



HAL
open science

Métabolomique par spectroscopie RMN HRMAS appliquée à l'hyperparathyroïdie et aux tumeurs pancréatiques

Stéphanie Battini

► **To cite this version:**

Stéphanie Battini. Métabolomique par spectroscopie RMN HRMAS appliquée à l'hyperparathyroïdie et aux tumeurs pancréatiques. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ005 . tel-01558860

HAL Id: tel-01558860

<https://theses.hal.science/tel-01558860>

Submitted on 10 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 7357

THÈSE présentée par :

Stéphanie BATTINI

soutenue le : **19 janvier 2017**

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

Discipline/Spécialité : Sciences Médicales

Métabolomique par spectroscopie RMN HRMAS appliquée à l'hyperparathyroïdie et aux tumeurs pancréatiques

Directeur de thèse	NAMER, Izzie-Jacques	PU-PH, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg
Directeur de thèse	ELBAYED, Karim	MCF, Université de Strasbourg
Rapporteur	PONCET, Gilles	PU-PH, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Université de Lyon
Rapporteur	MESNARD, François	Pr, Université de Picardie
Examineur	HEYD, Bruno	PU-PH, Hôpitaux Universitaires de Besançon
Examineur	ARMSPACH, Jean-Paul	IR, Université de Strasbourg

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier Monsieur le Professeur Michel de Mathelin de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie le Cancéropôle du Grand-Est d'avoir financé cette thèse.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mes deux directeurs de thèse : Monsieur le Professeur Izzie-Jacques Namer pour son encadrement qui a permis de mener à bien ces travaux et Monsieur le Docteur Karim Elbayed.

Je remercie Messieurs les Professeurs Gilles Poncet et François Mesnard de me faire l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je tiens à adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur Bruno Heyd et Monsieur le Docteur Jean-Paul Armspach de me faire l'honneur de siéger dans ce jury de thèse.

Je voudrais remercier Eric Salomon pour m'avoir initiée au travail de recherche lors de mon premier stage de laboratoire en Master.

Comment ne pas remercier David Taïeb qui a encadré mon stage de Master 2, m'a transmis sa passion pour la recherche et toujours soutenue.

Je voudrais remercier chaleureusement François-Marie Moussallieh pour son encadrement au début de ma thèse.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible : l'ensemble du personnel du Cancéropôle du Grand-Est, Monsieur le Professeur Philippe Bachellier, François Faitot, Gerlinde Averous ainsi que tout le personnel du Service d'Anatomie Pathologique et du CRB. Rosalie, Florence et Thuy-Tien, merci les filles !

J'adresse également mes remerciements les plus vifs au Docteur Martial Piotto, à Monsieur le Professeur Laurent Brunaud, Monsieur le Docteur Stéphane Koch et Marion Bourde-loie. Marion, merci pour ta disponibilité et ton soutien et au fait, faut la faire maintenant cette rando ! Ercüment, thank you for all !

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Alessio Imperiale.

Je souhaite également une bonne continuation à mes collègues Esther, Mojdeh, Elisa et Cyrille.

Béatrice et Mylène, merci pour votre bonne humeur et votre soutien au quotidien.

Elise, merci pour ton amitié et ta bienveillance à mon égard.

Un grand merci à mes amis de Marseille et de Grenoble, Cendrine, Claire, Thomas, Simon et Amélie.

A mes amis Strasbourgeois, Mélissa, Alexia, Valérie, Chloé, Fanny, Valentine, Clément, Aude, Chloé et Marion, merci d'être là tout simplement.

A mes amis Corses, Céline (plus de 20 ans déjà!), Cécile, Luc, Laurent (merci pour tous tes encouragements depuis le début et pour toutes les heures passées au téléphone quand ça n'allait pas!), Lionel et Florence (la terrible!, toujours là!).

Aurélié, toi aussi, si tu n'existais pas je t'aurais inventée! Tu le sais, "C'est pas pareil;)"! Merci pour tout.

Eric et Anne-Marie, merci pour votre soutien.

Laurence merci pour ton aide de tous les instants!

Hava et Sinan, plus que des amis, vous faites partie de ma famille <3

Mes cousines adorées Paule et Dume et leurs magnifiques filles <3 ainsi que ma tante Chantal! Vous avez toujours été là pour moi.

Je remercie du fond du coeur toute ma famille de Corse et d'Alsace (désolée, mais vous êtes trop nombreux pour être cités!).

A mes amours de parents, Papa, Maman, merci pour tout. Tout ce que j'accomplis, c'est grâce à vous, à votre soutien indéfectible. Malgré la distance qui nous sépare, vous êtes toujours là et encore plus dans les moments difficiles <3.

A Alexis, qui a toujours été à l'écoute, m'a toujours soutenue, encouragée, motivée (supportée!) dans tout ce que j'ai pu entreprendre. Merci pour ta patience, pour tout, merci d'être là <3.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Introduction à la métabolomique	2
1.2	Techniques analytiques en métabolomique	5
1.3	Rotation à l'angle magique (<i>MAS</i>)	7
1.4	Métabolomique en oncologie	11
1.4.1	Métabolisme des cancers	11
1.4.2	Régulateurs du métabolisme	14
1.4.2.1	Autophagie	14
1.4.2.2	Voie PI3k/Akyt/mTor	15
1.4.2.3	Macropinocytose	16
1.4.2.4	Métabolisme du glucose anabolique	16
1.4.2.5	Métabolisme de la glutamine	19
1.4.2.6	Hypoxie	22
1.4.2.7	Gènes suppresseurs de tumeurs	23
1.4.2.8	Voie des acides gras et des lipides	26
1.4.2.9	Biosynthèse du nicotinamide adénine dinucléotide	27
1.4.3	Applications	28
1.4.3.1	Tumeurs cérébrales	28
1.4.3.2	Cancers du sein	29
1.4.3.3	Cancers de la prostate	30
1.4.3.4	Cancers liés au système neuroendocrinien	31
1.4.3.5	Cancers des ovaires	32
1.4.3.6	Cancers urinaires	33
1.4.3.7	Cancers de l'oesophage	34
1.4.3.8	Cancers des poumons	35
1.4.3.9	Cancers colorectaux	37
1.4.3.10	Cancers de l'estomac	38
1.4.3.11	Cancers du foie	39
1.4.3.12	Cancers du pancréas	40
2	Objectifs	45
2.1	Les glandes parathyroïdes	46
2.2	Les adénocarcinomes du pancréas	46
2.3	Tumeurs intracanalaires papillaires mucineuses du pancréas (<i>TIPMP</i>)	46
3	Matériels et méthodes	47
3.1	Prélèvement et conservation des échantillons	48
3.1.1	Échantillons des glandes parathyroïdes	48

3.1.2	Échantillons du pancréas	48
3.1.3	Échantillons de <i>TIPMP</i>	49
3.2	Préparation des échantillons	49
3.3	Analyse <i>RMN HRMAS</i>	51
3.3.1	Équipement	51
3.3.2	Séquences d'impulsion utilisées	55
3.3.2.1	Expérience <i>1D</i>	56
3.3.2.1.1	<i>CPMG</i>	56
3.3.2.2	Expérience <i>2D</i>	60
3.3.2.2.1	<i>HSQC</i>	60
3.3.3	Pré-traitement des spectres	66
3.3.3.1	Étapes préalables	66
3.3.3.2	Calibration	69
3.3.3.3	Échantillonnage	70
3.3.3.4	Quantification des métabolites	72
3.3.4	Analyses Statistiques	75
3.3.4.1	Analyse en Composantes Principales	76
3.3.4.2	Analyse Discriminante par régression aux moindres carrés partiels	78
3.3.4.3	Analyse Discriminante par régression aux moindres carrés partiels par projection orthogonale	78
3.3.4.4	<i>ADEMA</i>	80
3.3.4.4.1	Introduction à <i>ADEMA</i>	80
3.3.4.4.2	Étapes d' <i>ADEMA</i>	82
3.3.4.5	Analyses statistiques univariées	97
3.3.4.6	Analyses de survie	98
3.3.5	Analyses histologiques	98
4	Résultats et Discussion	101
4.1	Les glandes parathyroïdes	102
4.1.1	Généralités	102
4.1.2	Problématique	103
4.1.3	Résultats et discussion	104
4.1.3.1	Préambule	104
4.1.3.1.1	Population de patients	104
4.1.3.1.2	État de la maladie	104
4.1.3.2	Résultats	107
4.1.3.2.1	Échantillons tissulaires	107
4.1.3.2.2	Qualité des spectres	107
4.1.3.2.3	<i>HPT1 vs. HPT</i> rénale	108
4.1.3.2.4	<i>PUG vs. PMG</i> au sein de l' <i>HPT1</i>	110
4.1.3.3	Discussion	112
4.2	Les adénocarcinomes pancréatiques	115
4.2.1	Généralités	115
4.2.2	Problématique	116
4.2.3	Résultats et discussion	118
4.2.3.1	Préambule	118
4.2.3.1.1	Population de patients	118

4.2.3.2	Résultats	120
4.2.3.2.1	Qualité des spectres	120
4.2.3.2.2	Impact de la chimiothérapie sur le parenchyme pancréatique et l'adénocarcinome pancréatique	123
4.2.3.2.3	"Longs-survivants" <i>vs.</i> "courts-survivants"	129
4.2.3.2.4	Analyse de survie	133
4.2.3.3	Discussion	134
4.3	Les <i>TIPMP</i>	138
4.3.1	Généralités	138
4.3.2	Problématique	138
4.3.3	Résultats et discussion	141
4.3.3.1	Préambule	141
4.3.3.1.1	Population de patients	141
4.3.3.2	Résultats	142
4.3.3.2.1	Qualité des spectres	142
4.3.3.2.2	<i>TIPMP</i> à <i>RM</i> de dégénérescence en cancer <i>vs.</i> <i>TIPMP</i> dégénérées en cancer	143
4.3.3.2.3	<i>TIPMP</i> à <i>RF</i> de dégénérescence en cancer <i>vs.</i> <i>TIPMP</i> dégénérées en cancer	145
4.3.3.2.4	<i>TIPMP</i> à <i>RM</i> de dégénérescence en cancer <i>vs.</i> <i>TIPMP</i> à <i>RF</i> de dégénérescence en cancer	148
4.3.3.3	Discussion	149
5	Conclusions et perspectives	157
5.1	Conclusions	158
5.2	Perspectives	159

Abréviations

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales
ADEMA : An Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alterations Using Mutual Information
ADK : adénocarcinome
CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CPP : Canal Pancréatique Principal
DPC : duodéno pancréatectomie céphalique
EE : Echo-Endoscopie
GSH : glutathione (-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine)
GC : Gas Chromatography
HE : Hématoxyline-Eosine
HPT : hyperparathyroïdie
HPT1 : hyperparathyroïdie primaire
HPT2 : hyperparathyroïdie secondaire
HPT3 : hyperparathyroïdie tertiaire
HRMAS : High Resolution Magic Angle Spinning
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation
Kel-F : polychlorotrifluoroéthylène
LC : Liquid Chromatography
MS : mass spectrometry
mTOR : mammalian target of rapamycin
OPLS-DA : Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis
PMG : Pathologie MultiGlandulaire
PP : Parenchyme Pancréatique
PTH : parathormone
PUG : Pathologie UniGlandulaire
TCA : tricarboxylic acid
TIPMP : Tumeur Intracanalair Papillaire Mucineuse du Pancréas
TSP : TriméthylSilyl Propionate Deutééré
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Table des figures

1.1	Nombre de publications par an indexées dans <i>PubMed</i> avec le mot-clé <i>metabolomics</i>	4
1.2	Comparaison des sensibilités entre la <i>MS</i> et la <i>RMN</i> . Adapté de Sumner LW <i>et al.</i> , 2003 [1].	7
1.3	Illustration schématique de la mise en rotation d'un rotor (contenant l'insert d'échantillon biologique) à la vitesse ω_r (pour nos études, $\omega_r = 3500 Hz$) autour d'un axe formant un angle $\Theta = 54,74^\circ$ par rapport au champ magnétique externe (axe vertical). Cet angle est nommé «angle magique».	9
1.4	Comparaison d'un spectre acquis en condition statique avec un spectre acquis en rotation à 2500 Hz avec basculement à l'angle magique (adapté de Cheng <i>et al.</i> , 1997 [2]).	9
1.5	Nombre de publications par an indexées dans <i>PubMed</i> avec les mots-clés <i>metabolomics AND cancer</i>	11
3.1	Préparation d'un échantillon biologique tissulaire pour une analyse métabolomique par spectroscopie <i>RMN HRMAS</i>	50
3.2	Préparation d'un échantillon biologique kystique pour une analyse métabolomique par spectroscopie <i>RMN HRMAS</i>	51
3.3	Dispositif <i>HRMAS</i> nécessaire à la préparation des échantillons biologiques. Insert jetable de 30 μL contenant une biopsie ainsi que son bouchon.	52
3.4	Spectromètre Bruker Avance III 500 utilisé pour l'acquisition de l'ensemble des spectres <i>RMN HRMAS</i> de cette thèse.	53
3.5	Connectique de la sonde <i>HRMAS</i> : (a) canal proton 1H , (b) canal phosphore ^{31}P , (c) canal carbone ^{13}C , (d) canal deutérium 2H , (e) système de chauffage, (f) thermocouple (mesure de la température), (g) gradient, (h) réglage de l'angle magique, (i) réglage des antennes <i>RF</i>	54
3.6	Test basse rotation : coupes histologiques d'échantillons provenant d'un adénocarcinome pancréatique, ayant tourné à deux vitesses de rotation : (1) 600 Hz (à gauche sur la figure) (2) 3500 Hz (à droite sur la figure). Coloration Hématoxyline-Eosine, Échelle 500 μm . Images calibrées avec le logiciel ImageJ [3].	54
3.7	Dispositif <i>RMN HRMAS</i> nécessaire à la préparation et à l'analyse des échantillons biologiques. De gauche à droite : le rotor, l'insert jetable de 30 μL contenant une biopsie ainsi que son bouchon et, le bouchon à ailettes du rotor.	55

3.8	Séquence d'impulsion <i>CPMG</i> avec une présaturation du signal de l'eau pendant le temps de répétition synchronisé sur la période du rotor. Le temps d'écho total pour l'ensemble des acquisitions a été fixé à 93 ms ($\tau = 285 \mu\text{s}$ et nombre de boucles ($L4$) = 328) [4].	56
3.9	Spectre 500 MHz ^1H <i>CPMG HRMAS</i> enregistré sur une molécule pure de lactate de sodium (la concentration étant de 2,7 mM).	59
3.10	Séquence d'impulsion <i>HSQC</i> utilisée avec une présaturation du signal de l'eau et utilisation de gradients afin de mettre en évidence les corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C . Ces corrélations permettent l'identification précise et complète des composés.	61
3.11	Spectre <i>RMN HRMAS</i> 500 MHz <i>HSQC</i> ^1H - ^{13}C enregistré sur une solution de taurine (la concentration étant de 1,9 mM).	62
3.12	Spectre ^1H <i>CPMG 1D</i> de glandes parathyroïdes hypersécrétantes (A) avant phasage (B) après phasage. Le phasage permet à tous les pics d'être en absorption.	67
3.13	Spectre ^1H <i>CPMG 1D</i> de glandes parathyroïdes hypersécrétantes (A) avant correction de la ligne de base (B) après correction de la ligne de base. La correction de la ligne de base permet de faire correspondre le milieu du bruit à une intensité nulle. C'est une étape cruciale qui affecte directement la valeur absolue de l'intégrale.	68
3.14	Spectre ^1H <i>CPMG 1D</i> de glandes parathyroïdes hypersécrétantes (A) avant recalage sur la référence (B) après recalage sur la référence.	69
3.15	Échantillonnage.	70
3.16	Quantification.	72
3.17	Spectre ^1H <i>CPMG 1D</i> de glandes parathyroïdes hypersécrétantes (A) avant recalage des spectres (B) après recalage des spectres. Dans cet exemple, avant la quantification, le pic du succinate du spectre en orange est décalé par rapport aux autres, il faut donc le recalcr à 2,405 ppm.	74
3.18	Un aperçu d' <i>ADEMA</i> (figure extraite de Çiçek A.E <i>et al.</i> , 2013 [5]). La première étape est de construire une population qui contient de multiples individus (dans ce cas <i>M1</i> et <i>M2</i> sont dans le groupe contrôle et <i>M3</i> et <i>M4</i> dans le groupe cas). Les concentrations des métabolites d'intérêt sont déterminées pour tous les individus (dans ce cas, concentrations des métabolites <i>A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> et <i>D</i>). Ensuite, pour la seconde étape, chaque observation est assignée à une probabilité d'être dans un intervalle de classe discret (<i>bins</i>)(seuls deux <i>bins</i> sont considérés, à savoir, vers le haut et vers le bas). La troisième étape est de construire le réseau métabolique afin de déterminer les associations entre les métabolites mesurés. Dans cette figure les cercles représentent les métabolites, et les flèches les réactions qui les relient. Quant à la quatrième étape, elle détermine les sous-ensembles de métabolites qui sont reliés dans le réseau métabolique. Deux ensembles ont été trouvés, $\langle A,B,C \rangle$ et $\langle A,B,D \rangle$, et sont les seuls sous-ensembles qui sont reliés. En utilisant les probabilités trouvées dans l'étape 2 et les sous-ensembles reliés trouvés dans l'étape 4, <i>ADEMA</i> détermine les niveaux de métabolites spécifique-cas et spécifique-contrôle, et compare les changements dans le groupe cas par rapport au groupe contrôle. Dans cet exemple, <i>ADEMA</i> conclut que <i>A</i> , <i>B</i> et <i>C</i> sont augmentés et <i>D</i> diminué dans le groupe cas par rapport au groupe contrôle.	81

3.19	Réseau Métabolique établi en collaboration avec le Dr N. Dali-Youcef.	83
3.20	Un exemple de fonction <i>B-spline</i> . Ici les fonctions basiques <i>B-splines</i> sont représentées pour 6 <i>bins</i> . Chaque courbe représente un <i>bin</i> . Pour chaque observation (axe- <i>x</i>), la valeur <i>y</i> correspondante sur chaque courbe donne la probabilité de cette observation d'être dans ce <i>bin</i> . La somme des valeurs <i>y</i> correspondant à une valeur <i>x</i> pour tous les <i>bins</i> vaut 1 (Figure extraite de Çiçek <i>et al.</i> [5]).	84
3.21	Illustration des combinaisons possibles pour les niveaux de métabolites de chaque groupe : cas et contrôle. Trois métabolites sont analysés afin de déterminer les niveaux attendus pour le groupe cas et le groupe contrôle. Dans cet exemple il y a juste un sous-ensemble de métabolites considérés, et il y a 2 <i>bins</i> (par exemple, soit vers le haut, soit vers le bas). En utilisant la fonction « <i>Classify-Combination</i> », il est déterminé que les combinaisons <i>o2</i> , <i>o3</i> , <i>o4</i> et <i>o7</i> sont contrôle-spécifiques (sur la gauche) et les combinaisons <i>o1</i> , <i>o5</i> , <i>o6</i> et <i>o8</i> sont cas-spécifiques (sur la droite). Quand des jeux de combinaisons sont pondérés séparément par leur information marginale, les niveaux attendus pour ces métabolites dans les groupes cas et contrôle sont attendus. (Figure extraite de Çiçek <i>et al.</i> [5]).	91
3.22	Illustration des combinaisons des niveaux attendus trouvés pour chaque <i>EFM</i> . Dans cette illustration, 8 métabolites ont été analysés. Il y a 6 sous-ensembles différents de métabolites qui ont été trouvés en utilisant les <i>EFMs</i> . Pour chacun d'entre eux, les niveaux attendus pour le groupe cas (à droite) et le groupe contrôle (à gauche) sont trouvés comme expliqué dans la figure précédente. (Figure extraite de Çicek <i>et al.</i> [5]).	93
3.23	Capture écran montrant l'organisation du code permettant de réaliser l'analyse <i>ADEMA</i> avec le logiciel <i>R</i> [6].	95
4.1	Anatomie des glandes parathyroïdes d'après Frank H.Netter, Atlas d'anatomie humaine [7].	102
4.2	Population de patients étudiée et échantillons tissulaires examinés.	105
4.3	Spectre 1D ¹ H RMN HRMAS obtenu de l'analyse de glandes parathyroïdes hypersécrétantes. (A) <i>PUG HPT1</i> ; (B) <i>PMG HPT1</i> ; (C) <i>PMG HPT2</i> ; (D) <i>PMG HPT3</i> . Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Pour des raisons d'affichage, l'amplitude du pic du lactate à 4,09 ppm et du pic de la glycérophosphocholine à 3,21 ppm, a été graphiquement réduite. Les identifications des métabolites sont données dans la table 3.1 au Chapitre 3. Les caractéristiques histologiques des glandes parathyroïdes hypersécrétantes correspondant à chaque spectre sont dépeintes dans le côté gauche de la figure (HE × 400; échelle, 50 μm). Les images ont été calibrées avec le logiciel ImageJ [3].	108
4.4	Résultats de l' <i>OPLS – DA</i> à deux composantes basée sur les métabolites <i>VIP</i> : Modèle à deux classes incluant 43 échantillons dont 19 échantillons provenant de patients avec une <i>HPT1</i> et 24 échantillons provenant de patients avec une <i>HPT</i> rénale. Une nette séparation entre les différentes classes est visible dans ce modèle.	109

- 4.5 Analyse du réseau métabolique selon l'algorithme *ADEMA* comparant les échantillons provenant de patients présentant une *HPT1* ($n = 19$) et les échantillons de patients présentant une *HPT* rénale ($n = 24$). Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans les échantillons provenant de patients présentant une *HPT1*, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes. 110
- 4.6 Résultats de l'*OPLS-DA* à deux composantes basée sur les métabolites *VIP* : Modèle à deux classes incluant 14 et 5 échantillons respectivement de patients avec une *PUG* et une *PMG*, provenant de patients présentant une *HPT1*. Une nette séparation entre les différentes classes est visible dans ce modèle. 111
- 4.7 Analyse du réseau métabolique selon l'algorithme *ADEMA* comparant les échantillons provenant de patients avec une *PUG* ($n = 19$) et les échantillons provenant de patients avec une *PMG* ($n = 5$), chez les patients présentant une *HPT1*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans les échantillons provenant de patients avec une *PUG*, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes. 112
- 4.8 Anatomie du pancréas d'après Frank H.Netter, Atlas d'anatomie humaine [7].116
- 4.9 Population de patients étudiée et échantillons d'adénocarcinome et de parenchyme pancréatique examinés. 119
- 4.10 Spectre $1D\ ^1H\ RMN\ HRMAS$ obtenu de l'analyse de tissu pancréatique (A) PP sans chimiothérapie néo-adjuvante ($n = 9$); (B) PP avec chimiothérapie néo-adjuvante. Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Pour des raisons d'affichage, l'amplitude du pic de la choline à 3,23 ppm, du pic de la glycine à 3,56 ppm et du pic du lactate à 1,33 ppm, a été graphiquement réduite. Les identifications des métabolites sont données dans le tableau 3.1 (Chapitre 3).121
- 4.11 Spectre $1D\ ^1H\ RMN\ HRMAS$ obtenu de l'analyse de tissu pancréatique (A) PA sans chimiothérapie néo-adjuvante; (B) PA avec chimiothérapie néo-adjuvante. Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Pour des raisons d'affichage, l'amplitude du pic du lactate à 1,33 ppm, a été graphiquement réduite. Les identifications des métabolites sont données dans le tableau 3.1 (Chapitre 3). . . . 122
- 4.12 Résultats de l'*OPLS - DA* à deux composantes basée sur les métabolites *VIP* : Modèle à deux classes incluant 44 et 9 échantillons respectivement d'adénocarcinome pancréatique (sans chimiothérapie néo-adjuvante) et de parenchyme pancréatique (sans chimiothérapie néo-adjuvante) provenant de patients souffrant d'un cancer du pancréas. Une nette séparation entre les différentes classes est visible dans ce modèle. 123

- 4.13 Impact de la chimiothérapie sur le parenchyme pancréatique. Les échantillons de *PP* provenant de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante ($n = 8$) ont été comparés à ceux provenant de patients n'en ayant pas reçue ($n = 9$). Résultats de l'analyse de réseaux selon l'algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans les échantillons provenant de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stable entre les deux groupes. 125
- 4.14 Impact de la chimiothérapie sur l'adénocarcinome pancréatique. Les échantillons de *PA* avec chimiothérapie néo-adjuvante ($n = 44$) ont été comparés à ceux sans chimiothérapie néo-adjuvante ($n = 62$). Résultats de l'analyse de réseaux selon l'algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans la population qui a reçu une chimiothérapie néo-adjuvante, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes. 129
- 4.15 Spectre $1D\ ^1H\ RMN\ HRMAS$ obtenus de l'analyse des longs et courts-survivants. (A) adénocarcinome pancréatique avec une longue survie ($n = 8$); (B) adénocarcinome pancréatique avec une courte survie ($n = 9$). Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Pour des raisons d'affichage, l'amplitude du pic du lactate à 1,33 ppm, du pic de la choline à 3,23 ppm, du pic des acides gras à 1,30 ppm, a été graphiquement réduite. Les identifications des métabolites sont données en table 4.1 (Chapitre 3). 132
- 4.16 L'analyse de réseaux permet d'établir le pronostic des patients. Les échantillons provenant de patients "longs-survivants" ($n = 8$) ont été comparés aux échantillons provenant de patients "courts-survivants" ($n = 9$) selon les résultats d'*ADEMA*. Aucune chimiothérapie néo-adjuvante n'a été administrée à ces patients. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits en augmentation ou diminution, les flèches bleues indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits stables entre les deux groupes. 133
- 4.17 La concentration d'éthanolamine : un biomarqueur unique prédisant la survie globale chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique. (A) courbe ROC et (B) courbes Kaplan-Meier obtenues de l'analyse des concentrations d'éthanolamine pour le diagnostic de longue survie chez des patients présentant un cancer du pancréas. L'aire sous la courbe était $0,861 \pm 0,101$, la valeur seuil était $0,740\text{ nmol/mg}$, la sensibilité et la spécificité étaient respectivement égales à $77,80\%$ et 75% . A droite la courbe de Kaplan-Meier montre des différences entre "longs" et "courts-survivants". La valeur p était $0,005$ pour le test log-rangs (test logarithmique par rangs). 134
- 4.18 Classification internationale, d'après Castellano-Megías VM *et al.* [8]. . . . 139

- 4.19 Spectres 1D 1H RMN HRMAS obtenus de l'analyse de *TIPMP* (A) *TIPMP* non dégénérées en cancer à *RM*; (B) *TIPMP* non dégénérées en cancer à *RF*; (C) *TIPMP* dégénérées en cancer. Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Les identifications des métabolites sont données dans le tableau 3.1 (Chapitre 3). 142
- 4.20 Résultats de l'OPLS-DA à deux composantes basée sur les métabolites *VIP*. Un modèle à deux classes incluant 25 échantillons de *TIPMP* (*TIPMP* non dégénérées à *RM* (n = 16) et *TIPMP* dégénérées (n = 9)). Une distinction nette entre les classes est montrée. 143
- 4.21 Les échantillons de *TIPMP* avec *RM* (n = 16) ont été comparés aux *TIPMP* dégénérées (n = 9). Résultats de l'analyse de réseaux selon l'algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans la population de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes. 144
- 4.22 Résultats de l'OPLS – DA à deux composantes basée sur les métabolites *VIP*. Un modèle à deux classes incluant 14 échantillons de *TIPMP* (*TIPMP* non dégénérées en cancer à *RF* (n = 14) et *TIPMP* dégénérées en cancer (n = 9)). Une distinction nette entre les classes est montrée. . . . 145
- 4.23 Les échantillons de *TIPMP* avec *RF* de dégénérescence en cancer (n = 14) ont été comparés aux *TIPMP* dégénérées en cancer (n = 9). Résultats de l'analyse de réseaux selon l'algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans la population de *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes. 147
- 4.24 Résultats de l'OPLS – DA à deux composantes. Un modèle à deux classes incluant trente échantillons de *TIPMP* non dégénérée en cancer (*RM* (n = 16) et *RF* (n = 14)). Aucune distinction n'est possible entre les deux classes. 148
- 4.25 Les échantillons de *TIPMP* avec *RM* (n = 16) ont été comparés aux échantillons de *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer (n = 14). Résultats de l'analyse de réseaux selon l'algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans la population de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes. 149
- 5.1 Système pneumatique reliant le bloc opératoire de Neurochirurgie à la salle du spectromètre. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre. 160

Liste des tableaux

3.1	Identification des métabolites dans les échantillons examinés lors de ce travail de thèse. Dplct : déplacement. Dans le chapitre 4, les numéros figurant sur les spectres, dans le but de pointer les métabolites détectés, correspondent à ceux notés dans cette table. Chaque pic dans les spectres $2D$ représente une corrélation $^1H - ^{13}C$	66
3.2	Groupements des métabolites sélectionnés pour la quantification.	74
4.1	Caractéristiques des 43 échantillons provenant de 32 patients présentant une hyperparathyroïdie. F, femme ; H, homme ; HPT1, hyperparathyroïdie primaire ; HPT2, hyperparathyroïdie secondaire ; HPT3, hyperparathyroïdie tertiaire ; PUG, pathologie uniglandulaire ; PMG, pathologie multiglandulaire ; P3, glande parathyroïde inférieure ; P4, glande parathyroïde supérieure ; D, droite ; G, gauche ; ND, non déterminée.	107
4.2	Caractéristiques des patients. Dix-sept échantillons provenant de patients présentant un adénocarcinome pancréatique. Huit patients étaient classés longs-survivants tandis que les 9 autres étaient classés courts-survivants. LS ; "longs-survivants" ; CS, "courts-survivants" ; T, tumeur ; N, ganglions lymphatiques ; Diff, différenciation ; B, bien ; M, modérément ; P, peu ; Coll, colloïde ; Invas Vasc, invasion vasculaire ; ND, non déterminée.	120
4.3	Impact de la chimiothérapie néo-adjuvante sur le PP . Résultats du test U de Mann Whitney. CT néo-adj, chimiothérapie néo-adjuvante.	125
4.4	Impact de la chimiothérapie néo-adjuvante sur le PA . Résultats du test U de Mann Whitney. CT néo-adj, chimiothérapie néo-adjuvante.	128
4.5	Différences de métabolites selon le taux de survie. Résultats du test U de Mann-Whitney (analyse univariée, test non paramétrique). Pas de chimiothérapie néoadjuvante. LongsSurv, "longs-survivants" ; CourtsSurv, "courts-survivants" ; CT néo-adj, chimiothérapie néo-adjuvante.	131

Chapitre 1

Introduction

1.1 Introduction à la métabolomique

La métabolomique est une science très récente désignant l'ensemble des métabolites présents dans un milieu biologique. Les métabolites sont des petites molécules issues du métabolisme et dont la masse moléculaire est inférieure à 1500 Da. La métabolomique est basée sur l'identification et la quantification de l'ensemble des métabolites présents dans une cellule, un tissu, un organe, un organite ou un organisme à un temps donné et dans des conditions données. Les métabolites, produits par les protéines, prennent part aux réactions biochimiques de la cellule. Ils sont regroupés en deux classes : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les primaires sont directement impliqués dans plusieurs processus tels que la reproduction, la croissance ou le développement d'un organisme ou d'une cellule. Ces métabolites primaires sont communs à de nombreux organismes : les acides aminés, les sucres, certains alcools, les vitamines et les nucléotides. Quant aux métabolites secondaires, ils ne sont *a priori* pas impliqués directement dans ces processus : les xénobiotiques, les toxines, certaines drogues, les terpènes, certains composés azotés comme les alcaloïdes et les phénols. Les métabolites secondaires peuvent provenir de métabolismes inhabituels, comme par exemple, d'une suite de réactions biologiques de défense, d'interactions biologiques qui sont spécifiques à certains organismes (comme les champignons, les bactéries etc. . .).

