une dysfonction de la SDH, enzyme mitochondriale qui catalyse l'oxydation du succinate en fumarate (5).

1.1 ÉPIDÉMIOLOGIE

Les PPG sont des tumeurs rares avec une incidence annuelle estimée entre 2 et 8 cas par millions d'habitants (6). Ces tumeurs surviennent chez environ 0,05 à 0,1% des patients atteints d'hypertension artérielle chronique (7). Actuellement, 10% à 49% des PPG sont découverts fortuitement lors d'examens d'imagerie (6,8–11). Ces tumeurs touchent majoritairement les patients âgés de 30 à 50 ans (6), mais se retrouvent dans 10% à 20% des cas chez les enfants (12,13).

Une maladie métastatique est observée dans 5% à 20% des phéochromocytomes et 15% à 35% des paragangliomes (14–16).

Il est estimé que 25% à 40% des PPG sont secondaires à des mutations germinales pathogènes héréditaires (17–19). Parmi les formes héréditaires, les mutations *SDHx* expliquent la quasi-totalité des PPG de la tête et du cou, plus de 50% des PPG thoraco-abdomino-pelviens et environ 30% des phéochromocytomes (20). La proportion de mutations *SDHx* chez les patients porteurs de tumeurs métastatiques demeure la plus élevée parmi l'ensemble des syndromes de prédisposition aux PPG, oscillant en fonction des études entre 43% et 71% chez l'adulte et entre 70% et 82% chez l'enfant (15,21–23).

1.2 CLINIQUE

Les PPG se caractérisent par des signes cliniques résultant d'un effet de masse tumorale et/ou d'une hypersécrétion de catécholamines (2). La présence d'une hypertension artérielle est observée dans 85 à 90% des cas et s'accompagne d'une majoration du risque d'infarctus du myocarde et de troubles du rythme (24,25). Les complications neurovasculaires sont à l'origine d'une grande morbidité due à l'incidence accrue d'accidents vasculaire cérébraux (26–28). La triade de Ménard (association de sueurs, palpitations et céphalées), bien que rare, constitue le mode de présentation le plus caractéristique avec une spécificité supérieure à 90% (29–31). Enfin les cardiomyopathies dilatées ou hypertrophiques touchent 11% des patients et sont secondaires à l'exposition chronique aux catécholamines (32–34).

Outre la symptomatologie consécutive à une hypersécrétion de catécholamines, les PPG peuvent être à l'origine d'un syndrome de masse, notamment pour les localisations cervicales. À la palpation, une tuméfaction mobile et indolore, parfois pulsatile associée à la présence d'acouphènes, d'une hypoacousie ou de céphalées et de vertiges, peut être retrouvée. L'atteinte des nerfs crâniens se traduit le plus souvent par une dysphonie et/ou une dysphagie. Un syndrome de Claude-Bernard-Horner est parfois observé. Les tumeurs de grande taille induisent des signes de compression locale non spécifiques comprenant des sensations douloureuses ou de pesanteur. Le tableau clinique résultant du syndrome de masse sera fonction de la localisation de la tumeur et de ses rapports avec les structures avoisinantes (2).

1.3 DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE

1.3.1 Diagnostic biochimique

La première étape du diagnostic est la mise en évidence d'une hypersécrétion de catécholamines par la quantification de leurs produits de dégradation : la métanéphrine, la normétanéphrine et la 3-méthoxytyramine. Un taux circulant supérieur à trois fois la valeur de référence est fortement évocateur (1,35,36). Une augmentation de la chromogranine A (CGA) plasmatique est un argument supplémentaire notamment pour le diagnostic des formes non sécrétantes (2,37,38) pouvant concerner jusqu'à 26% des PPG (18).

1.3.2 Diagnostic radiologique

Actuellement la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont des examens de première intention en raison de leur excellente résolution spatiale. L'IRM est néanmoins préférée au scanner pour les paragangliomes de la base du crâne et du cou (1,39).

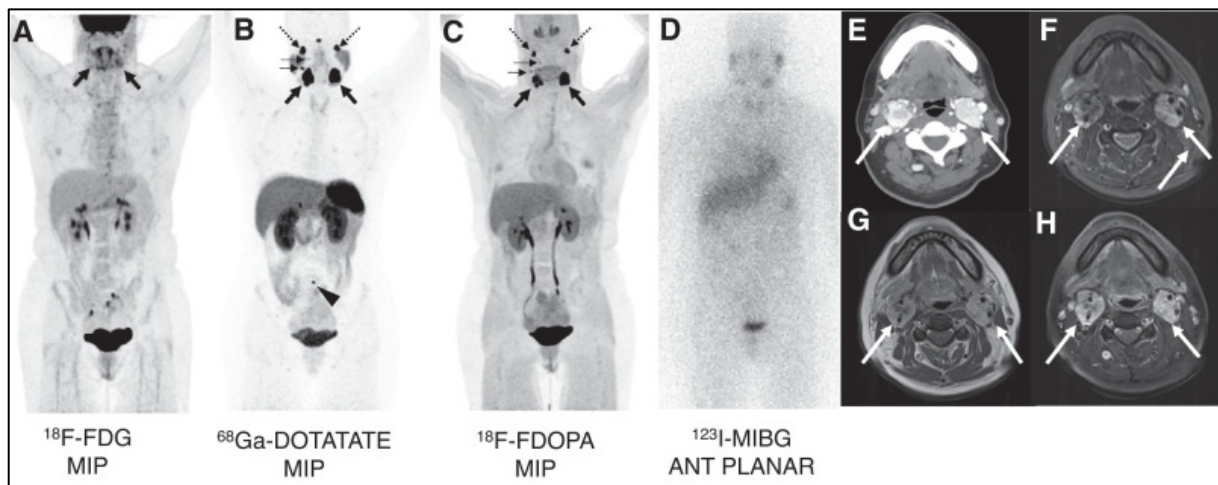


Figure 1 : IRM et scintigraphie de paragangliomes de la tête et du cou : Imageries d'une patiente de 46 ans atteinte de paragangliomes de la tête et du cou associés à une mutation SDHD avec métastases ganglionnaires et osseuses. D'après Casquarillo JA et al., J Nucl Med 2021

L'imagerie fonctionnelle reste plus sensible et spécifique que la TDM et l'IRM pour la détection des métastases et des tumeurs multifocales, ce qui en fait la méthode préférentielle dans ces situations (35,40). Les techniques principalement utilisées sont la scintigraphie au ^{123}I -MIBG, la tomographie par émission de positons (TEP) au ^{18}F FDOPA, la TEP au ^{18}F FDG et la TEP aux ^{68}Ga -DOTA-SSA (39).

1.3.3 Prise en charge

La chirurgie reste le traitement de première intention des PPG, cette dernière étant délicate pour les paragangliomes de la tête et cou (1,7,41–43). Un blocage alpha-adrénergique préopératoire est recommandé afin d'éviter un relargage massif de catécholamines secondaire à la manipulation de la tumeur (1,7,44). Lorsque le rapport bénéfice risque de la chirurgie est incertain notamment du fait de la localisation tumorale, la radiothérapie et la radiochirurgie constituent des solutions thérapeutiques alternatives (1,7,38,45,46).

Pour les formes métastatiques, une approche palliative basée sur un traitement locorégional peut être envisagée pour réduire le volume tumoral et limiter la sécrétion catécholaminergique (1,7,38,47,48). Cependant, en présence d'une progression rapide de la maladie ou d'une masse tumorale importante, une radiothérapie métabolique utilisant de l'¹³¹I-MIBG ou un analogue de la somatostatine marqué au lutétium 177 peut être proposée (1,7,38,47,49–52). Enfin une chimiothérapie à base de cyclophosphamide, vincristine et dacarbazine est le traitement de dernière ligne, visant à améliorer la qualité de vie du patient et réduire autant que possible la masse tumorale (1,38,53–55).

1.4 LA SUCCINATE DESHYDROGENASE

1.4.1 Structure et fonctions

La succinate déshydrogénase (SDH) est un hétérotétramère situé au carrefour entre le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale (5). Les quatre sous-unités : SDHA, SDHB, SDHC, SDHD et leur facteur d'assemblage SDHAF2 sont codés par le génome nucléaire. La SDH est enchâssée au sein de la membrane mitochondriale interne (MMI). La partie hydrophile est composée des sous-unités SDHA et SDHB et siège dans la matrice mitochondriale. La partie hydrophobe, formée des sous-unités SDHC et SDHD, permet la fixation du complexe à la membrane mitochondriale interne (56).

Les sous-unités SDHA et SDHB forment le noyau catalytique. La sous-unité SDHA contient les sites de liaison du FAD et du succinate. La sous-unité SDHB est composée de trois centres fer/soufre (Fe/S) permettant le transfert d'électrons générés par la réaction d'oxydoréduction vers l'ubiquinone. Elle assure également l'interface entre le noyau catalytique et le domaine membranaire formé par les sous-unités SDHC et SDHD dont la structure est hémistique, lui permettant de recruter l'ubiquinone (5,56,57).

La liaison du succinate au domaine catalytique initie la réaction enzymatique. Son oxydation par le FAD conduit à la formation de fumarate et de FADH₂. Les électrons du FADH₂ sont ensuite acheminés vers le noyau hémistique du domaine membranaire par l'intermédiaire des centres Fe/S de la sous-unité SDHB et permet la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol, substrat du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (5).

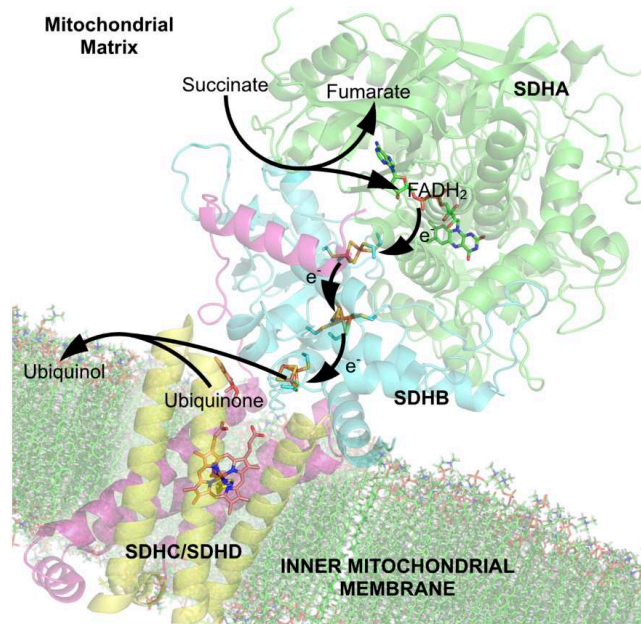


Figure 2 : Réaction enzymatique du complexe SDH La réaction enzymatique d'oxydation du succinate en fumarate utilise le FADH₂ comme cofacteur. Les électrons produits lors de cette réaction d'oxydoréduction sont transportés par la sous-unité SDHB vers le complexe SDHC/D, puis transférés à l'ubiquinol. D'après Richard Wheeler.

1.4.2 Mécanismes oncogénétiques

L'accumulation de succinate par dysfonction de la SDH induit une perturbation des voies régulant la réponse cellulaire à l'hypoxie en raison d'une stabilisation anormale des facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF) (58,59). Les HIF sont des facteurs de transcription hétérodimériques composés de deux sous-unités, une alpha (HIF1 α ou HIF2 α) cytosolique et bêta (HIF β) nucléaire (60,61). En situation normoxique, les résidus proline (P) en position 402 et 564 de HIF1 α sont hydroxylés par les *Prolyl Hydroxylase Domain Proteins* (PHDs), ce qui permet sa reconnaissance par la protéine VHL (pVHL), complexe protéique doté d'une activité E3 ubiquitine ligase (60,62–65). L'acétylation d'un résidu lysine (K) en position 532 par l'enzyme acétyl transférase ARD1 favorise également cette reconnaissance (60,66). Ces modifications post-traductionnelles conduisent à l'ubiquitination de HIF-1 α et à sa dégradation par le protéasome (60,67). Un autre mécanisme de régulation négative de HIF-1 α est

l'hydroxylation du résidu asparagine (N) en position 803 par le facteur inhibant HIF-1 (FIH-1), ce qui entrave la liaison de HIF-1 α avec son coactivateur p300/CBP, empêchant ainsi l'activation transcriptionnelle de ses gènes ciblés (60,68–71). En condition normoxique HIF est donc régulé négativement de manière constitutive, empêchant ainsi l'activation de ses gènes cibles.

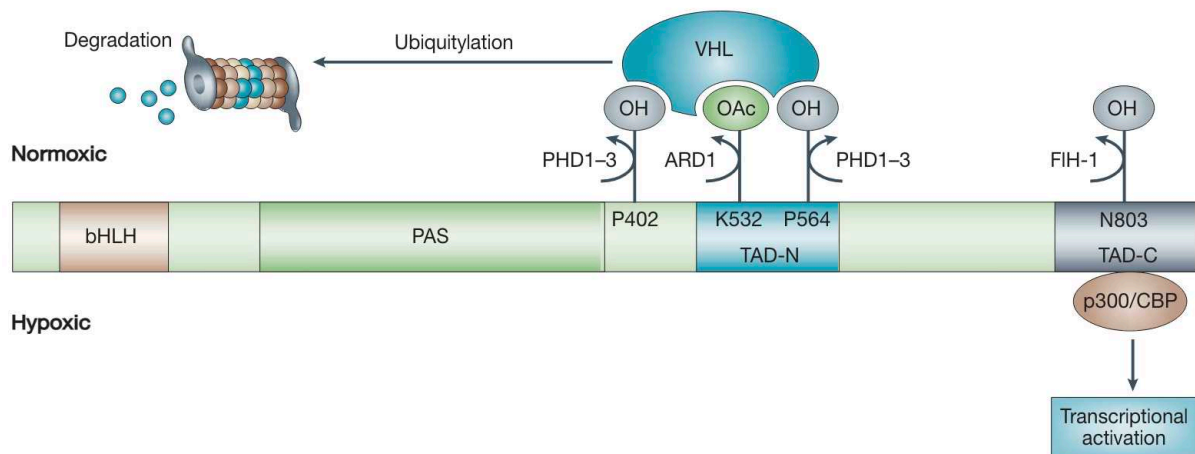


Figure 3 : Structure et régulation de HIF-1 α . La dégradation de HIF-1 α est régulé par concentration en oxygène dans le micro-environnement. En conditions normoxiques, les résidus proline (P) en position 402 et 564 de HIF-1 α sont hydroxylés par les enzymes PHD (prolyl hydroxylase-domain protéine) 1 à 3. Ceci permet la reconnaissance de la sous-unité alpha par la protéine VHL, composant de reconnaissance d'un complexe protéique E3 ubiquitine ligase. La liaison de VHL est également favorisée par l'acétylation du résidu lysine (K) 532 par l'acétyl transférase ARD1. L'ubiquitination de HIF-1 α permet sa dégradation par le protéasome. L'oxygène régule également négativement l'interaction de HIF-1 α avec ses coactivateurs transcriptionnels. La liaison de HIF-1 α avec les protéines p300 et CBP est entravée par l'hydroxylation d'un résidu asparagine (N) 803 par le facteur inhibant HIF-1 (FIH-1). En conditions hypoxiques, la protéine VHL ne peut se lier à HIF-1 α du fait de l'absence d'hydroxylation des résidus prolines, empêchant ainsi sa dégradation. L'hydroxylation du résidu asparagine N803 par FIH-1 est également inhibée, permettant à la sous-unité alpha d'induire la transcription de ses gènes cibles. Abréviations : bHLH, hélice-boucle-hélice basique ; PAS, Per-Arnt-Sim ; TAD-C, domaine de transactivation C-terminal ; TAD-N, domaine de transactivation N-terminal. D'après Gregg L. Semenza

En situation hypoxique, l'inhibition des enzymes PHDs inhibe la reconnaissance de HIF-1 α par la protéine VHL, entraînant ainsi sa stabilisation (60,69–71). La sous-unité alpha se transloque alors dans le noyau pour se lier à HIF-1 β , l'hétérodimère ira ensuite se fixer sur des éléments de réponse cellulaire à l'hypoxie (HRE) présents dans les promoteurs des gènes cibles pour activer leur transcription (61).