La métabolomique fait partie avec la génomique (étude du fonctionnement d'un système biologique en tenant compte de son génome), transcriptomique (étude de l'*ARNm* issu de la transcription du génome) et protéomique (étude de l'ensemble des protéines d'un organisme à un temps donné et dans des conditions données), des approches en « omiques » qui consistent à appréhender la complexité du vivant dans son ensemble. Ces différentes approches permettent de décrire le vivant en étant le moins restrictives possible et d'obtenir le maximum d'informations sur la réponse cellulaire et/ou tissulaire à une exposition *in vitro* ou *in vivo*.

Dans les années 1960, l'avènement des techniques de spectrométrie de masse (*mass spectrometry*, *MS*) couplée à la chromatographie en phase gazeuse (*gas chromatography*, *GC*) a vu naître le concept de métabolomique. Ce n'est qu'en 1971 qu'est publié le premier article relatif à la métabolomique [9]. Dans ce dernier Pauling *et al.*, ont effectué une analyse quantitative de métabolites de fluides corporels par chromatographie. La notion de profil métabolique, quant à elle, a été introduite par Horning *et al.* en 1971 lors de

leurs travaux sur les stéroïdes, les acides, drogues et métabolites des drogues, présents dans les constituants urinaires *via* la *GC – MS* [10].

Prenons l'exemple de la toxicologie avec l'ingestion d'un médicament par des patients. La signature biologique au niveau du métabolome va refléter à la fois, une exposition chimique et l'effet biologique induit par cette exposition. D'une part l'exposition chimique permet la mesure de substances chimiques parentes ou de leurs produits directs de biotransformation ou de biodégradation. D'autre part, l'effet biologique induit va permettre la détection et mesures de biomarqueurs *via* leur niveau d'expression qui sera sur- ou sous-exprimé suite à cette exposition chimique.

Ces différentes approches en « omiques » ont pour avantage principal de caractériser de manière globale et non ciblée les perturbations biologiques liées à une exposition chimique par exemple.

Mais ce n'est qu'à la fin des années 1990 et avec le développement des différentes approches en « omiques » que le terme « métabolomique » va apparaître pour la première fois *via* le mot « métabolome ». Le mot « métabolome » a été cité pour la première fois par Oliver *et al.* en 1998 [11] et Tweedale *et al.* en 1998 [12]. Oliver *et al.*, lors de leur travail sur le rôle des produits issus du gène de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ont défini la métabolomique comme « la mesure de la concentration du maximum de métabolites permettant d'obtenir un « instantané » métabolique ». Tweedale *et al.*, quant à eux, l'ont définie comme « le nombre total de métabolites dans une cellule », lors de leur étude sur l'effet de la croissance lente sur le métabolisme d'*Escherichia coli*. Nicholson *et al.* ont, en 1999, défini ce concept de métabolomique [13]. Alors que la métabolomique et la métabonomique ont des définitions similaires, étant habituellement utilisées pour décrire l'utilisation de techniques de chimie analytique, couplées avec des analyses statistiques, afin d'étudier des changements dans le métabolome causés par une pathologie ou une perturbation au cours du temps, le terme métabolomique est plus communément employé dans la littérature. Et c'est ce terme que nous emploierons tout au long de cette thèse. Ainsi, la métabolomique permet l'étude globale d'un ensemble moléculaire.

Les réserves cellulaires de métabolites servent à l'expression d'un phénotype biologique. Ce dernier est en effet influencé par le génome et le protéome, mais aussi par des facteurs environnementaux, nutritionnels, et xénobiotiques [14], [15].

La métabolomique permet d'avoir un instantané de la biochimie sous-jacente d'un échan-

tillon grâce à des mesures répétées au cours du temps, du métabolisme cellulaire.

Les changements du niveau des métabolites peuvent être observés comme le résultat d'une pathologie avant l'apparition des signes cliniques [16]. De la même manière, des changements précoces dans le métabolisme peuvent être vus comme le résultat de la toxicité d'une drogue, montrant la possibilité de modifier ou de changer le médicament avant l'apparition de symptômes pathologiques [17], [18]. Le métabolisme des xénobiotiques est également mesurable [19] et comme les métabolites sont généralement conservés d'une espèce à l'autre, les méthodes développées dans des études pré-cliniques peuvent facilement être transférables dans un contexte humain.

De par le développement des techniques analytiques depuis la fin des années 1990, la métabolomique est en plein essor. En effet, comme le montre la figure 1.1, 2 publications étaient référencées dans *PubMed*, avec le mot-clé *metabolomics*, en 2000, alors qu'en septembre 2016, il y a plus de 13700 publications (cf.fig.1.1)!

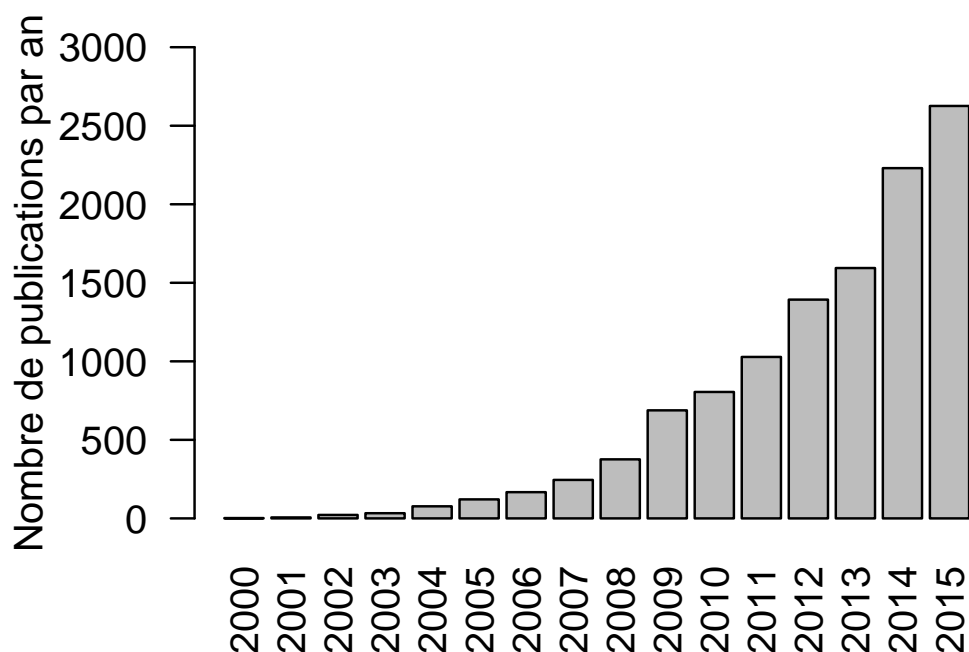


FIGURE 1.1 – Nombre de publications par an indexées dans *PubMed* avec le mot-clé *metabolomics*.

Les métabolites peuvent être étudiés d'une part quantitativement et d'autre part qua-

litativement. Lors d'une étude quantitative, le nombre de molécules à caractériser peut atteindre des dizaines, des milliers, voire des dizaines de milliers. En effet, tout dépendra du seuil de concentration. A présent, aucune méthode analytique ne dispose d'une telle sensibilité. Pour une étude qualitative, les structures extrêmement variées de métabolites ainsi que leurs propriétés physico-chimiques disparates rendent l'idée de la mise en place d'une technique d'extraction universelle, impossible.

Pour résumer, il est donc impossible d'étudier simultanément tous les métabolites. D'où la nécessité d'utiliser différentes techniques analytiques qui vont s'avérer complémentaires.

1.2 Techniques analytiques en métabolomique

Différentes méthodes de spectroscopie permettent d'acquérir des données métabolomiques à partir d'échantillons biologiques.

De par la grande diversité physico-chimique des métabolites, une seule méthodologie ne suffit pas à détecter et quantifier tous les métabolites en même temps. Il est donc nécessaire de diversifier les méthodologies que ce soit pour l'extraction ou les analyses biochimiques. Les trois méthodologies les plus représentatives sont : la résonance magnétique nucléaire (*RMN*), la spectrométrie de masse (*MS*) et la spectroscopie Raman. Cependant la *MS* le plus souvent couplée à des techniques séparatives et la *RMN*, sont les deux techniques de référence, les plus utilisées, offrant de grandes possibilités d'applications, notamment dans le domaine médical et chirurgical. Nous allons nous focaliser sur la *RMN*, technique que nous avons utilisée dans le cadre de ce travail, bien que la *MS* et la *RMN* soient souvent combinées dans des études métabolomiques car elles apportent l'une et l'autre des informations complémentaires.

La *MS* couplée à la *GC* (*GC – MS*) par exemple, présente l'avantage d'être plus sensible que la *RMN* et malgré une résolution de structure moins performante et une plus faible reproductibilité des résultats, elle permet de « voir » un plus grand nombre de signatures de métabolites. Le développement de spectromètres de masse toujours plus résolutifs permet d'ores et déjà de « voir » jusqu'à plusieurs milliers d'analytes dans un extrait. Cependant, il faut rappeler que la *MS* est une technique destructive pour l'échantillon, impliquant nécessairement une ionisation préalable de l'échantillon, ce dernier ne pouvant être re-

couvert après analyse. Les principales faiblesses de la *MS* sont les principales forces de la *RMN*. L'aire sous les pics dans le spectre *RMN* est directement liée à la concentration d'un noyau spécifique (par exemple, 1H , ^{13}C ...), rendant la quantification des composés dans un mélange complexe très précise. Un métabolite détecté comme abondant dans un échantillon spécifique peut être identifié, soit grâce aux positions de la résonance de ses noyaux dans le spectre *RMN*, soit au travers de l'application de plusieurs séquences d'impulsions. Un autre aspect sous-estimé de la spectroscopie *RMN* est sa polyvalence, qui lui permet d'analyser les métabolites dans l'état liquide (sérum, liquide etc...), dans les tissus intacts (par exemple, les tumeurs) ou *in vivo*.

Cependant, effectuer des études de spectroscopie *RMN* sur des cellules ou tissus reste bien plus complexe que l'étude des échantillons à l'état liquide. En effet, les cellules et tissus sont intrinsèquement hétérogènes. Cette hétérogénéité est à l'origine de variations locales du champ magnétique B_0 au niveau cellulaire, ce qui provoque un élargissement des raies spectrales. En effet, le principal phénomène contribuant à la largeur de raie provient de l'importante différence de susceptibilité magnétique au sein de l'échantillon. Pour réduire considérablement cet effet induit par l'hétérogénéité de l'échantillon, la *RMN* du liquide nécessite une extraction chimique à partir des cellules ou des tissus à analyser. L'extraction permet l'obtention de préparations liquides homogènes, possédant une susceptibilité magnétique homogène, particulièrement adaptées pour l'analyse *RMN*. Cependant ce processus rend la préparation des échantillons longue.

Par ailleurs, la sensibilité, qui est la principale force de la *MS*, est la faiblesse principale de la spectroscopie *RMN*. Mais, malgré l'apparition des sondes cryogéniques, des aimants supraconducteurs avec des champs magnétiques bien plus élevés et des bobines radiofréquences miniaturisées augmentent la sensibilité, la spectroscopie *RMN* est toujours moins sensible que la *MS* (cf. fig.1.2).

Pour résumer, la *RMN* bien que moins sensible que la *MS*, a l'avantage de pouvoir mettre en évidence une vision globale du métabolome.

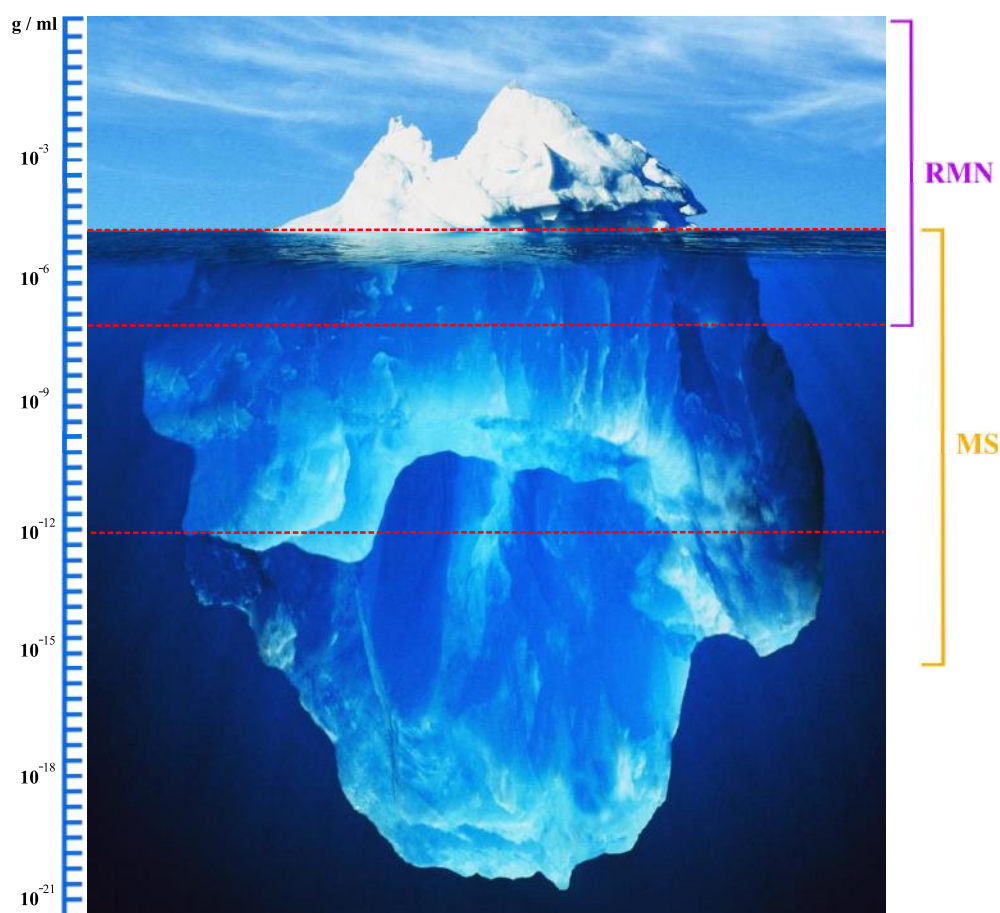


FIGURE 1.2 – Comparaison des sensibilités entre la *MS* et la *RMN*. Adapté de Sumner LW *et al.*, 2003 [1].

1.3 Rotation à l'angle magique (*MAS*)

La *RMN* est une technique non destructive, rapide et reproductible permettant l'identification de divers composants dans un mélange complexe *via* l'acquisition de spectres contenant une grande quantité d'information sur l'échantillon analysé.

La *RMN* du liquide est particulièrement adaptée à l'étude des composés en phase liquide dont l'orientation des molécules varie constamment au cours du temps, la moyenne de l'ensemble des couplages dipolaires valant 0. Pour rendre l'analyse directe par *RMN* du liquide haute résolution, les échantillons doivent être de nature homogène, avec une uniformité de leur susceptibilité magnétique. Les biopsies sont des échantillons semi-solides. Dans ce type de milieu, des gradients importants de susceptibilité magnétique sont présents. Par conséquent :

- en phase liquide, l'orientation des molécules varie constamment au cours du temps, la moyenne de l'ensemble des couplages dipolaires valant 0 ;

- en phase solide, les couplages dipolaires deviennent alors les interactions principales responsables d'un élargissement des raies.

En effet, lorsque les échantillons sont semi-solides, telles que des biopsies, l'analyse directe par *RMN* n'est pas possible. Ceci étant dû à la non uniformité de la susceptibilité magnétique qui va conduire à un élargissement significatif des raies sur le spectre *RMN*. Pour étudier ce type de composés, la spectroscopie *RMN* à haute résolution (*HR*) en rotation à l'angle magique (*Magic Angle Spinning – MAS*) est particulièrement adaptée. La spectroscopie *RMN HRMAS* s'est avérée être l'une des plus innovantes technique pour avoir une vision globale du métabolisme. Cette technique est également la seule capable d'étudier des tissus intacts.

La *RMN HRMAS* consiste en une rotation de l'échantillon sur lui-même à un angle de $54,74^\circ$ (« angle magique »), par rapport au champ magnétique principal B_0 (cf. fig.1.3). Cette inclinaison permet de réduire significativement l'élargissement des raies induites par différentes interactions et de s'approcher de la résolution atteinte en *RMN* du liquide. En effet, ce sont l'interaction dipolaire et l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique liées à la matière solide qui induisent cet élargissement de raies. La *RMN HRMAS* permet d'étudier des échantillons hétérogènes composés de parties liquides, à forte mobilité, et de parties solides, où la mobilité est bien plus restreinte.

Pour éliminer les couplages dipolaires et annuler les effets des interactions dipolaires sur les raies des spectres, il faut que $\theta = 54,74^\circ$. En effet, la rotation à cet angle va moyennner à zéro la contribution dipolaire de l'échantillon et ainsi diminuer considérablement cet effet représentant la principale source d'élargissement en *RMN HRMAS*, ce qui va améliorer sensiblement la résolution.

Ainsi, en appliquant une rotation de l'échantillon (ici, vitesse de rotation = 3500 Hz) autour d'un axe incliné d'un angle $\theta = 54,74^\circ$, appelé « angle magique », par rapport à l'axe vertical correspondant au champ magnétique statique, la contribution dipolaire va être réduite (cf. fig.1.3).

Par conséquent, nous obtenons des spectres avec une diminution de l'élargissement des raies et une résolution proche de celle obtenue en *RMN* du liquide (cf. fig.1.4).

En 1997, Cheng *et al.* ont été les premiers à utiliser la *RMN HRMAS* afin d'étudier un échantillon intact de tissu lymphatique [2].

Santos *et al.* se sont intéressés à l'évolution de l'intégrité de l'*ARNm* tissulaire (*via*

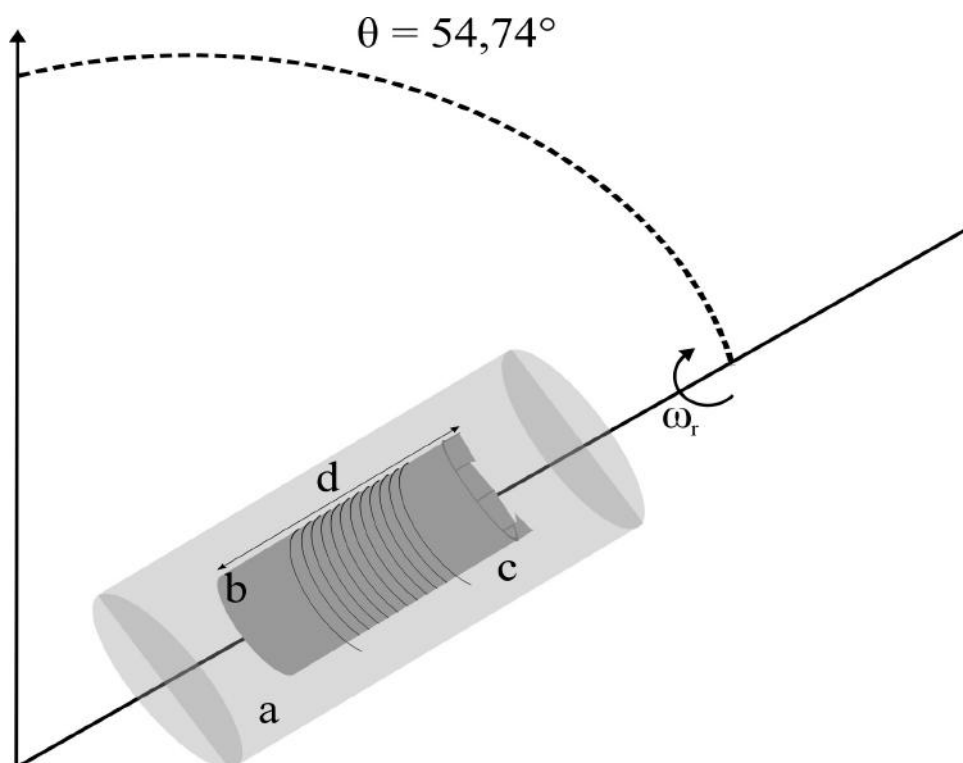


FIGURE 1.3 – Illustration schématique de la mise en rotation d'un rotor (contenant l'insert d'échantillon biologique) à la vitesse ω_r (pour nos études, $\omega_r = 3500\text{Hz}$) autour d'un axe formant un angle $\Theta = 54,74^\circ$ par rapport au champ magnétique externe (axe vertical). Cet angle est nommé «angle magique».

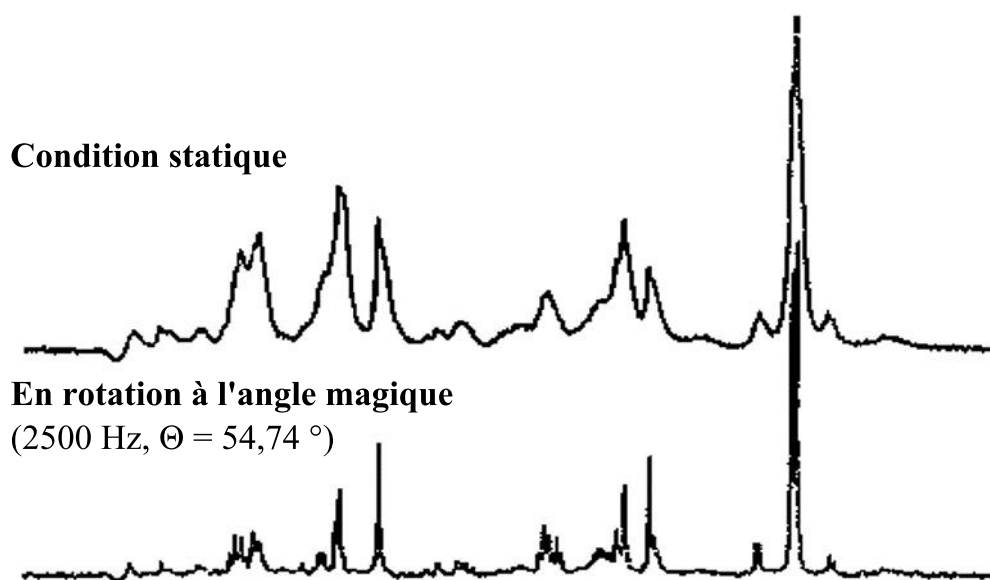


FIGURE 1.4 – Comparaison d'un spectre acquis en condition statique avec un spectre acquis en rotation à 2500 Hz avec basculement à l'angle magique (adapté de Cheng *et al.*, 1997 [2]).

une analyse immunohistochimique) et à l'expression génique (*via* les micropuces à *ADN*). Il ressort de cette étude qu'une acquisition de l'ordre de la dizaine de minutes n'entraîne ni une baisse, ni modification significative respectivement de l'intégrité de l'*ARNm* et de l'expression génique [20].

Ainsi, même si la *RMN HRMAS* présente les limites suivantes :

- nécessité d'un contrôle maximal de l'échantillon (délai d'ischémie) ;
- en cas de recouvrement des signaux, analyse en *2D* (15h pour la plus commune) ;
- pas d'automatisation ;
- sensibilité limitée ($\mu\text{M}/\text{mg}$).

La *RMN HRMAS* présente beaucoup d'avantages à bien des égards :

- tissus intacts ;
- préparation des échantillons dans un environnement à -20°C limitant leur dégradation ;
- préparation facile et rapide ($\ll 2$ minutes) ;
- analyse possible sur peu de matériel biologique (5-20 mg suffisent) ;
- analyse rapide (*1D*, 10 minutes) ; d'où analyse de beaucoup d'échantillons en peu de temps ; et une analyse possible pendant la chirurgie ;
- dégradation limitée lors de l'acquisition (échantillon maintenu à 4°C) ;
- morphologie reconnaissable des tissus malgré les effets de la rotation ;
- robustesse et haute reproductibilité ;
- analyses qualitatives et quantitatives ;
- analyse peu coûteuse (estimée inférieure à 50 euros par échantillon).

Le principal avantage de cette technique est qu'elle n'est pas destructive pour l'échantillon. Ainsi, nous pouvons utiliser ce même échantillon pour d'autres types d'analyses et finalement réaliser un contrôle histopathologique de notre échantillon. C'est pour toutes les raisons décrites précédemment que nous avons choisi d'utiliser cette technique dans le cadre de cette thèse.

1.4 Métabolomique en oncologie

La métabolomique en oncologie est également en plein essor. En effet, comme le montre la figure 1.5, aucune publication n'était référencée dans *PubMed*, avec les mots-clés « *metabolomics AND cancer* » en 2000, alors qu'en octobre 2016, il y a plus de 2350 publications !

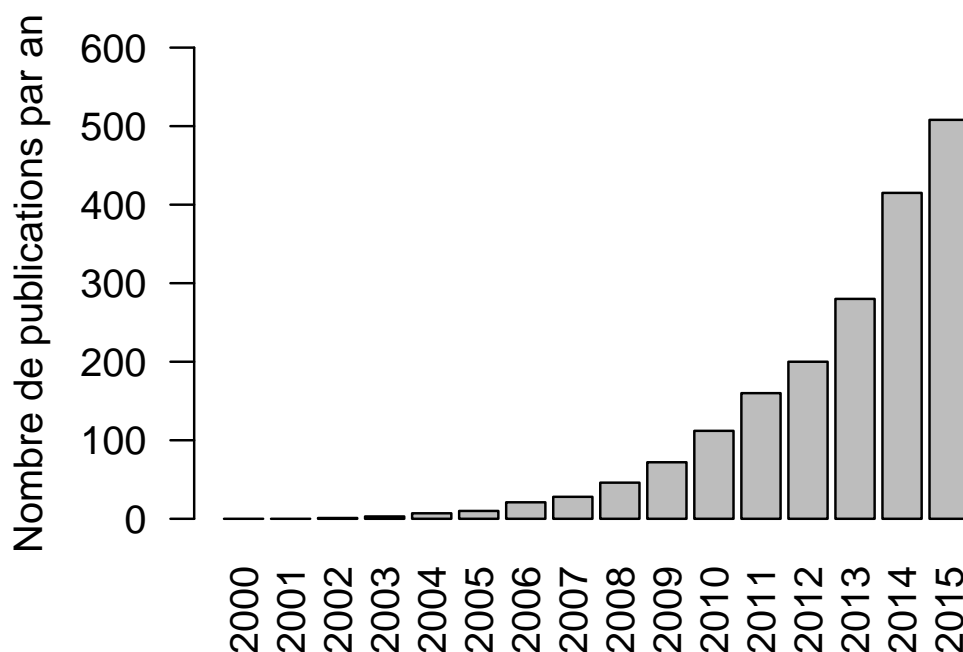


FIGURE 1.5 – Nombre de publications par an indexées dans *PubMed* avec les mots-clés *metabolomics AND cancer* .

1.4.1 Métabolisme des cancers

C'est par un processus de fermentation du glucose que les cellules cancéreuses peuvent se multiplier. Le métabolisme du glucose en lactate génère de 2 à 4 adénosine triphosphate (*ATP*) par molécule de glucose. En comparaison, la phosphorylation oxydative qui est le processus permettant la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (*ADP*) en *ATP*, génère jusqu'à 36 *ATP*. Lors de la prolifération cellulaire des mammifères, les cellules sont exposées à un approvisionnement continu en glucose et en autres nutriments. Bernardinis *et al.* et Harris *et al.*, en 2008, ont montré que les cellules cancéreuses sont

suffisamment pourvues en *ATP* [21]. La régulation de l'*ATP* étant finement régulée, même de faibles perturbations de production d'*ATP* peuvent entraîner des conséquences graves, fatales sur la survie cellulaire [22], [23], [24], [25]. Afin de pallier à cela, plusieurs voies de signalisation sont à disposition de la cellule. Ces voies de signalisation agissent comme des senseurs métaboliques. Par exemple, la protéine kinase *AMP* (adénosine-5'-monophosphate) dépendante (*AMPK*) est un senseur métabolique incontournable. En effet, l'*AMPK* permet d'ajuster précisément les besoins et disponibilités énergétiques tissulaires.

Une balance énergétique positive doit être maintenue par les cellules, ce qui est caractérisé par un rapport *ATP/ADP* élevé. Lorsqu'il y a un facteur environnemental qui perturbe la balance énergétique, la production d'*ATP* chute. L'adénylate kinase modifie les rapports *ATP/ADP* et *ATP/AMP*. Les épisodes de stress énergétique, comme l'absence de glucose, l'exercice physique, l'ischémie ou l'hypoxie, activent l'*AMPK* ce qui entraîne une augmentation du rapport *AMP/ATP*. L'*AMPK* participe au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire. Pour ce faire, à court terme, l'*AMPK* contrôle l'activité de certaines enzymes et à long terme l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. L'activation de l'*AMPK* stimule aussi des voies cataboliques impliquées dans la synthèse d'*ATP* (*via* oxydation des acides gras et glycolyse) et inhibe des voies anaboliques ou consommatrices d'*ATP* (synthèse des protéines, de cholestérol et des acides gras), ce qui permet de réajuster la balance énergétique cellulaire. Ce système senseur du métabolisme énergétique constitue un mécanisme de survie cellulaire hautement conservé chez les eucaryotes.

Les cellules cancéreuses pourraient avoir été sélectionnées par l'hypoxie [26]. En 2013, Guillaumond *et al.* ont montré que dans le cadre des tumeurs pancréatiques, des modifications de leur métabolisme leur permettent de survivre et de se développer en milieu pauvre en oxygène et de sélectionner des cellules particulièrement résistantes et agressives [27]. Les cellules cancéreuses pancréatiques évoluent par conséquence dans des conditions très hostiles, avec un accès limité aux nutriments (stress nutritif) mais surtout à l'oxygène (stress hypoxique ou «hypoxie») provoqué par le manque de vascularisation [27]. Les cellules les plus résistantes (*a fortiori* les plus agressives) à ce stress, survivront au sein de la tumeur et permettront la formation de la masse tumorale pancréatique.

S'il est bien établi que l'hypoxie dans une tumeur est un facteur majeur permettant *in*

fine la progression du cancer, les mécanismes précis par lesquels l'hypoxie exerce son rôle «pro-tumoral» restent encore mal définis. Guillaumond *et al.* ont décrit une analyse qualitative et quantitative des régions hypoxiques des tumeurs pancréatiques. Ils démontrent, tout d'abord, la présence de nombreuses régions hypoxiques dans ces tumeurs et décrivent ensuite des modifications métaboliques provoquées par le stress hypoxique qui permettent aux cellules tumorales de proliférer en consommant peu d'oxygène : les cellules tumorales augmentent simultanément leur capacité à utiliser le glucose (processus appelé « glycolyse ») et la glutamine (« glutaminolyse ») par rapport à des cellules normalement oxygénées. Ces modifications métaboliques se sont avérées être essentielles à la survie des cellules hypoxiques les plus agressives.

De façon intéressante, Guillaumond *et al.* montrent que les changements métaboliques provoqués par le stress hypoxique dans les cellules tumorales nourrissent également les cellules tumorales mieux oxygénées (dites « normoxiques ») voisines, qui pourront ainsi elles aussi se développer selon un processus dit « symbiose tumorale » : les cellules tumorales se mettent à produire du lactate en milieu hypoxique, et les cellules tumorales normoxiques voisines s'adaptent à leur tour en augmentant leur capacité à internaliser le lactate puis à l'utiliser comme nutriment.

De plus, la production de lactate dans la tumeur est associée à une acidification au sein de la tumeur, reconnue pour favoriser la dégradation de la matrice extracellulaire et ainsi la dissémination tumorale et la formation de métastases. Les auteurs suggèrent donc que l'agressivité caractéristique des tumeurs pancréatiques et la fréquence de formation des métastases sont dues aux adaptations métaboliques liées au manque d'oxygène.

Les cellules cancéreuses consomment du glucose en grande quantité et le dégradent en acide lactique, même en présence d'oxygène. Cette caractéristique particulière a été nommée effet Warburg. La transformation du pyruvate en lactate diminue beaucoup la récupération de l'énergie contenue dans le glucose par rapport à la respiration. De plus, la prolifération cellulaire intense dans les cellules cancéreuses est très consommatrice en énergie. Ces cellules augmentent considérablement l'entrée du glucose dans la cellule afin de compenser le mauvais rendement énergétique de la fermentation. La consommation en glucose des cellules cancéreuses est donc forte.

1.4.2 Régulateurs du métabolisme

1.4.2.1 Autophagie

L'autophagie, du grec ancien signifiant littéralement « se manger soi-même » est un mécanisme physiologique du catabolisme, qui implique la dégradation de composants cellulaires inutiles ou dysfonctionnels à travers la machinerie lysosomale. Il existe trois grands types différents d'autophagie :

- la microautophagie ;
- l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes ;
- la macroautophagie (la forme principale).

Dans l'ensemble, l'autophagie peut être considérée comme un processus favorable à la physiologie des cellules. Elle les protège contre certains envahisseurs qui réussissent à s'introduire dans le cytoplasme. L'autophagie protège aussi les cellules contre la sénescence métabolique en éliminant les mitochondries détériorées, qui produisent des quantités excessives de dérivés nocifs de l'oxygène, ainsi que les protéines endommagées par ces dérivés. Les acides aminés libérés lors de la dégradation des protéines ne sont pas perdus ; ils peuvent être réutilisés pour en construire de nouvelles. Un tel recyclage se produit aussi lorsque les cellules souffrent d'une carence alimentaire, et surtout d'un apport insuffisant en azote organique. Ce mécanisme permet donc un « contrôle qualité » du cytoplasme d'où son rôle protecteur contre le vieillissement. Toutefois, sa dérégulation conduit à une mort dite « mort autophagique » par autodigestion de la cellule.

Il existe un lien étroit entre l'autophagie et le cancer. Selon les circonstances, l'autophagie est :

- soit un mécanisme suppresseur de tumeurs (plutôt lors de l'initiation tumorale) : inhibition de la prolifération, dégradation des mitochondries endommagées, mort cellulaire suite à un traitement anti-cancer ;
- soit un mécanisme oncogénique (plutôt lors de l'échappement thérapeutique et la progression tumorale) : survie de la cellule cancéreuse suite à une carence en O_2 ou en facteur de croissance, inhibition de l'apoptose.

Les gènes *ATG* (*AuTophagy*) sont des gènes conservés et spécifiques de l'autophagie. D'une manière générale, ce processus est stimulé par les gènes suppresseurs de tumeurs, tels que *P53* et *PTEN* et il est important de noter qu'un gène *ATG*, que l'on nomme *ATG6* ou « *Becline1* », est aussi un gène suppresseur de tumeur qui agit par un mécanisme

d'haplo-insuffisance. *Becline1* est délété dans 40 à 75% des cancers du sein et des ovaires chez l'humain.

1.4.2.2 Voie PI3k/Akyt/mTor

La phosphoinositide-3-kinase (*PI3K*) est un hétérodimère à activité kinase, qui peut être directement activée par un récepteur à tyrosine kinase ou par l'intermédiaire de la protéine *Ras* (cette dernière étant activée par une mutation ou un de ces récepteurs). Les protéines kinases B (*AKT*) sont des sérine/thréonine kinase qui interviennent dans la survie et la prolifération cellulaire. *mTOR* est activée par les *AKT* via la phosphorylation de *tuberous sclerosis complex 1 (TSC1)* et de *tuberous sclerosis complex 2 (TSC2)* et en inhibant la protéine pro-apoptotique *bcI associated death (BAD)*.

La protéine *mammalian target of rapamycin (mTOR)* est une sérine/thréonine kinase intracellulaire qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la vie cellulaire (cycle cellulaire et apoptose) ainsi que dans l'organisation du cytosquelette. La voie *mTOR* peut être activée de différentes manières : soit par l'intermédiaire de signaux extracellulaires captés via des récepteurs membranaires aux facteurs de croissance, soit par des signaux intracellulaires métaboliques tels que le taux d'oxygène, d'*ATP* ou d'acides aminés.

Cette voie joue également un rôle important dans l'angiogenèse en régulant la production de *HIF* (qui lui joue un rôle dans l'angiogenèse en stimulant la production de facteurs de croissance comme le facteur de croissance vasculaire (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet derived growth factor, PDGF*).

La liaison de *VEGF* à son récepteur active la voie PI3K/AKT/mTOR stimulant ainsi la prolifération des cellules tumorales mais également la prolifération des cellules endothéliales et des péricytes. Par conséquent, la voie PI3K/AKT/mTOR favorise la néo angiogenèse tumorale.

En résumé, la voie de signalisation PI3K / AKT / mTOR est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Elle est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses, la plupart des protéines la constituant pouvant être mutées, délétées ou surexprimées selon les cas.

1.4.2.3 Macropinocytose

La macropinocytose désigne la formation de grandes vésicules endocytaires primaires de taille et de forme irrégulières, produites par évagination de la membrane péri cellulaire, qui permet l'accumulation accélérée de solutés extracellulaires.

La macropinocytose de protéines induites par *Ras* est une source d'acides aminés essentiels, pouvant réduire la dépendance à la glutamine extracellulaire, propre aux cellules transformées. Comisso *et al.* ont montré qu'en favorisant la macropinocytose, la signalisation de l'oncogène *Kras* pouvait réduire la dépendance de la prolifération des cellules cancéreuses sur l'approvisionnement de la glutamine exogène [28].

1.4.2.4 Métabolisme du glucose anabolique

Comme pour d'autres types de cancers, le cancer du pancréas possède une grande capacité à utiliser le glucose [29]. Les changements métaboliques impliquant le glucose sont aussi dus à l'oncogène *Kras*. Par exemple, la glycolyse est augmentée en aval de *Kras* de différentes manières. Le transporteur du glucose *GLUT1* est régulé du point de vue de la transcription en réponse aux mutations *Kras* dans le cancer du pancréas et d'autres types de tumeurs menant à l'absorption du glucose [29]. De plus, les enzymes clés de la glycolyse telles que *HK1*, *HK2* et *PFK1*, sont régulées en aval de l'activation de *Kras* par la transcription [29]. Un des sorts possibles de la glycolyse est la conversion du pyruvate en lactate par l'enzyme la lactate déshydrogénase.

L'oncogène *Kras* montre une augmentation de l'expression de la lactate déshydrogénase (*LDHA*) à travers l'augmentation de sa transcription. De plus, les cellules pancréatiques cancéreuses, peuvent réguler l'activité et les niveaux de la *LDHA* via des modifications post-traductionnelles de l'enzyme. L'acétylation de la *LDHA*, au 5^{eme} résidu lysine, réduit son activité et cible la *LDHA* pour la dégradation des lysosomes.

Les cellules cancéreuses pancréatiques ont montré des niveaux réduits de cette acétylation particulière, résultant d'une activité de la *LDHA* plus importante. Une étude récente a suggéré que le lactate peut être utilisé comme une source d'énergie alternative par les cellules pancréatiques cancéreuses, ce qui permet une augmentation de la prolifération.

La glycolyse étant élevée dans les cancers du pancréas, conduisant à une augmentation de la production de lactate, la capacité à utiliser le lactate pourrait fournir un avantage supplémentaire aux cellules pancréatiques cancéreuses. En effet, l'inhibition de la glyco-

lyse à travers l'inhibition de l'expression de la *LDHA* par l'acide ribonucléique (*ARN*) interférence, a réduit la croissance des cellules pancréatiques cancéreuses [30].

Une étude, qui a utilisé des souris transgéniques, avec un cancer du pancréas, où l'expression de *KrasG12D* était induite par la doxycycline qu'elles ont ingérée, a montré que l'oncogène *Kras* est nécessaire à l'entretien tumoral, en partie à cause de connexions alternatives (« recâblage ») du métabolisme du glucose anabolique [29].

Le « recâblage » métabolique par *Kras* est complexe, et les voies métaboliques impliquées dans le cancer du pancréas divergent de celles impliquées dans les cellules normales. En particulier, le flux glycolytique augmenté dérive des différentes voies anaboliques.

La voie des pentoses phosphate (*pentose phosphate pathway, PPP*) est une branche de la glycolyse qui génère des sucres avec 5 carbones (ribose-5-phosphate) à partir de sucres avec 6 carbones, pour être utilisés dans la biosynthèse des nucléotides. En parallèle, cela génère des équivalents réduits sous la forme de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (*NADPH*) pour utiliser un contrôle rédox et la biosynthèse de différentes molécules telles que les acides gras [31], [32]. La voie des *PP* peut être visualisée comme ayant une branche oxydative et une branche non-oxydative.

L'oxydation utilise le glucose-6-phosphate pour produire 2 équivalents réduits sous la forme de *NADPH*. Les réactions non-oxydatives de la voie des *PP* sont d'abord utilisées afin de produire du ribose-5-phosphate.

Les réactions non-oxydatives sont aussi importantes pour générer des sucres avec 6 carbones à partir de sucres avec 5 carbones, qui peuvent être utilisés pour favoriser la glycolyse. Les branches oxydative et non-oxydative de la voie des pentoses phosphate peuvent être découplées, et elles peuvent réguler la contribution relative et la production de deux branches de la voie des *PP* selon leurs besoins (nécessitant plus de *NADPH* que de ribose par exemple [32]).

Dans les cancers du pancréas, la voie des *PP* est importante pour l'entretien tumoral, car, elle génère la fraction de glucose de l'acide désoxyribonucléique (*ADN*) utilisé pour dupliquer le génome pendant la génération des cellules filles. De manière inattendue, l'oncogène *Kras* conduit à augmenter spécifiquement le flux à travers la branche non-oxydative de la voie des *PP*. Il en résulte la production de plus de ribose-5-phosphate, qui peut être utilisé pour la biosynthèse de l'*ARN* et de l'*ADN*. Cela se passe indépendamment de la génération de *NADPH* via la branche oxydative. L'activation de *Kras* mène à une

augmentation de la transcription de deux enzymes de la branche non-oxydative de la voie des *PP*, la ribose-5-phosphate-isomérase A et la ribulose-5-phosphate-3-épimérase, qui conduisent à une augmentation du flux à travers la branche non-oxydative [29].

L'inhibition de cette voie, à travers la suppression de l'expression, soit de la ribose-5-phosphate isomérase A, soit de la ribulose-5-phosphate-3-épimérase, entraîne une diminution de la croissance du cancer du pancréas à la fois *in vitro* et *in vivo*. Une autre voie dépendante du glucose qui est régulé par l'oncogène *Kras* dans les cancers du pancréas est la voie de la biosynthèse de l'hexosamine (*hexosamine biosynthesis pathway, HBP*). Cette voie mène à la production d'uridine diphosphate-N-acétylglucosamine et d'autres hexosamines, qui sont les substrats principaux pour la glycosylation des protéines et des lipides, incluant plusieurs protéines nucléaires et cytoplasmiques sur leur résidu sérine ou thréonine [33].

HBP utilise du glucose et de la glutamine pour produire de l'uridine diphosphate-N-acétylglucosamine agissant comme un pont entre la glycolyse et la glutaminolyse.

L'entrée du glucose dans l'*HBP* est régulée par sa première enzyme limitante, la glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase (*GFPT1*). Cette enzyme catalyse la conversion du fructose-6-phosphate et de la glutamine en, respectivement, glucosamine-6-phosphate et glutamate [34]. Dans une boucle de rétroaction négative, le produit final d'*HBP*, l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine, inhibe l'activité de *GFPT1* en autorégulant cette voie [35]. *HBP* organise l'absorption des nutriments, partiellement en modulant la glycosylation et la localisation de la membrane des récepteurs de facteurs de croissance [36]. De plus, *HBP* et la glycosylation des protéines ont été trouvées en augmentation dans différents types de cancers [33]. En général, la glycosylation est une modification protumorigénique qui est responsable des phénotypes liés au cancer tels que la motilité (faculté de se mouvoir), la prolifération et l'angiogenèse [37].

Dans les cancers du pancréas, l'oncogène *Kras* augmente le flux du glucose à travers *HBP* en régulant l'expression de *GFPT1* [38]. En accord avec cela, la suppression de *Kras* résultait dans la diminution de la glycosylation dans les cellules pancréatiques cancéreuses. L'inhibition de la voie *HBP* dans les cellules pancréatiques cancéreuses par l'*ARN* interférence dû à la suppression de *GFPT1* résultait en une diminution de la croissance des cellules clonogéniques et de la croissance des xénogreffes chez les souris [29].

Un des aspects intéressants de plusieurs changements dans le métabolisme du glucose vu

dans les cancers du pancréas est qu'il semble être conduit par l'activation de la voie de signalisation Raf/MEK *via* l'oncogène *Kras* (*mitogen-activated protein kinase*, *MAPK* ; *extracellular signal-regulate kinases*, *ERK* ; d'où MAPK/ERK kinase, *MEK*).

En effet, l'inhibition pharmacologique de *MEK* conduit à une diminution chez plusieurs enzymes limitantes qui sont régulées par *Kras* et des diminutions dans les métabolites respectifs en aval. Cet effet sur la transcription est induit par l'oncogène *c-Myc*, comme une proportion élevée des transcrits géniques qui sont régulés par l'oncogène *Kras*, et qui ont des liens avec *Myc* dans leurs promoteurs. Fonctionnellement, la suppression de l'expression de *c-Myc* par l'*ARN* interférence entraîne une expression diminuée des enzymes de mêmes métabolites, régulés par *Kras* et leurs métabolites correspondant en aval. Bien qu'il n'y ait pas d'inhibiteurs à l'échelle clinique pour la plupart des enzymes métaboliques (*GFPT*, ribose—phosphate isomerase A, ribulose—phosphate-3-épimérase), les inhibiteurs de la voie *MEK* sont utilisés dans les essais cliniques de plusieurs types de tumeurs [39]. Par conséquent, l'utilisation des inhibiteurs *MEK*, basée sur leur capacité à inhiber le métabolisme du glucose dans les cancers du pancréas en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques, peut-être une stratégie utile.

En fait, les données disponibles suggèrent des combinaisons thérapeutiques potentiellement attractives. Par exemple, les voies de signalisation *MEK* contrôlent l'expression des enzymes clés de la branche non-oxydative de la voie des *PP* [29], une source significative de ribonucléotides pour la synthèse de l'*ADN de novo* dans la cellule. Et cela, en combinant des traitements endommageant l'*ADN*, tels que la radiothérapie avec des inhibiteurs de *MEK*, pourrait potentiellement encourager un effet synergique.

1.4.2.5 Métabolisme de la glutamine

La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le sang [40]. Elle a été étudiée pour son rôle dans le cancer car elle apparaît comme étant nécessaire pour la croissance de plusieurs types de tumeurs [41]. Elle est une source significative de carbone dans les cellules cancéreuses et favorise le processus anabolique à travers la glutaminolyse (le métabolisme de la glutamine génère de l' α -cétoglutarate [42]). La glutamine est également un précurseur du glutathion (à travers sa conversion en glutamate par la glutaminase), un puissant antioxydant.

La glutamine est aussi la source de groupes aminés pour les acides aminés non-essentiels

tels que l'alanine, l'aspartate, la sérine et la glycine. Le N-groupe, libéré lors de la conversion de la glutamine en glutamate, alimente aussi la synthèse des nucléotides et la voie de la biosynthèse de l'*HBP*.

L'oncogène *Kras* n'affecte pas le flux au cours de la branche oxydative de la voie des *PP* générant du *NADPH* [29]. De plus, une carence en glucose tout en ralentissant la croissance de l'adénocarcinome pancréatique, a peu d'effets sur l'état d'oxydoréduction cellulaire dans les cellules pancréatiques tumorales [43]. Cela suggère que le cancer pancréatique utilise des mécanismes alternatifs pour maintenir l'équilibre rédox. En effet, le retrait de la glutamine résulte en une augmentation significative des dérivés réactifs de l'oxygène (*DRO*) dans les cellules pancréatiques tumorales, et il a été montré que le métabolisme de la glutamine est essentiel à l'équilibre rédox dans les cellules pancréatiques tumorales [43].

Le métabolisme du squelette carboné de la glutamine par la voie canonique produit de l' α -cétoglutarate dans la mitochondrie pour alimenter le cycle de Krebs. Cette étape recourt à la glutamate déshydrogénase (*GLUD1*) pour la transformation du glutamate en α -cétoglutarate [42]. Ce dernier peut finalement être utilisé pour l'anapleurose, donnant lieu à une génération d'intermédiaires utilisés pour la biomasse tels que les acides nucléiques, les protéines et les lipides [44]. En revanche, les lignées cellulaires pancréatiques tumorales n'utilisent pas *GLUD1*. A la place, elles utilisent l'aspartate transaminase (*GOT2*) pour produire de l' α -cétoglutarate, *via* une réaction anaplérotique, dans la mitochondrie. Cette réaction crée simultanément de l'aspartate à partir d'oxaloacétate, qui est libéré dans le cytoplasme.

L'aspartate cytosolique est ensuite sollicité par l'aspartate aminotransférase cytosolique (*glutamic oxaloacétate transaminase, GOT1*) pour convertir l'aspartate dérivé de la glutamine en oxaloacétate. L'oxaloacétate est ensuite converti en malate par la malate déshydrogénase (*MDH1*) et enfin en pyruvate et *NADPH* par l'enzyme malique. En effet, cette voie métabolique semble être une source essentielle du *NADPH* cytosolique dans les cellules tumorales pancréatiques (pour la croissance des cellules tumorales pancréatiques) [43]. Cette branche alternative du métabolisme de la glutamine est nécessaire pour la croissance du cancer du pancréas, la diminution des enzymes clés de cette voie métabolique (*GOT1, MDH1* ou l'enzyme malique) a supprimé *in vitro* la croissance de tumeurs xénogreffées [43]. De plus, le *NADPH* produit par cette voie, était essentiel à la

croissance des cellules tumorales pancréatiques *via* son rôle dans l'équilibre rédox. Et ce, comme une remise à l'état rédox en ajoutant du N-acétylcystéine ou du glutathion réduit qui pourrait sauver la croissance de l'inhibition de ces enzymes clés.

De plus, ce métabolisme alternatif de la glutamine a montré qu'il était *Kras* dépendant, comme l'oncogène *Kras* commande l'expression de *GOT1* tandis qu'il réprime *GLUD1* dans les cellules pancréatiques tumorales [43]. Il est intéressant de noter que *GOT1* pouvait être remplacé pour la prolifération des cellules normales, indiquant que cette voie peut être thérapeutiquement plus souple. Bien qu'actuellement aucun inhibiteur *GOT1* ne soit disponible, d'autres enzymes clés dans le métabolisme de la glutamine connaissent des inhibiteurs. Un exemple est la glutaminase et son inhibiteur bis-2-(5-phenylacétamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl) éthyl sulfide (*BPTES*), qui diminue la viabilité des cellules pancréatiques tumorales *in vitro* [43].

Comme cela a été vu dans la même étude, un résultat majeur du métabolisme unique de la glutamine dans les adénocarcinomes pancréatiques est la production de *NADPH*, qui a pour conséquence une augmentation de la capacité des cellules pancréatiques tumorales à résister à la détérioration oxydative. On pourrait dire qu'une thérapie combinée ciblant le métabolisme de la glutamine (telle que l'inhibition de la glutaminase), parallèlement au *DRO* classique produisant des thérapies telles que la radiothérapie ou la chimiothérapie, peuvent être intéressantes. Ces thérapies doivent se faire en synergie et tuer efficacement les cellules pancréatiques tumorales. Bien que le *NADPH* produit par cette nouvelle voie soit essentiel pour l'adénocarcinome pancréatique, *via* son rôle dans la conservation des groupements du glutathion réduit, *NADPH* a plusieurs rôles clés à jouer dans les cellules normales et plus particulièrement dans les cellules tumorales. *NADPH* est nécessaire à plusieurs aspects de la biosynthèse et semble limité pour la croissance tumorale.

Une cellule qui se divise nécessite, par exemple, des groupements significatifs de *NADPH* pour la synthèse des acides gras en comparaison avec une cellule normale dans un état de non-prolifération, c'est-à-dire de quiescence [31], [32].

De plus, la réplication de l'*ADN*, et particulièrement, la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides (*via* la ribonucléotide réductase), requiert *NADPH* comme le donneur d'électron, expliquant en partie les quantités importantes de *NADPH* nécessaires à la prolifération cellulaire [32].

Bien que les données suggèrent un rôle essentiel de la production de *NADPH* dans

l'équilibre rédox des adénocarcinomes pancréatiques, *NADPH* est probablement nécessaire pour tous ces processus de biosynthèse dans les adénocarcinomes pancréatiques. Des études détaillées ont évalué l'utilisation du *NADPH* sous différentes conditions pendant la pathogénèse, nécessaire pour définir ses rôles précis.

1.4.2.6 Hypoxie

Les zones au sein d'adénocarcinomes pancréatiques sont hypoxiques [45] [27], ce qui résulte probablement de la nature hypovasculaire du tissu. Ce micro environnement hypoxique a des conséquences sur la complexité des systèmes biologiques et en particulier le métabolisme cellulaire. En effet, une étude récente caractérisant les régions hypoxiques dans le cancer du pancréas suggère que l'hypoxie augmente l'activité de *HBP* [27].