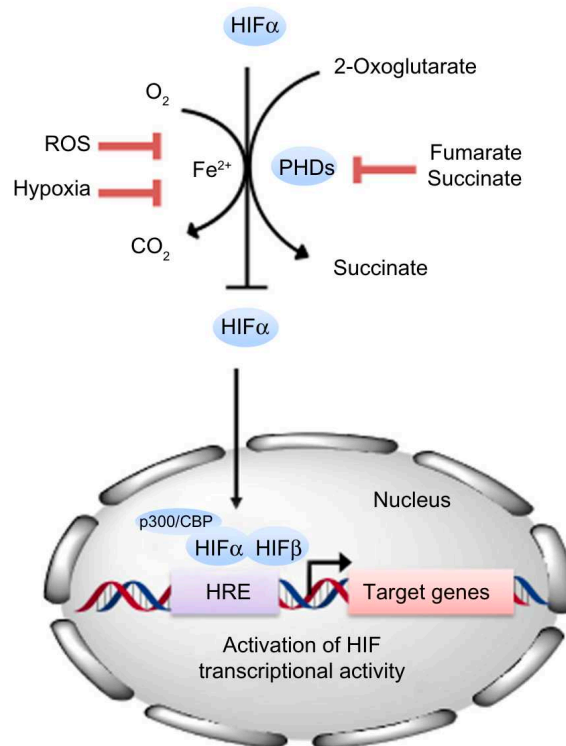


Figure 4 : Stabilisation des HIF et induction transcriptionnelle. Les PHDs utilise l'oxygène et le 2OG comme substrats. Elles sont inactivées en conditions hypoxiques, ce qui permet la stabilisation de HIF-1 α et sa translocation dans le noyau. Sa liaison avec la sous-unité β et les coactivateurs p300/CBP active les éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). Le fumarate et le succinate ont une structure proche du 2OG. Présents à haute concentration, ils agissent comme inhibiteurs compétitifs des PHDs. Il est également suggéré que les ROS modulent aussi l'activité des PHDs. Abréviations : HIF, facteur inducible par l'hypoxie ; 2OG, 2-oxoglutarate (alpha-cétoglutarate) ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; PHDs, prolyl hydroxylase domain proteins ; HRE, élément de réponse à l'hypoxie ; p300/CBP, protéine de liaison p300/CREB. D'après Yang et collaborateurs

La stabilisation des HIF entraîne une reprogrammation du métabolisme cellulaire en favorisant la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative. Ceci est permis par la surexpression d'enzymes impliquées dans la glycolyse et par la surexpression des transporteurs de glucose GLUTs (60,72,73). L'angiogenèse est aussi potentialisée par l'induction transcriptionnelle de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (facteur de croissance endothéliale vasculaire), ENG (endogline), LEP (leptine) ou LRP1 (*LDL-receptor-related protein 1*) (62,74). Les HIF stimulent également la transcription de facteurs de prolifération cellulaire comme le TGF- β 3 (facteur de croissance transformant β 3), IGF2 (facteur de croissance analogue à l'insuline 2) ou TGF- α (facteur de croissance transformant alpha) (62).

Un défaut d'activité enzymatique secondaire à une mutation pathogène sur une des sous unités de la SDH, *i.e* les mutations *SDHx*, induit une accumulation de succinate et conduit ainsi à une inhibition des PHDs et la stabilisation de la sous-unités HIF-1 α (58,59). Cette situation de pseudo-hypoxie conduit à l'activation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la survie et la transformation épithélio-mésenchymateuse, gènes clefs de l'oncogenèse (58,75,76).

L'accumulation de succinate conduit également à l'inhibition d'autres enzymes dépendantes de l'alpha-cétoglutarate comme les histones déméthylases (KDM) et les ADN déméthylases de la famille TET (*ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*). Cette inhibition entraîne une hyperméthylation du génome, réprimant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, régulateurs de la dissémination métastatique et d'autres impliqués dans la différenciation chromaffine (58,77).

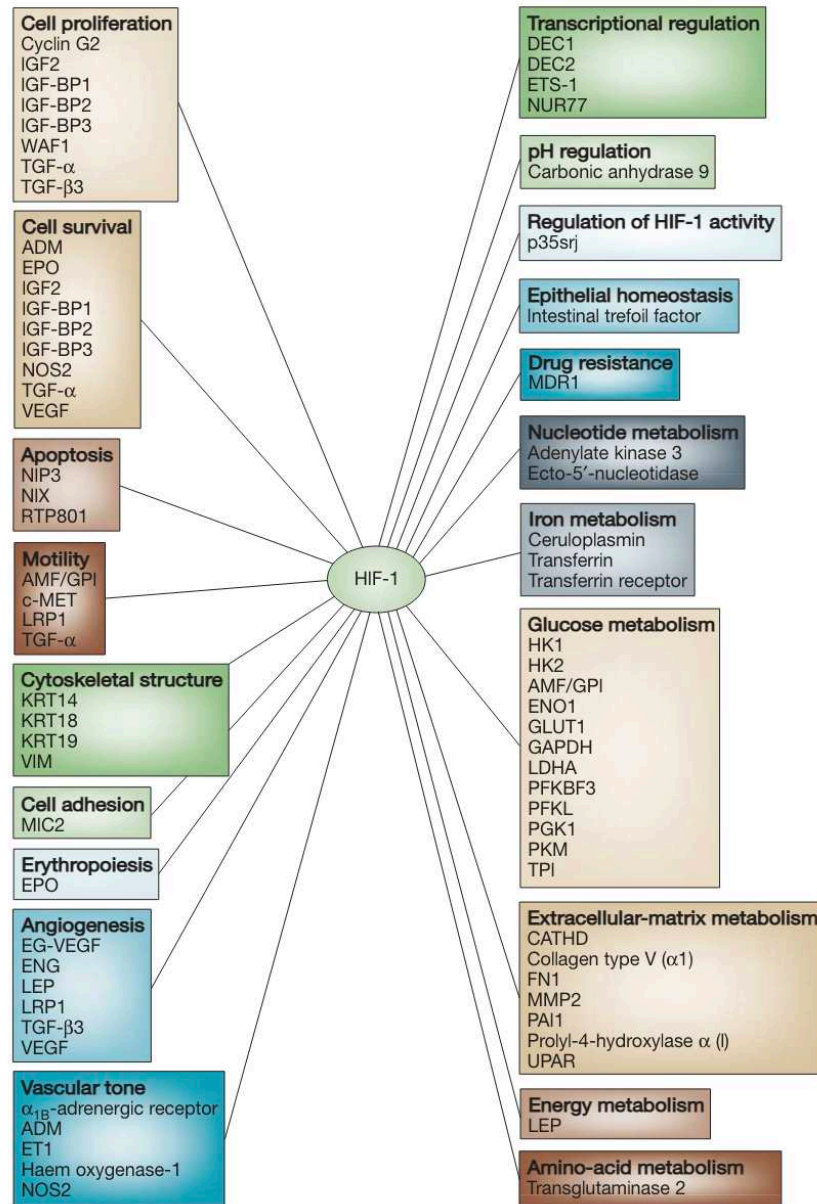


Figure 5 : Gènes activés transcriptionnellement par HIF-1. *Abréviations* : ADM, adrémédulline ; ALDA, aldolase A ; ALDC, aldolase C ; AMF, facteur de motilité autocrine ; CATHD, cathepsine D ; EG-VEGF, VEGF dérivé de la glande endocrine ; ENG, endogline ; ET1, endothéline-1 ; ENO1, éno1ase 1 ; EPO, érythropoïétine ; FN1, fibronectine 1 ; GLUT1, transporteur de glucose 1 ; GLUT3, transporteur de glucose 3 ; GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; HK1, hexokinase 1 ; HK2, hexokinase 2 ; IGF2, facteur de croissance analogue à l'insuline 2 ; IGF-BP1, protéine de liaison du facteur de croissance analogue à l'insuline 1 ; IGF-BP2, protéine de liaison du facteur de croissance analogue à l'insuline 2 ; IGF-BP3, protéine de liaison du facteur de croissance analogue à l'insuline 3 ; KRT14, kératine 14 ; KRT18, kératine 18 ; KRT19, kératine 19 ; LDHA, lactate déshydrogénase A ; LEP, leptine ; LRP1, protéine liée au récepteur des LDL 1 ; MDR1, résistance multidrogue 1 ; MMP2, métalloprotéinase matricielle 2 ; NOS2, synthase de l'oxyde nitrique 2 ; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3 ; PFKL, phosphofructokinase L ; PGK1, phosphoglycérate kinase 1 ; PAI1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 ; PKM, pyruvate kinase M ; TGF- α , facteur de croissance transformant- α ; TGF- β 3, facteur de croissance transformant- β 3 ; TPI, triosephosphate isomérase ; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; UPAR, récepteur de l'activateur du plasminogène urokinase ; VEGFR2, récepteur-2 du VEGF ; VIM, vimentine D'après Gregg L. Semenza.

1.4.3 Corrélation phénotype-génotype

La corrélation génotype-phénotype des mutations *SDHx* est complexe en raison de la grande variabilité de la présentation clinique, la pénétrance et l'évolution de la maladie variable en fonction des mutations (20).

Les mutations *SDHA* représentent environ 10% des patients (78,79). La pénétrance est estimée à 10% vers 70 ans (80). De plus, les tumeurs se développent sans localisation préférentielle (20,81).

Les mutations *SDHB* sont associées au développement de paragangliomes thoraco-abdominaux dans plus de 60% des cas, de la tête et du cou dans 27% des cas et de phéochromocytomes dans 17% à 29% des cas. Ces mutations concernent 10% des patients avec une pénétrance estimée à 30% à l'âge de 80 ans. Une maladie métastatique est observée dans 17% des cas (20,82).

Les mutations *SDHC* forment un syndrome rare, touchant moins de 2% des patients, et principalement caractérisé par le développement de PPG de la tête et du cou. L'âge moyen au diagnostic est de 38 ans, la pénétrance est incomplète et le risque métastatique faible (20).

Les patients porteurs de mutations *SDHD* développent dans plus de 80% des cas des paragangliomes de la tête et du cou et thoraco-abdominaux dans un peu plus de 20% des cas. En revanche, moins de 25% des patients développent un phéochromocytome (20). La pénétrance est incomplète, estimée à 86% à 50 ans (83). La transmission est autosomique dominante, soumise à empreinte maternelle (84).

Les PPG associés aux mutations du gène *SDHAF2* sont rares, de transmission autosomique dominante et de pénétrance complète. Les patients développent

généralement des PPG de la tête et du cou. Aucune maladie métastatique n'a été rapportée (23,58,85,86).

1.5 DIAGNOSTIC GENETIQUE

Environ 30% des PPG sont héréditaires, le dépistage génétique est recommandé chez tous les patients présentant un PPG, quelle que soit leur histoire familiale (1,87).

1.5.1 Séquençage et classification des variants

Les progrès significatifs dans la compréhension de la génétique des PPG ont révélé l'implication d'un nombre considérable de gènes. Dans ce contexte, la technique de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS) est la méthode de choix pour le diagnostic génétique des PPG (87).

En pratique, le laboratoire d'oncogénétique moléculaire du centre hospitalo-universitaire de Lille utilise un panel NGS comprenant 19 gènes de prédisposition : *SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, NF1, RET, VHL, EGLN2, TMEM217, MAX, FH, EGLN1 (PHD2), MDH2, EPAS1, KIF1B, DLST, SCL25A11 et SUCLG2*.

Les variants sont classés en cinq catégories selon les recommandations de l'ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics), ce qui permet de les classer en fonction de leur signification clinique comme suit (88) :

1. **Variant pathogène** : variant dont la pathogénicité est établie et dont la preuve a été apportée par des études fonctionnelles, statistiques et cliniques.
2. **Variant probablement pathogène** : variant suggérant une forte probabilité d'association mais dont la preuve définitive de son caractère n'a pas encore été établie.
3. **Variant de signification incertaine** : variant pour lequel les données disponibles actuellement sont insuffisantes pour conclure à leur impact clinique.
4. **Variant probablement bénin** : variant où la forte probabilité d'être bénin a été évaluée en fonction de sa fréquence dans la population, des outils de prédiction et son absence d'association à la pathologie dans la littérature.
5. **Variant bénin** : variant sans association avec la maladie du fait de sa fréquence en population générale et son caractère non pathogène dans les essais fonctionnels.

1.5.2 Problématique des variants de signification incertaine (VSI)

1.5.2.1 Fréquence des VSI

En raison de l'incertitude entourant leur impact fonctionnel, les variants de signification incertaine (VSI) posent un défi majeur pour le diagnostic des syndromes de prédisposition liés aux mutations *SDHx*. La fréquence des VSI dans ces gènes a été peu étudiée, et malheureusement, peu de données sont disponibles à ce jour. José V

Lima Jr et ses collaborateurs ont trouvé que, toutes mutations confondues (*SDHx* et 22 autres gènes), 30% des patients atteints de syndromes de prédisposition étaient porteurs de VSI. Sept pourcents des patients porteurs d'une mutation *SDHC* présentaient un VSI, 5% pour *SDHA* et 2,4% pour *SDHAF2* (89). Stefanie Parisien-La Salle et ses collaborateurs ont trouvé 11,6% de VSI parmi les paragangliomes et 6,7% parmi les phéochromocytomes, toutes mutations confondues (les données spécifiques aux mutations *SDHx* n'étant pas disponibles) (90).

1.5.2.2 Les VSI *SDHx*

Les VSI sont principalement dues à des mutations qui entraînent l'apparition de variants faux-sens, synonymes et introniques. Les variants faux-sens résultent d'un changement de nucléotide unique qui entraîne la substitution d'un acide aminé par un autre. Selon le type d'acide aminé substitué et ses propriétés physico-chimiques, il peut être difficile de prédire la conséquence fonctionnelle sans études supplémentaires. Les variants synonymes impliquent une modification d'une base par une autre sans changement de la séquence protéique en raison de la redondance du code génétique. Bien que ces variants ne modifient pas la séquence d'acides aminés, ils peuvent affecter l'épissage de l'ARNm ou sa stabilité. Enfin les variants introniques peuvent affecter les mécanismes d'épissage. Ces différents types de variants nécessitent des investigations approfondies pour déterminer leur impact clinique et fonctionnel afin de mieux orienter le diagnostic génétique.

1.5.2.3 Outils de classification des VSI

Lorsqu'un VSI est identifié, l'objectif est de recueillir des arguments en faveur ou non de sa pathogénicité.

En pratique pour les PPG *SDHx*, l'immunohistochimie sur bloc tumoral, le séquençage de la tumeur à la recherche d'une perte d'hétérozygotie et l'analyse de ségrégation familiale sont les outils d'aide à leur classification (86). Les principaux obstacles à leur mise en œuvre sont notamment de pouvoir disposer d'un fragment tumoral pour l'analyse histologique et le séquençage, ainsi que la disponibilité des sujets pour l'analyse de ségrégation familiale.

L'immunohistochimie (IHC) combinée *SDHA/SDHB* constitue un moyen fiable d'identifier les patients porteurs de mutations *SDHx*. L'utilisation d'un anticorps anti-SDHB permet l'identification des PPG liés à une inactivation bi-allélique de n'importe quel gène du complexe SDH. En revanche, l'absence de réactivité avec l'immunomarquage anti-SDHA est spécifique des mutations *SDHA* (91–93).

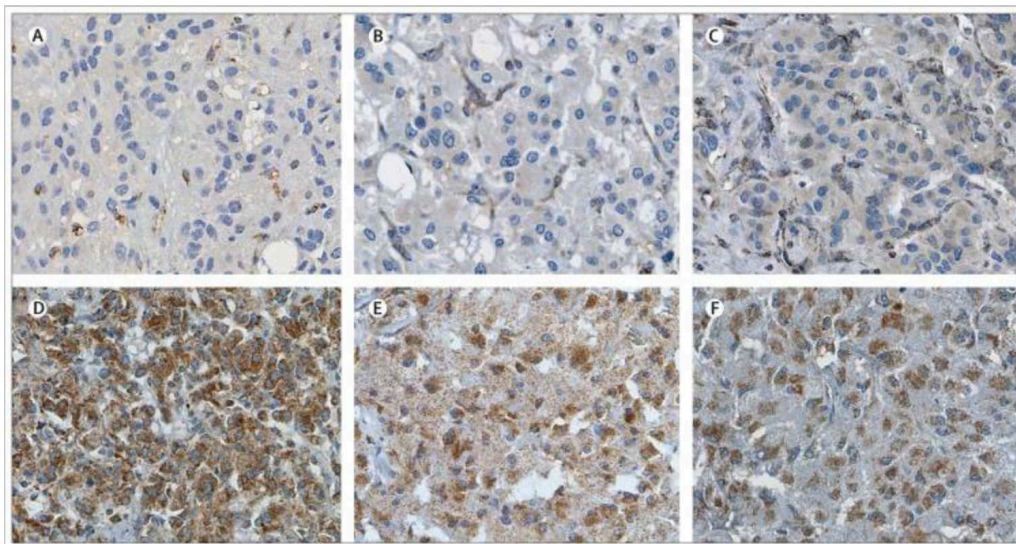


Figure 6 : Immunohistochimie anti-SDHB sur coupe tumorale. A) Phéochromocytome muté *SDHB*. B) Paragangliome avec mutation *SDHC*. C) Paragangliome muté *SDHD*. D,E,F) Phéochromocytomes avec mutations *VHL*, *RET* et *NF1* respectivement. D'après Francien H van Nederveen et collaborateurs.