Le facteur induit par l'hypoxie (*hypoxia inducing factor, HIF*), comprenant une composante α de 826 acides aminés (*HIF1 α*), joue un rôle central dans la réponse à l'hypoxie. A une faible concentration d'oxygène dans la cellule, *HIF1 α* est stabilisé et passe par translocation dans le noyau où il agit comme un facteur de transcription déclenchant plusieurs réponses hypoxiques. La stabilité de la régulation d'*HIF1 α* est complexe et étroitement régulée par la dégradation protéique *via* l'ubiquitine. Une des conséquences de l'activation d'*HIF1 α* est la connexion métabolique qui permet à une cellule de survivre dans un environnement avec peu d'oxygène. A savoir, cela conduit à une augmentation de la glycolyse en régulant à la hausse, des gènes clés tels que l'hexokinase (*HK*), la pyruvate kinase isoenzyme de type (*PKM2*) et la *LDHA*, entre autres [46]. Cela conduit également à un glissement vers la voie des *PP* *via* une régulation en hausse de l'expression des transcétolases (transketolases, *TKT* et *TKTL2*) [47].

HIF1 α coordonne aussi une diminution de l'entrée du carbone glucidique dans le cycle de Krebs. Ce qui apparaît comme une adaptation bénéfique en présence d'hypoxie, en raison du manque d'oxygène qui agit comme un accepteur d'électron pendant la phosphorylation oxydative. *HIF1 α* peut diminuer le flux du glucose en augmentant la transcription de la pyruvate déshydrogénase kinase (*PHHK*) [48]. La *PDHK* phosphoryle et inhibe la pyruvate déshydrogénase, qui est l'enzyme permettant la conversion du pyruvate en acétyl-CoA.

Dans les cancers du côlon présentant une mutation *Kras*, des gènes en lien avec l'expression d'*HIF1 α* et d'*HIF2 α* sont induits par l'oncogène *Kras* en aval [49], créant un état

d' « hypoxie aérobie ». Ce résultat est en accord avec les cellules transformées-Ras qui présentent un profil métabolique similaire, de cellules hypoxiques [50]. Dans le cancer du pancréas, *HIF1 α* a montré des changements métaboliques en aval de la mucine membranaire 1 (*mucin-1*, *MUC1*). Aussi, une interférence avec *HIF1 α* a des effets anti-tumoraux sur les cellules tumorales pancréatiques *in vivo* et *in vitro* [51].

Une autre réponse hypoxique induite par l'activité d'*HIF1 α* est l'activation de l'autophagie [52]. Comme l'autophagie est un mécanisme critique dans le métabolisme des cellules tumorales pancréatiques dans des conditions de normoxie, elle peut avoir des rôles supplémentaires dans le cadre de l'hypoxie. En effet, l'autophagie semble promouvoir l'initiation tumorale dans les cultures tumorales pancréatiques dans des conditions d'hypoxie [53].

1.4.2.7 Gènes suppresseurs de tumeurs

L'oncogène *Kras*, un facteur clé de la pathogénèse du pancréas et un régulateur du métabolisme du pancréas, est à l'origine d'altérations génétiques des gènes suppresseurs de tumeurs qui, dans ce cas, limitent l'évolution maligne [54]. Plusieurs de ces gènes sont liés au métabolisme cellulaire [55]. Les conséquences des mutations *Kras* dans le cancer du pancréas ou même les changements métaboliques *Kras*-indépendants sont probablement modulés par les modifications induites par les gènes suppresseurs de tumeurs. De plus, ces mutations, suppresseurs de tumeur, peuvent altérer la dépendance d'une tumeur selon une voie métabolique particulière. Un exemple est le gène suppresseur de tumeur *p53*, qui est bien connu pour son rôle dans l'apoptose et l'arrêt de la croissance. *p53* peut, comme un facteur de transcription, favoriser la transcription des gènes ce qui mène à l'arrêt de la croissance à la phase *G1*, en ayant une fonction permettant de contrôler un cycle cellulaire qui protège les cellules contre une action génotoxique de différentes origines telles qu'une irradiation, l'hypoxie ou une drogue, induisant des dommages génotoxiques.

De manière alternative, il peut aussi favoriser l'apoptose en réponse à certains stimuli [56]. *p53* est le gène muté le plus commun dans le cancer, avec la moitié des tumeurs humaines qui présentent des mutations altérant la fonction de *p53* [56]. Dans le cancer du pancréas, *p53* est muté dans la majorité des tumeurs [57], et sa fréquence augmente avec la progression tumorale [58]. Pour avoir une preuve supplémentaire de son rôle dans le cancer du pancréas, la délétion ou mutation de *p53* accélère le développement des tumeurs pancréatiques chez des souris mutées *Kras*. Il a été montré que *p53* régule plusieurs aspects

du métabolisme cellulaire. Globalement, la démonstration nette de l'expression de *p53* qui favorise la phosphorylation oxydative et atténue la glycolyse bien qu'il y ait certains tissus et contextes cellulaires pour lesquels cela diffère un peu.

Par conséquent, dans les cancers où *p53* serait absent ou muté (comme c'est le cas dans la majorité des cancers du pancréas), il serait attendu de voir des augmentations de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative. Par exemple *p53* favorise l'expression de *SCO2* (*synthesis of cytochrome c oxidase*), un membre de la cyclooxygénase 2 (*COX – 2*) impliquée dans la chaîne de transports d'électrons qui augmente les niveaux de la respiration mitochondriale tandis que la glycolyse est diminuée. De plus, la glutamine est un carburant majeur du cycle de Krebs dans plusieurs types de cancers (elle peut fournir des intermédiaires du cycle de Krebs). *p53* peut activer la glutaminase 2, qui augmente la conversion de la glutamine en glutamate, qui peut être utilisé à la fin pour faire de l' α -cétoglutarate (α CK) [59]. Ceci peut conduire à un flux augmenté au travers du cycle de Krebs et une augmentation de la phosphorylation oxydative. Il y a de multiples manières par lesquelles *p53* peut atténuer la glycolyse, en incluant la promotion de l'inactivation de la phosphoglycérate mutase [60] et en empêchant les transporteurs du glucose *GLUT1* et *GLUT2* [61].

p53 active aussi la glycolyse provoquée par *TP53* et la fructose-2,6-biphosphatase qui est un régulateur de l'apoptose et qui diminue la concentration intracellulaire du fructose-2,6-biphosphonate; il en résulte une diminution de la glycolyse et une augmentation de la phosphorylation oxydative [62]. De plus *p53* influence aussi la voie des *PP* en inhibant l'activation de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la première limite pour l'enzyme de la voie des *PP* [63]. De plus, des données récentes suggèrent que *p53* influence le rôle de l'autophagie dans la progression du cancer pancréatique en utilisant un modèle de souris transgénique avec un adénocarcinome pancréatique où *Kras* est activé en même temps que la perte d'*ATG5* (*autophagy related protein 5*) et d'*ATG7* (*autophagy related protein 7*) et les copies de *p53* ont été supprimées dans l'embryon. Dans le cadre de la perte combinée de *p53* et de la déficience de l'autophagie, la formation de la tumeur doit en fait être accélérée. Ceci est en contraste avec les tumeurs où *Kras* est activé et l'autophagie est annulée dans le cadre d'un locus *p53* intact. Ici, la progression tumorale est complètement inhibée [64].

Une possibilité qui n'est pas adressée dans cette étude concerne la manière dont *p53* est

mutée/perdue dans le cadre d'un cancer. Dans cette étude, la délétion homozygote de *p53* crée une situation où *p53* n'est jamais présente dans le tissu avant le développement de la tumeur.

Bien que ces données soient d'un grand intérêt, il serait opportun d'étudier le rôle de l'autophagie dans la progression du cancer du pancréas dans un cadre plus physiologique, avec une perte de *p53* alors que la tumeur évolue. En effet, les données de cette étude [65] ont montré qu'une perte d'*ATG5* dans des modèles de souris transgéniques avec un cancer du pancréas où *p53* est perdu de manière stochastique avec la perte de l'hétérogénéité qui réduit de manière significative la progression du cancer du pancréas. D'autres gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cancer du pancréas ont aussi des rôles dans le métabolisme cellulaire. Ce qui inclut la kinase hépatique B1 (*liver kinase B1*, *LKB1*), une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle la protéine kinase activée par l'adénosine mono phosphate (*AMPK*) [66]. Les patients avec des mutations de lignées germinales de la *LKB1* (appelé syndrome de Peutz-Jegher) ont un risque élevé de développer un cancer du pancréas [67] et un syndrome d'insuffisance haploïde de *LKB* qui coopère avec l'oncogène *Kras* dans les souris transgéniques ayant développé un cancer du pancréas [67]. Bien que les conséquences métaboliques de la perte de *LKB1* dans les cancers du pancréas n'ont pas été très étudiées en aval, des effecteurs de *LKB1* telle que l'*AMPK* qui a des rôles essentiels dans le métabolisme, suggèrent que le métabolisme du pancréas peut être altéré au moment de la perte de *LKB1*. Par conséquent, l'*AMPK* stimule les voies cataboliques produisant de l'*ATP* (glycolyse et oxydation des acides gras) et atténue les voies anaboliques consommant de l'*ATP* (lipogenèse et synthèse des protéines).

En fait, passer à l'oxydation des acides gras permet un bénéfice net de l'augmentation des niveaux de *NADPH* dans les cellules. Pour finir, la voie de signalisation de *LKB1-AMPK* régule positivement l'autophagie à travers l'activation d'*ULK1* (sérine/thréonine protéine kinase) et de l'inhibition de la voie *mTOR*, suggérant que les tumeurs avec une mutation de la *LKB1* peuvent réduire l'autophagie, en comparaison avec les tumeurs qui ont une *LKB1* intacte. Par conséquent, il serait intéressant de comprendre comment des adénocarcinomes pancréatiques avec une mutation de la *LKB1* gèrent l'énergie ou d'autres facteurs de stress métabolique.

1.4.2.8 Voie des acides gras et des lipides

Les lipides et les acides gras sont importants dans la croissance cellulaire tumorale et comme déjà décrit précédemment, les cellules présentant *Ras* développent un mécanisme afin de récupérer les acides gras libres de l'environnement extracellulaire [68]. Le rôle des différents acides gras dans le métabolisme du cancer du pancréas a commencé à être exploré récemment. Il est intéressant de noter que différentes catégories d'acides gras ont à la fois des propriétés pro- et anti-tumorigéniques dans différents types de cancers rendant la biologie complexe [69]. Plusieurs études récentes ont montré que les adénocarcinomes pancréatiques ont des niveaux plus faibles d'acides gras que leur tissu normal correspondant. Par exemple, la choline et les acides gras étaient trouvés diminués dans une étude utilisant comme technique la *RMN* [70]. L'acide palmitoléique était trouvé diminué, à la fois dans le tissu et le sérum, dans les modèles de rats présentant un adénocarcinome pancréatique, en comparaison avec des animaux contrôles [71].

Dans une autre étude qui combinait transcriptomique et protéomique afin de comparer des adénocarcinomes pancréatiques avec des tissus non tumoraux pancréatiques provenant du même patient, les acides gras étaient systématiquement diminués dans les adénocarcinomes pancréatiques [72]. Le mécanisme proposé était : les lipases spécifiques (*PNLIP*, *CLPS*, *PNLIPRP1* et *PNLIPRP2*) qui sont à la baisse dans les adénocarcinomes pancréatiques, résultant ainsi une diminution de la teneur d'acides gras libres.

Les acides palmitique et stéarique sont deux acides gras saturés qui induisent l'apoptose et inhibent la prolifération des lignées cellulaires pancréatiques [72]. Parmi ces lignées, d'autres acides gras avec des propriétés anti-tumorigéniques ont été décrits tels que l'acide polyinsaturé N3 qui peut perturber et réduire la progression tumorale pancréatique [73]. Cependant, une étude a montré que les lipides, pouvaient être également pro-tumorigénique, avec un régime riche en matières grasses, ce qui favorise la croissance tumorale chez des modèles murins avec un adénocarcinome pancréatique [74]. Les effets directs des lipides sur les cellules tumorales elles-mêmes ne sont certainement pas responsables de ces observations, cependant, c'est la preuve que les acides gras ont des effets pro-tumorigéniques directs dans le cancer du pancréas. En effet, le métabolisme lipidique est vraisemblablement une source importante d'énergie dans le cancer du pancréas et, conforme aux lignées cellulaires tumorales pancréatiques traitées par de l'acide linoléique et de l'acide oléique, met en évidence des taux de prolifération en hausse [75]. Le métabolisme des acides gras

peut aussi générer un *DRO* comme c'est le cas avec l'acide linoléique [76], un potentiel facteur anti-tumorigénique dans le cancer du pancréas (qui dépend des niveaux de *DRO*). Ceci pourrait expliquer pourquoi dans certains cas, les acides gras favorisent la croissance tumorale et dans d'autres cas, en sont supprimeurs. Même si la diminution du niveau de certains acides gras est apparemment importante dans le cadre du cancer du pancréas, il reste à déterminer quels sont les acides gras cytotoxiques pour les cellules tumorales et quels sont les acides gras qui fournissent la tumeur en substrats métaboliques. Une explication possible de la diminution du niveau des acides gras dans le cancer du pancréas pourrait être qu'ils sont rapidement métabolisés par les cellules tumorales. Il serait intéressant de comprendre le rôle complexe des lipides dans le cancer du pancréas à travers des études métaboliques très détaillées.

1.4.2.9 Biosynthèse du nicotinamide adénine dinucléotide

Le nicotinamide adénine dinucléotide (*NAD*) est un cofacteur crucial dans les réactions de réductions de beaucoup de voies métaboliques [77]. *NAD* peut être trouvé dans sa forme oxydée (*NAD*⁺) ou réduite (*NADH*). Il est un facteur crucial pour le cycle de Krebs et la glycolyse, avec une réduction du *NAD* nécessaire à la conversion du glycéraldéhyde en 1,3-biphosphoglycérate. Il est aussi utilisé comme un donneur d'électrons afin de faire de l'*ATP* via la phosphorylation oxydative. Outre son pouvoir oxydatif, *NAD* a d'autres rôles dans la cellule. Il régule des facteurs de transcription impliqués dans des voies liées à l'inflammation, à la progression du cycle cellulaire, à l'apoptose, au métabolisme ou à la réparation de l'*ADN*.

Il y a deux principales voies pour la synthèse du *NAD* dans une cellule :

- la synthèse *de novo*, à partir des acides aminés tryptophane ou aspartate ;
- la voie de récupération, où le *NAD* est recyclé en composés contenant du nicotinamide.

La voie de synthèse par récupération est essentielle pour maintenir des niveaux de *NAD* chez les mammifères. Elle est dépendante du nicotinamide phosphoribosyltransférase (*NAMPT*), l'enzyme limitante qui convertit le nicotinamide en nicotinamide mononucléotide. Bloquer cette enzyme avec un inhibiteur chimique spécifique (*FK866*) va réduire les niveaux de *NAD* dans la cellule, ce qui conduit à la mort cellulaire dans plusieurs types de cancers [78]. Comme les cellules cancéreuses reposent sur la disponibilité

du *NAD*, cibler le *NAD* indirectement à travers la nicotinamide phosphoribosyl transférase peut être vu comme une possible cible thérapeutique [79], [80]. Une étude récente a démontré que les cellules pancréatiques tumorales dépendent du métabolisme du *NAD* pour leur survie avec des résultats précliniques prometteurs quand le nicotinamide est ciblé.

1.4.3 Applications

La métabolomique appliquée au cancer a été définie comme l'étude des variations métaboliques globales ainsi que la mesure des profils biochimiques liés aux voies métaboliques connues sous l'influence d'un processus oncogène [81].

1.4.3.1 Tumeurs cérébrales

Un des cancers les plus étudiés par *RMN HRMAS* est celui du système nerveux central.

Erb *et al.* en 2008, ont caractérisé le gradient de malignité des oligodendrogliomes *via* une analyse métabolomique. Les résultats ont révélé un gradient de l'hypoxie tumorale augmentant selon la direction suivante : oligodendrogliomes de bas-grade, oligodendrogliomes intermédiaires et oligodendrogliomes de haut-grade. La classification métabolique semble fournir une corrélation plus étroite avec l'évolution des patients que l'analyse histopathologique [82].

Afin de caractériser les gliomes, le type le plus important de tumeurs cérébrales chez les adultes, Opstad *et al.* en 2010 ont utilisé la *RMN HRMAS*, travaillant sur du tissu intact, afin de corréliser les résultats de cette technique avec ceux trouvés *via* la *RMN in vivo*. Cette étude portait sur 17 patients présentant un astrocytome. Cette analyse a révélé des corrélations entre les spectres *RMN in vivo* et *ex vivo* pour plusieurs métabolites, tels que la créatine, le glutamate/glutamine, le myoinositol, le N-acétyl-aspartate, le scyllo-inositol, la choline totale et les pics de lipides/macromolécules. La créatine, le myoinositol, la choline totale et les pics de lipides/macromolécules corrélaient entre les concentrations *in vivo* et *ex vivo* et se présentaient comme d'importants facteurs de classement des astrocytomes [83].

Dali-Youssef *et al.* en 2015, ont cartographié l'expression génique des histones acétylases et co-facteurs qui a ensuite été corrélée à la survie et au profil métabolomique des gliomes

via RMN HRMAS. Les données métabolomiques obtenues suggèrent que la diminution du rapport glycérophosphocholine/phosphocholine est associé aux tumeurs de haut-grade et que les expressions de HDAC1, HDAC4 et SIRT1 doivent influencer l'agressivité des tumeurs au travers des changements du profil métabolomique des tumeurs [84].

1.4.3.2 Cancers du sein

La spectroscopie *RMN HRMAS* a été utilisée pour la première fois en 1998 pour étudier des biopsies tissulaires provenant de patients présentant un cancer du sein (Cheng *et al.*, 1998). L'étude intégrait 19 biopsies de patients présentant un cancer du sein. Les spectres ont été obtenus à partir d'échantillons intacts, provenant de tissus frais. Dans cette étude, les marqueurs métaboliques de la tumeur tels que la phosphocholine, le lactate et les lipides pouvaient être corrélés avec le grade tumoral histopathologique de la tumeur [85].

En 2002, Sitter *et al.*, ont inclus 10 patients présentant un cancer du sein. Les spectres (de tissus intacts) *RMN HRMAS* ont été comparés aux spectres obtenus après extraction à l'acide perchlorique, de tissus du même type. Les acquisitions en 2D de leur étude ont permis d'identifier la majorité des métabolites. Plus de 30 métabolites ont été détectés et identifiés. Les spectres de tissus intacts provenant de patients présentant un cancer du sein différaient de ceux obtenus après l'extraction à l'acide perchlorique par la présence de lipides. Le tissu cancéreux mammaire montrait une concentration plus élevée de glycine, lysine, asparagine, aspartate, alanine, valine, leucine, isoleucine, glutamate, glutamine tyrosine et histidine (qui sont des acides aminés), de glucose et de lactate (qui sont des métabolites impliqués dans le cycle énergétique), et de glycérophosphocholine, phosphocholine et choline [86].

Comme Cheng *et al.*, Sitter *et al.* ont également corrélé, le rapport Lactate/Choline et le grade tumoral ou entre les concentrations de choline et glycine et la taille de la tumeur primitive. Bathen *et al.* en 2007 ont relevé l'utilité du phénotype métabolique (par *RMN HRMAS*) comme un outil de prédiction du grade histopathologique, du statut hormonal et de la diffusion du cancer aux ganglions lymphatiques. Soixante-dix-sept patients présentant un cancer du sein étaient inclus dans cette étude (94 échantillons de la tumeur cancéreuse, et 48 échantillons du tissu adjacent) [87].

1.4.3.3 Cancers de la prostate

Comme dans le cadre du cancer du sein, l'analyse *RMN HRMAS* a été appliquée afin d'évaluer la survenue, la proportion et l'agressivité du cancer avec 149 échantillons intacts de tumeurs prostatiques humaines provenant de 40 patients présentant un cancer de la prostate [88]. Alors que l'analyse du tissu malin n'a pas relevé de ratio spécifique entre les métabolites qui pourraient être en corrélation avec le score de Gleason, les évaluations des échantillons provenant de tissus non malins, pris à plusieurs distances du lieu de la tumeur ont révélé que les ratios m-Inositol/s-Inositol et Chol/Cr pouvaient être significativement liés au score de Gleason de la tumeur et pouvaient différencier les tumeurs qui ont un score de Gleason de 6 et de 7.

Sachant qu'un échantillon de prostate contient habituellement un mélange de tissu malin et non-malin, l'étude a plutôt utilisé une régression linéaire multivariée afin de déterminer la proportion de tissu cancéreux dans un échantillon. Les résultats reportés montrent que les ratios moyens de glycérophosphocholine/créatine et phosphocholine/créatine, m-Inositol/s-Inositol, choline/créatine, et s-Ino/créatine sont corrélés significativement ($p < 0.05$) avec la fraction tumorale de l'échantillon. Les ratios glycérophosphocholine/créatine et phosphocholine/créatine sont aussi corrélés significativement ($p < 0.001$) avec les niveaux d'expression du marqueur *Ki67* de la prolifération cellulaire et différenciés entre les tissus malins et non-malins. L'analyse métabolomique de 16 cas de cancers prostatiques récurrents, a défini une augmentation des niveaux de l'antigène spécifique de la prostate (*prostatic specific antigen, PSA*) dans le sérum après prostatectomie. Les analyses ont été réalisées sur 2 groupes de 16 cas sélectionnés au hasard sans réapparition de leur cancer [89]. Une analyse en composantes principales (*ACP*) a été réalisée sur les 27 régions spectrales les plus intenses sélectionnées sur la base du niveau au-dessus de la moyenne de tous les pics.

Quatre composantes principales qui corrélaient avec les caractéristiques pathologiques du tissu étaient identifiées par l'analyse canonique entre les cas récurrents et leur premier groupe de 16 cas non-récurrents correspondants. Les applications des résultats obtenus du second groupe des 16 autres cas non-récurrents correspondants ont révélé le pouvoir prédictif métabolomique de la réapparition du cancer de la prostate, avec un niveau de précision de 78 %, augmenté significativement à partir de la capacité actuelle du paradigme clinique au niveau de 50 % (quant à l'évaluation de la réapparition potentielle du

cancer de la prostate pour les cas correspondants).

En plus de travailler avec des tissus intacts, la *RMN HRMAS* a permis d'acquérir des profils métabolomiques de lignées cellulaires cancéreuses, incluant *PC3* pour leur réponse à la chimiothérapie [90]. Par exemple, le profil métabolomique des cellules cancéreuses *PC3* a montré une augmentation de la phosphocholine, du lactate et des acides gras ainsi qu'une diminution de l'acétate et de différents acides aminés, tels que la glutamine, proline, asparagine, phenylalanine et, leucine. Ces résultats suggèrent que la *RMN HRMAS* pourrait être utilisée pour caractériser les voies métaboliques cellulaires, et également fournir un aperçu des phénotypes cellulaires tumoraux. Le cancer agressif de la prostate qui se diffuse possiblement aux os est une pathologie fatale [91]. Les métastases osseuses du cancer de la prostate ont été comparées aux métastases osseuses d'autres types de cancers et à de l'os « normal » afin de montrer que le cholestérol est significativement plus élevé et pourrait être un biomarqueur de ce cancer [91].

1.4.3.4 Cancers liés au système neuroendocrinien

Une quantité considérable d'études métabolomiques s'est focalisée sur l'origine de différents types de tumeurs dans le système neuro-endocrinien. Un champ intéressant de recherche est la thyroïde. Les nodules de la thyroïde sont des problèmes fréquents en clinique où le cancer de la thyroïde est une des préoccupations les plus importantes. Les profils métaboliques acquis par *RMN HRMAS* permettent de faire la distinction entre tissu sain et lésion de la thyroïde. Cette technique permet également de différencier les tumeurs en fonction de leur grade de malignité. Les profils spectraux du tissu thyroïdien sain et du tissu provenant de lésions de la thyroïde étaient clairement distinguables avec une simple comparaison visuelle.

Par exemple, avec les résultats de l'*ACP* et les coefficients de pondération pour la première composante, indiquaient que la différenciation pouvait être attribuée à une augmentation du lactate et d'autres acides aminés tels que la phénylalanine, sérine, taurine, glutamine, alanine, isoleucine, leucine et valine. De plus, une diminution des lipides a été mise en évidence dans les échantillons tumoraux. Les résultats de l'*ACP* ne permettaient pas de faire une discrimination entre les échantillons tumoraux bénins et malins. Cependant, l'analyse par *OPLS-DA* indiquait la possibilité de différenciation entre les 2 groupes ($p = 0,0004$) avec une augmentation du lactate et de la taurine ainsi qu'une diminution de la choline,

phosphocholine, myo-inositol dans les échantillons malins. Des travaux ont aussi étudié la possibilité d'utiliser les profils métaboliques afin de différencier les tissus glandulaires malins et bénins. Les profils métaboliques de la corticosurrénale et de la médullosurrénale ont été comparés avec ceux de l'adénome, du carcinome de la corticosurrénale et du phéochromocytome ont été décrit par Imperiale *et al.* [92].

En plus de permettre la différenciation entre le tissu sain et malin, les profils métaboliques ont été utilisés pour faire la distinction entre différentes mutations présentes dans le cancer afin de guider le traitement et de déterminer le pronostic du patient. Les résultats d'une étude sont capables de différencier les échantillons sporadiques ($n = 48$) et les échantillons avec une mutation de la *SDH* ($n = 23$), parmi des échantillons de phéochromocytomes et de paragangliomes en analysant les 24 métabolites identifiés présents dans les 71 spectres avec l'*ACP* et l'*OPLS - DA*. A travers ces analyses, 12 métabolites ont été identifiés montrant que les phéochromocytomes/paragangliomes avec une mutation de la *SDH* pouvaient être caractérisés par de hauts taux de succinate, myo-inositol, méthionine, taurine, glutamine, et *ATP* tandis que les tumeurs sporadiques étaient caractérisées par de hauts niveaux d'adrénaline, noradrénaline, glutamate, glutathion, ascorbate et aspartate [92].

L'*ACP* et *OPLS - DA* ont aussi été appliquées afin de différencier les profils métaboliques par *RMN HRMAS* des cellules avec 6 variantes pathologiques du gène de la Ménine. Les mutations du gène de la ménine¹ qui encode la protéine de la ménine sont responsables de multiples syndromes néoplasiques endocriniens, la ménine de type 1 (*MEN1*) est un exemple de cancer héréditaire. Les résultats de cette étude identifiaient des diminutions dans 8 métabolites qui contribuent majoritairement à la différenciation : phosphocholine, taurine, choline, créatine, aspartate, glutathion, 3-hydroxybutyrate et l'inosine [93].

Le développement des outils diagnostiques qui identifient les mutations est essentiel pour affiner le diagnostic, le traitement et l'évaluation des risques familiaux. Ces études montrent la possibilité d'utiliser la *RMN HRMAS* pour classer les tumeurs d'après leurs caractéristiques génétiques, et par conséquent permettent d'affiner le diagnostic et le traitement ciblé.

1.4.3.5 Cancers des ovaires

Dans les analyses urinaires d'un ensemble de cancers féminins utilisant la *GC - MS* et la *LC - MS*, des biomarqueurs suggérés pour le cancer du sein tels que : 5-hydroxyméthyl-

deoxyuridine et 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, étaient confirmés pour les cancers du sein et les lésions oxydatives de l'ADN et la méthylation de l'ADN étaient observés en augmentation significative dans les cancers de l'ovaire comparés aux contrôles [94].

Dans une autre étude sur le cancer des ovaires, une combinaison de *GC – MS* et de *LC – MS* a été utilisée afin de comparer le cancer de l'ovaire épithélial primitif avec les tumeurs métastatiques résultant d'un cancer primitif de l'ovaire. Au moment de la transformation en métastases, les tumeurs ovariennes montraient une consommation de l'énergie significativement modifiée au travers de métabolites associés à la glycolyse et l'oxydation des acides gras (telle que la carnitine), aussi bien que des changements significatifs dans le métabolisme de la phénylalanine, marqué par le changement en phénylpyruvate et phényllactate [95].

Sellem *et al.* ont, en 2011, caractérisé le profil métabolomique des carcinomes épithéliaux ovariens. Les résultats montrent que les trois types de carcinomes épithéliaux ovariens ont un profil métabolomique différent. Enfin, les modèles statistiques des carcinomes séreux ont fourni de bonnes prédictions de la survie des patients et de la réponse à la chimiothérapie des patients [96].

La chromatographie en phase liquide à haute pression (*ultra performance liquid chromatography, UPLC*) couplée à la *MS* est utile dans l'analyse des profils métaboliques du plasma des tumeurs ovariennes bénignes et malignes. Ceci étant réalisé au travers de la validation avec succès de 4 biomarqueurs (L-tryptophan, lyso-phosphocholine (18 :3), lyso-phosphocholine(14 :0) et 2-piperidione) qui sont significativement plus bas à cause de la malignité des 535 métabolites trouvés afin de classer la malignité et la bénignité dans les tumeurs ovariennes [97].