Démontrer la présence d'une perte d'hétérozygotie tumorale, par mutation additionnelle ou délétion secondaire sur le second allèle, constitue un argument fort en faveur de la pathogénicité du variant identifié. Cette recherche s'effectue sur l'ADN tumoral par méthode de séquençage MLPA ou SNP array (87).

L'analyse de co-ségrégation familiale consiste à rechercher la présence du VSI candidat chez les apparentés sains et malades. La présence de ce variant chez d'autres membres affectés vient soutenir le rôle pathogène de ce dernier. L'absence de co-ségrégation l'exclut (87).

Parmi les autres tests à disposition évaluant la pathogénicité d'un variant, il existe des approches par biologie moléculaire avec la recherche de mutations des sites d'épissage sur fragment tumoral ou ARN leucocytaire et les analyses de méthylation de l'allèle controlatéral. Il existe également d'autres techniques s'intéressant au complexe SDH. Sur fragment tumoral congelé, il est possible de mettre en évidence une perte de son activité enzymatique ou de montrer une accumulation de succinate par mesure de sa concentration (87). Ces examens complémentaires sont néanmoins réservés à la recherche et non faits en pratique courante.

Type of material required	Test description	Expected results	Target gene	Target mutation type	Evidence level of test*	Refs
Tumour or leukocyte RNA	cDNA sequencing	Identification of aberrant RNA transcript	All PPGLs susceptibility genes	Splice mutations	B	108,114
Tumour DNA	Sequencing, MLPA, SNP array or microsatellite markers study (for copy number analysis)	Identification of LOH (by deletion or somatic mutation of the contralateral allele)	PPGLs tumour suppressor genes	All	B	105,107,110,111
	Methylation analysis	Identification of methylation of the contralateral allele	PPGLs tumour suppressor genes	All	B	21
Frozen tumour tissue	SDH enzymatic activity measurement	Loss of SDH enzymatic activity	<i>SDH</i>	All	A	115
	Fumarase enzymatic activity measurement	Loss of fumarase enzymatic activity	<i>FH</i>	All	A	20
	Succinate concentration	Accumulation of succinate	<i>SDH</i>	All	B	20
	Fumarate concentration	Accumulation of fumarate	<i>FH</i>	All	B	20
	Metabolome profiling by HRMAS NMR spectroscopy	Accumulation of succinate	<i>SDH</i>	All	C	124
FFPE tumour tissue section	SDHB/SDHD IHC	SDHB negative or SDHD positive IHC	<i>SDH</i>	All	A	5,116–118
	SDHA IHC	SDHA negative IHC	<i>SDHA</i>	All	A	112,117,119
	MAX IHC	MAX negative IHC	<i>MAX</i>	Truncating mutations	B	22
	2-SC IHC	2-SC positive IHC	<i>FH</i>	All	B	101
<i>In vitro</i> assay	PC12 rat pheochromocytoma cell-based luciferase reporter assay (mutagenesis)	Alteration of MAX regulatory effects on MYC	<i>MAX</i>	Missense	C	120
	Endomembrane localization or subcellular distribution of expressed mutant constructs by confocal microscopy	Intracellular distribution of TMEM127 mutant	<i>TMEM127</i>	Missense	C	94,114,121
	SDH cellular distribution	Loss of SDH mitochondrial localization	<i>SDH</i>	All	C	122
<i>In vivo</i> assay	<i>In vivo</i> succinate detection by magnetic resonance spectroscopy	Accumulation of succinate <i>in vivo</i>	<i>SDH</i>	All	C	123

Figure 7 : Tests disponibles évaluant la pathogénicité des variants. D'après Toledo Rodrigo A., Burnichon Nelly et collaborateurs.

1.6 SUIVI DES PATIENTS ET DES APPARENTES MUTES

1.6.1 Patients

Les patients atteints de PPG avec mutations *SDHx* sont considérés comme à haut risque de récurrence et doivent donc bénéficier d'un suivi à vie. Il comporte un examen clinique, un dosage des métanéphrines et normétanéphrines plasmatiques ou urinaires et de la chromogranine A. Le choix de la méthode radiologique sera fonction de la nature de la mutation et des recommandations internationales (1,7,38).

1.6.2 Apparentés mutés

La découverte d'un syndrome de PPG héréditaires chez le proband doit permettre la mise en place d'un dépistage familial de manière à diagnostiquer et traiter plus précocement les membres de la famille atteints (1).

1.6.2.1 Dépistage initial

Après identification d'un variant pathogène ou probablement pathogène affectant les gènes *SDHx*, le premier dépistage clinique doit débuter entre 6 et 10 ans pour les porteurs asymptomatiques de variants *SDHB* et entre 10 et 15 ans pour les porteurs asymptomatiques de variants *SDHA*, *SDHC* et *SDHD*. Ce dépistage consiste en la réalisation d'un examen clinique avec mesure de la tension artérielle, un dosage des métanéphrines et normétanéphrines plasmatiques ou urinaires, une imagerie par IRM et TEP-TDM est recommandée chez l'adulte et uniquement l'IRM chez l'enfant afin de limiter l'exposition aux radiations ionisantes (94).

1.6.2.2 Suivi après un premier dépistage clinique négatif

En raison du risque à vie de développer un PPG, les porteurs asymptomatiques de mutations *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* doivent bénéficier d'un suivi régulier après un premier bilan négatif. Ce suivi comportera un examen clinique annuel avec mesure de la tension artérielle, le dosage des métanéphrines et normétanéphrines plasmatiques ou urinaires répété tous les deux ans chez l'enfant et annuellement chez l'adulte ainsi qu'une imagerie par IRM tous les 2 à 3 ans (94).

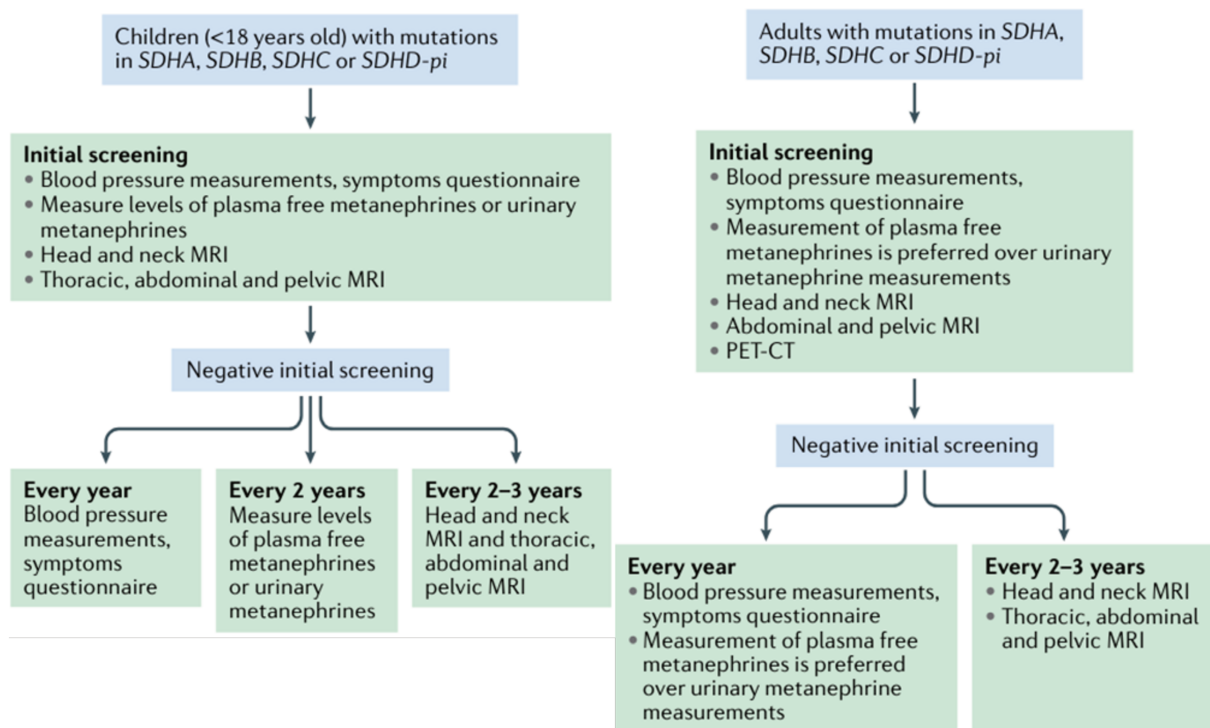


Figure 8 : Suivi des porteurs d'une mutation *SDHx* en fonction de l'âge. Chez l'enfant, le suivi repose sur l'examen clinique annuel, le dosage des métanéphrines urinaires ou plasmatiques tous les deux ans et un examen d'imagerie par IRM tous les deux à trois ans. Chez l'adulte, le suivi repose sur l'examen clinique et le dosage des métanéphrines plasmatiques ou urinaires annuel ainsi qu'une imagerie par IRM tous les deux à trois ans. D'après Amar et collaborateurs.

1.7 PROBLEMATIQUE DU SUIVI

Le suivi des PPG associés aux mutations *SDHx* est complexe. Tout d'abord la pénétrance variable rend difficile l'évaluation précise du risque de développer la maladie chez les individus concernés (20). De plus, les dosages hormonaux peuvent être mis en défaut. En effet, 80% des PPG surrenaliens et thoraco-abdomino-pelviens sécrètent des catécholamines tandis que les PPG cervicaux et de la base du crâne sont non fonctionnels dans 90% des cas (2,37,38). Enfin, l'identification d'un variant de signification indéterminée (VSI) nécessite une interprétation soigneuse et rend parfois complexe la prise en charge du patient (87).

1.8 PERSPECTIVES D'AMELIORATION DU DIAGNOSTIC ET DU SUIVI

En raison de la complexité du diagnostic moléculaire due à la présence de VSI et de la difficulté du suivi des tumeurs non sécrétantes, ainsi que de la nécessité de limiter l'exposition des patients aux radiations ionisantes, les cliniciens ont besoin de biomarqueurs innovants pour améliorer la prise en charge des patients.

Les mutations *SDHx* entraînent une dysfonction enzymatique de la SDH et une accumulation cytosolique de succinate. Le dosage des niveaux plasmatiques de succinate et de fumarate ainsi que le calcul du ratio succinate/fumarate (RS/F) ont déjà été évalués comme des outils prometteurs pour le diagnostic et le suivi de ces tumeurs.

Le Laboratoire d'Hormonologie, Métabolisme, Nutrition et Oncologie du CHU de Lille, dirigé par le professeur Pascal Pigny, avait déjà conduit une étude montrant que le ratio succinate/fumarate (RS/F) sérique permet d'identifier les mutations des gènes *SDHx* et ainsi d'aider à la classification des VSI (95).

De plus, Lamy et ses collaborateurs ont démontré que la concentration sérique de succinate est corrélée à la charge tumorale et à l'extension métastatique chez les patients atteints de PPG avec mutations SDHB, faisant de ce biomarqueur un outil utilisable pour évaluer la réponse au traitement et surveiller la progression de la maladie (96).

Le dosage du succinate et du fumarate ainsi que le calcul du ratio succinate/fumarate sont donc potentiellement de nouveaux outils utilisables pour la classification des VSI et le suivi des PPG associés aux mutations *SDHx*. Ces dosages permettraient l'identification des mutations pathogènes, ainsi que l'évaluation de la charge tumorale. L'intégration de ces marqueurs métaboliques dans la pratique clinique pourrait améliorer significativement la gestion des patients atteints de PPG.

2 OBJECTIFS DE LA THESE

Les PPG liés aux mutations *SDHx* représentent un défi majeur. Le suivi des patients repose actuellement sur l'examen clinique, l'imagerie, le dosage des métanéphrines et de la chromogranine A. Toutefois, le suivi des patients atteints de PPG *SDHx* est complexe en raison de la présence de tumeurs non sécrétantes, de la variabilité du risque métastatique et de la variabilité du risque de récurrence en fonction du profil mutationnel. Afin d'améliorer le suivi, il est crucial de développer des marqueurs innovants, tels que le succinate et le fumarate.

En 2020, le service d'Hormonologie, Métabolisme, Nutrition et Oncologie du CHRU de Lille a développé une méthode de dosage de ces deux oncométabolites par GC-MS/MS en mode SIM. Nous avons repris ces travaux dans le but d'améliorer la méthode, en passant du mode SIM au mode MRM, et en ajoutant la quantification de l' α -cétoglutarate sérique à ce panel. Enfin nous avons également analysé les rapports succinate/fumarate et succinate/ α -cétoglutarate chez les patients issus de la cohorte OncoMetab *SDHx* afin d'évaluer leur potentiel en tant que biomarqueurs pour le suivi.

Le principal objectif de ce travail est la mise en place d'un suivi longitudinal des patients touchés par cette pathologie et leurs apparentés mutés. Pour répondre à ces objectifs, 21 patients ont été analysés.

3 MATERIEL ET METHODE

3.1 POPULATION

Vingt-et-un patients ont été inclus (10 femmes et 11 hommes). Les critères d'inclusion étaient : d'être porteur d'une mutation *SDHx* et d'avoir bénéficié d'au moins deux prélèvements espacés d'au moins trois mois dans le cadre de l'étude OncoMetab *SDHx*. Tous les patients ont donné leur non-opposition avant inclusion. Trois groupes ont été constitués (Régression, Stabilité et Progression) à partir de l'évolutivité de la maladie en se basant sur les données cliniques, radiologiques et biologiques disponibles. Le groupe Régression comporte les patients dont les données indiquent une régression de la maladie tumorale (n = 4). Le groupe Stabilité inclut des patients dont la maladie tumorale est stable (n = 11) et le groupe Progression est quant à lui composé de patients présentant une maladie tumorale évolutive (n = 6). Les données sont détaillées dans le Tableau 1.

Le groupe Régression comprend 4 individus (autant d'hommes que de femmes), avec 2 prélèvements disponibles pour chaque patient. L'âge médian est de 32 ans, le ratio succinate/fumarate moyen est de 10,0 et le ratio succinate/AKG moyen de 13,9. Sur le plan mutationnel, 50 % des patients présentent une mutation *SDHA* et 50% *SDHB*. Parmi les 8 prélèvements disponibles, 2 ont été effectués chez des patients sans aucune lésion tumorale, 2 autres chez des patients ne présentant qu'une seule lésion, et enfin 4 chez des patients présentant des tumeurs multiples. Les données sont détaillées dans le Tableau 1.

Le groupe Stabilité est composé de 11 patients (5 femmes et 6 hommes). L'âge médian est de 44 ans, la moyenne des ratios succinate/fumarate et succinate/AKG est

de 7,7 et 4,1 respectivement. Sur le plan mutationnel, 18% des patients sont porteurs d'une mutation *SDHA*, 45% d'une mutation *SDHB*, 27% d'une mutation *SDHC* et 9% d'une mutation *SDHD*. Parmi les 23 prélèvements à disposition, 5 ont été effectués chez des patients avec lésions multiples, 8 autres chez des patients ne présentant qu'une seule lésion et enfin 10 chez des patients dépourvus de lésions tumorale. Les données sont détaillées dans le Tableau 1.

Le groupe Progression est composé de 6 patients, comprend autant d'hommes que de femmes et 15 prélèvements. L'âge médian est de 37 ans. La moyenne des ratios succinate/fumarate et succinate/AKG est de 10,8 et 4,6 respectivement. Sur le plan mutationnel, 17% des patients sont porteurs d'une mutation *SDHA*, 33% *SDHB* et 50% *SDHD*. Parmi les 15 prélèvements à disposition, 2 ont été effectués chez des patients dépourvus de lésions tumorales et 13 chez des patients présentant de multiples tumeurs. La moitié des patients présente une maladie métastatique. Les données sont détaillées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques des groupes d'évolutivité.

Groupe	Régression (n = 4)	Stabilité (n = 11)	Progression (n = 6)
R_{S/F}, médiane (Q₁ - Q₃)	10,0 (9,1 – 14,4)	7,7 (6,1 – 9,3)	10,8 (6,8 – 13,6)
R_{S/AKG}, médiane (Q₁ - Q₃)	13,9 (2,7 – 31,1)	4,1 (2,1 – 9,4)	4,6 (2,5 – 14,6)
Age, médiane (min, max)	32 (24, 45)	44 (16, 70)	37 (33, 65)
Sexe, n (%)			
Femme	2 (50)	5 (45)	3 (50)
Homme	2 (50)	6 (55)	3 (50)
Type de mutation, n (%)			
SDHA	2 (50)	2 (18)	1 (17)
SDHB	2 (50)	5 (45)	2 (33)
SDHC	0	3 (27)	0
SDHD	0	1 (9)	3 (50)
Nombre de lésions au moment du prélèvement			
0	2	10	2
1	2	8	0
≥ 2	4	5	13
Patients métastatiques	2 (50 %)	1 (9 %)	3 (50 %)
Tumeur primitive			
Aucune lésion	0	3	0
TAP	2 (50)	1	3 (50)
Cervicale	2 (50)	6	3 (50)
Surrénale	0	1	0
Lésions multiples	0	0	0
Nombre de prélèvements par groupe	8	23	15

Abréviations : R_{S/F}, ratio succinate/fumarate ; R_{S/AKG}, ratio succinate/AKG ; Q₁, premier quartile ; Q₃, troisième quartile ; SDH, succinate déshydrogénase ; TAP, Thoraco-Abdomino-Pelvien.

3.2 ANALYSE GENETIQUE

L'analyse génétique a été effectuée par séquençage de nouvelle génération (NGS). Les gènes *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *NF1*, *RET*, *VHL*, *EGLN2*, *TMEM217*, *MAX*, *FH*, *EGLN1 (PHD2)*, *MDH2*, *EPAS1*, *KIF1B*, *DLST*, *SLC25A11* et *SUCLG2* ont été étudiés. Les variants ont été classés selon la classification de l'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).

3.3 PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Deux tubes secs ont été prélevés par ponction veineuse puis rapidement transmis au laboratoire à 4°C. À réception, les échantillons sanguins ont été aliquotés puis stockés à -20°C jusqu'à l'analyse.

3.4 QUANTIFICATION SUCCINATE, DU FUMARATE ET DE L'ALPHA-CETOGLUTARATE

La quantification du succinate, du fumarate et de l'alpha-cétoglutarate a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS/MS). Trente microlitres d'une solution standard de succinate- $^{13}\text{C}_4$, fumarate- $^{13}\text{C}_4$ et d'alpha-cétoglutarate- $^{13}\text{C}_5$ à 1 mmol/L ont été ajoutés à 500 μL de sérum. Puis, 100 μL d'acide chlorhydrique à 2,4 N ont été ajoutés pour ajuster le pH, enfin l'échantillon a été saturé avec du chlorure de sodium. Les métabolites d'intérêt ont été extraits par extraction liquide-liquide avec pour solvant l'acétate d'éthyle. Le surnageant a été évaporé sous un flux d'azote à 37 °C jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Le tout a été

dérivé avec 50 µL de BSTFA + 1% TMCS à 80 °C et 50 µL de chloroforme pendant 45 minutes. L'analyse GC-MS/MS a été réalisée en utilisant un SCION GC 436 couplé à un EVOQ GC-TQ triple quadropole. La multiple reaction time monitoring (MRM) a été utilisée comme méthode de détection. Les conditions MRM ont été optimisées pour chaque analyte, incluant la sélection des transitions m/z spécifiques et les paramètres de collision énergétique. Les concentrations des analytes ont été déterminées en utilisant le rapport des signaux des analytes et de l'étalon interne (Tableau 2).

Tableau 2 : Temps de rétentions et transitions du succinate, fumarate et alpha-cétoglutarate.

Métabolite	Temps de rétention	Ion parent	Ion fils	Energie de transition (eV)
Succinate	16.8 minutes	247.1	131	20
Succinate ¹³C₄	16.8 minutes	251.1	131	20
Fumarate	17.78 minutes	245.1	217.1	5
Fumarate ¹³C₄	17.78 minutes	249.1	220.1	5
AKG	24.30 minutes	347.1	291.2	5
AKG ¹³C₅	24.30 minutes	352.1	294.2	5

3.5 ÉVALUATION DES PERFORMANCES ANALYTIQUES

Pour démontrer la capacité d'une méthode de dosage à rendre des résultats fiables, il est essentiel de procéder à une vérification des performances du système analytique. Ce processus, appelé «validation de méthode» doit satisfaire un certain nombre de conditions précisées dans le document «Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) /validation (portée B) des méthodes de Biologie médicale».

3.5.1 Fidélité

Les tests de fidélité évaluent la capacité d'une méthode à fournir des résultats identiques. Elle comprend la répétabilité et la fidélité intermédiaire également appelée reproductibilité intra-laboratoire et sont évaluées par le calcul de l'écart-type et du coefficient de variation (CV).

Les objectifs des essais de répétabilité sont de caractériser la meilleure performance possible du système analytique dans des conditions optimales et la vérification du bon fonctionnement du couple instrument/réactif. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître ses performances initiales. En pratique, elle a été déterminée à partir de 10 extractions du même échantillon sur 4 niveaux de concentration. Les mêmes conditions analytiques (opérateur, matériel et temporalité) ont été appliquées.

La fidélité intermédiaire consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes. En pratique, les mêmes niveaux de concentration que ceux employés dans les essais de répétabilité ont été utilisés. Pour chaque niveau de concentration, 10

extractions ont été pratiquées. La temporalité, la variabilité liée au matériel et la variabilité inter-opérateurs ont été évaluées.

3.5.2 Linéarité et domaine de mesure

La linéarité permet de vérifier que la méthode de quantification mise au point fournit une valeur proportionnelle à la concentration. Cette dernière s'évalue à l'aide de la pente et du coefficient de détermination de la courbe de tendance. Pour ce faire, des solutions salines de concentrations croissantes 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 12, 15 et 20 µM ont été élaborées, extraites et analysées. Les courbes de linéarité sont déterminées à partir des concentrations expérimentales obtenues.

La limite de quantification (LOQ) correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue. C'est donc la plus petite valeur qui peut être fournie pour un échantillon de patient. Les LOQ peuvent être déterminées de deux manières :

- Graphiquement par le biais de courbes d'Horwitz qui modélisent le CV en fonction de la concentration. Une courbe de tendance logarithmique a ensuite été appliquée au nuage de points afin de pouvoir calculer la concentration pour laquelle le coefficient de variation équivaut à 20%.
- Calculatoire en multipliant l'écart-type des blancs par dix.

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma_b$$

Figure 9 : Détermination calculatoire des limites de quantification. *Abréviations : LOQ, limite de quantification ; σ_b , écart-type des blancs.*

La limite de détection (LOD) correspond au plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration pouvant être distingué avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction réalisé dans les mêmes conditions. En deçà de cette valeur, il est impossible d'affirmer avec un niveau suffisant de confiance la présence de l'espèce recherchée dans l'échantillon analysé. En pratique, les LOD ont été obtenues par la méthode des blancs en sommant la moyenne des blancs avec trois fois leur écart-type.

Pour ce faire, 10 blancs ont été extraits avec intégration du bruit de fond.

$$\text{LOD} = M_{\text{blanc}} + 3 \times \sigma_b$$

Figure 10 : Détermination calculatoire des limites de détection. *Abréviations* : LOD, limite de détection ; M_{blanc} , moyenne des blancs et σ_b , écart-type des blancs.

4 RESULTATS

4.1 ÉVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

4.1.1 Répétabilité

La répétabilité a été réalisée dans les conditions suivantes : même opérateur, même période et même matériel. En l'absence de recommandations spécifiques nous avons retenu un coefficient de variation inférieur à 20 % comme seuil. Les coefficients obtenus pour les trois paramètres sont tous inférieurs à 3 % (Tableau 2).

4.1.2 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été réalisée en faisant varier au moins un facteur (opérateur, matériel, temporalité). Un coefficient de variation inférieur à 20 % a été retenu pour définir le caractère reproductible de la méthode. Les coefficients de variation des 3 oncométabolites sont inférieurs à 20% pour les 4 niveaux de concentration choisis (Tableau 3).

Tableau 3 : Essais de répétabilité sur 4 niveaux de concentration. Résultats exprimés en moyenne, écart-type et coefficient de variation (CV).

Extrait	Niveau 1			Niveau 2			Niveau 3			Niveau 4		
	Succinate	Fumarate	AKG	Succinate	Fumarate	AKG	Succinate	Fumarate	AKG	Succinate	Fumarate	AKG
1	1,90	2,12	2,02	4,24	5,09	5,09	10,20	10,29	9,78	19,71	20,02	19,94
2	1,90	2,07	1,97	4,34	5,14	5,21	10,11	10,31	10,45	19,85	20,18	20,31
3	1,82	2,14	1,95	4,28	5,14	5,03	10,13	10,37	10,30	19,72	20,23	20,42
4	1,92	2,06	1,96	4,39	5,07	5,13	10,18	10,21	10,27	19,77	20,01	20,31
5	1,81	2,21	1,96	4,35	5,12	5,16	9,85	10,34	10,37	19,76	20,09	20,26
6	1,87	1,99	1,96	4,29	5,14	5,03	10,20	10,17	10,30	20,83	20,66	20,89
7	1,91	2,10	2,03	4,31	5,10	5,12	10,39	10,23	10,41	19,66	20,13	20,35
8	1,89	2,14	1,96	4,41	5,06	5,11	10,33	10,53	10,45	19,58	20,09	20,39
9	1,97	2,18	2,01	4,21	5,15	5,04	10,08	10,16	10,61	20,03	20,20	20,44
10	1,87	2,11	1,96	4,36	5,14	5,09	10,48	10,38	10,57	19,99	20,12	20,08
Moyenne	1,89	2,11	1,98	4,318	5,12	5,10	10,20	10,30	10,35	19,89	20,17	20,34
Écart-type	0,046	0,062	0,030	0,066	0,033	0,058	0,177	0,115	0,229	0,357	0,185	0,249
CV	2,45%	2,94%	1,54%	1,53%	0,64%	1,13%	1,74%	1,12%	2,21%	1,80%	0,92%	1,22%

Tableau 4 : Essais de fidélité intermédiaire sur 4 niveaux de concentration. Résultats exprimés en moyenne, écart-type et coefficient de variation.

Extrait	Niveau 1			Niveau 2			Niveau 3			Niveau 4		
	Succinate	Fumarate	AKG	Succinate	Fumarate	AKG	Succinate	Fumarate	AKG	Succinate	Fumarate	AKG
1	2,14	2,43	2,61	5,48	5,86	5,64	10,21	10,41	10,95	19,04	20,45	20,80
2	2,28	2,29	2,26	5,22	5,45	5,41	9,88	10,47	10,58	19,64	20,63	20,94
3	2,15	2,59	2,23	5,12	5,80	5,93	10,22	10,45	10,66	19,84	20,60	21,20
4	2,06	2,52	2,26	5,17	5,54	5,64	10,07	10,21	10,45	20,18	19,89	20,45
5	1,89	2,13	2,04	4,65	5,02	4,89	9,72	10,13	9,90	19,29	20,07	19,85
6	1,95	2,26	2,07	4,69	5,18	5,05	9,53	10,14	10,03	18,82	20,43	20,15
7	1,88	2,20	2,06	4,78	5,17	5,03	9,74	10,29	10,10	19,87	20,26	20,02
8	2,01	2,05	1,96	4,68	5,07	4,93	9,43	9,96	9,87	19,77	20,39	20,22
9	1,76	1,98	1,73	4,84	5,10	4,68	9,16	10,01	9,70	19,08	20,18	19,92
10	1,71	2,07	2,07	4,31	5,11	5,08	9,24	10,12	10,09	18,69	20,05	19,91
Moyenne	1,98	2,25	2,13	4,90	5,33	5,23	9,72	10,22	10,23	19,42	20,29	20,35
Écart-type	0,180	0,207	0,232	0,346	0,314	0,403	0,381	0,182	0,404	0,505	0,246	0,480
CV	9,09%	9,18%	10,90%	7,07%	5,89%	7,71%	3,91%	1,79%	3,95%	2,60%	1,21%	2,36%

4.1.3 Limites de détection de quantification

La limite de détection (LOD) d'une méthode analytique est la plus petite quantité ou concentration d'un analyte que la méthode est capable de détecter de manière fiable, mais pas nécessairement de le quantifier avec précision. Avec la méthode des blancs, la LOD calculée pour le succinate est égale à 0,16 μM , 0,014 μM pour le fumarate et 0,008 μM pour l'alpha-cétoglutarate

Tableau 5: Série de 10 blancs réactifs utilisés pour la détermination calculatoire des limites de détection et de quantification. Résultats exprimés en moyenne, écart-type et coefficient de variation.

Extrait	Blanc		
	Succinate	Fumarate	AKG
1	0,096	0,012	0,004
2	0,103	0,005	0,000
3	0,077	0,006	0,001
4	0,083	0,007	0,001
5	0,099	0,006	0,000
6	0,106	0,009	0,003
7	0,116	0,009	0,001
8	0,054	0,010	0,004
9	0,129	0,010	0,007
10	0,103	0,010	0,001
Moyenne	0,097	0,008	0,002
Écart-type	0,021	0,002	0,002
CV	21,64%	25,83%	97,15%

La limite de quantification (LOQ) correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration fournie avec un niveau de fiabilité acceptable et d'incertitude connue.

Avec la méthode recommandée par le Comité Français d'Accréditation, les LOQ calculées sont égales à 0,209 μM pour le succinate et 0,020 μM pour le fumarate et l'alpha-cétoglutarate.

Des courbes d'Horwitz, modélisant le CV en fonction de la concentration expérimentale obtenue, ont été élaborées pour chaque espèce à quantifier. Pour calculer les LOQ, il a fallu résoudre l'équation de la courbe de tendance en fixant le CV à 20%. On obtient ainsi une LOQ égale à 0,241 μM pour le succinate, 0,123 μM pour le fumarate et 0,671 μM pour l'alpha-cétoglutarate. Les courbes sont présentées ci-dessous.

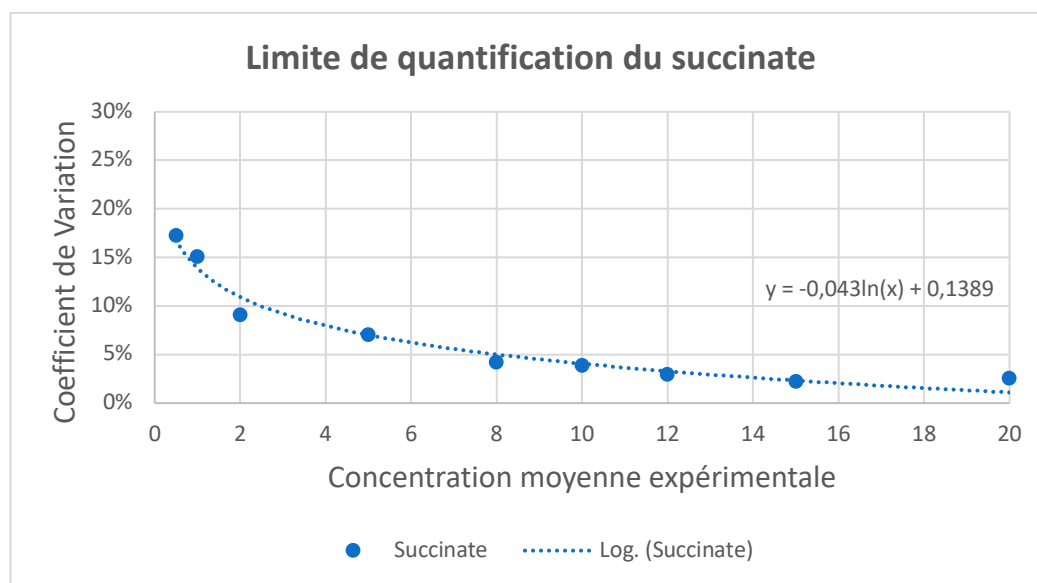


Figure 11 : Courbe d'Horwitz permettant de calculer la limite de quantification du succinate.