1.4.3.6 Cancers urinaires

Les cancers urinaires incluent les cancers de la vessie, de la prostate (décrit précédemment), du rein et des testicules. L'étude parue en 2012 par Lin *et al.* sur le cancer du rein et de la vessie a révélé de potentiels biomarqueurs tels que l'eicosatriénol, l'acide azaprostanoïque, le docosatriénol, le rétinol et le 14-*apo*-bet-cartenal dans le cadre du cancer de la vessie; et la glycéro-phosphocholine, ganglioside *GM3* et *C17* sphinganine, parmi d'autres lipides dans le cadre du cancer du rein [98]. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé la *LC – MS*.

L'urine peut être examinée dans le but de déceler des biomarqueurs types de la détection précoce du cancer de la vessie. Une des conclusions les plus marquantes, est la différence dans les carnitines qui sont impliquées dans le transport des acides gras à travers les membranes des mitochondries [99]. Dans cette étude, la concentration de carnitine peut diminuer dans le cancer de la vessie. Une carence en acétyl-carnitine urinaire est courante dans le cancer de la vessie et les acétyles carnitines augmentent dans le cancer alors qu'ils restent à l'équilibre dans le groupe contrôle [99]. Dans l'analyse non ciblée de l'urine, les acétyles carnitines ont aussi montré des caractéristiques du cancer du rein. Pour les cellules, il a été reporté que les acétyles carnitines augmentent ce qui pourrait être indicatif d'une augmentation du métabolisme des acides gras dans le cancer du rein [100].

Le carcinome cellulaire rénal est souvent associé à un pronostic moins péjoratif s'il est détecté plus tôt, alors que s'il est détecté après l'apparition de symptômes, le pronostic peut être mauvais [101]. Un total de 30 métabolites a été décrit comme potentiel biomarqueur de la malignité qui pourrait être spécifique au carcinome cellulaire rénal.

Au moment de l'analyse des voies métaboliques de ces potentiels biomarqueurs, il a été suggéré que le carcinome cellulaire pouvait être associé à une perturbation du catabolisme phospholipidique, du métabolisme des sphingolipides, de la β -oxydation des acides gras, du métabolisme du cholestérol et du métabolisme de l'acide arachidonique en plus du métabolisme de la phénylalanine et du tryptophane [102]. Le profilage de la sarcosine et des métabolites associés comme biomarqueurs potentiels du cancer de la prostate a été décrit dans l'étude de Soliman *et al.* Dans ce cas il était nécessaire de développer un protocole particulier pour le profilage spécifique de ce groupe de métabolites. L'utilisation de standards a permis l'approximation et la calibration des concentrations endogènes des métabolites d'intérêt dans les échantillons d'urine [103].

1.4.3.7 Cancers de l'oesophage

Un des principaux constats dans les différences métaboliques associées aux cancers de l'oesophage est le changement dans le métabolisme des glucides, suspecté de promouvoir la glycolyse et de perturber le cycle de Krebs. Ceci a particulièrement été observé dans l'étude de Wu *et al.* en 2011, où 20 métabolites avec un carbone central étaient observés de manière significativement différente dans les tissus tumoraux et le tissu contrôle. Et ceci à partir d'une origine similaire dans l'analyse du profil métabolomique, réalisé par

GC – MS [104].

Dans un autre exemple, où la combinaison de différentes techniques analytiques a amélioré la découverte de potentiels biomarqueurs, la *RMN* a été employée avec la *LC – MS* dans l'analyse du métabolisme du cancer de l'œsophage. De potentiels biomarqueurs similaires du métabolisme des glucides ont été mis en évidence par chaque technique. Toutefois, en combinant les métabolites dans les analyses multivariées, 12 métabolites varient constamment chez les patients présentant un cancer de l'œsophage en comparaison avec les groupes « contrôles » de patients. Cette variation était encore augmentée au moment de l'inclusion dans un seul modèle [105].

Plusieurs techniques ont décrit le métabolisme des glucides et le métabolisme du carbone central afin de caractériser le cancer de l'œsophage. Certains métabolites impliqués dans des voies biochimiques ne sont pas mis en évidence à cause du seuil de détection qui doit être renforcé pour une technique donnée.

1.4.3.8 Cancers des poumons

Plusieurs études ont essayé d'utiliser la *RMN HRMAS* pour déterminer le profil métabolique du cancer pulmonaire [106]. Une étude en 2010, a montré la capacité de la *RMN HRMAS* à différencier 24 échantillons de tumeurs et de tissu bénin adjacent, et également à discriminer les différents types de tumeurs. Quand l'*ACP* était appliquée à l'ensemble des spectres (de 0,5 à 8,75 ppm), les tissus les plus tumoraux étaient localisés dans la 1^{ère} composante négative (*PC1*) et tous les tissus adjacents, dans la composante positive *PC1*, montrant une différence dans le profil entre cancer et tissu bénin. En effet, le lactate, la glycérophosphocholine, la phosphocholine, la taurine, la créatine et les lipides sont élevés dans les tumeurs tandis que le glucose, l'acétate et la méthionine sont élevés dans le tissu bénin. Les résultats de la *PLS – DA* montrent une séparation forte entre les adénocarcinomes (n = 4) et les tumeurs carcinoïdes (n = 4), avec une forte corrélation négative pour la glycérophosphocholine, la taurine, l'ascorbate et des signaux inconnus provenant le plus souvent d'oligopeptides [107].

Une étude similaire a confirmé la capacité de la *RMN HRMAS* à différencier le tissu pulmonaire bénin et malin. A travers une *ACP*, Jordan *et al.* ont mis en évidence l'augmentation du lactate, de la phosphocholine et de la glycérophosphocholine dans les tumeurs tandis que la diminution de l'acétate, du myoinositol, du ratio inosine/adénosine

et du glucose était mise en lumière [108]. D'autres études ont essayé de jumeler les profils métabolomiques de tissus provenant de patients présentant un cancer du poumon avec des échantillons de sérum provenant des mêmes patients dans l'espoir de développer un outil de dépistage sanguin plus utile pour de larges populations. Ces essais étaient motivés par le fait que pendant qu'un scanner X peut détecter de petites lésions pulmonaires à un stade précoce du cancer, son coût élevé couplé avec une dose de radiation potentiellement dangereuse pour toutes les populations, en excluant son utilisation en tant qu'outil diagnostique annuel dans le cadre du dépistage du cancer du poumon.

Les profils métabolomiques établis du cancer du poumon, permettent potentiellement de faire un tri pour dépister les patients suspects, avec un scanner X pour la détection précoce du cancer à des stades encore asymptomatiques. Les échantillons de tissus et de sérum associés provenant de 14 patients présentant un carcinome à cellules squameuses ($n = 5$) et d'un adénocarcinome ($n = 9$), ainsi que le sérum provenant de 17 sujet sains pour le groupe contrôle, ont été analysés en utilisant la *RMN HRMAS* suivie d'une analyse histopathologique quantitative [108].

L'*ACP* a été réalisée sur les tissus et les sérums pour 21 régions spectrales identifiées à partir des spectres des tissus. Comme dans les études précédemment décrites, le profilage métabolomique a permis de différencier les carcinomes à cellules squameuses des adénocarcinomes. Les profils du sérum du cancer et des contrôles sains pouvaient être différenciés avec une bonne significativité statistique ($p < 0,0001$). Malgré le faible effectif des échantillons, cette observation appuie fortement les investigations ultérieures et l'utilisation future des profils métabolomiques à partir du sérum en tant qu'outil diagnostic du cancer du poumon avec la possibilité d'améliorer le diagnostic précoce et le traitement des patients.

Des biomarqueurs similaires ont été suggérés dans le cadre du cancer du poumon et d'autres types de cancers. Par exemple, les acides gras, la sphingomyéline et la lysophosphatidylcholine ont été associés avec la progression du cancer du poumon [109]. En fait, ces métabolites ont été reportés avec 100 % de sensibilité et 91 % de spécificité dans la comparaison entre le sérum de patients présentant un cancer du poumon et le sérum provenant de patients constituant le groupe contrôle.

1.4.3.9 Cancers colorectaux

Comme pour d'autres cancers, des marqueurs de la détection précoce ont été mis en évidence dans les cancers colorectaux [110]. Le cancer colorectal présente un taux élevé de guérison lorsqu'il est traité à des stades précoces. La découverte de biomarqueurs pourrait conduire à améliorer le diagnostic et pronostic de plusieurs cancers et offrir la possibilité de prédire l'apparition du cancer de telle manière que dans le futur, le traitement contre le cancer pourrait être plus préventif que curatif.

Piotto *et al.*, en 2009, ont caractérisé le profil métabolomique des cancers colorectaux *via RMN HRMAS*. Par des analyses multivariées, deux types de tissus ont pu être discriminés avec une grande précision. Un niveau plus élevé de taurine, glutamate, aspartate et lactate a pu être retrouvé dans les adénocarcinomes tandis qu'une quantité élevée de myo-inositol et de β -glucose discriminait les tissus sains [111].

Dans une autre étude, Piotto *et al.*, en 2012, ont montré l'intérêt et la possibilité d'une analyse *RMN HRMAS* durant la chirurgie. Il a été montré dans ce travail que la *RMN HRMAS* pouvait aider les chirurgiens à délimiter les limites de l'invasion tumorale avec plus de précision. Les résultats du profil métabolomique étaient en accord avec ceux de l'analyse histopathologique [112]. Dans l'étude de Ritchie *et al.*, la *MS* à transformée de Fourier (*FTICR/MS*) était employée pour mettre en évidence des biomarqueurs. Ensuite, les auteurs ont choisi la *LC/MS* et la *RMN* pour la caractérisation des molécules. L'utilité clinique des biomarqueurs était évaluée pour plusieurs populations indépendantes en utilisant une approche ciblée [113].

Ritchie *et al.* ont noté la découverte d'acides gras à longue chaîne : 446 m/z, 448 m/z et 450 m/z comme étant significativement réduits dans le sérum chez les patients présentant un cancer colorectal en comparaison avec le groupe contrôle. Cela soulève la prédisposition au risque de cancer colorectal en fonction du mode de vie et du régime alimentaire ; les études essaient de faire le lien entre la progression du cancer colorectal et les facteurs de risque qui pourraient l'influencer [113].

Leichtle *et al.*, dans leur étude sur le profilage du sérum, ont utilisé l'ionisation par électrobulbisation (*electrospray ionisation, ESI*) et la *MS* afin de trouver de potentiels biomarqueurs du cancer colorectal. Aucune technique de séparation au préalable n'a été utilisée afin d'évaluer sur le plan quantitatif les concentrations de 26 acides aminés, 11 étaient trouvés comme significativement différents entre le groupe « cancer » et le groupe

« contrôle » [114]. Tous (excepté un) avaient été reportés dans la littérature comme de potentiels biomarqueurs, quelle que soit la technique analytique employée.

L'urine est un biofluide fréquemment analysé dans la recherche de biomarqueurs par différentes approches métabolomiques. Le même groupe a travaillé sur le dépistage de biomarqueurs urinaires du cancer colorectal à une plus grande échelle dans des recherches antérieures [115], [116]. Cheng *et al.* ont montré que le profil métabolique du cancer colorectal comprenait un métabolisme d'hôte microbien intestinal [110]. Cette étude a également montré qu'un panel combiné de citrate, hippurate, p-cresol, 2-aminobutyrate, myristate, putrescine et kynurénate est capable de discriminer le groupe « cancer » du groupe « contrôle ».

Plusieurs techniques analytiques doivent être employées dans la découverte de biomarqueurs au sein de la recherche contre le cancer. En utilisant à la fois la *GC – MS* et l'*UPLC – MS*, appliquées à 64 patients présentant un cancer colorectal et 65 sujets « contrôles ») Qiu *et al.* [115] voulaient savoir si les bio fluides contenaient des biomarqueurs pertinents de la malignité tumorale. Les échantillons de patients présentant un cancer colorectal montraient un taux de pyruvate et de lactate plus élevé que dans le groupe « contrôle » ainsi qu'un niveau de tryptophane, d'uridine et de tyrosine plus faible. Ce qui ressort de cette étude est que la combinaison des techniques analytiques était nécessaire et utile à la caractérisation du métabolisme du cancer colorectal afin d'élargir la gamme de métabolites qui pourrait être détectée et de renforcer la confiance des conclusions tirées des métabolites détectés en utilisant deux techniques analytiques.

1.4.3.10 Cancers de l'estomac

Les biomarqueurs des cancers gastriques peuvent être détectés dans la muqueuse gastrique. Alors, des biomarqueurs fiables qui pourraient être cliniquement significatifs, permettraient d'offrir une précision diagnostique, en ajoutant les résultats métabolomiques à ceux de l'endoscopie et de la biopsie.

Wu *et al.* en 2010, ont utilisé la *GC – MS* afin d'étudier le profil métabolomique de données provenant de la muqueuse gastrique. Ces données comptaient du tissu tumoral et non-tumoral. Ces données ont été traitées par des analyses univariées et multivariées et ont permis de déceler 18 potentiels biomarqueurs dont 5 qui montraient une différence entre les échantillons de tumeurs invasives et non-invasives. Un taux élevé de 1-cystéine

et 1-tyrosine, qui était lié à l'augmentation glycolytique et de ces effets sur le cycle de Krebs, a été trouvé dans les échantillons de tumeurs non-invasives. L'élévation de l'hypoxanthine était attribuée à ses besoins en tant que substrat et source d'azote dans la prolifération cellulaire. Enfin, la diminution du phénanthrérol et de l'acide butanoïque dans les échantillons de tumeurs invasives a été mise en évidence [117].

1.4.3.11 Cancers du foie

Le carcinome hépato cellulaire est une des tumeurs malignes les plus répandues dans le monde et le pronostic des patients présentant ce type de tumeurs est fortement dépendant du stade du cancer [118]. Par conséquent, comme pour beaucoup de cancers, une méthode qui permettrait la détection précoce est d'une importance cruciale. Dans leur étude, Wu *et al.* ont utilisé la *GC – MS* afin de chercher des biomarqueurs prospectifs de ce cancer. Ces biomarqueurs étaient : des acides gras, des acides organiques et inorganiques, des acides aminés, du xylitol, de l'arabinofuranose, de l'hypoxanthine et de l'urée [118].

Une autre étude a été publiée en 2012 par Ressom *et al.* (*LC – MS*), traitait de la caractérisation du carcinome hépato-cellulaire, et de sa progression à partir de la cirrhose hépatique [119]. Une comparaison des niveaux de métabolites dans le sérum était réalisée entre des patients présentant un carcinome hépatocellulaire et des patients formant le groupe « contrôle ». Cette comparaison a permis de mettre en évidence des pics d'intérêt entre les spectres de chaque groupe. Plusieurs potentiels biomarqueurs ont été mis en évidence : la sphingosine-1-phosphate et la lysophosphatidylcholine étaient considérées comme significativement augmentées dans les échantillons provenant de patients présentant un carcinome hépatocellulaire ; tandis que l'acide glycochéno-désoxycholique-3-sulfate, l'acide glycolique, l'acide désoxycholique, l'acide taurocholique et le taurochenodésoxycholate étaient significativement diminués [119]. L'importance de la sphingosine-1-phosphate et la voie biochimique dans laquelle elle est impliquée est un des intérêts actuels dans diverses maladies. Elle est responsable d'une large variété de processus biologiques ; par conséquent, sa dérégulation dans les pathologies est étudiée afin de comprendre la voie, en particulier son potentiel en tant que cible thérapeutique dans le futur [120].

1.4.3.12 Cancers du pancréas

Le cancer du pancréas a été décrit comme étant le cancer avec le plus mauvais pronostic parmi tous les cancers [121], [122]. L'adénocarcinome ductal pancréatique est souvent associé à une prolifération incontrôlée hautement métastatique et résistante aux thérapies [123]. Des marqueurs tumoraux protéiques ont été décrits tels que l'antigène carbohydrate (*CA19 – 9*), une surface cellulaire associée à la mucine qui protège contre les infections associées à des pathogènes (*Mucin1, MUC1*), l'immunoglobuline, molécule d'adhésion cellulaire liée à l'antigène carcinoembryonnaire 1 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, CEACAM1*, glycoprotéine biliaire) et la cytokine 1 inhibitrice du macrophage (*macrophage inhibitory cytokine 1, MIC1*).

Cependant, en utilisant ces marqueurs, l'adénocarcinome ductal du pancréas peut ne pas être distingué de la pancréatite chronique ; en effet, la sensibilité et spécificité posent problème pour leur détection. Dans l'étude de Urayama *et al.*, la *GC – MS*, *LC – MS* et la chromatographie liquide à interaction hydrophile (*hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC*) sont les techniques analytiques utilisées [123]. L'analyse du plasma a été effectuée dans l'espoir de trouver des biomarqueurs de la détection précoce du cancer pancréatique. Les métabolites suivants ont été trouvés significativement différents entre les groupes patients et contrôles : N-méthylalanine, lysine, glutamine, phénylalanine, acide arachidonique, acide tauroursodésoxycholique et de la cholyglycine.

Zhang *et al.* ont également utilisé la *RMN* et trouvé, dans le plasma, des niveaux élevés de glycoprotéine N-acétylée, de diméthylamine, citrate, alanine, glutamate, glutamine, histidine, lysine et valine parmi d'autres ont été décrits comme des potentiels biomarqueurs qui différencient les patients présentant un adénocarcinome pancréatique des patients présentant une pancréatite ou ceux faisant partie du groupe contrôle [121].

En 2007, Fang *et al.* ont choisi d'utiliser la *RMN* comme technique afin de distinguer les échantillons provenant de patients présentant un cancer du pancréas de ceux présentant une pancréatite chronique. Une concentration plus élevée de phosphocholine et de glycérophosphocholine, a été mise en évidence dans les échantillons provenant de patients présentant une pancréatite chronique. Dans cette même population, une concentration plus faible de leucine, isoleucine, valine, lactate et alanine a été détectée. Les tendances inverses ont été observées dans les échantillons provenant de patients présentant un cancer du pancréas. Par ailleurs, un taux de taurine augmenté et de bétaine diminué a été

montré dans échantillons des deux populations [124].

Misra *et al.* ont, en 2008, voulu caractériser les métabolites présents dans différents tissus (pancréas, foie, cerveau) par spectroscopie *RMN HRMAS*. Les échantillons tissulaires de pancréas ($n = 6$) provenaient de patients victimes de traumatismes et ayant subi une intervention chirurgicale. Cette étude avait pour seul but d'identifier le maximum de métabolites avec différentes expériences *1D* et *2D* [125].

En 2010, Nishiumi *et al.* ont détecté 60 métabolites dans le sérum de 21 patients présentant un adénocarcinome pancréatique et de 6 volontaires sains en utilisant la *GC - MS*. Parmi les 60 métabolites, 18 présentaient des variations significatives dans le groupe des patients présentant un cancer du pancréas. L'analyse par *PLS - DA* leur a permis de réussir à faire la discrimination entre les différents stades du cancer, notamment à discriminer les stades III, IVa et IVb [126]. La même année, afin de trouver des biomarqueurs de la détection précoce du cancer du pancréas, la spectroscopie par *RMN* a été employée dans l'analyse de sérum de patients présentant un adénocarcinome pancréatique ($n = 17$) et de sérum de patients du groupe « contrôle » ($n = 23$). Le cancer du pancréas cause une diminution significative du 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalérate, lactate et oxyde de triméthylamine ; il cause également une augmentation de l'isoleucine, des triglycérides, de la leucine et de la créatinine.

En 2012, Napoli *et al.* ont utilisé la spectroscopie *RMN* afin d'étudier les métabolites présents dans les échantillons d'urine provenant de patients présentant un adénocarcinome pancréatique ($n = 33$) et de patients sains constituant le groupe contrôle ($n = 54$). En comparaison avec le groupe contrôle, plusieurs variations de métabolites étaient observées dans le groupe de patients présentant un adénocarcinome pancréatique. L'acéto-acétate, la leucine, le glucose, et la 2-phénylacétamide étaient trouvés en augmentation ; tandis que le citrate, la créatinine, la glycine, l'hippurate, 3-hydroxyisovalérate et la trigonelline affichaient des concentrations diminuées [127].

Leichtle *et al.* ont choisi d'étudier 3 groupes de patients par *MS* : 40 patients présentant un adénocarcinome pancréatique, 40 patients volontaires sains et 23 patients présentant une pancréatite chronique. En se basant sur une approche bio-informatique à 3 classes, les auteurs ont comparé les groupes et évalué leur sélectivité. Plusieurs acides aminés combinés ont montré une sélectivité supérieure quand les métabolites étaient comparés au marqueur tumoral protéique *CA19.9* dans la discrimination entre les trois groupes [128].

He *et al.* en 2013 ont évalué le profil métabolique de souris nues xénotransplantées (cancer pancréatique) par *RMN HRMAS* avant et après radiothérapie. Avant la radiothérapie les concentrations de choline, taurine, alanine, isoleucine, leucine, valine le lactate et glutamate étaient augmentés dans le groupe de souris nues contrôle. Dans ce même groupe et toujours avant la radiothérapie, les concentrations de phosphocholine, glycérophosphocholine et bêtaïne étaient diminuées. Après la radiothérapie, dans les échantillons du groupe de souris « cancer pancréatique » le niveau d'acétate était augmenté. Les niveaux de choline et bêtaïne étaient diminués [129].

Ritchie *et al.* en 2013 ont cherché des biomarqueurs associés au cancer pancréatique en utilisant la *MS* afin de comparer les profils du sérum de patients présentant un cancer du pancréas avec celui de patients volontaires sains [130].

En 2015, Urayama étudiait la possibilité de dépistage précoce du cancer du pancréas en mettant en corrélation les paramètres cliniques et métabolomiques [131].

Yuan *et al.* ont, en 2016, analysé 82 métabolites présents dans le plasma de 484 patients présentant un cancer du pancréas par *LC-MS*. Les auteurs ont trouvé que deux métabolites du cycle de Krebs, l'isocitrate et l'acocinate, étaient statistiquement significativement associés à la survie des patients [132].

Chapitre 2

Objectifs

2.1 Les glandes parathyroïdes

Les objectifs de cette étude étaient :

- d'évaluer si les profils métabolomiques étaient différents entre l'*HPT1* et les *HPT* rénales (*HPT2* et *HPT3*);
- de comparer les pathologies uniglandulaires (*PUG*) avec les pathologies multiglandulaires (*PMG*) chez les patients présentant une *HPT1* en utilisant une analyse métabolomique.

2.2 Les adénocarcinomes du pancréas

Les objectifs de cette étude étaient de :

- définir le métabolome du parenchyme pancréatique;
- définir le métabolome de l'adénocarcinome pancréatique;
- chercher des biomarqueurs métaboliques associés aux patients dits longs-survivants présentant un adénocarcinome pancréatique *via* une analyse métabolomique.

2.3 Tumeurs intracanalaires papillaires mucineuses du pancréas (*TIPMP*)

Les objectifs de cette étude étaient de comparer :

- le profil métabolomique de *TIPMP* non dégénérées en cancer à risque moyen (*RM*) de dégénérescence en cancer avec celui de *TIPMP* dégénérées en cancer;
- le profil métabolomique de *TIPMP* non-dégénérées en cancer à risque fort (*RF*) de dégénérescence en cancer avec celui de *TIPMP* dégénérées en cancer;
- le profil métabolomique de *TIPMP* non dégénérées en cancer en fonction de leur risque de dégénérescence en cancer (*RM vs. RF*).

Chapitre 3

Matériels et méthodes

3.1 Prélèvement et conservation des échantillons

Pour que l'analyse *RMN HRMAS* se déroule dans les meilleures conditions, une rigueur particulière est accordée au prélèvement et à la conservation des échantillons.

3.1.1 Échantillons des glandes parathyroïdes

Les prélèvements tissulaires de glandes parathyroïdes hypersécrétantes ont été réalisés dans le service de chirurgie endocrinienne du Centre Hospitalier Universitaire de la Timone à Marseille ainsi que dans le Service de Chirurgie Endocrinienne du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Brabois à Nancy.

Tous les échantillons ont été collectés pendant la chirurgie et placés dans des cryotubes qui ont été plongés immédiatement dans un container contenant de l'azote liquide (-196°C) afin d'éviter la poursuite des réactions métaboliques au sein de l'échantillon.

En effet, les réactions métaboliques ne pouvant être quantifiées entre le moment du prélèvement de la pièce opératoire et sa congélation, il est nécessaire de raccourcir cette étape au maximum. Ceci permettant d'éviter la poursuite de réactions biochimiques et enzymatiques. Les cryotubes contenant les échantillons biologiques sont conservés dans un congélateur -80°C .

Enfin, les cryotubes contenant le matériel biologique ont été envoyés dans de la carbo-glace à l'Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, dans le Service de Biophysique et de Médecine Nucléaire du Professeur Izzie-Jacques NAMER. Ces derniers, une fois réceptionnés, sont stockés dans un congélateur à -80°C jusqu'à leur préparation.

3.1.2 Échantillons du pancréas

Les prélèvements tissulaires d'adénocarcinomes pancréatiques ont été réalisés dans le Service de Chirurgie Digestive du Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, à l'Hôpital de Hautepierre. L'ensemble du travail concernant les adénocarcinomes pancréatiques est basé sur une analyse expérimentale rétrospective de tissu congelé disponible en tumoro-thèque.

Dans certains cas, l'ischémie était inconnue, donc les échantillons présentant des stigmates spectroscopiques d'une longue souffrance ischémique ont été détectés et exclus de

la population de patients à étudier. La collection, la congélation et la conservation des échantillons sont identiques à la description qui en est faite dans le paragraphe précédent.

3.1.3 Échantillons de *TIPMP*

Les prélèvements du liquide «intra-kystique» des *TIPMP* ont été réalisés à l'Hôpital Jean Minjot au sein du Centre Hospitalier Régional Universitaire (*CHRU*) de Besançon. Une échoendoscopie sous anesthésie générale est réalisée à l'aide d'un échoendoscope linéaire électronique (*GF – UCT180Olympus*©), une analyse détaillée de la glande pancréatique sur son ensemble est faite permettant de localiser le ou les plus volumineux kystes pancréatiques. Une analyse doppler est également faite de façon à ne pas méconnaître des vaisseaux sur le trajet de ponction. En cas de présence de plusieurs lésions kystiques, c'est la plus volumineuse qui a été ponctionnée.

Par ailleurs, la découverte d'une lésion tissulaire suspecte fait l'objet d'une ponction systématique supplémentaire, pour l'anatomopathologie. Lors du prélèvement écho-guidé, une aiguille à ponction (*EUSN3Cook*©), est utilisée, une seringue est placée à l'extrémité en aspiration, cela permet la collecte du liquide jusqu'à affaissement du « kyste ».

Le contenu, si la quantité est suffisante est divisé dans deux tubes : un pour une analyse biochimique (*ACE*), et une partie (1 à 2 ml) dans un cryotube pour l'analyse *RMN HRMAS*. La congélation et la conservation sont identiques à la procédure décrite précédemment. Les échantillons ont été stockés au *CHRU* de Besançon à -80°C .

Ensuite ces derniers ont été transportés dans de la glace carbonique l'Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, dans le Service de Biophysique et de Médecine Nucléaire du Professeur Izzie-Jacques NAMER.

3.2 Préparation des échantillons

Tous les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à leur préparation.

La préparation de chaque échantillon ne prend qu'une à deux minutes. Elle se fait au sein d'un congélateur (-20°C) adapté à nos conditions de travail. Au préalable, nous vérifions la calibration de la balance de précision qui nous permet de peser les échantillons (l'incer-

titude de notre balance étant de 0,1 mg). Une fois cette dernière effectuée, un étalonnage de la balance est réalisé avec des masses respectivement de 5 mg et de 5 g. Ces masses correspondent respectivement à la plus petite masse que nous pouvons analyser et à la masse de l'insert contenant la biopsie le tout placé dans un pilulier en verre pour la pesée. La préparation des échantillons dans un environnement à -20°C (pour les échantillons tissulaires) permet de limiter au maximum la dégradation de l'échantillon biologique durant cette étape.

Pour les échantillons tissulaires, l'échantillon est carotté à l'aide d'un emporte-pièce appelé « punch » (cf. fig.3.1).



FIGURE 3.1 – Préparation d'un échantillon biologique tissulaire pour une analyse métabolomique par spectroscopie *RMN HRMAS*.

Pour les échantillons liquidiens, le liquide intra-kystique a dû être décongelé afin de faciliter le pipetage du matériel à peser. Dans ce cas, l'échantillon est prélevé à l'aide d'une pipette de $20\ \mu\text{L}$ dont l'étalonnage est vérifié une fois par an afin de garantir la fiabilité de la mesure (cf. fig. 3.2).

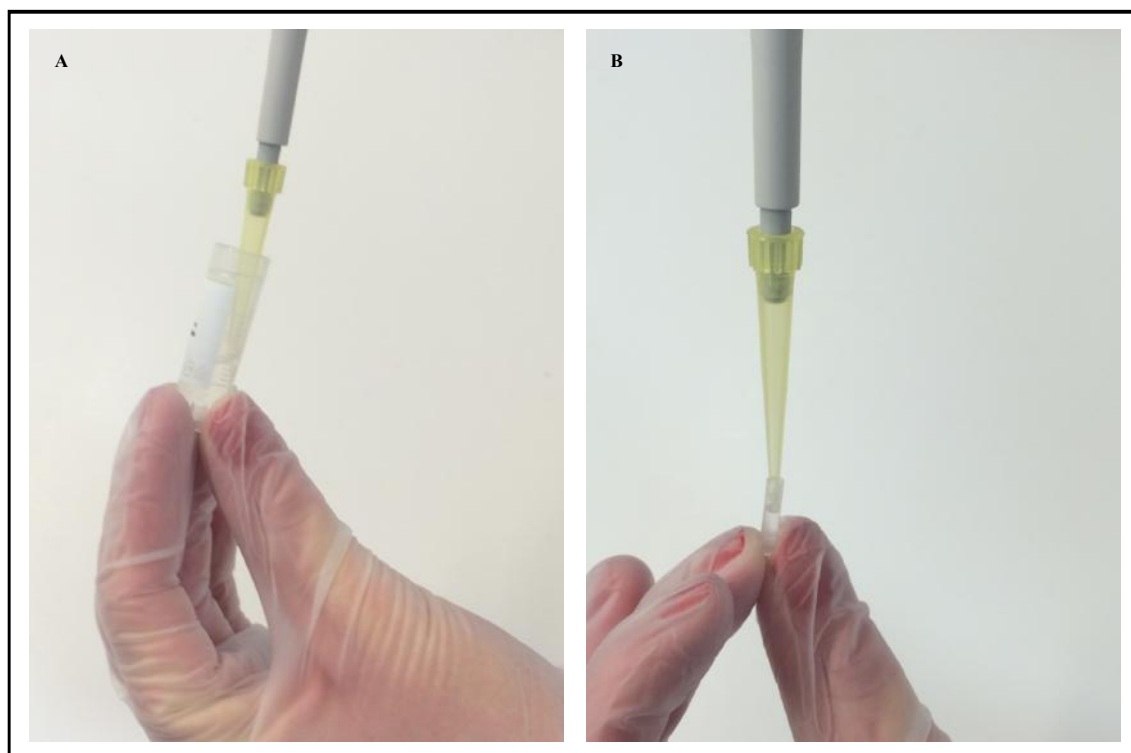


FIGURE 3.2 – Préparation d'un échantillon biologique kystique pour une analyse métabolomique par spectroscopie *RMN HRMAS*.

Puis, sans aucun traitement chimique préalable, l'échantillon tissulaire/liquidien est directement introduit dans un insert de 30 μL en *Kel - F* (polychlorotrifluoroéthylène). L'insert est ensuite pesé afin de déterminer la masse du matériel biologique prélevé qui est dans cette étude comprise entre 6 et 20 mg pour les échantillons tissulaires et, entre 19 et 20 mg pour les échantillons liquidiens. Cette étape est cruciale car la normalisation des spectres nécessite la prise en compte de cette masse. L'insert, une fois pesé, est complété par 8 μL de D_2O afin de disposer d'un signal d'asservissement en *RMN* appelé « *lock* » et est fermé par un bouchon (cf. fig.3.3). L'insert est ensuite placé dans un eppendorf de 1,5 mL et est stocké à -80°C jusqu'à l'analyse *RMN HRMAS*.

3.3 Analyse *RMN HRMAS*

3.3.1 Équipement

Dans le cadre de ce travail de recherche, l'ensemble des spectres 1D et 2D ont été enregistrés sur le spectromètre Bruker Avance III 500 opérant à la fréquence 500,13 MHz pour les noyaux ^1H . Le spectromètre est installé depuis 2008 dans le Service d'Anatomie Pa-



FIGURE 3.3 – Dispositif *HRMAS* nécessaire à la préparation des échantillons biologiques. Insert jetable de 30 μL contenant une biopsie ainsi que son bouchon.

thologique de l'Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (cf. fig.3.4).

Ce spectromètre est équipé d'une sonde de 4 mm à triple résonance (^1H , ^{13}C , ^{31}P) avec un canal deutérium (^2H) utilisé comme signal de verrouillage du « *lock* » nécessaire à compenser la dérive du champ magnétique principal. La sonde *HRMAS* est constituée d'une partie connectique et de la tête de mesure intégrant le stator et les antennes d'émission-réception (cf. fig.3.5).

La sonde possède également une bobine de gradient dont l'axe principal est parallèle à l'axe du stator. La sonde est couplée à un système pneumatique qui permet de faire basculer le stator, d'entraîner et d'éjecter le rotor. Afin de limiter la dégradation de l'échantillon lors de l'analyse métabolomique par *RMN HRMAS*, le spectromètre est équipé d'une unité de refroidissement (*Bruker Cooling Unit, BCU*). La température de l'échantillon est maintenue relativement constante grâce à un flux d'air asséché. L'enregistrement du signal

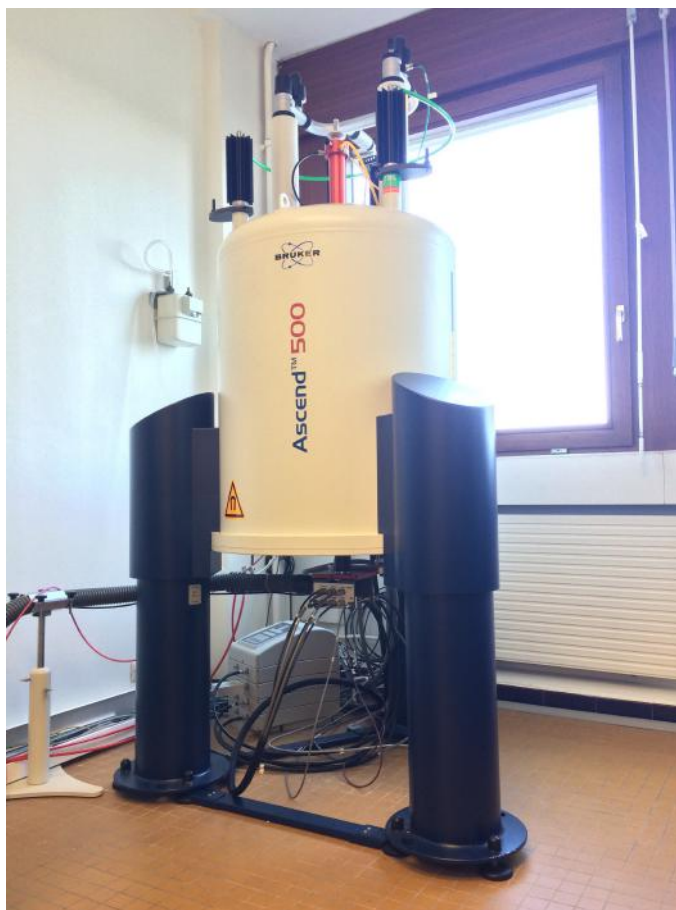


FIGURE 3.4 – Spectromètre Bruker Avance III 500 utilisé pour l’acquisition de l’ensemble des spectres *RMN HRMAS* de cette thèse.

RMN se fait à une vitesse de rotation de 3500 Hz afin de maintenir les bandes latérales de rotation hors de la fenêtre spectrale. La vitesse de rotation entraîne une augmentation de la température intrinsèque de l’échantillon de 1°C/kHz. Ceci nous garantissant donc une température réelle pendant l’enregistrement des spectres de 3 à 4°C. La vitesse de rotation ne semble pas entraîner de détérioration majeure du tissu. Nous avons, à ce titre, effectué plusieurs tests sur différents organes à des vitesses de rotation différentes : basse vitesse (600 Hz) *vs.* haute vitesse (3500 Hz) (cf. fig.3.6).

La seule différence entre les deux vitesses est qu’à 3500 Hz le tissu est mécaniquement plus repoussé vers les parois de l’insert par la force centrifuge créant ainsi un vide plus important. En effet, malgré la contrainte mécanique de la rotation, le tissu est toujours morphologiquement reconnaissable par l’anatomopathologiste quelle que soit la vitesse de rotation.

La durée prolongée de l’acquisition (cf. 2D, 15h) est responsable d’une dégradation bio-

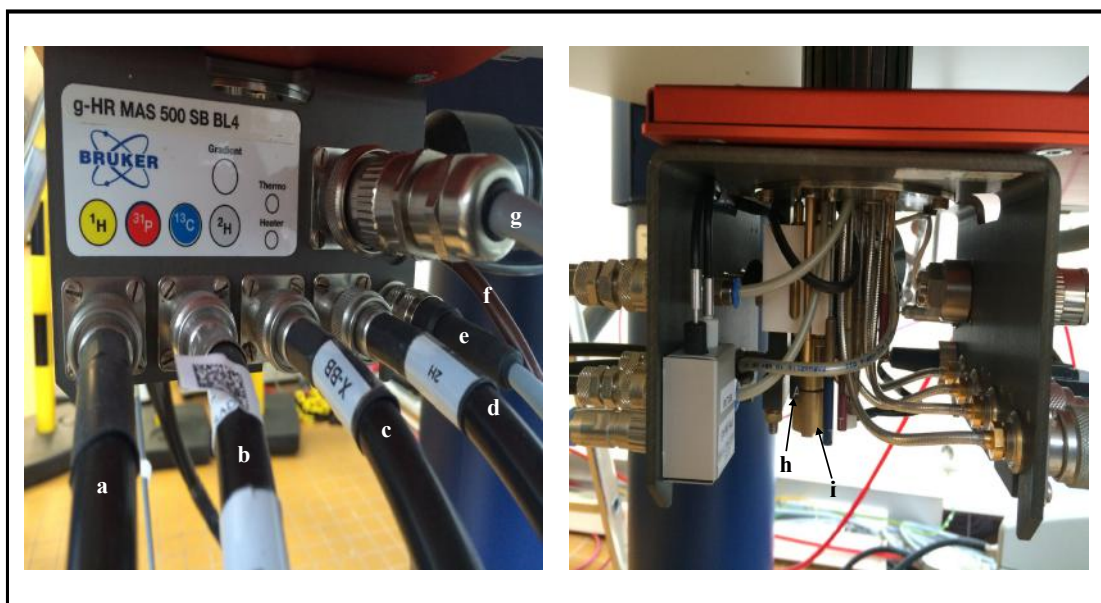


FIGURE 3.5 – Connectique de la sonde *HRMAS* : (a) canal proton 1H , (b) canal phosphore ^{31}P , (c) canal carbone ^{13}C , (d) canal deutérium 2H , (e) système de chauffage, (f) thermocouple (mesure de la température), (g) gradient, (h) réglage de l'angle magique, (i) réglage des antennes *RF*.

600 Hz

3500 Hz

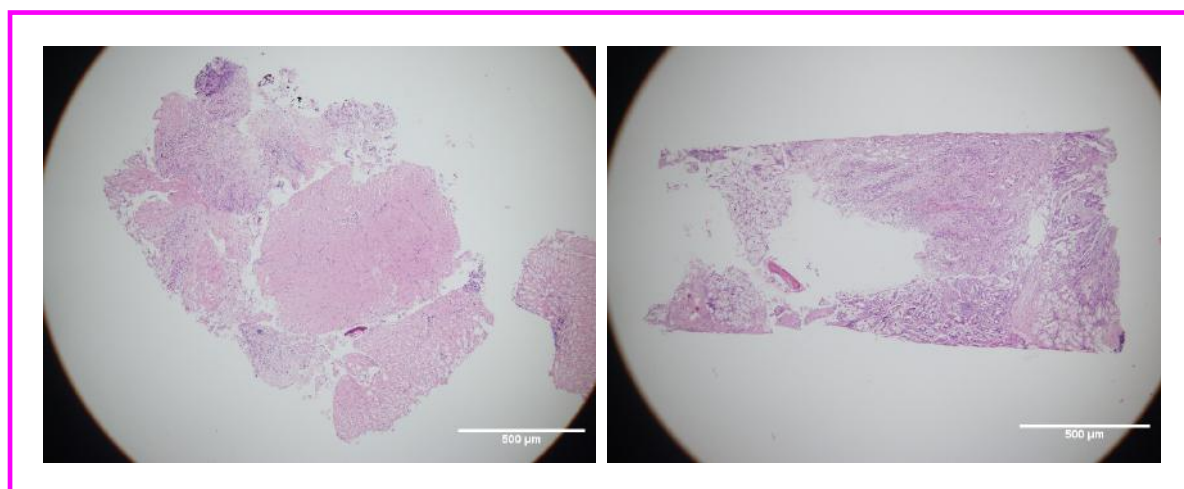


FIGURE 3.6 – Test basse rotation : coupes histologiques d'échantillons provenant d'un adénocarcinome pancréatique, ayant tourné à deux vitesses de rotation : (1) 600 Hz (à gauche sur la figure) (2) 3500 Hz (à droite sur la figure). Coloration Hématoxyline-Eosine, Échelle 500 μm . Images calibrées avec le logiciel ImageJ [3].

logique de l'échantillon au cours du temps. Ce phénomène se vérifie lors des expériences en deux dimensions. Ainsi, l'acquisition des spectres *2D* dans le cadre de ce travail de recherche n'a été faite que dans le but d'obtenir une identification complète des métabolites détectés et non à titre quantitatif. Elle n'a d'ailleurs été effectuée que pour un échantillon représentatif d'un sous-groupe. Sur la figure.3.7, est représenté le dispositif *RMN*

HRMAS utilisé pour la préparation des différents échantillons étudiés et leur mise en place à l'aide de cette technique.

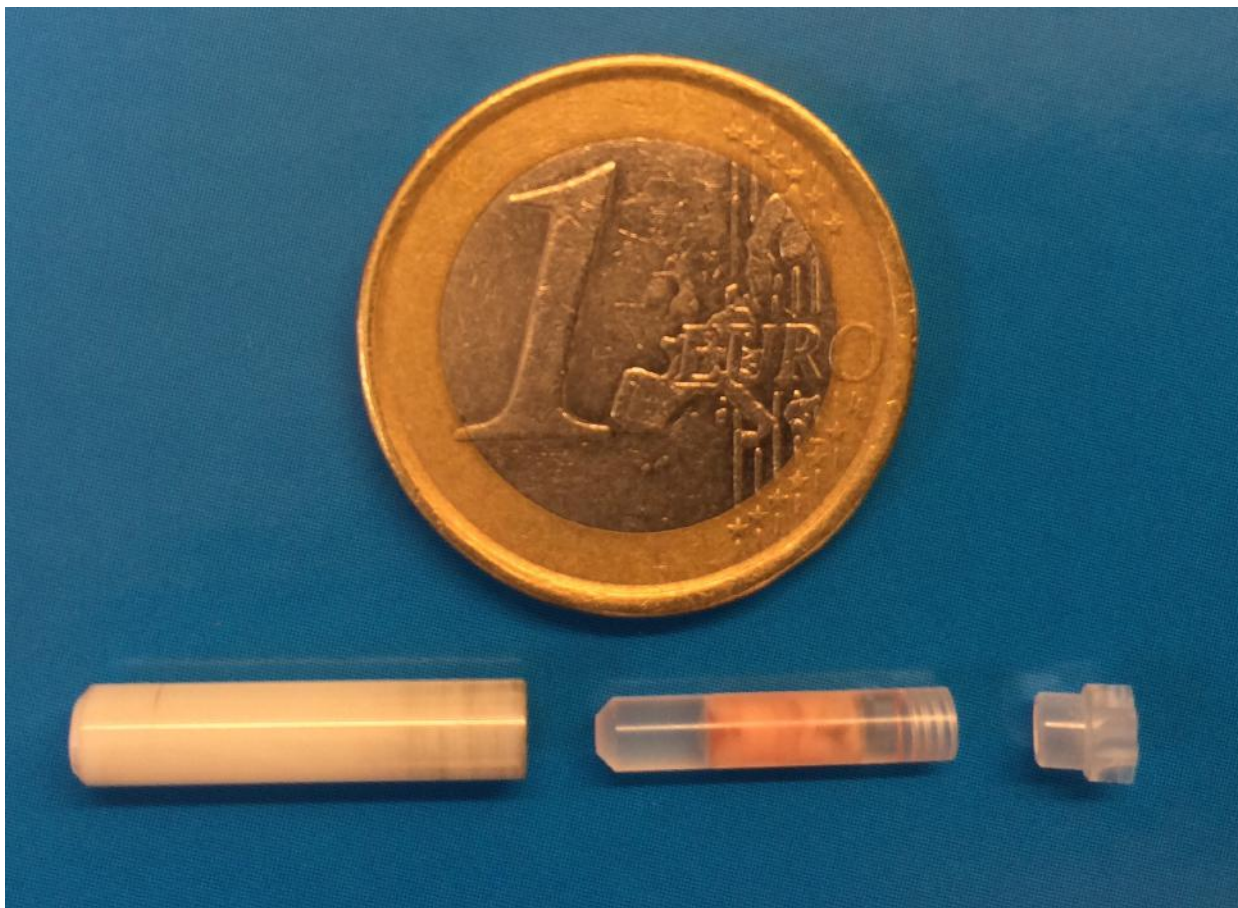


FIGURE 3.7 – Dispositif *RMN HRMAS* nécessaire à la préparation et à l'analyse des échantillons biologiques. De gauche à droite : le rotor, l'insert jetable de 30 μL contenant une biopsie ainsi que son bouchon et, le bouchon à ailettes du rotor.

3.3.2 Séquences d'impulsion utilisées

Maintenant que le prélèvement et la préparation des échantillons ont été décrits, les différentes séquences d'impulsion utilisées vont être détaillées. Avant de commencer l'analyse *RMN HRMAS*, l'insert est introduit dans un rotor de 4 mm en zirconium (Zr_2O_2) et ce dernier est fermé par un bouchon à ailettes faisant office de turbine.

3.3.2.1 Expérience 1D

3.3.2.1.1 CPMG La séquence d'impulsion utilisée dans le cadre de ces travaux de thèse est la séquence développée par Carr-Purcell-Meiboom-Gill (*CPMG*) [133], [134]. Cette dernière est basée sur une succession d'échos de spins. La *CPMG* est une des séquences les plus utilisées pour étudier la métabolomique par spectroscopie *RMN HRMAS*. En effet, cette séquence permet tout d'abord de supprimer les signaux larges correspondants aux macromolécules. Ensuite, la *CPMG* a l'avantage de corriger les imperfections de l'impulsion à 180° . Ainsi, cette correction permet d'obtenir des spectres phasés. La *CPMG* est représentée figure 3.8.

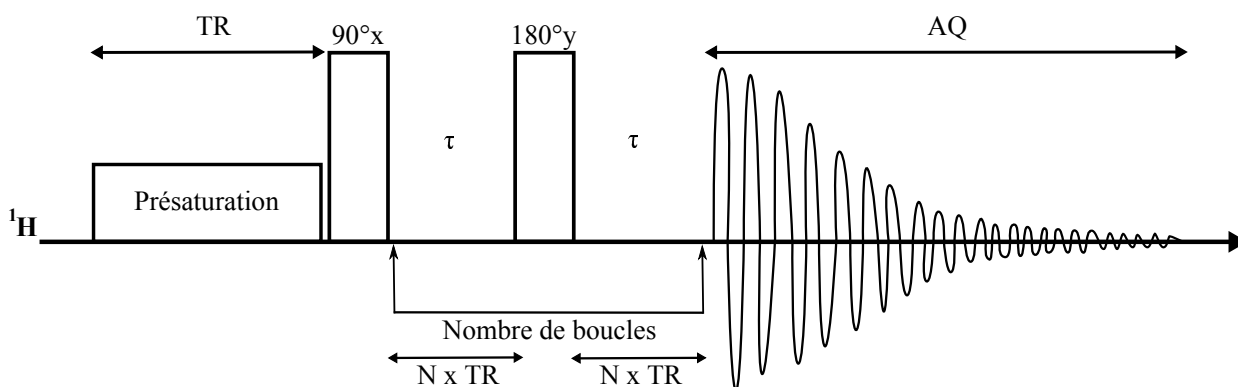


FIGURE 3.8 – Séquence d'impulsion *CPMG* avec une présaturation du signal de l'eau pendant le temps de répétition synchronisé sur la période du rotor. Le temps d'écho total pour l'ensemble des acquisitions a été fixé à 93 ms ($\tau = 285 \mu\text{s}$ et nombre de boucles ($L4$) = 328) [4].

Cette séquence est tout d'abord constituée par une pré-saturation du signal de l'eau pendant le temps de répétition TR suivie d'une impulsion de 90° afin de basculer l'aimantation dans le plan transversal. Elle est ensuite constituée d'un écho de spin τ - 180° - τ qui permet de refocaliser les aimantations à l'issue de celui-ci. L'écho de spins permet de refocaliser les déplacements chimiques tout en permettant à la relaxation transversale de s'établir pendant cette période.

La valeur du délai τ est fixée en tenant compte de deux paramètres. Pour commencer ce délai doit être réglé de telle manière que $\frac{1}{\tau} \gg J$ (constante de couplage) afin de minimiser la distorsion de phase introduite par le couplage scalaire pendant l'expérience. Ensuite,

ce délai doit être synchronisé avec la vitesse de rotation de l'échantillon :

$$\tau = N \times TR = \frac{1}{\omega} = 285 \mu s$$

Cette synchronisation permet aux imperfections des impulsions (B_1) appliquées d'être ressenties toujours de la même manière par l'échantillon biologique.

Le principal intérêt de cette séquence est de pouvoir atténuer voire supprimer les signaux correspondant aux macromolécules. Ceci, en se basant sur la différence de temps de relaxation transversale entre les macromolécules et les métabolites.

Le principe consiste à fixer un temps d'écho total ($\tau_{echo} = 2 \times \tau \times L4$) suffisamment long pour qu'un maximum de macromolécules relaxent (retournent à l'équilibre), mais suffisamment court pour que les signaux correspondant aux métabolites ne soient pas trop atténués. Le temps d'écho total a ainsi été fixé pour les études réalisées par *RMN HRMAS* à 93 ms ($\tau = 285 \mu s$ et $L4 = 328$). Ce temps d'écho de 93 ms correspond à un compromis entre l'atténuation des signaux provenant des lipides et l'obtention d'un spectre avec un rapport signal/bruit correct en 10 minutes de temps pour un échantillon de biopsie dont la masse est comprise entre 6 et 20 mg. Il est possible de faire varier ce délai inter-pulsion en fonction des signaux larges que nous voulons éliminer. La *CPMG* peut ainsi être considérée comme une «filtre macromoléculaire».

Pour résumer, le principe de cette séquence est de retarder l'acquisition du signal du système après l'avoir laissé relaxer. Ainsi les signaux des plus grosses molécules (macromolécules) sont éliminés. Les expériences 1H *RMN HRMAS CPMG* sur des échantillons tissulaires provenant de glandes parathyroïdes pathologiques et d'adénocarcinomes pancréatiques ont été enregistrées avec les paramètres d'acquisition suivants :

- échantillonnage : 32768 ;
- fenêtre spectrale (ppm) : 14,0019 ;
- temps d'acquisition (s) : 2,33 ;
- gain du receveur : 128 ;
- délai de relaxation (s) : 2 ;
- temps d'écho (ms) : 93 ;
- nombre de boucles *CPMG* : 328 ;
- nombre de scans fictifs : 4 ;

- nombre de scans : 128 ;
- durée d'impulsion 1H 90° (μs) : 7,95 ;
- vitesse de rotation (Hz) : 3500 ;
- champ RF présaturation (Hz) : 20.

d'où un temps d'acquisition de 2,33s/scan, ce qui correspond à une durée d'acquisition de chaque spectre de 10 min.

Les expériences 1H RMN $HRMAS$ $CPMG$ sur des échantillons de liquide intra-kystique provenant de $TIPMP$ ont été enregistrées avec les paramètres d'acquisition suivants :

- échantillonnage : 32768 ;
- fenêtre spectrale (ppm) : 14,0019 ;
- temps d'acquisition (s) : 2,33 ;
- gain du receveur : 128 ;
- délai de relaxation (s) : 2 ;
- temps d'écho (ms) : 93 ;
- nombre de boucles $CPMG$: 328 ;
- nombre de scans fictifs : 4 ;
- nombre de scans : 1024 ;
- durée d'impulsion 1H 90° (μs) : 10,15 ;
- vitesse de rotation (Hz) : 3500 ;
- champ RF présaturation (Hz) : 20.

d'où un temps d'acquisition de 2,33s/scan, ce qui correspond à une durée d'acquisition de chaque spectre de 75 min.

Les déplacements chimiques de spectres sont référencés par rapport au pic de gauche du doublet du lactate (groupement CH , doublet) situé à 1,33 ppm (cf. fig.3.9).

Sur un spectre $1D$ enregistré avec une $CPMG$, chaque pic est équivalent à un certain nombre de protons. Pour interpréter un spectre il faut prendre en compte trois éléments :

- le déplacement chimique ;
- la multiplicité du pic ;

— l'intégrale du pic.

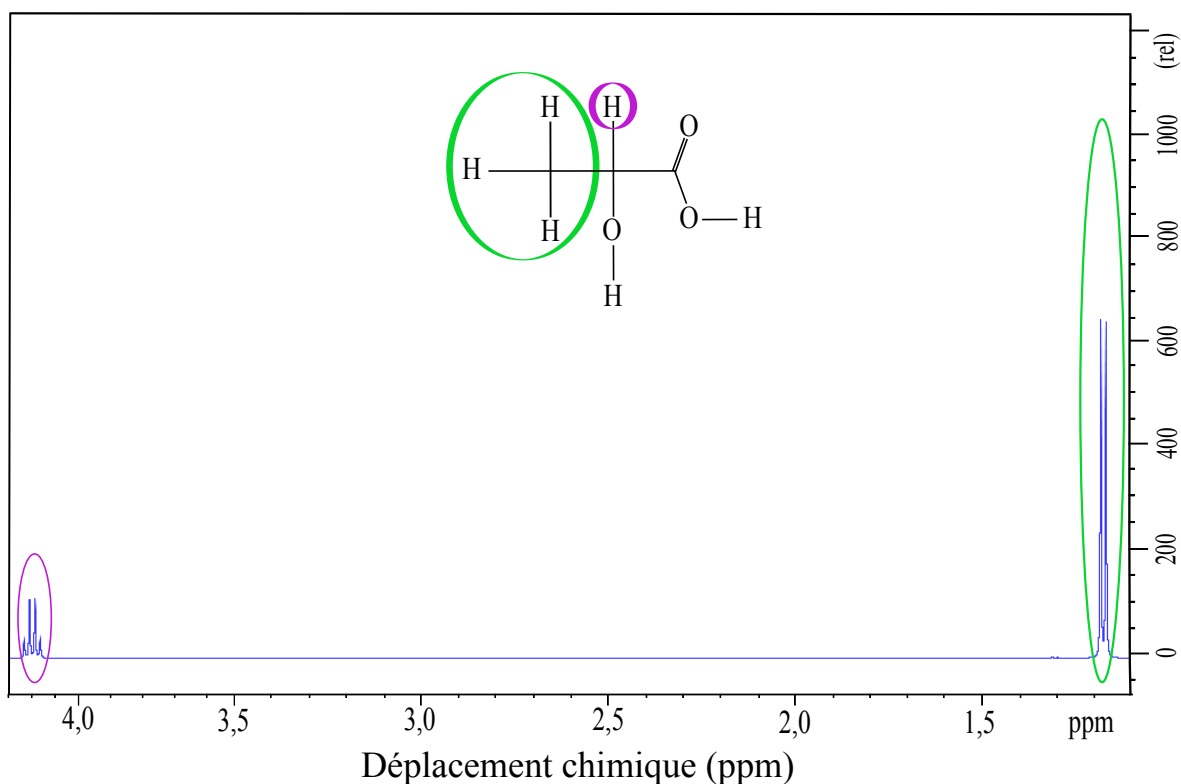


FIGURE 3.9 – Spectre 500 MHz ^1H CPMG HRMAS enregistré sur une molécule pure de lactate de sodium (la concentration étant de 2,7 mM).