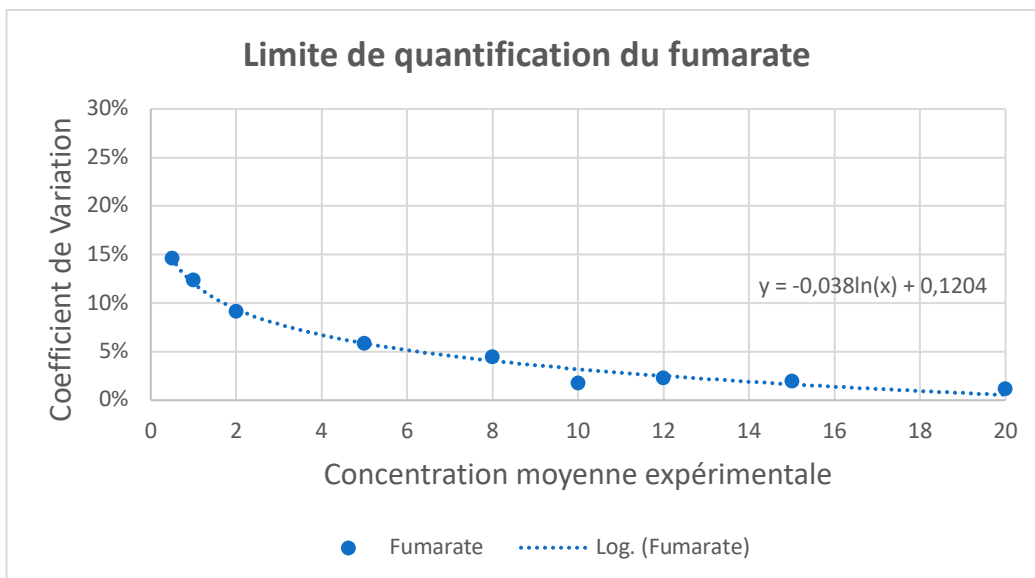


Figure 12 : Courbe d'Horwitz permettant de calculer la limite de quantification du fumarate.

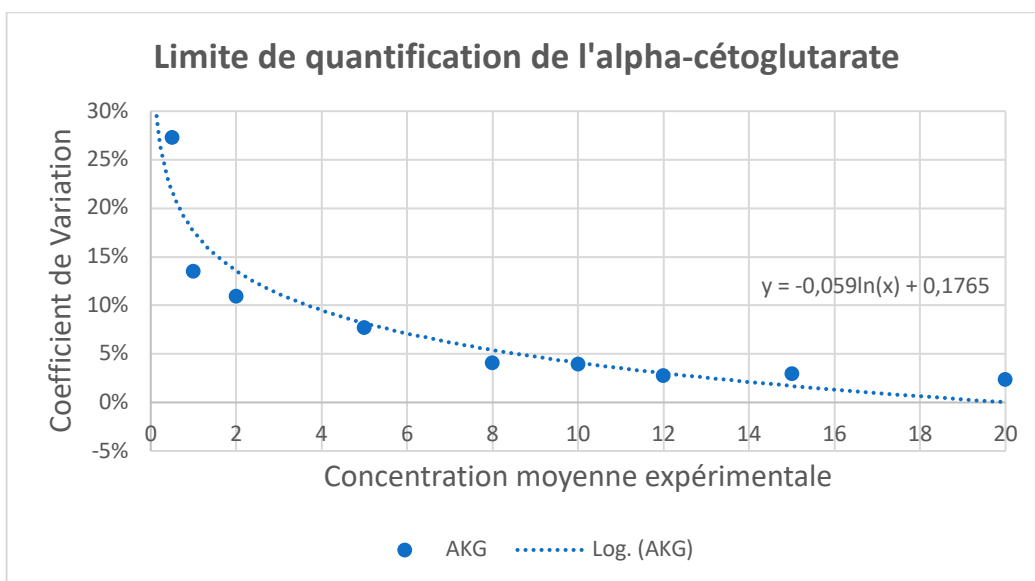


Figure 13 : Courbe d'Horwitz permettant de calculer la limite de quantification de l'alpha-cétoglutarate.

4.1.4 Linéarité et domaine de mesure

Les courbes de linéarité sont présentées ci-dessous. Le coefficient de détermination est supérieur à 99% pour les 3 paramètres jusqu'à 20 µM.

Le domaine de mesure (DDM) a été défini en prenant en compte la LOQ et la limite supérieure de linéarité pour les 3 espèces, nous obtenons donc un DDM compris entre 0,241µM et 20 µM pour le succinate, 0,123µM et 20 µM pour le fumarate et 0,671µM et 20 µM pour l'alpha-cétoglutarate.

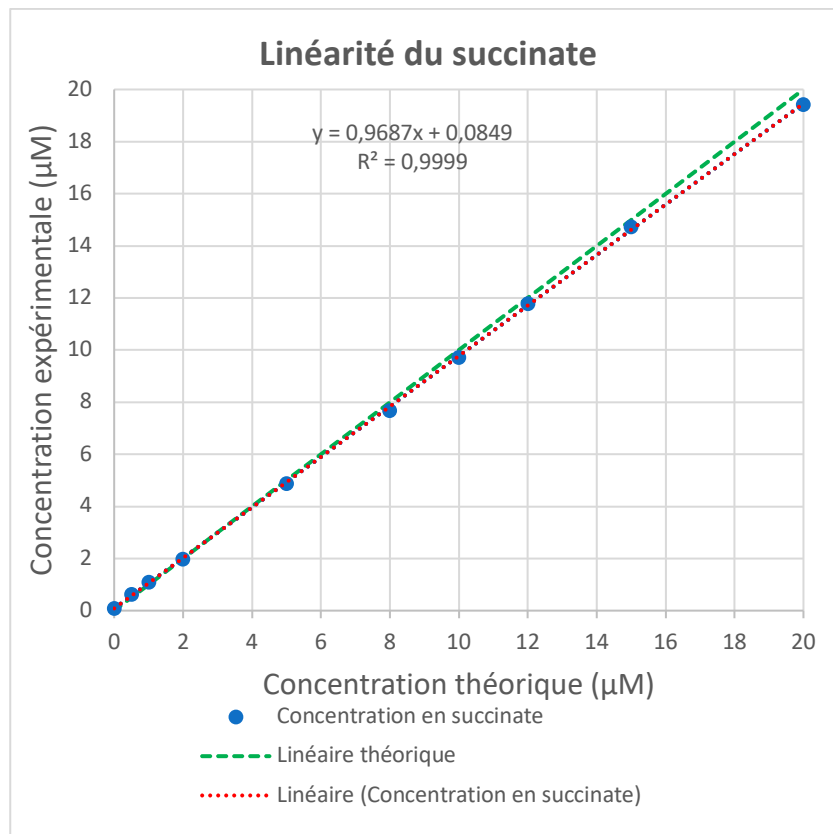


Figure 14 : Détermination de la linéarité du succinate.

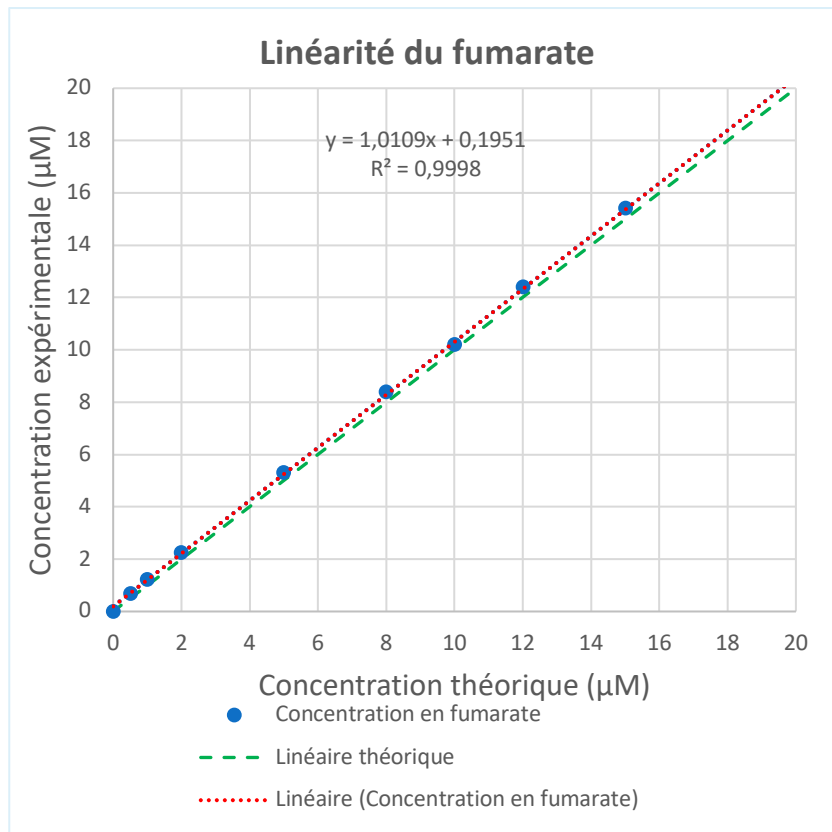


Figure 15 : Détermination de la linéarité du fumarate.

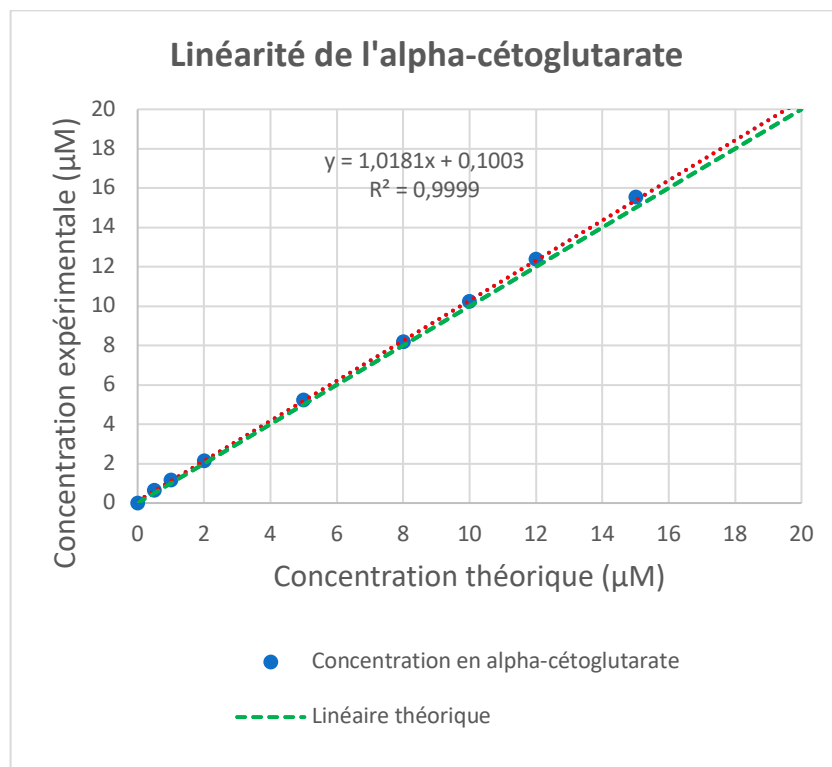


Figure 16 : Détermination de la linéarité de l'alpha-cétoglutarate.

4.2 UTILISATION DU SUCCINATE, DU FUMARATE ET DE L'ALPHA-CETOGLUTARATE EN TANT QUE BIOMARQUEURS

Vingt-et-un patients issus de la cohorte OncoMetab SDHx ont été répartis en 3 groupes : Régression, Stabilité et Progression.

La classification a été établie en fonction des données cliniques, radiologiques et biologiques. Les données recueillies au moment de chaque prélèvement ont été comparées à celles du prélèvement suivant pour statuer de l'évolutivité de la maladie. Les moyennes des ratios succinate/fumarate (S/F) et succinate/AKG (S/AKG) ont été calculées pour chaque groupe.

Tableau 6 : Moyennes des ratios succinate/fumarate (S/F) et succinate/AKG (S/AKG) au sein des groupes Régression, Stabilité et Progression. Résultats exprimés en moyennes de ratios.

Temps de prélèvement	Ratios	Régression	Stabilité	Progression
T1	S/F	13.4	7.5	9.6
	S/AKG	17.2	27.9	13.4
T2	S/F	11.9	8.1	12.9
	S/AKG	19.5	7.8	17.5
T3	S/F		7.5	11.6
	S/AKG		5.7	8.6

Les patients du groupe régression présentent une décroissance du ratio succinate/fumarate au cours du temps avec un ratio moyen égal à 13.4 au temps T1 et 11.9 au T2. La courbe de tendance (superposée à la courbe de suivi) présente un coefficient directeur négatif égal à -1,519 (Figure 17).

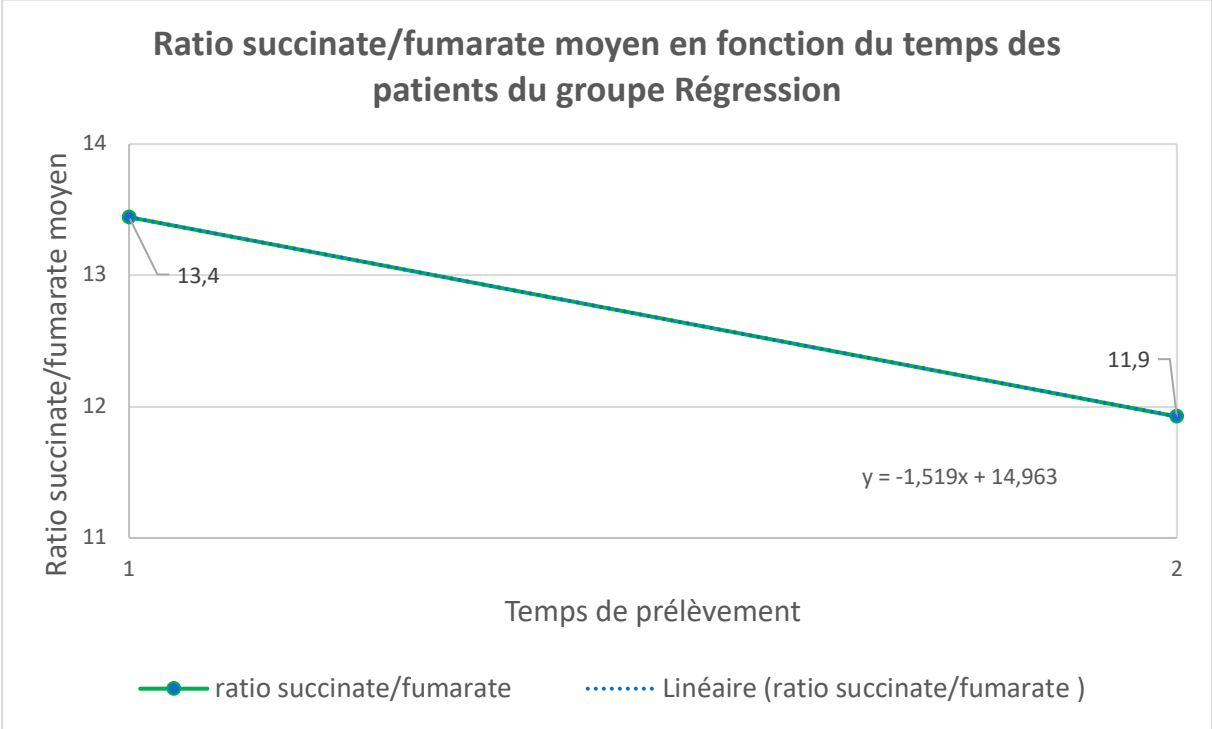


Figure 17 : Évolution du ratio succinate/fumarate en fonction du temps au sein du groupe Régression. Résultats exprimés en ratio moyen.

Dans le groupe stabilité, les ratios succinate/fumarate observés stagnent avec une moyenne égale à 7.5 au T1, 8.1 au T2 et 7.5 au T3. La courbe de tendance présente un coefficient directeur quasiment nul (-0,0083) (Figure 18).

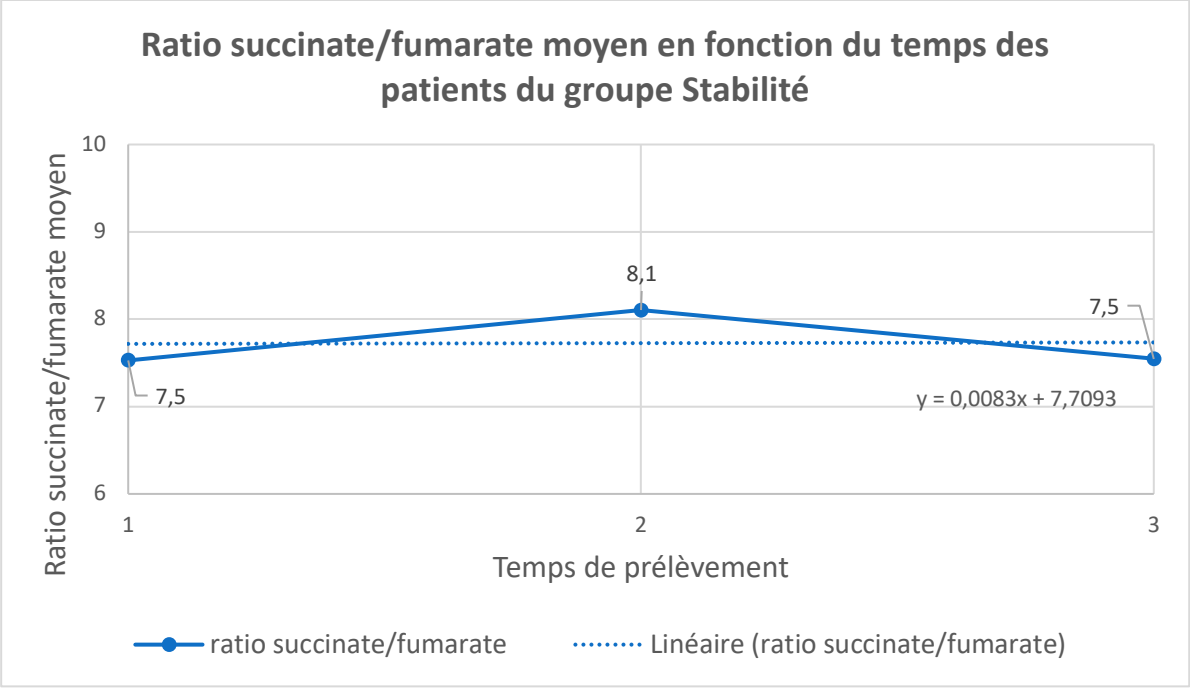


Figure 18 : Évolution du ratio succinate/fumarate au sein du groupe Stabilité. Résultats exprimés en ratios moyens.

Dans le groupe progression le ratio succinate/fumarate moyen est égal à 9,6 à T1, 12.9 au temps T2 puis 11.6 au T3. La courbe de tendance présente un coefficient directeur positif égal à 1,0096 (Figure 19).

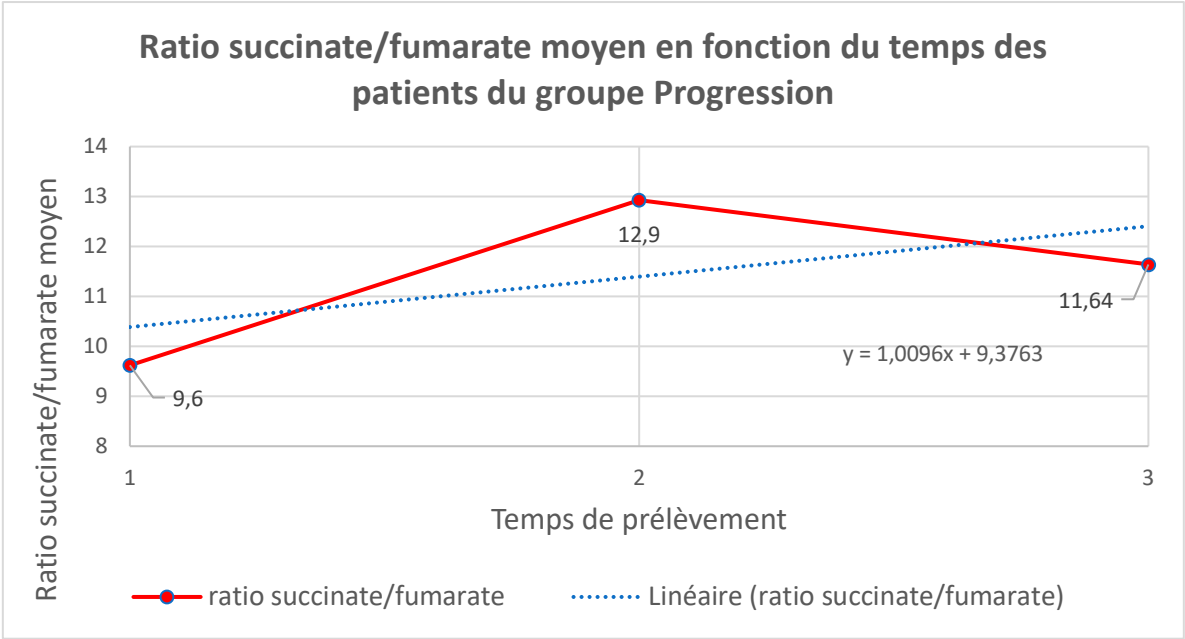


Figure 19 : Évolution du ratio succinate/fumarate au sein du groupe Progression. Résultats exprimés en ratios moyens.

La moyenne du ratio succinate/AKG, dans le groupe régression passe de 17.2 (T1) à 19.5 (T2). La courbe de tendance possède un coefficient directeur positif égal à 2,2932 (Figure 20).

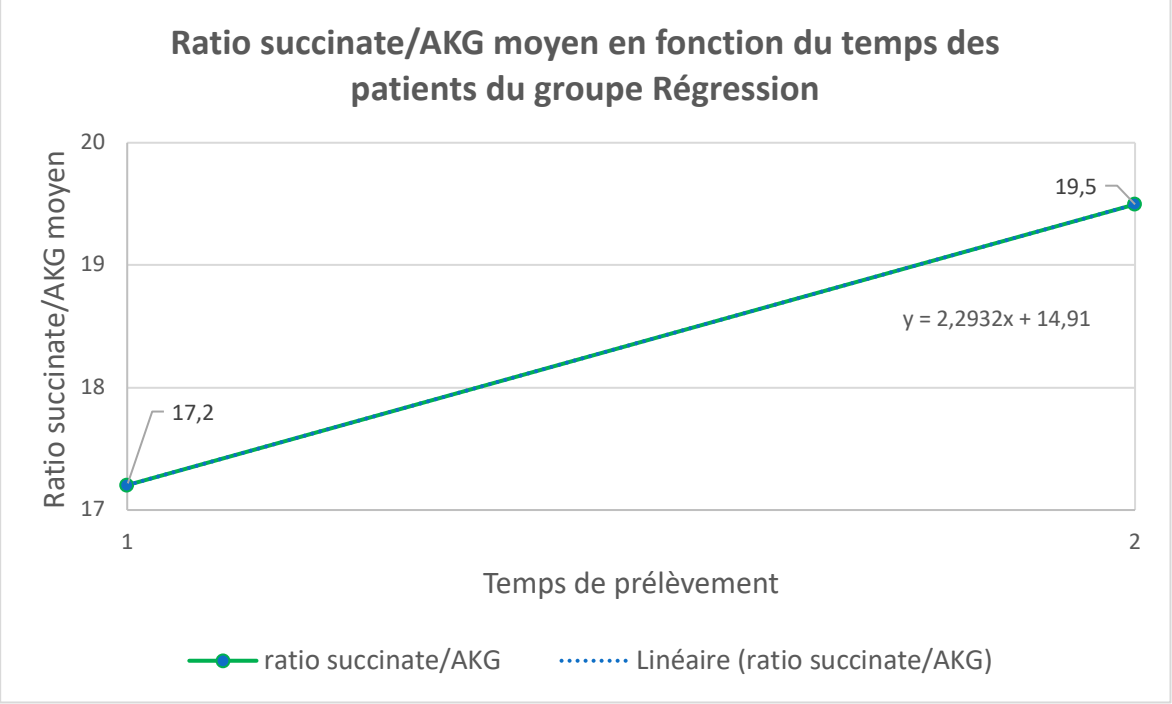


Figure 20 : Évolution du ratio succinate/AKG au sein du groupe Régression. Résultats exprimés en ratio moyen.

Au sein du groupe stabilité, le ratio succinate/AKG est de 27.9 au T1 puis 7.8 au T2, et enfin 5.7 au T3. Le coefficient directeur de la courbe de tendance est négatif (-11,081) (Figure 21).

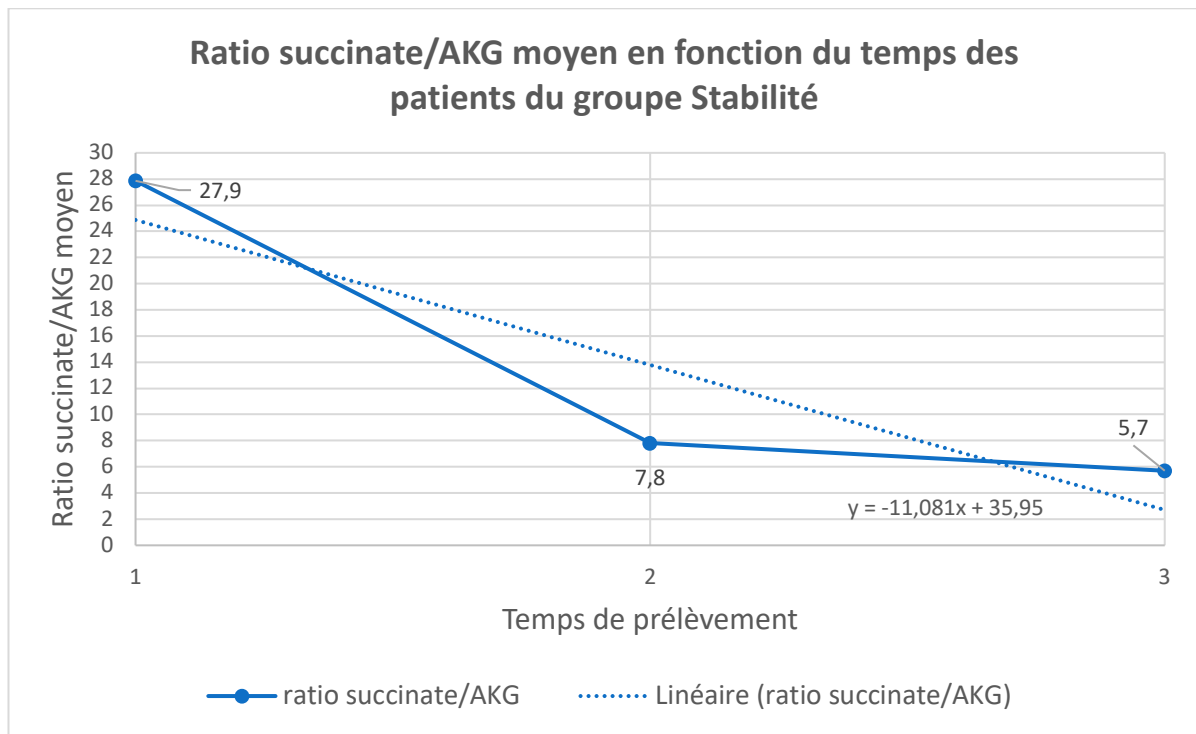


Figure 21 : Évolution du ratio succinate/AKG au sein du groupe Stabilité. Résultats exprimés en ratio moyen.

Au sein du groupe Progression, le ratio succinate/AKG est égal à 13.4 au T1 puis 17.5 au temps T2 et enfin 8.6 au temps T3. Le coefficient directeur de la courbe de tendance est négatif (-2,4317) (Figure 22).

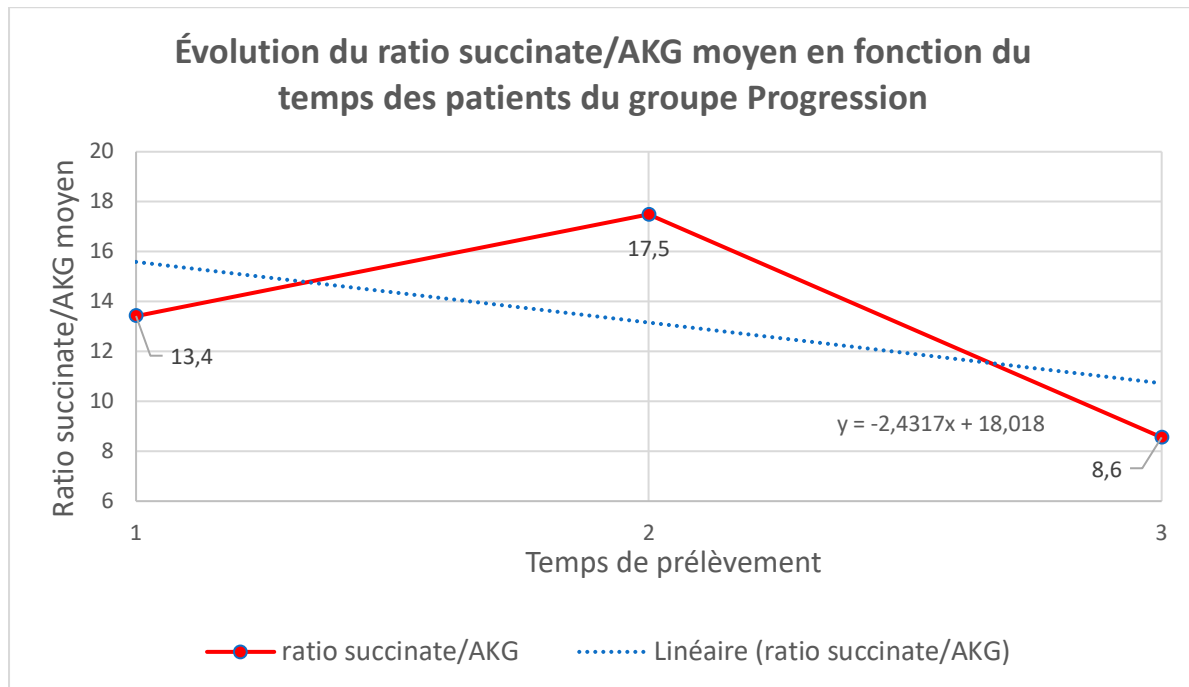


Figure 22 : Évolution du ratio succinate/AKG au sein du groupe Progression. Résultats exprimés en ratio moyen.

5 DISCUSSION

5.1 ANALYSE CRITIQUE DES RESULTATS DE VALIDATION DE METHODE

La méthode mise au point répond aux objectifs de répétabilité et de fidélité intermédiaire, le CV seuil est fixé à 20%. Pour les quatre niveaux de concentrations testés, les coefficients de variations obtenus lors des essais de répétabilité sont tous inférieurs à 3% et s'étendent de 1,12% à 10,90% dans les essais de fidélité intermédiaire. Ces résultats témoignent des bonnes capacités de la méthode à fournir des résultats identiques lorsque les conditions analytiques sont contrôlées mais également lorsqu'elles sont sujettes à variations.

Les limites de quantification (LOQ) et de détection (LOD) sont suffisamment basses pour détecter de très faibles quantités d'oncométabolites. Les LOD étant égales à 0,16 μM pour le succinate, 0,014 μM pour le fumarate et 0,008 μM pour l'alpha-cétoglutarate. Les LOQ étant égales à 0,241 μM pour le succinate, 0,123 μM pour le fumarate et 0,671 μM pour l'alpha-cétoglutarate.

Concernant l'étude de linéarité, cette dernière montre un coefficient de détermination R^2 supérieur à 99% pour les 3 paramètres confirmant le caractère linéaire de la méthode

Nous avons donc mis au point une méthode applicable en routine de laboratoire pour déterminer les concentrations circulantes de succinate de fumarate ou d'AKG. Elle vient ainsi améliorer la méthode précédente développée en 2020 par le service par le changement d'étalons internes, passant d'éléments marqués au deutérium au profit

du carbone 13 (^{13}C) plus stable et par l'ajout de l'alpha-cétoglutarate au panel des oncométabolites. L'accumulation de succinate induit par les mutations *SDHx* inhibe des enzymes dépendantes de l'alpha-cétoglutarate comme les PHDs, intégrer ce dernier à notre méthode permettra d'apprécier les versants inhibiteur et activateur enzymatique plus finement. La *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) est également plus avantageuse comparativement au mode *single ion monitoring* de l'ancienne méthode en raison de son caractère plus sensible et sélectif, d'une minimisation des interférences de matrice par la réduction du bruit de fond.