Le **déplacement chimique** permet de déterminer la position relative des fréquences d'absorption des protons. Elles s'expriment en ppm (parties par million) et sont lues sur l'axe des abscisses. Le déplacement chimique varie en fonction de l'environnement chimique dans lequel réside le proton considéré. Il faut également noter que plus l'électronégativité des atomes voisins du proton est grande, plus il est déblindé (on dit qu'il résonne à « champ faible ») et son pic sera situé sur la partie gauche du spectre. Inversement, plus l'électronégativité est petite, plus il est blindé (on dit qu'il résonne à « champ fort ») et sera situé sur la partie droite du spectre. Ainsi, sur la figure 3.9, le groupement CH_3 entouré en vert est déblindé il a donc un plus petit déplacement chimique que le CH entouré en violet. En effet, le groupement CH est proche de la fonction acide $\text{C} = \text{O}-\text{OH}$.

La **multiplicité du pic** est le deuxième paramètre nécessaire à l'interprétation spectrale. Un proton peut « voir » d'autres protons. On dit alors qu'ils sont couplés. Sur la

figure 3.9 le CH entouré en vert a comme proche voisin un hydrogène entouré en violet. Ainsi, le signal correspondra à un doublet. Le CH entouré en violet a comme proche voisin trois hydrogènes ainsi le signal correspondra à un quadruplet.

Les **intégrales des pics** sont le dernier paramètre à considérer. L'aire sous le signal de résonance est appelé intégrale. Cette dernière est proportionnelle au nombre de protons responsables de ce signal. Pour chaque molécule le ratio aire du pic/nombre de protons est différent. Il faut donc avoir pour chaque spectre un pic de référence dont on connaît le nombre de proton. Dans le cadre de cette thèse, le spectre de référence est celui du lactate de sodium enregistré dans les mêmes conditions analytiques que les spectres d'échantillons biologiques. La concentration de cet insert référence de lactate de sodium est de 125 mM pour un nombre de moles égal à 3 μM .

Dans une biopsie, il y a plusieurs métabolites qui ont un ou plusieurs pic(s), de différentes multiplicités, et qui parfois présentent un recouvrement des signaux, ce qui complexifie le spectre. Cette complexité démontre l'intérêt d'enregistrer un spectre en $2D$.

3.3.2.2 Expérience $2D$

Afin de procéder à une identification précise des métabolites, plusieurs expériences $2D$ peuvent être réalisées. Dans le cadre de ce travail, l'expérience hétéronucléaire « *Heteronuclear Single Quantum Correlation* » ($HSQC$) a été utilisée.

3.3.2.2.1 $HSQC$ Une expérience $2D$ très largement utilisée pour obtenir une identification complète des métabolites détectés en $RMN\ HRMAS$ est l'expérience $HSQC$ [135]. Une $HSQC$ corrèle les déplacements chimiques des 1H et des ^{13}C directement liés. Au cours de l' $HSQC$, les transferts d'aimantation sont réalisés à l'aide de séquences *Intensive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer* ($INEPT$) et l'aimantation de l'hétéro noyau évolue dans un état simple quantum pendant la période d'évolution t_1 .

Les séquences $HSQC$ sont le plus souvent acquises en détection inverse. Ceci consiste à obtenir dans la dimension F1 (indirecte) les paramètres RMN (déplacement chimique, couplage...) d'un noyau peu sensible et de détecter le signal d'un noyau plus sensible grâce à un transfert d'aimantation (cf. fig.3.10).

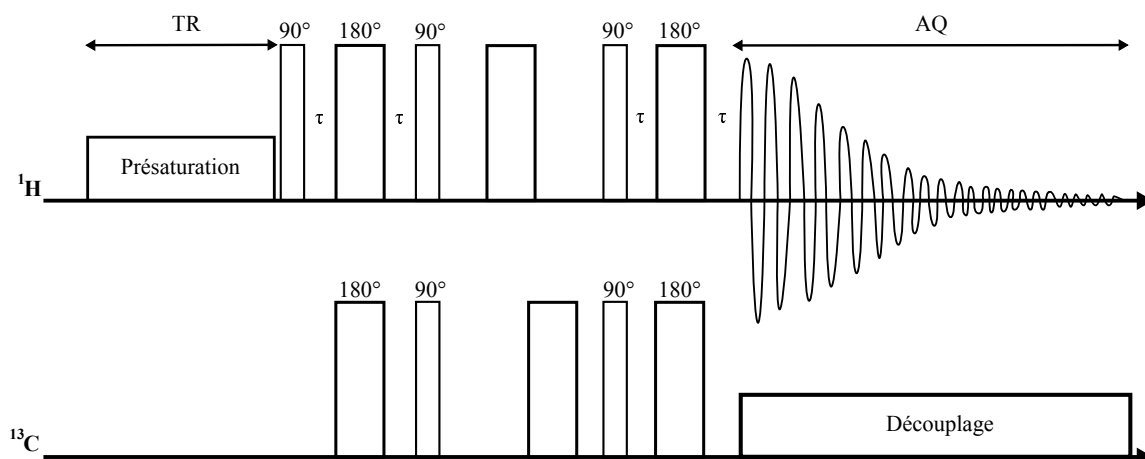


FIGURE 3.10 – Séquence d'impulsion *HSQC* utilisée avec une présaturation du signal de l'eau et utilisation de gradients afin de mettre en évidence les corrélations hétéronucléaires 1H - ^{13}C . Ces corrélations permettent l'identification précise et complète des composés.

Le transfert de polarisation permet un gain de sensibilité. Ce gain permet d'obtenir un spectre équivalent en rapport signal/bruit à un spectre acquis en détection directe mais avec un nombre d'accumulations bien inférieur. Toutefois, il est nécessaire d'échantillonner une gamme de fréquences plus large dans la dimension $F1$ que dans le cas d'une détection directe (6 kHz pour le proton contre 30 kHz pour le carbone).

C'est une expérience qui présente l'avantage de nous fournir une double information grâce à la corrélation 1H - ^{13}C . En effet, les signaux *RMN* du proton en dimension horizontale ($F2$) et du carbone en dimension verticale ($F1$) sont combinés en une seule et même analyse (cf. fig.3.11).

Ainsi, nous obtenons avec certitude l'identification des métabolites grâce à cette double information. Il faut néanmoins rappeler que cette analyse n'est effectuée qu'à titre qualitatif de par sa durée. En effet, une analyse de ce type dure 15 heures. Ceci étant dû à la fois à la sensibilité plus faible du ^{13}C (1,59 %) et à sa plus faible abondance naturelle (1,1 %) en comparaison avec l'hydrogène. Les paramètres d'acquisition utilisés pour l'enregistrement des spectres *2D HSQC* 1H - ^{13}C sont renseignés ci-dessous :

- mode d'acquisition en $F1$: Echo-Anti Echo ;
- échantillonnage $F2$: 1024 ;
- nombre d'incrément : 256 ;
- temps de l'incrément (μs) : 48 ;
- fenêtre spectrale 1H (ppm) : 14,0019 ;
- fenêtre spectrale ^{13}C (ppm) : 165,6500 ;

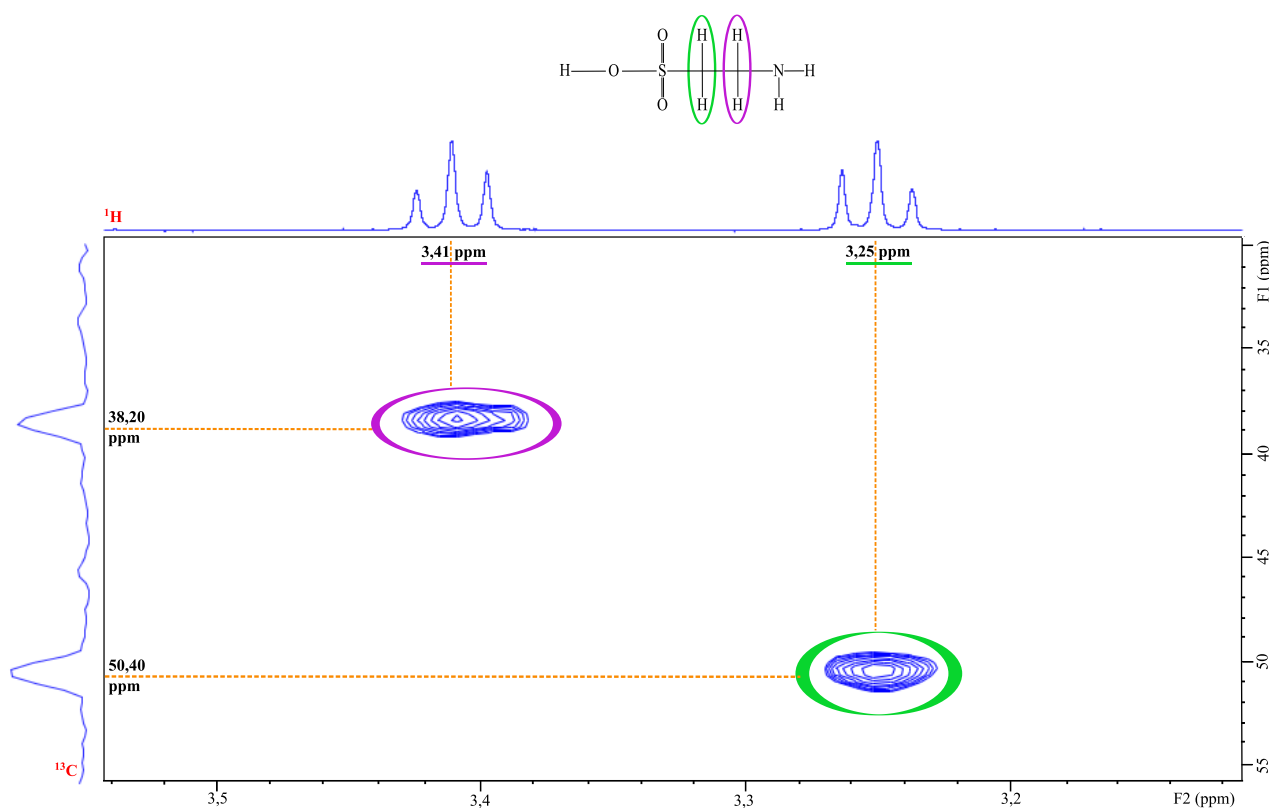


FIGURE 3.11 – Spectre *RMN HRMAS* 500 MHz *HSQC* ^1H - ^{13}C enregistré sur une solution de taurine (la concentration étant de 1,9 mM).

- temps d'acquisition F2 (s) : 0,07 ;
- gain du receveur : 128 ;
- délai de relaxation (s) : 1,50 ;
- temps de l'incrément (μs) : 24 ;
- nombre de scans fictifs : 16 ;
- nombre de scans : 136 ;
- durée d'impulsion ^1H 90° (μs) : 7,95 ;
- découplage : *GARP* – 4 ;
- constante J (*CH*) (Hz) : 145.

d'où une durée d'acquisition de chaque spectre d'environ 16 h.

Les métabolites qui ont pu être identifiés de façon précise et complète sont listés dans le tableau ci-dessous. Les numéros notés sur les figures de spectres *RMN HRMAS* en Chapitre 4 (4.3, 4.10, 4.11, 4.15 et 4.19) se réfèrent au tableau 3.1 :

Nb	Métabolites	Groupements	Dplct. chimique 1H (ppm)	Dplct. chimique ^{13}C (ppm)
1	3hydroxybutyrate	CH_3	1,20	24,35
2	Acétate	CH_3	1,91	25,90
3	Acides gras (a)	$(1)CH_2$	1,30	32,16
4	Acides gras (b)	CH_2	2,80	28,50
5	Acides gras (c)	$(1)CH_2$	2,26	36,60
6	Alanine	βCH_3	1,48	18,87
7	Arginine	γCH_2	1,65	25,90
		βCH_2	1,92	30,13
		δCH_2	3,22	43,23
8	Ascorbate	$CH - O$	4,52	80,87
9	Asparagine	$\beta CH_2(d)$	2,84	36,98
		$\beta CH_2(u)$	2,94	37,15
		$\alpha CH - NH_2$	3,99	53,72
10	Aspartate	$\beta CH_2(u)$	2,67	38,97
		$\beta CH_2(d)$	2,78	39,20
		$\alpha CH - NH_2$	3,90	54,68
11	Bétaïne	$(CH_3)_3$	3,28	56,09
		CH_2	3,91	68,72
12	Citrate	CH_2	2,54	48,73
		CH_2	2,65	48,73
13	Choline	$N^+ - (CH_3)_3$	3,23	56,48
		βCH_2	3,52	69,98
		αCH	4,06	58,36
14	Créatine	CH_3	3,03	39,56
		CH_2	3,93	56,35
15	Éthanolamine	$CH_2 - NH_2$	3,13	43,90
16	Fumarate	$CH = CH$	6,54	137,00
17	Sérine	γCH_2	3,97	62,90
18	Glutamate	βCH_2	2,08	29,67

		γCH_2	2,35	35,96
19	Glutamine	αCH	3,77	57,23
20	Glutathion	$CH_2 - CO - NH$	2,55	33,96
		$CH_2 - SH$	2,95	28,33
		$CH - NH_2$	3,78	46,04
		CH	4,58	58,44
21	Glycérol	$CH_2 - OH(d2X)$	3,55	65,03
		$CH_2 - OH(u2X)$	3,64	65,07
		$CH - OH$	3,77	74,69
22	Glycérophosphocholine	$N^+ - (CH_3)_3$	3,21	56,51
		βCH_2	3,69	68,47
		$CH_2 - HPO_4(d)$	3,87	69,20
		$CH_2 - OH$	3,91	73,29
		$CH_2 - HPO_4(u)$	3,94	69,20
		αCH_2	4,33	62,13
23	Glycine	αCH_2	3,55	43,73
24	Glycogène	$CH - OH$	3,60	73,96
		$CH - OH$	3,78	63,30
		$CH - OH$	5,43	102,00
25	Hypotaaurine	$CH_2 - S$	2,65	58,46
		$CH_2 - N$	3,34	36,12
26	Isobutyryl-L-carnitine	CH_3	1,14	20,56
27	Isoleucine	δCH_3	0,92	13,57
		γCH_3	0,99	17,27
		γCH_2	1,46	26,68
		βCH	1,96	37,98
		$\delta CH - NH_2$	3,65	60,76
28	Lactate	CH_3	1,33	22,69
		CH	4,12	71,17
29	Leucine	δCH_3	0,96	23,43
		βCH_2	1,71	42,43
		$\alpha CH - NH_2$	3,73	55,92

30	Lysine	δCH_2	1,73	29,17
		βCH_2	1,90	32,48
		$\gamma CH_2(d)$	1,91	30,25
31	Méthionine	$CH_3 - S$	2,12	16,48
		βCH_2	2,17	32,19
		γCH_2	2,63	31,35
		αCH	3,85	56,33
32	Myoinositol	$(CH)_2$	3,54	73,81
		$(CH)_2$	3,63	75,11
		CH	4,05	74,79
33	Ornithine	γCH_2	1,74	25,52
		βCH_2	1,93	30,28
		$\delta CH_2 - NH_2$	3,05	41,83
		$\alpha CH - NH_2$	3,77	57,05
34	Phénylalanine	<i>ortho</i> - CH	7,32	132,00
		<i>para</i> - CH	7,37	131,91
		<i>mé</i> ta- CH	7,42	137,82
35	Phosphocréatine	CH_3	3,03	39,25
		CH_2	3,93	56,37
36	Phosphocholine	βCH_2	3,61	68,90
		αCH	4,18	60,81
37	Scyllo-inositol	$CH(X6)$	3,35	77,20
38	Sérine	γCH_2	3,97	62,90
39	Succinate	$(CH_2)_2$	2,41	36,85
40	Taurine	$CH_2 - NH_3^+$	3,26	50,22
		$CH_2 - SO_3^-$		
41	Thréonine	CH_3	1,32	22,16
		$CH - NH_2$	3,57	64,06
		$CH - OH$	4,24	68,75
42	Tryptophane	<i>mé</i> ta- CH	7,54	114,18
		<i>ortho</i> - CH	7,74	121,26

		<i>para - CH</i>	6,89	118,72
43	Tyrosine	méta-CH	6,89	118,72
		<i>ortho - CH</i>	7,18	133,22
44	Valine	$\gamma'CH_3$	1,04	20,44
		$\alpha CH - NH_2$	3,60	63,05
45	α -glucose	méta-CH	3,39	72,19
		méta-CH	3,52	73,92
		<i>para - CH</i>	3,70	75,20
		CH_2	3,81	63,20
		<i>ortho - CH</i>	3,84	74,14
		<i>ortho - CH - OH</i>	5,23	94,63
46	β -glucose	méta-CH	3,39	72,19
		<i>ortho - CH</i>	3,46	78,46
		$CH_2(u)$	3,74	63,35
		$CH_2(d)$	3,90	63,35
		<i>ortho - CH - CH</i>	4,64	98,58

TABLE 3.1: Identification des métabolites dans les échantillons examinés lors de ce travail de thèse. Dplct : déplacement. Dans le chapitre 4, les numéros figurant sur les spectres, dans le but de pointer les métabolites détectés, correspondent à ceux notés dans cette table. Chaque pic dans les spectres 2D représente une corrélation $^1H - ^{13}C$.

3.3.3 Pré-traitement des spectres

3.3.3.1 Étapes préalables

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il a été fait notamment usage d'analyses statistiques multivariées. Ce type d'analyse permet de mettre en évidence des corrélations (ou des différences) entre les échantillons analysés. Ces analyses multivariées s'imposent lorsque le nombre de variables/individus devient trop important et/ou lorsque les différences entre les individus sont faibles. Toutefois, ces méthodes statistiques sont très

sensibles au traitement préalable des données à leur analyse statistique. Effectivement, afin de pouvoir conclure quand à une similarité (ou une différence) qui serait mise en évidence par ce type d'analyses et afin d'éviter de biaiser les futures analyses statistiques, il est impératif d'effectuer un pré-traitement rigoureux de tous les spectres *RMN* basé sur le même protocole.

La première étape consiste à phaser de manière très pointue tous les pics. La correction de la phase permet à tous les pics d'être en parfaite absorption. Les résultats avant et après correction de la phase du doublet du lactate à 1,33 ppm sont visibles figure.3.12.

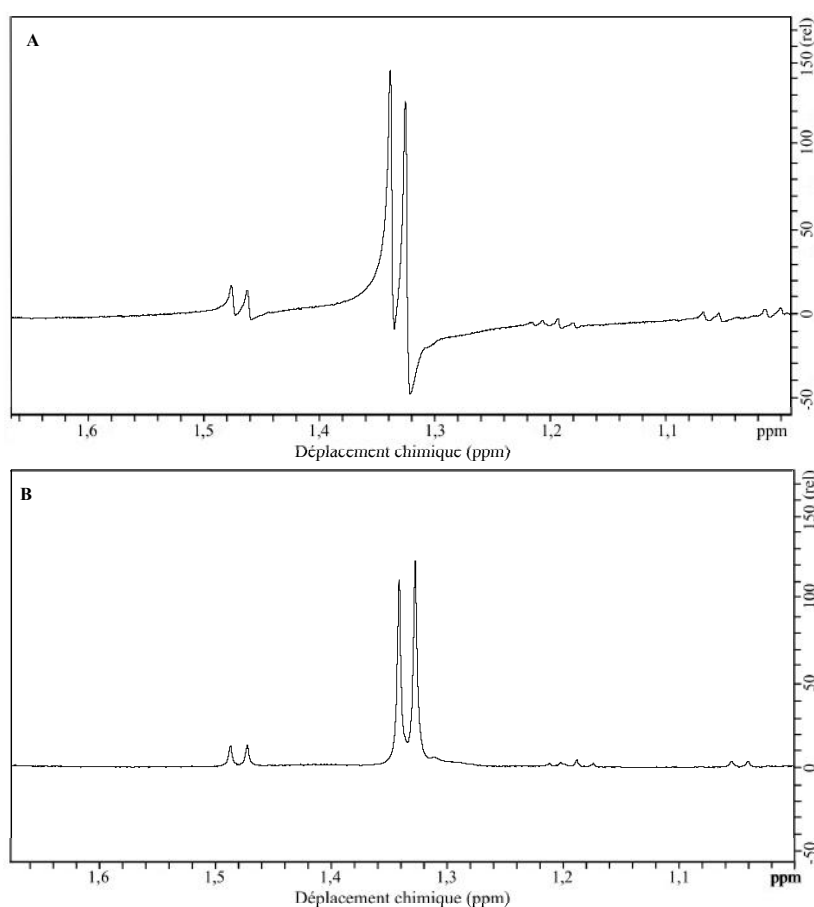


FIGURE 3.12 – Spectre 1H CPMG 1D de glandes parathyroïdes hypersécrétantes (A) avant phasage (B) après phasage. Le phasage permet à tous les pics d'être en absorption.

La seconde étape consiste à corriger la ligne de base de nos spectres. Cette dernière permet de faire correspondre le milieu du bruit des spectres à une intensité nulle (cf. fig.3.13). Cette étape doit être réalisée avec grand soin car la ligne de base affecte directement la valeur absolue de l'intégrale des pics (l'aire sous la courbe de pics). Dans certains cas, une distorsion de la ligne de base peut être observée, due à une probable instabilité de l'appareillage [136] ou à la nature de l'échantillon (hétérogénéité de l'échantillon...).

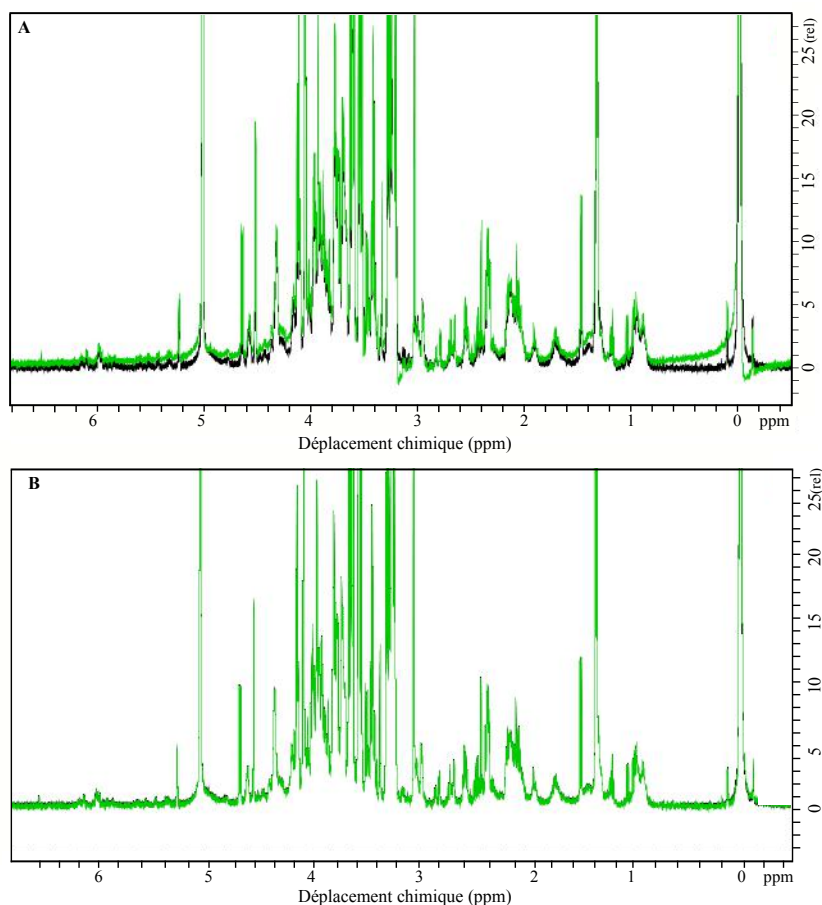


FIGURE 3.13 – Spectre 1H CPMG 1D de glandes parathyroïdes hypersécrétantes (A) avant correction de la ligne de base (B) après correction de la ligne de base. La correction de la ligne de base permet de faire correspondre le milieu du bruit à une intensité nulle. C'est une étape cruciale qui affecte directement la valeur absolue de l'intégrale.

La dernière étape nécessite de recalibrer tous les spectres par rapport à une référence choisie. Celle-ci est le pic de gauche du doublet du lactate (groupement CH) que l'on fixe à 1,33725 ppm (cf. fig.3.14).

Cette étape est également cruciale car les déplacements chimiques de certains composés sont extrêmement sensibles au pH . Ces variations de pH , aussi petites puissent-elles être peuvent engendrer un décalage en fréquence (axe des abscisses du spectre). Ce décalage peut être responsable d'un biais dans les aires mesurées.

Toutes ces étapes précédemment décrites doivent être réalisées avec grande rigueur et vérifiées en superposant tous les spectres à étudier. En effet, si après leur superposition des différences subsistent, il faut recommencer toutes les étapes afin de ne pas entraîner de biais dans les futures analyses statistiques. Si tous les spectres sont parfaitement superposables, nous pouvons passer à l'étape suivante, qui est la calibration.

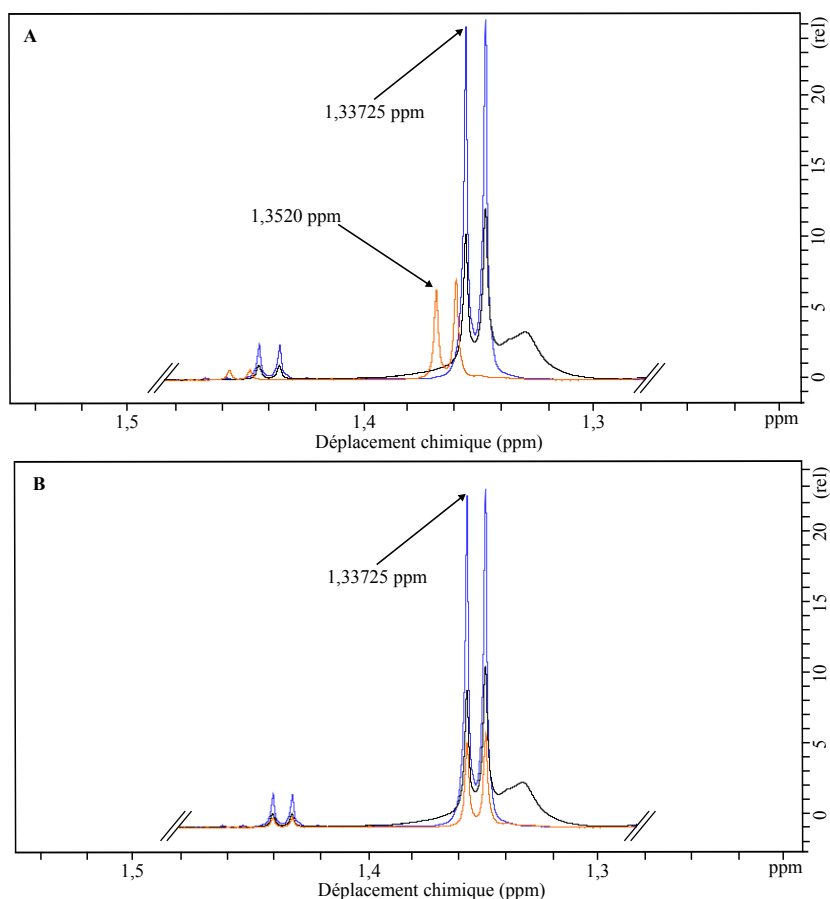


FIGURE 3.14 – Spectre ^1H CPMG 1D de glandes parathyroïdes hypersécrétantes (A) avant recalage sur la référence (B) après recalage sur la référence.

3.3.3.2 Calibration

Dans le cadre de ce travail, tous les spectres ont été calibrés. La calibration effectuée consiste à ramener la masse de l'échantillon pesé à une masse référence fixée à 1 kg. Pour toutes les analyses *RMN HRMAS* de ce travail, la référence était un insert de lactate de sodium de concentration et quantité connues (concentration de 125 mM et nombre de moles de 3 μM). Cet insert a été analysé dans les mêmes conditions analytiques que celles retenues pour les analyses *RMN HRMAS*. Cette méthode permet ainsi de mesurer l'intensité du signal *RMN* de la solution de lactate de sodium dans les mêmes conditions que les analyses d'échantillons biologiques.