5.2 ANALYSE CRITIQUE DES DONNEES DE SUIVI LONGITUDINAL

La quantification précise des concentrations sériques de succinate, de fumarate et d'alpha-cétoglutarate ainsi que l'analyse des ratios succinate/fumarate et succinate/AKG sont de possibles outils prometteurs du suivi des perturbations métaboliques spécifiques des paragangliomes et phéochromocytomes associés aux mutations *SDHx*. La quantification de ces paramètres et la détermination des ratios dans le cadre du suivi pourrait non seulement permettre une évaluation en temps réel de l'efficacité du traitement, mais aussi favoriser une détection précoce des récives, permettant ainsi d'apporter une action thérapeutique précoce.

Au sein du groupe Régression, la ratio succinate/fumarate décroît, passant de 13.4 au T1 à 11.9 au T2 (Tableau 6 et Figure 17) tandis que l'on constate une légère ascension du ratio succinate/AKG de 17.2 au T1 à 19.5 au T2 avec un coefficient directeur de la courbe de tendance égal à 2,2932 (Tableau 6 et Figure 20). La diminution du ratio succinate/fumarate modélisée par la courbe de tendance décroissante, dont le coefficient directeur est égal à -1.519, est en cohérence avec une réduction de l'activité

métabolique tumorale. Cependant, l'augmentation du ratio succinate/AKG n'est pas explicable avec les données actuelles et pourrait être en rapport avec une accumulation persistante de succinate malgré la diminution de fumarate ou des altérations métaboliques résiduelles encore non résolues.

Au sein du groupe Stabilité, les ratios succinate/fumarate moyens sont relativement stables, 7.5 au T1, 8.1 au T2 et 7.5 au T3 (Tableau 6 et Figure 18), le ratio succinate/AKG montre en revanche une décroissance notable passant de 27.9 au T1 à 5.7 au T3 (Tableau 6 et Figure 21). Les coefficients directeurs des courbes de tendance sont de 0,0083 pour le ratio succinate/fumarate et -11,081 pour le ratio succinate/AKG. Cette relative stabilité du ratio succinate/fumarate modélisée par la courbe de tendance linéaire dont la pente est quasiment nulle traduirait une absence de progression clinique et métabolique de la maladie. Cependant, la nette diminution du ratio succinate/AKG entre les temps T1 et T2 est due à une valeur aberrante d'un patient chez qui l'alpha-cétoglutarate est présent en très faible quantité, ce qui a pour effet de tirer la moyenne du ratio succinate/AKG vers le haut.

Le retrait de cette valeur aberrante abaisse considérablement la moyenne du ratio succinate/AKG au T1, passant de 27.9 à 7.4 et modifie l'allure de la courbe de tendance, réduisant le coefficient directeur de cette dernière à -0,8741. La courbe modélisant le suivi du ratio succinate/AKG au sein de ce groupe, de même que la courbe de tendance, présentent une allure plus cohérente avec la clinique des patients (Tableau 7 et Figure 23).

Tableau 7 : Ratios succinate/AKG après retrait d'une valeur aberrante au temps T1 dans le groupe Stabilité. Résultats exprimés en moyennes de ratios.

Temps de prélèvement	Avant retrait valeur aberrante	Après retrait valeur aberrante
T1	27.9	7.4
T2	7.8	7.8
T3	5.7	5.7

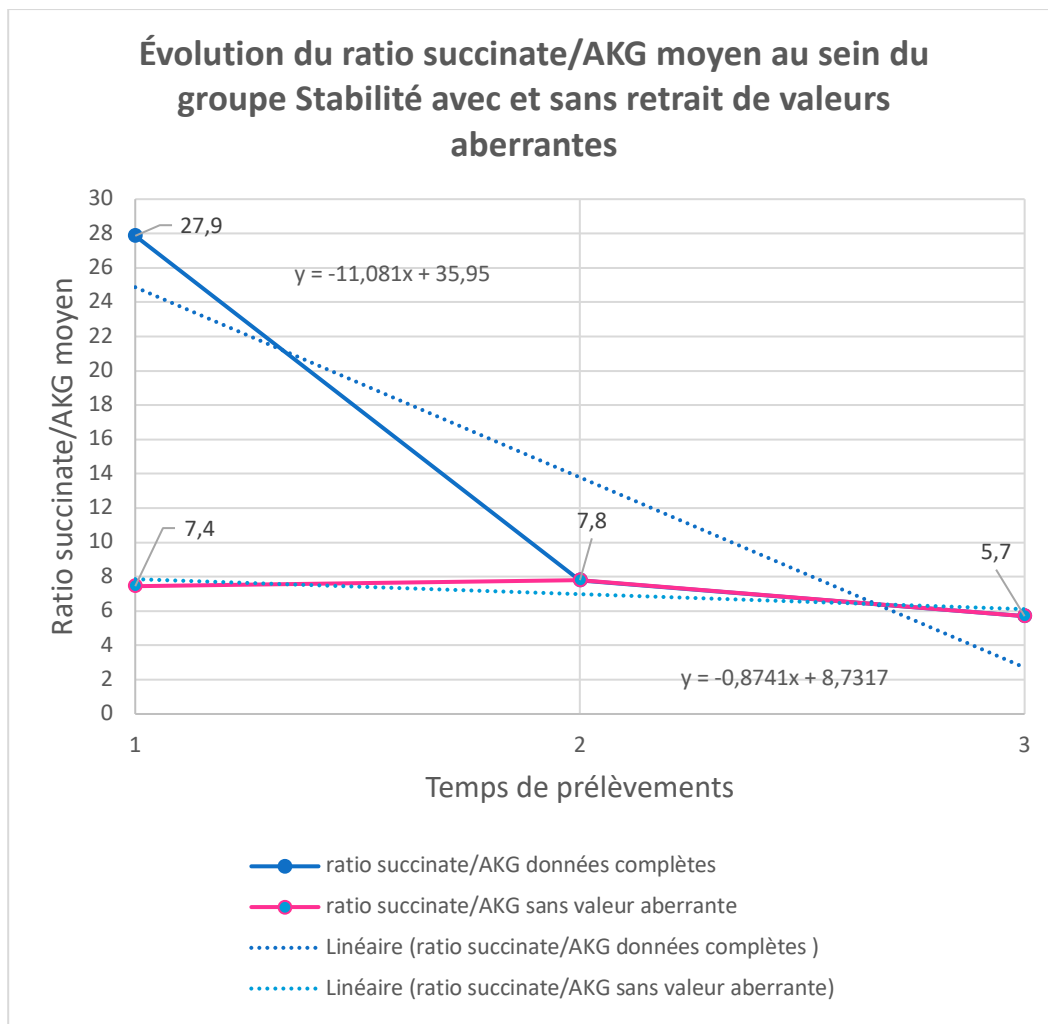


Figure 23 : Évolution du ratio succinate/AKG moyen au sein du groupe Stabilité avec et sans retrait de valeurs aberrantes. Résultats exprimés en ratio moyen.

Au sein du groupe Progression on constate une tendance croissante du ratio succinate/fumarate, les valeurs passant de 9,6 au T1 à 12,9 au T2 suivie d'une légère décroissance à 11,6 au T3 (Tableau 6 et Figure 19), un profil de variation similaire est également visible pour le ratio succinate/AKG (13.4 au T1 puis 17.5 au T2 et 8.6 à T3) (Tableau 6 et Figure 22). La courbe de tendance linéaire pour le ratio succinate/fumarate présente une pente croissante de coefficient directeur égal à 1,0096, ce qui suggérerait une augmentation de l'activité métabolique ou de la masse tumorale (Figure 19). En revanche, la courbe de tendance linéaire du ratio succinate/AKG décroît avec un coefficient directeur égal à -2,4317 (Figure 22). Cette tendance décroissante n'est pas actuellement interprétable avec les données disponibles.

La comparaison des ratios succinate/fumarate entre les groupes Stabilité et Progression montre des valeurs globalement plus élevées dans le groupe Progression avec de surcroît une dynamique ascendante alors qu'elles restent stables dans le groupe Stabilité. L'allure des courbes de tendance est nettement différente également. En effet, les coefficients directeurs de ces dernières sont de 1,0096 pour le groupe Progression et 0,0083 pour le groupe Stabilité (Figure 24). Ceci vient renforcer l'idée que des ratios plus élevés sont observés chez des patients à forte masse tumorale ou activité métabolique élevée. En revanche, comme dit précédemment, les ratios succinate/fumarate moyens sont relativement stables dans le groupe Stabilité. Ceci suggère que nous pourrions utiliser la méthode de quantification mise au point pour le suivi des patients mutés dépourvus de tumeurs. L'augmentation de leur ratio succinate/fumarate suggérerait le développement d'un PPG.

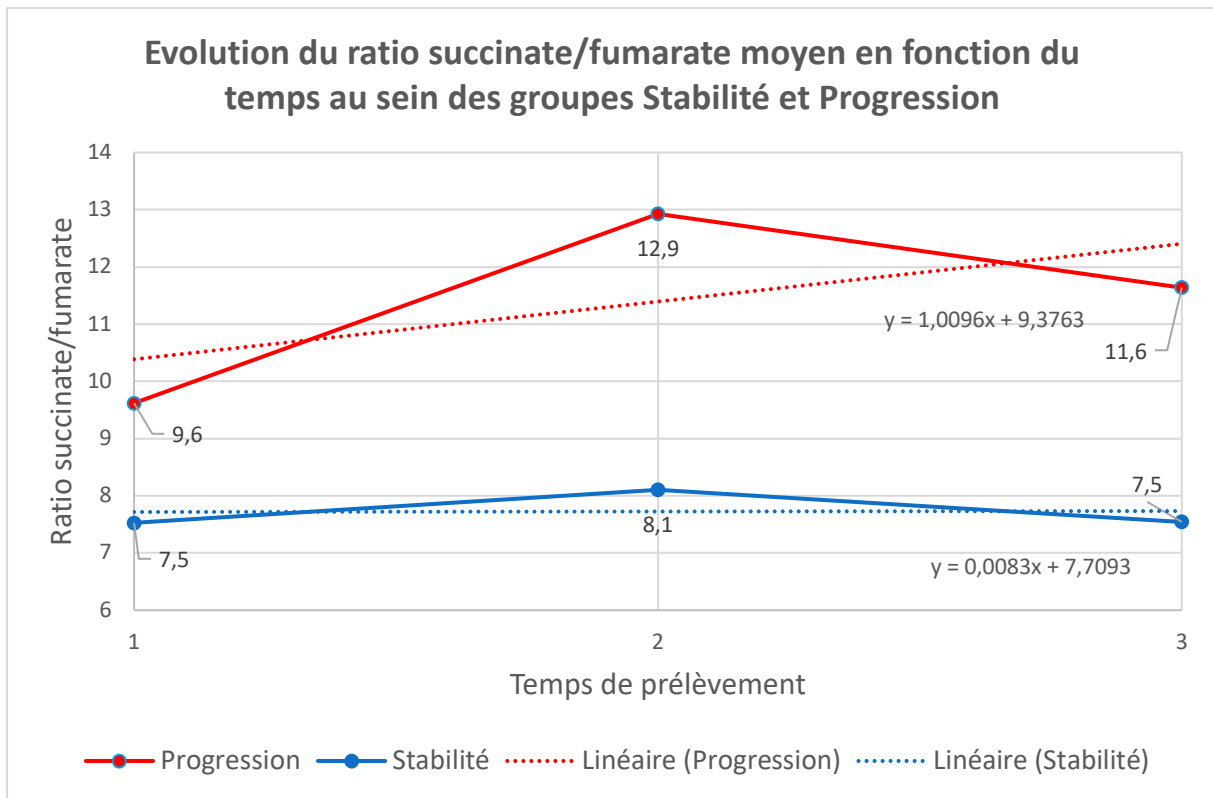


Figure 24 : Suivi longitudinal des ratios succinate/fumarate au sein des groupes Stabilité et Progression.
Résultats exprimés en ratio moyen.

Les données du suivi longitudinal de patients amorcé dans ce travail présentent des résultats encourageants mais présentent également quelques limites. Tout d'abord afin d'homogénéiser le recueil des données, il est nécessaire d'intégrer les patients dans un protocole de prise en charge et de suivi spécifique. Ce protocole serait axé sur un calendrier de prélèvement adapté au stade évolutif du patient. Cela permettrait de disposer du même nombre de prélèvement pour chacun des patients sur une période donnée. Les patients considérés stables bénéficieraient d'un prélèvement annuel afin de documenter une relative stagnation de leurs ratios ou leur augmentation en cas développement de tumeurs, tandis que les patients dont la maladie serait en progression pourrait être prélevé tous les six mois afin de documenter une ascension de leurs ratios. Les patients devant subir une intervention chirurgicale verrait cette

dernière encadrée par deux prélèvements sanguins afin de documenter la variation des différents ratio (succinate/fumarate et succinate/AKG).

Enfin, dans le cadre de ce travail, le manque de données ne provient pas du manque de patients mais de la nécessité de disposer d'un minimum de deux prélèvements par patient, ce qui n'était pas toujours le cas. De plus, l'ancienneté de certains prélèvements sanguins, parfois de plusieurs années, ne nous permettait pas de pouvoir les analyser.

6 CONCLUSION

Les phéochromocytomes et les paragangliomes (PPG) sont des tumeurs neuroendocrines dérivant de la médullo-surrénale ou des ganglions des systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Leur présentation clinique de même que leur localisation sont sujettes à beaucoup de variation. La présence de tumeurs multiples ou malignes révèle souvent la présence d'un syndrome de prédisposition héréditaire pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. Les PPG *SDHx*, liés à des mutations des gènes *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* et *SDHAF2*, sont responsables d'une grande morbi-mortalité du fait d'un risque non négligeable de récurrence et de dissémination métastatique. Afin de proposer un suivi adapté plus précoce, toute identification de mutation *SDHx* chez un patient doit conduire au dépistage des apparentés. Un suivi à vie est indispensable pour les patients présentant ce type de mutation. Les contraintes générées par la complexité du suivi de même que les VSI identifiés en NGS ont fait émerger la nécessité d'identifier de nouveaux biomarqueurs afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Nous proposons ici une méthode de quantification simultanée du succinate, du fumarate et de l'alpha-cétoglutarate par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La validation de méthode a montré de très bonnes performances analytiques et une capacité à obtenir des résultats fiables. L'utilisation du mode MRM à des fins de quantification présente un avantage certain. En effet, la double sélection de l'ion précurseur et de l'ion fragment qui correspond à une transition, permet une nette diminution du bruit de fond. Le rapport signal sur bruit s'en trouve amélioré, diminuant ainsi les limites de quantification. L'autre amélioration notable de la méthode consiste en l'utilisation d'étalons internes marqués au carbone

13, les rendant plus stables dans le temps en comparaison avec les éléments marqués au deutérium.

Le suivi longitudinal des ratios succinate/fumarate et succinate/AKG de patients présentant une mutation *SDHx* a permis d'obtenir des résultats prometteurs. Le ratio succinate/fumarate est cohérent avec le stade évolutif de la maladie et pourrait être utilisé dans le but d'évaluer l'évolutivité de la maladie, cependant l'interprétation du ratio succinate/AKG reste délicat car sujet à plus de variations. À la vue de ces résultats préliminaires encourageants, il serait nécessaire mettre en place un protocole spécifique afin d'homogénéiser le recueil de données.

À terme, nous espérons intégrer cette technique à la pratique courante du service de soin afin d'apporter un élément de suivi personnalisé aux patients présentant une mutation *SDHx*.

7 BIBLIOGRAPHIE

1. Lenders JWM, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SKG, Murad MH, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2014;99(6):1915-42.
2. Haute Autorité de Santé [Internet]. [cité 3 déc 2023]. Phéochromocytomes et Paragangliomes. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/p_3292734/fr/pheochromocytomes-et-paragangliomes
3. Cornu E, Belmihoub I, Burnichon N, Grataloup C, Zinzindohoué F, Baron S, et al. Phéochromocytome et paragangliome. *Rev Médecine Interne.* 1 nov 2019;40(11):733-41.
4. Aygun N, Uludag M. Pheochromocytoma and Paraganglioma: From Epidemiology to Clinical Findings. *Med Bull Sisli Etfal Hosp.* 3 juin 2020;54(2):159-68.
5. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion.* juin 2010;10(4):393-401.
6. Kiernan CM, Solórzano CC. Pheochromocytoma and Paraganglioma: Diagnosis, Genetics, and Treatment. *Surg Oncol Clin N Am.* janv 2016;25(1):119-38.
7. Chen H, Sippel RS, Pacak K. The NANETS Consensus Guideline for the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors: Pheochromocytoma, Paraganglioma & Medullary Thyroid Cancer. *Pancreas.* août 2010;39(6):775-83.
8. Baguet J, Hammer L, Mazzuco T, Chabre O, Mallion J, Sturm N, et al. Circumstances of discovery of phaeochromocytoma: a retrospective study of 41 consecutive patients. *Eur J Endocrinol.* 1 mai 2004;681-6.
9. Kopetschke R, Slisko M, Kilisli A, Tuschy U, Wallaschofski H, Fassnacht M, et al. Frequent incidental discovery of phaeochromocytoma: data from a German cohort of 201 phaeochromocytoma. *Eur J Endocrinol.* août 2009;161(2):355-61.
10. Solorzano CC, Lew JI, Wilhelm SM, Sumner W, Huang W, Wu W, et al. Outcomes of pheochromocytoma management in the laparoscopic era. *Ann Surg Oncol.* oct 2007;14(10):3004-10.
11. Lenders JWM, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Phaeochromocytoma. *Lancet Lond Engl.* 20 août 2005;366(9486):665-75.
12. Beltsevich DG, Kuznetsov NS, Kazaryan AM, Lysenko MA. Pheochromocytoma surgery: epidemiologic peculiarities in children. *World J Surg.* juin 2004;28(6):592-6.
13. Barontini M, Levin G, Sanso G. Characteristics of pheochromocytoma in a 4- to 20-year-old population. *Ann N Y Acad Sci.* août 2006;1073:30-7.

14. O'Riordain DS, Young WF, Grant CS, Carney JA, van Heerden JA. Clinical spectrum and outcome of functional extraadrenal paraganglioma. *World J Surg.* sept 1996;20(7):916-21; discussion 922.
15. Amar L, Bertherat J, Baudin E, Ajzenberg C, Bressac-de Paillerets B, Chabre O, et al. Genetic Testing in Pheochromocytoma or Functional Paraganglioma. *J Clin Oncol.* déc 2005;23(34):8812-8.
16. 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.* 1 nov 2011;29(31):4137-42.
17. 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.
18. Mannelli M, Castellano M, Schiavi F, Filetti S, Giacchè M, Mori L, et al. Clinically Guided Genetic Screening in a Large Cohort of Italian Patients with Pheochromocytomas and/or Functional or Nonfunctional Paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab.* mai 2009;94(5):1541-7.
19. Fishbein L, Merrill S, Fraker DL, Cohen DL, Nathanson KL. Inherited Mutations in Pheochromocytoma and Paraganglioma: Why All Patients Should Be Offered Genetic Testing. *Ann Surg Oncol.* mai 2013;20(5):1444-50.
20. Cascón A, Calsina B, Monteagudo M, Mellid S, Díaz-Talavera A, Currás-Freixes M, et al. Genetic bases of pheochromocytoma and paraganglioma. *J Mol Endocrinol.* 1 avr 2023;70(3):e220167.
21. 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.* mars 2016;22(3):302-14.
22. Ayala-Ramirez M, Feng L, Johnson MM, Ejaz S, Habra MA, Rich T, et al. Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators. *J Clin Endocrinol Metab.* mars 2011;96(3):717-25.
23. Crona J, Taïeb D, Pacak K. New Perspectives on Pheochromocytoma and Paraganglioma: Toward a Molecular Classification. *Endocr Rev.* 4 août 2017;38(6):489-515.
24. Kantorovich V, Pacak K. Pheochromocytoma and paraganglioma. *Prog Brain Res.* 2010;182:343-73.
25. Manger WM, Gifford RW. Pheochromocytoma. *J Clin Hypertens.* 31 mai 2007;4(1):62-72.

26. Madhok J, Kloosterboer A, Venkatasubramanian C, Mihm FG. Catecholamine-induced cerebral vasospasm and multifocal infarctions in pheochromocytoma. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 20 août 2020;2020:20-0078.
27. Lin PC, Hsu JT, Chung CM, Chang ST. Pheochromocytoma Underlying Hypertension, Stroke, and Dilated Cardiomyopathy. *Tex Heart Inst J.* 2007;34(2):244-6.
28. Majic T, Aiyagari V. Cerebrovascular manifestations of pheochromocytoma and the implications of a missed diagnosis. *Neurocrit Care.* 2008;9(3):378-81.
29. Bravo EL, Tagle R. Pheochromocytoma: state-of-the-art and future prospects. *Endocr Rev.* août 2003;24(4):539-53.
30. Neumann HPH, Young WF, Eng C. Pheochromocytoma and Paraganglioma. *N Engl J Med.* 8 août 2019;381(6):552-65.
31. Plouin PF, Degoulet P, Tugayé A, Ducrocq MB, Ménard J. [Screening for phaeochromocytoma : in which hypertensive patients? A semiological study of 2585 patients, including 11 with phaeochromocytoma (author's transl)]. *Nouv Presse Med.* 7 mars 1981;10(11):869-72.
32. Szatko A, Glinicki P, Gietka-Czernel M. Pheochromocytoma/paraganglioma-associated cardiomyopathy. *Front Endocrinol.* 13 juill 2023;14:1204851.
33. Batisse-Lignier M, Pereira B, Motreff P, Pierrard R, Burnot C, Vorilhon C, et al. Acute and Chronic Pheochromocytoma-Induced Cardiomyopathies: Different Prognoses? *Medicine (Baltimore).* 18 déc 2015;94(50):e2198.
34. Y-Hassan S, Falhammar H. Pheochromocytoma- and paraganglioma-triggered Takotsubo syndrome. *Endocrine.* 2019;65(3):483-93.
35. LENDERS JWM, KERSTENS MN, AMAR L, PREJBISZ A, ROBLEDO M, TAIEB D, et al. Genetics, diagnosis, management and future directions of research of phaeochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* août 2020;38(8):1443-56.
36. Eisenhofer G, Peitzsch M. Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Chem.* déc 2014;60(12):1486-99.
37. Zuber S, Wesley R, Prodanov T, Eisenhofer G, Pacak K, Kantorovich V. Clinical utility of chromogranin A in SDHx-related paragangliomas. *Eur J Clin Invest.* avr 2014;44(4):365-71.
38. 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.* mai 2016;174(5):G1-10.
39. Carrasquillo JA, Chen CC, Jha A, Ling A, Lin FI, Pryma DA, et al. Imaging of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *J Nucl Med.* 1 août 2021;62(8):1033-42.

40. Taïeb D, Hicks RJ, Hindié E, Guillet BA, Avram A, Ghedini P, et al. European Association of Nuclear Medicine Practice Guideline/Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Procedure Standard 2019 for radionuclide imaging of pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. sept 2019;46(10):2112-37.
41. Castinetti F, Qi XP, Walz MK, Maia AL, Sansó G, Peczkowska M, et al. Outcomes of adrenal-sparing surgery or total adrenalectomy in pheochromocytoma associated with multiple endocrine neoplasia type 2: an international retrospective population-based study. *Lancet Oncol*. mai 2014;15(6):648-55.
42. 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*. déc 2006;140(6):943-8; discussion 948-950.
43. 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*. avr 2016;154(4):597-605.
44. Pacak K. Preoperative management of the pheochromocytoma patient. *J Clin Endocrinol Metab*. nov 2007;92(11):4069-79.
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 JM, Cuenca X, Mazon JJ, et al. Treatment of head and neck paragangliomas with external beam radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 juin 2014;89(2):353-9.
47. 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*. 12 juin 2017;102(9):3296-305.
48. 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*. 15 juin 2017;23(12):e68-75.
49. 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*. 1 sept 2017;102(9):3278-87.
50. 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*. oct 2006;47(10):1599-606.

51. Gonas 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*. 1 sept 2009;27(25):4162-8.
52. 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*. déc 1997;20(11):648-58.
53. 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*. 15 oct 2008;113(8):2020-8.
54. 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*. 15 août 1988;109(4):267-73.
55. 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)*. nov 2014;81(5):642-51.
56. 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*. 31 janv 2003;299(5607):700-4.
57. Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, et al. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. 1 juill 2005;121(7):1043-57.
58. Buffet A, Burnichon N, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP. An overview of 20 years of genetic studies in pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. mars 2020;34(2):101416.
59. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 1 janv 2005;7(1):77-85.
60. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. sept 2015;5(5):378-89.
61. Yang M, Su H, Soga T, Kranc KR, Pollard PJ. Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. *Hypoxia*. 30 août 2014;2:127-42.
62. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. oct 2003;3(10):721-32.
63. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 9 nov 2001;294(5545):1337-40.

64. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, et al. Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 oct 1999;96(22):12436-41.
65. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 5 oct 2001;107(1):43-54.
66. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 27 nov 2002;111(5):709-20.
67. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 20 mai 1999;399(6733):271-5.
68. Block KM, Wang H, Szabó LZ, Polaske NW, Henchey LK, Dubey R, et al. Direct inhibition of hypoxia-inducible transcription factor complex with designed dimeric epidithiodiketopiperazine. *J Am Chem Soc*. 23 déc 2009;131(50):18078-88.
69. Dann CE, Bruick RK, Deisenhofer J. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1: An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 nov 2002;99(24):15351-6.
70. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 15 juin 2002;16(12):1466-71.
71. McNeill LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horsfall LE, Schofield CJ. Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J*. 1 nov 2002;367(Pt 3):571-5.
72. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. sept 2008;8(9):705-13.
73. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 10 août 1956;124(3215):269-70.
74. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 16 févr 2001;49(3):507-21.
75. Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer*. 2014;135(10):2237-48.
76. Lorient C, Burnichon N, Gadessaud N, Vescovo L, Amar L, Libé R, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Is Activated in Metastatic Pheochromocytomas and Paragangliomas Caused by SDHB Gene Mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 juin 2012;97(6):E954-62.

77. Letouzé E, Martinelli C, Lorient C, Burnichon N, Abermil N, Ottolenghi C, et al. SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell*. 10 juin 2013;23(6):739-52.
78. Hanson H, Durkie M, Lalloo F, Izatt L, McVeigh TP, Cook JA, et al. UK recommendations for SDHA germline genetic testing and surveillance in clinical practice. *J Med Genet*. févr 2023;60(2):107-11.
79. van der Tuin K, Mensenkamp AR, Tops CMJ, Corssmit EPM, Dinjens WN, van de Horst-Schrivers AN, et al. Clinical Aspects of SDHA-Related Pheochromocytoma and Paraganglioma: A Nationwide Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 févr 2018;103(2):438-45.
80. Casey RT, Ascher DB, Rattenberry E, Izatt L, Andrews KA, Simpson HL, et al. SDHA related tumorigenesis: a new case series and literature review for variant interpretation and pathogenicity. *Mol Genet Genomic Med*. mai 2017;5(3):237-50.
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*. déc 2012;49(12):768-76.
82. Ka A, Db A, Dev P, Dr B, L V, Rt C, et al. Tumour risks and genotype-phenotype correlations associated with germline variants in succinate dehydrogenase subunit genes SDHB, SDHC and SDHD. *J Med Genet* [Internet]. juin 2018 [cité 31 mai 2024];55(6). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29386252/>
83. Burnichon N, Mazzella JM, Druil D, Amar L, Bertherat J, Coupié I, et al. Risk assessment of maternally inherited SDHD paraganglioma and pheochromocytoma. *J Med Genet*. févr 2017;54(2):125-33.
84. Bayley JP, Kunst HPM, Cascon A, Sampietro ML, Gaal J, Korpershoek E, et al. SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and pheochromocytoma. *Lancet Oncol*. avr 2010;11(4):366-72.
85. 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*. juill 2014;99(7):E1392-1396.
86. Muth A, Crona J, Gimm O, Elmgren A, Filipsson K, Stenmark Askmalm M, et al. Genetic testing and surveillance guidelines in hereditary pheochromocytoma and paraganglioma. *J Intern Med*. févr 2019;285(2):187-204.
87. NGS in PPGL (NGSnPPGL) Study Group, Toledo RA, Burnichon N, Cascon A, Benn DE, Bayley JP, et al. Consensus Statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Nat Rev Endocrinol*. avr 2017;13(4):233-47.
88. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and

the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* mai 2015;17(5):405-24.

89. Lima JV, Scalissi NM, de Oliveira KC, Lindsey SC, Olivati C, Ferreira EN, et al. Germline genetic variants in pheochromocytoma/paraganglioma: single-center experience. *Endocr Oncol.* 10 mai 2023;3(1):e220091.
90. Parisien-La Salle S, Dumas N, Bédard K, Jolin J, Moramarco J, Lacroix A, et al. Genetic spectrum in a Canadian cohort of apparently sporadic pheochromocytomas and paragangliomas: New data on multigene panel retesting over time. *Clin Endocrinol (Oxf).* juin 2022;96(6):803-11.
91. van Nederveen FH, Gaal J, Favier J, Korpershoek E, Oldenburg RA, de Bruyn EMCA, et al. An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol.* août 2009;10(8):764-71.
92. Korpershoek E, Favier J, Gaal J, Burnichon N, van Gessel B, Oudijk L, et al. SDHA immunohistochemistry detects germline SDHA gene mutations in apparently sporadic paragangliomas and pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab.* sept 2011;96(9):E1472-1476.
93. Broudin C, Favier J, Verkarre V, Méatchi T. [Pathologist contribution in the diagnosis of hereditary predisposition to paraganglioma and pheochromocytoma]. *Ann Pathol.* avr 2020;40(2):134-41.
94. Amar L, Pacak K, Steichen O, Akker SA, Aylwin SJB, Baudin E, et al. International consensus on initial screening and follow-up of asymptomatic SDHx mutation carriers. *Nat Rev Endocrinol.* juill 2021;17(7):435-44.
95. Bancel LP, Masso V, Dessein AF, Aubert S, Leteurtre E, Coppin L, et al. Serum Succinate/Fumarate Ratio in Patients With Paraganglioma/Pheochromocytoma Attending an Endocrine Oncogenetic Unit. *J Clin Endocrinol Metab.* 18 août 2023;108(9):2343-52.
96. Lamy C, Tissot H, Faron M, Baudin E, Lamartina L, Pradon C, et al. Succinate: A Serum Biomarker of SDHB-Mutated Paragangliomas and Pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 28 sept 2022;107(10):2801-10.

AUTEUR : Nom : LEFINT Prénom : Ronny

Date de soutenance : 26 septembre 2024

Titre de la thèse : Détection des oncométabolites circulants par MRM chez les patients porteurs de mutations *SDHx*.

Thèse – Médecine – Lille 2024

Cadre de classement : *Biologie médicale*

DES + spécialité : *Biologie médicale*

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

Contexte : Les syndromes *Paragangliomas* sont caractérisés par le développement de phéochromocytomes et paragangliomes en lien avec une mutation constitutionnelle pathogène d'un gène du complexe de la succinate déshydrogénase (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* ou *SDHAF2*). Cette mutation entraîne une accumulation cytosolique de succinate. L'objectif de ce travail est le développement d'une méthode quantifiant le succinate, le fumarate et l'alpha-cétoglutarate (AKG) en tant que biomarqueurs utilisables dans le suivi des patients porteurs de mutations *SDHx*.

Méthode : Nous proposons une méthode de dosage du succinate, du fumarate et de l'alpha-cétoglutarate sériques en dilution isotopique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Après avoir analysé les performances du système analytique, les ratios succinate/fumarate et succinate/AKG moyens ont été calculés au sein de trois groupes de patients (Régression, Stabilité et Progression) répartis selon l'évolutivité de la maladie.

Résultats : Les critères de validation de la méthode ont été respectés. Nous avons pu observer au cours du suivi la tendance des ratios au sein des trois groupes. Le ratio succinate/fumarate tend à décroître dans le groupe Régression, stagne dans le groupe Stabilité et croît dans le groupe Progression. En revanche, l'interprétation du ratio succinate/AKG se révèle plus délicate.

Conclusion : La méthode mise au point s'avère robuste et servirait à poursuivre le suivi longitudinal des patients porteurs de mutations *SDHx* dans le cadre d'un protocole de prise en charge spécifique. Le ratio succinate/fumarate s'avère cohérent avec le stade évolutif de la maladie, cependant l'interprétation du ratio succinate/AKG est quant à elle sujette à variations. Les données recueillies dans le cadre de ce suivi sont pour le moins encourageantes, le suivi des ratios succinate/fumarate et succinate/AKG seraient utilisées afin d'apporter un élément de prise en charge personnalisée des patients.

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur Pascal PIGNY

Assesseurs : Madame le Docteur Catherine CARDOT BAUTERS

Madame le Docteur Lucie COPPIN

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur BANCEL Léo-Paul