3.3.3.3 Échantillonnage

Après la calibration des spectres, un échantillonnage (que l'on appelle aussi «*bucketing*» ou «*binning*») de nos spectres est nécessaire afin de rendre nos données *RMN* utilisables pour les futures analyses statistiques. Cet échantillonnage se fait par l'intermédiaire du logiciel AMIX 3.9.14 (Bruker, GmbH, Allemagne). Cette étape consiste à découper tous les spectres en de petites régions, appelées «*buckets*». Dans le cadre de ce travail les «*buckets*» étaient de 0,01 ppm. Cet intervalle semblant être un bon compromis entre le nombre de variables et la résolution des signaux (cf. fig.3.15).

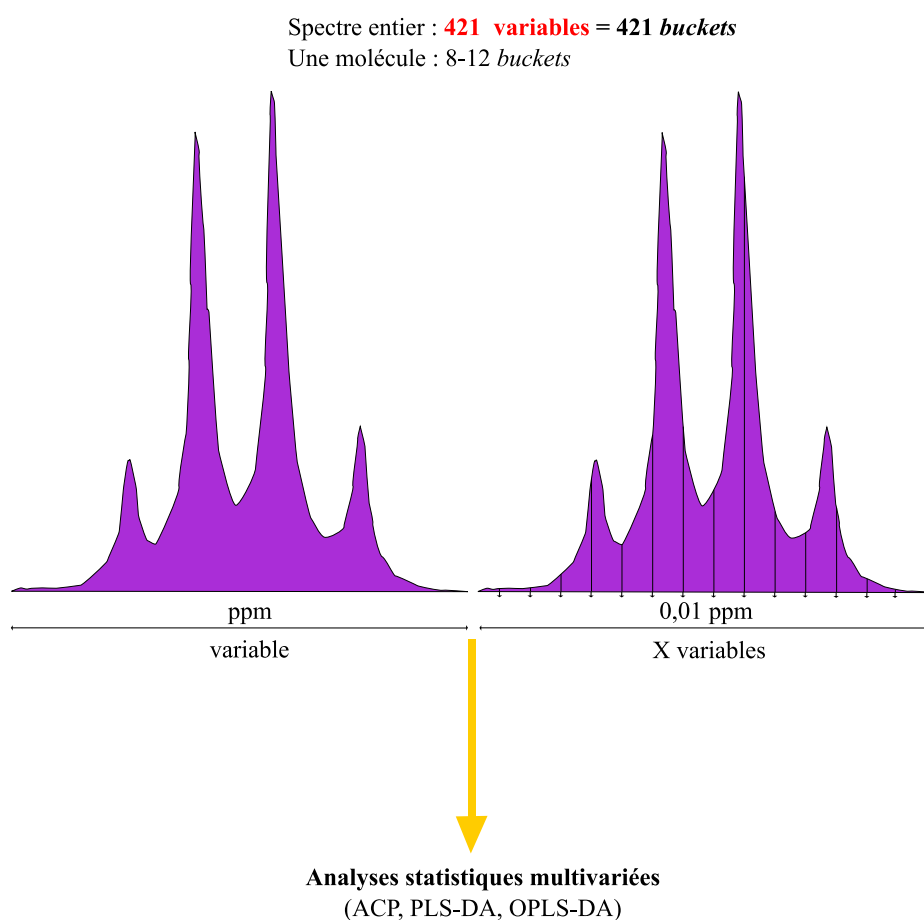


FIGURE 3.15 – Échantillonnage.

Ensuite, l'intégrale de chacun de ces intervalles est mesurée.

Enfin, la valeur de l'intégration de chaque *bucket* est divisée par l'intensité totale de l'intégralité du spectre en excluant les zones des contaminants comme le formate, l'acétone, le 1,4-dioxane (la colle), l'éthanol, et les zones des acides gras. La présence de colle a été notée dans quelques prélèvements. En effet, l'étude sur les adénocarcinomes pancréatiques

étant rétrospective, certains échantillons ont été dédiés pour l'analyse extemporanée en anatomopathologie. Lors d'une analyse en extemporanée, la partie tissulaire à analyser en histologie est incluse dans une colle spéciale, O.C.T (1,4-dioxane), sur un support métallique puis le tout est congelé dans un cryostat (-20°C) afin de pouvoir faire des coupes congelées puis la coloration nécessaire. Ces coupes peuvent alors être immédiatement analysées. D'où la détection du signal de la colle dans certains cas. Par ailleurs, des tests de pollution ont été effectués et il s'avère que les signaux de l'acétone, de l'éthanol et du formate provenant de l'environnement de travail (la salle du spectromètre étant située dans le Service d'Anatomie Pathologique) ont également pu être détectés.

Pour le travail sur les glandes parathyroïdes hypersécrétantes, nous avons retenu les régions du spectre comprises entre 2,32 ppm et 6,54 ppm en prenant soin d'exclure le signal de l'eau à 5 ppm, les différents signaux des acides gras entre 0 ppm et 2,32 ppm, entre 2,73 ppm et 2,93 ppm et enfin le signal de l'éthanol entre 3,62 ppm et 3,68 ppm.

Concernant l'étude sur les adénocarcinomes pancréatiques, nous avons sélectionné les régions du spectre comprises entre 0,70 ppm et 7,50 ppm. Nous avons exclu les zones où se situent les signaux des acides gras (entre 2,70 ppm et 2,94 ppm), le signal de l'éthanol et celui de la colle (entre 3,62 et 3,81 ppm) ainsi que le signal de l'eau entre 4,90 et 5,20 ppm.

Dans le cadre du travail sur les *TIPMP*, les régions du spectre comprises entre 0,90 ppm et 8,00 ppm ont été retenues. Les zones d'exclusions étant comprises entre 1,15 ppm et 1,22 ppm puis entre 3,62 et 3,70 ppm ; ces zones correspondant respectivement au groupement CH_3 et au groupement CH_2 de l'éthanol. La zone comprise entre 4,90 et 5,20 ppm, correspondant au signal de l'eau, a également été exclue.

Cette étape génère une matrice de données, avec en lignes les individus et en colonnes les variables, qui seront pré-traitées afin de donner un poids statistique équivalent aux métabolites présents en quantité variable.

Une fois la matrice de données obtenue, nous pouvons procéder aux analyses statistiques multivariées. Nous pouvons également utiliser une autre approche, qui nous permettra également d'effectuer des analyses statistiques uni- et multivariées, à savoir, la quantification des métabolites.

3.3.3.4 Quantification des métabolites

Une quantification des métabolites a été réalisée après les étapes de prétraitements préalablement décrites. Cette quantification s'exprime en nmol/mg. Elle est réalisée *via* un algorithme développé en interne (Dr Karim Elbayed) en utilisant le logiciel MATLAB R2012b (MathWorks©, France). La quantification des métabolites se fait à partir des spectres enregistrés avec une séquence *CPMG*, la sensibilité de détection étant d'environ 0,1 nmol/mg (cf. fig.3.16). Cette méthode, simple, consiste à comparer l'aire du signal d'un groupement d'un métabolite par rapport à un signal de référence de concentration molaire connue. Notre référence est un insert de lactate de sodium d'une concentration 125 mM et contenant 3 μ moles. Pour chaque groupement du métabolite à quantifier, l'aire totale prend en compte une normalisation par rapport à la masse de l'échantillon et par rapport au nombre de proton du groupement considéré.

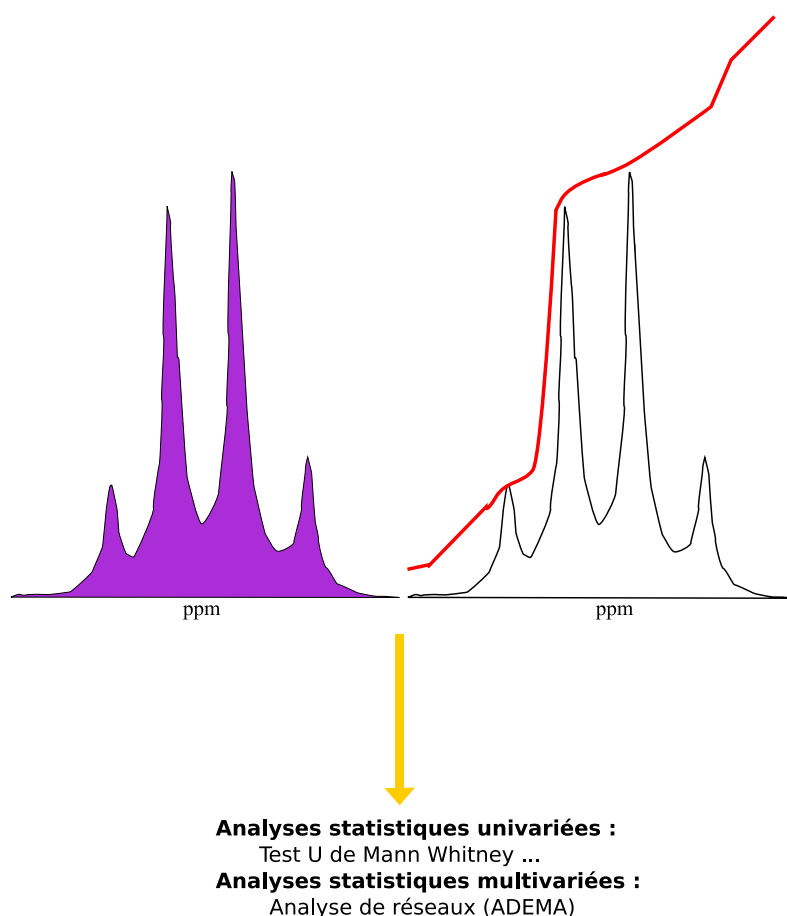


FIGURE 3.16 – Quantification.

Les groupements des métabolites quantifiés dans l'étude des glandes parathyroïdes, des adénocarcinomes pancréatiques et des *TIPMP* sont répertoriés dans le tableau 3.2.

Nb	Métabolites	Groupement	Déplacement chimique
1	3hydroxybutyrate	CH_3	1,20
2	Acétate	CH_3	1,92
3	Alanine	βCH_3	1,47
4	Ascorbate	$CH - O$	4,53
5	Asparagine	$CH_2(d)$	2,92
6	Aspartate	βCH_2	2,68
7	Bétaïne	$(CH_3)3$	3,27
8	Choline	$N^+ - (CH_3)3$	3,21
9	Créatine	CH_3	3,03
10	Éthanomaline	$CH_2 - NH_2$	3,13
11	Fumarate	CH	6,52
12	Glutamate	γCH_2	2,34
13	Glutamine	γCH_2	2,44
14	Glutathion	$CH_2 - SH$	2,95
15	Glycérol	$(CH_2(d))2$	3,65
16	Glycérophosphocholine	αCH_2	4,33
17	Glycine	αCH_2	3,55
18	Hypotaurine	$CH_2 - N$	3,34
19	Isobutyryl-L-carnitine	$(CH_3)2$	1,16
20	Lactate	CH	4,12
21	Lysine	δCH_2	1,70
22	Méthionine	$CH_2 - S$	2,63
23	Myoinositol	CH	4,05
24	Phénylalanine	<i>para</i> - CH	7,35
25	Scyllo-inositol	<i>all</i> - HS	3,35
26	Succinate	$(CH_2)2$	2,39
27	Taurine	$CH_2 - SO_3^-$	3,41
28	Thréonine	$CH - OH$	4,25
29	Total-Choline	$N^+ - (CH_3)3 + CH_2 - NH_3^+$	3,22
30	Tryptophane	méta- CH	7,53

31	Tyrosine	métab-CH	6,88
32	Valine	$\gamma'CH_3$	1,04
33	α -glucose	$C1H$	5,23
34	β -glucose	$(CH_2(d))_2$	4,65

TABLE 3.2: Groupements des métabolites sélectionnés pour la quantification.

L'étape primordiale et préliminaire à la quantification est de s'assurer que le groupe-ment du métabolite à quantifier soit parfaitement superposable à celui des autres spectres (cf. fig.3.17). Ceci est un exemple pour les quantifications de chaque métabolite. Il faut réaligner les spectres en cas de décalage :

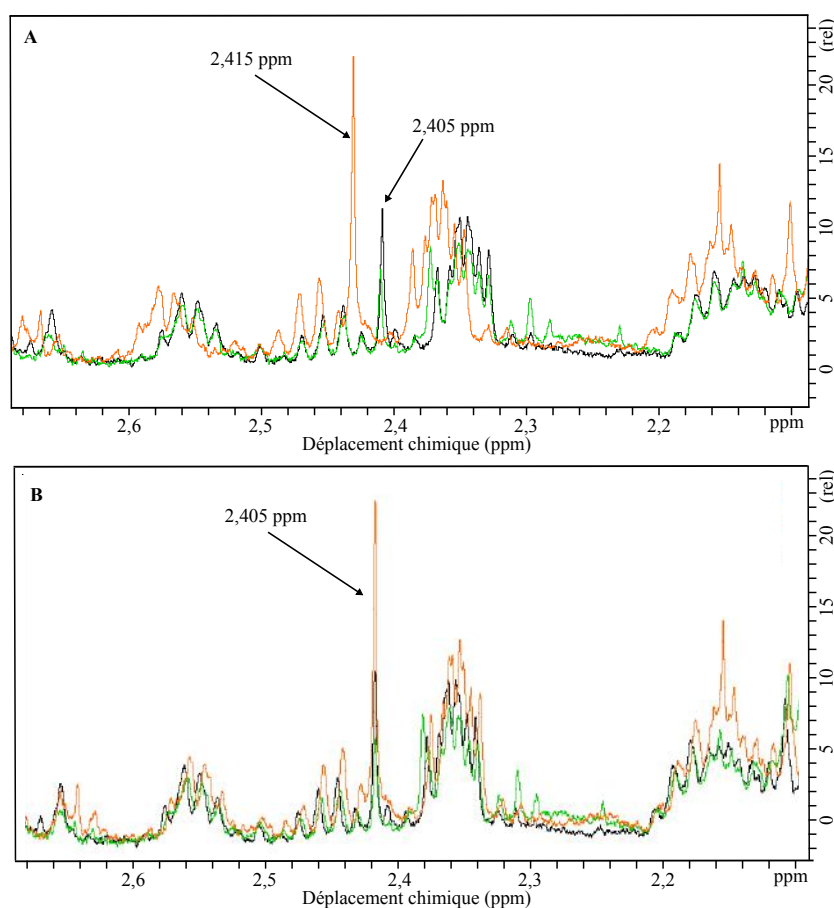


FIGURE 3.17 – Spectre 1H CPMG 1D de glandes parathyroïdes hypersécrétantes (A) avant recalage des spectres (B) après recalage des spectres. Dans cet exemple, avant la quantification, le pic du succinate du spectre en orange est décalé par rapport aux autres, il faut donc le recalier à 2,405 ppm.

3.3.4 Analyses Statistiques

La métabolomique est, par nature, liée à l'étude de systèmes biologiques complexes. Ces études, nécessitant une analyse statistique multivariée importante, sont décrites sous la forme d'un système d'entrées (X) et de sorties (Y).

Le but étant de comprendre et décrire les relations entre X et Y en l'absence d'un modèle théorique. De plus, le nombre de variables d'entrées X est souvent très important par rapport au nombre d'observations. L'analyse des données en métabolomique, bien que se résumant souvent et principalement à une relation $Y = f(X)$ comme celle décrite ci-avant, se caractérise aussi et surtout par deux approches diamétralement opposées, que nous détaillerons plus tard dans le corps du texte, à savoir la méthode dite non supervisée et la méthode supervisée.

L'analyse statistique intervient juste après l'étape de «*bucketing*» ou de quantification.

- à partir du *bucketing* : un spectre entier comporte 421 variables, soit 421 *buckets* ; une molécule est représentée par 8-12 *buckets*.

Plusieurs analyses statistiques multivariées peuvent ensuite être réalisées (*ACP*, *PLS – DA*, *OPLS – DA*) (cf. fig.3.15) ;

- à partir de la quantification : plusieurs analyses statistiques univariées (test U de Mann Whitney...) et multivariées peuvent ensuite être réalisées (*ACP*, *PLS – DA*, *OPLS – DA*, analyse de réseaux avec *ADEMA*) (cf. fig.3.16).

Si la technique de «*bucketing*» est simple à mettre en place et robuste, il est plus compliqué de faire la relation entre les résultats des analyses statistiques multivariées et des métabolites spécifiques (cf. fig.3.15).

Une première approche peut être la quantification des métabolites d'intérêt afin de réaliser par la suite des analyses statistiques univariées complémentaires aux analyses multivariées. Cette approche permet de mettre en évidence les métabolites significativement différents entre les groupes examinés et donc vraisemblablement à la base de la classification phénotypique des échantillons analysés (cf. fig.3.16).

Dans le cadre de ce travail de thèse, les deux approches ont été utilisées, à savoir l'analyse statistique univariée et multivariée, les objectifs de ces méthodes étant complémentaires. En effet, une analyse statistique univariée ne s'intéresse qu'à une seule variable, mesure physico-chimique (température, concentration d'un composé chimique ...) ou une variable sélectionnée parmi un jeu de données ; alors qu'une analyse statistique multivariée

traite simultanément plusieurs variables et montre les relations qui peuvent exister entre ces dernières. Les variables peuvent provenir de mesures différentes ou correspondre à plusieurs mesures réalisées simultanément, comme dans un spectre *RMN* par exemple. Tous les spectres dans leur intégralité (*bucketting*) ont été soumis à une première approche par une méthode statistique multivariée sans *a priori* appelée Analyse en Composantes Principales (*ACP*). La deuxième approche a été de soumettre ensuite le même jeu de spectres à une méthode statistique multivariée avec *a priori* appelée Analyse Discriminante par régression aux Moindres Carrés Partiels par projection Orthogonale ou *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS – DA)*. Ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel SIMCA P (version 13.0.3, Umetrics AB, Umea, Sweden). Les métabolites ne présentant pas de recouvrement de leurs signaux ont été quantifiés. Leurs valeurs quantitatives sont exprimées en nmol/mg. Elles ont été utilisées dans procédures statistiques univariées tel que le test non paramétrique U de Mann-Whitney *via* le logiciel R [6] et dans des procédures multivariées, comme par exemple l'analyse de réseaux *via* l'algorithme pour déterminer les changements de niveau de métabolites prévu en utilisant l'information mutuelle (*An Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alterations Using Mutual Information, ADEMA*).

Pour terminer, rappelons que la chimométrie, qui est une branche de la chimie analytique, consiste en l'application d'outils mathématiques et statistiques afin d'extraire le maximum d'informations utiles et pertinentes à partir de données physico-chimiques.

3.3.4.1 Analyse en Composantes Principales

L'analyse en composantes principales (*ACP*) est une analyse statistique descriptive qui fut introduite en 1901 par Pearson [137]. Elle a ensuite été développée et formalisée par Hotelling en 1933 [138].

L'ACP a pour objectifs de simplifier et de réduire un jeu de données à X_n variables initialement corrélées, en un nouveau jeu de données à nombre réduit de variables non corrélées appelées les composantes principales (CP_n) par rotation des X_n axes initiaux. Les CP_n obtenues sont des combinaisons linéaires des variables initiales. Ces dernières sont pondérées de coefficients appropriés de telle sorte que la première composante principale CP_1 détienne le maximum de variations, la deuxième composante principale, CP_2 ,

la plus grande variation etc.

L'*ACP* présente plusieurs intérêts quant à son application dans le cas des données *RMN*. Tout d'abord, en *RMN*, plusieurs centaines, milliers de variables peuvent être extraites à partir des données brutes. D'où la nécessité de réduire la dimension des données originelles. Qui plus est, dans ce type de données, les données initiales peuvent être inter-corrélées ce qui provoque une certaine redondance compliquant les calculs statistiques.

Ensuite, par sa réduction de la dimensionnalité des données, l'*ACP* simplifie grandement la visualisation des données. En effet, après réduction de la dimensionnalité, chaque variable obtient ses nouvelles coordonnées, appelées *scores*. Un graphique à deux ou trois dimensions permet de visualiser facilement ces *scores*. Ce graphique se construit sur la base des nouveaux axes, où ces nouveaux points forment des groupes selon leur similarité. Puis, les *loadings* de l'*ACP* représentent les coefficients de corrélations linéaires entre les variables d'origine et les facteurs (les composantes principales). L'interprétation des *loadings* permet d'obtenir la correspondance chimique des similarités entre les points. Pour résumer, ceci représente les coordonnées des variables d'origine dans le nouvel espace.

Par ailleurs, un autre intérêt de l'*ACP* est la détection de points aberrants, les *outliers*. Ces *outliers* peuvent être à l'origine d'une perte d'information ou d'une mauvaise interprétation des résultats. Cela va permettre l'exclusion de ces points avant toutes autres analyses statistiques. En effet, en gardant ces points l'*ACP* aurait forcé le modèle à passer par ces points aberrants et aurait modifié la direction des composantes principales.

Pour finir, l'*ACP* est une technique de classification. En effet, les points présentant des similitudes seront regroupés tandis que les points montrant des dissimilitudes seront éloignés. L'*ACP* permet de structurer et de simplifier un ensemble d'observations et de variables, dans leur globalité sans privilégier l'une d'entre elles en particulier. L'*ACP* est ce que l'on appelle une méthode statistique dite non-supervisée, c'est-à-dire qu'elle ne requiert pas de connaissances supplémentaires aux données expérimentales ; par exemple, le groupe d'appartenance des échantillons (groupe cas ou groupe contrôle) lors d'une classification des échantillons.

Pour résumer, l'*ACP* permet, sans information supplémentaire, de classer les échantillons. Si les résultats sont positifs, correspondant à la classe d'appartenance par exemple, ou à un grade de malignité, cela signifie que le modèle est très puissant. Dans le cas contraire,

il faut forcer ce modèle en lui spécifiant par exemple une classe d'appartenance. Dans ce cas, une Analyse Discriminante par régression aux moindres carrés partiels est réalisée.

3.3.4.2 Analyse Discriminante par régression aux moindres carrés partiels

L'analyse par régression aux moindres carrés partiels (*Partial Least Square, PLS*) est une méthode statistique de réduction des données, proposée au cours des années 1980 par Wold [139], tout comme l'est l'*ACP*. Cette méthode qui s'est montrée particulièrement adaptée pour les études métabolomiques [140]. La *PLS*, contrairement à l'*ACP*, est une méthode dite supervisée, qui nécessite une classification préalable des échantillons en un groupe d'appartenance, par exemple, pour le groupe cas et le groupe contrôle de patients. La régression *PLS* discriminante (*PLS - DA*) est une extension de la *PLS* [141]. C'est une méthode particulièrement adaptée lorsque le nombre de variables explicatives est très supérieur au nombre d'individus (et également lorsque les variables sont corrélées); ce qui est le cas avec les données *RMN*. En effet, cette méthode permet d'étudier les relations entre un ensemble de variables réponses Y et un ensemble de variables explicatives X lorsque la colinéarité est forte ou le nombre de variables explicatives et ou de réponses est élevé par rapport au nombre d'échantillons étudiés. La régression *PLS* effectue une analyse en composantes principales pour chaque ensemble de variables X et Y sous la contrainte d'une forte corrélation entre les composantes de X et celles de Y .

Pour résumer, la *PLS - DA* permet, avec une information supplémentaire, comme par exemple la classe d'appartenance, de classer les échantillons. Si les résultats sont positifs, cela signifie que le modèle est discriminant. Lorsque l'interprétation de la *PLS - DA* est trop complexe, une analyse discriminante par régression aux moindres carrés partiels par projection orthogonale est réalisée.

3.3.4.3 Analyse Discriminante par régression aux moindres carrés partiels par projection orthogonale

L'analyse discriminante par régression aux moindres carrés partiels par projection orthogonale (*Orthogonal Partial Least Square - Discriminant Analysis, OPLS - DA*) est une modification récente de la *PLS - DA* [142] qui a pour objectif d'améliorer l'interprétation de modèles *PLS* et de réduire la complexité du modèle.

Pour commencer, l'*OPLS - DA* permet d'analyser la variation de chaque composante *PLS* : les variations corrélée (à X) et non-corrélée sont séparées, ce qui permet de les étudier et analyser distinctement.

Ensuite, vient la suppression de la variation non corrélée des données. Cette dernière présente un intérêt prédictif mais aussi une interprétation simplifiée des modèles prédictifs. L'algorithme *NIPALS* originel est modifié par la méthode *OPLS - DA* proposée par Trygg *et al.* [142]. Un prétraitement y est effectué permettant l'élimination de la variation orthogonale systématique d'un jeu de données X .

Deux variations modélisées (celle prédictive de X et celle prédictive de Y) constituent le modèle *O - PLS*. Cependant, seule la variation prédictive d' Y est utilisée pour la modélisation de Y . L'*O - PLS* peut alors être appliquée à la *PLS - DA* et être utilisée pour la discrimination (*OPLS - DA*).

L'*OPLS - DA* va permettre de séparer la variation entre les classes et la variation inter-classe, ce que ne permet pas la *PLS - DA*. L'interprétation de l'*OPLS - DA* en est ainsi améliorée, donc facilitée par rapport à une *PLS - DA* classique. En effet, pour estimer Y , les *scores* et *loadings* prédictifs de l'*OPLS - DA* utilisés, sont composés de la variation directement corrélée avec Y exempte de celle non corrélée [143].

Ensuite, il est important de souligner que l'*OPLS - DA* ne fournit pas d'avantage prédictif par rapport à la *PLS - DA*. Effectivement, s'il n'y a pas de variation non corrélée à Y au sein d' X , les modèles résultants de la *PLS - DA* et de l'*OPLS - DA* seront quasi-similaires.

Enfin, pour résumer, l'*OPLS - DA* est une méthode statistique dite supervisée, c'est-à-dire qu'elle requiert des connaissances supplémentaires aux données expérimentales ; par exemple classification des échantillons selon leur groupe d'appartenance (groupe cas et groupe contrôle). C'est cette utilisation des classes qui va permettre à l'algorithme *PLS* d'améliorer la séparation entre les deux groupes dans l'espace des *scores*. L'*OPLS - DA* fournit une méthode qui permet d'éliminer la variation systématique des données d'entrée X non corrélées au jeu de réponse Y . En clair, l'*OPLS - DA* permet de supprimer la variabilité dans X qui est orthogonale à Y .

Le nombre de variables est toujours supérieur au nombre d'échantillons. C'est pourquoi nous utilisons ces analyses statistiques multivariées particulièrement adaptées à ce cas de

figure. Par contre, quand nous commençons à étudier des sous-groupes parmi une faible population initiale, les effectifs sont vraiment réduits et ces analyses ne sont plus adaptées. Dans ces cas précis, une nouvelle approche statistique originale, par l'algorithme pour déterminer les changements de niveau de métabolites prévu en utilisant l'information mutuelle (*ADEMA*), est appliquée. *ADEMA* permet de travailler avec beaucoup de métabolites et peu d'échantillons. C'est pourquoi dans ce Chapitre, l'accent est mis sur cette approche originale. J'ai personnellement réécrit le code de cet algorithme en langage *R* dans son intégralité, pendant 6 mois, en collaboration avec l'auteur d'*ADEMA*.

3.3.4.4 *ADEMA*

3.3.4.4.1 Introduction à *ADEMA* L'algorithme pour déterminer les changements de niveau de métabolites prévu en utilisant l'information mutuelle, *ADEMA*, est une technique multivariée basée sur l'information mutuelle afin d'identifier des changements de niveau de métabolites attendus dans différents types d'échantillons biologiques [5].

La première étape de cet algorithme consiste à former une population avec de multiples individus dans le groupe contrôle et le groupe cas et, à mesurer les concentrations de ces métabolites d'intérêt (variables).

Lors de la deuxième étape, chaque observation est assignée à des intervalles de classe discrets (appelés « *bins*») avec une certaine probabilité.

La troisième étape est d'obtenir le sous-réseau métabolique pour les métabolites mesurés. La quatrième étape repère les sous-ensembles de métabolites reliés entre eux, en utilisant le réseau métabolique.

La cinquième et dernière étape utilise les probabilités trouvées dans l'étape 2, afin de déterminer les niveaux de métabolites contrôle-spécifique et variable-spécifique (*bins*) et, de comparer ces niveaux qui permettront de trouver des changements dans le groupe cas par rapport au groupe contrôle (cf. fig.3.18).

Dans l'exemple de la figure.3.18, il y a deux souris dans le groupe cas et deux souris dans le groupe contrôle. Quatre métabolites d'intérêt sont mesurés pour chaque individu et sont reliés en utilisant le réseau métabolique. Il a été déterminé que $\langle A,B,C \rangle$ et $\langle A,B,D \rangle$ sont les sous-ensembles reliés. Chaque observation est assignée à une probabilité d'être soit vers le haut soit vers le bas (deux intervalles de classe discrets, appelés « *bins* »).

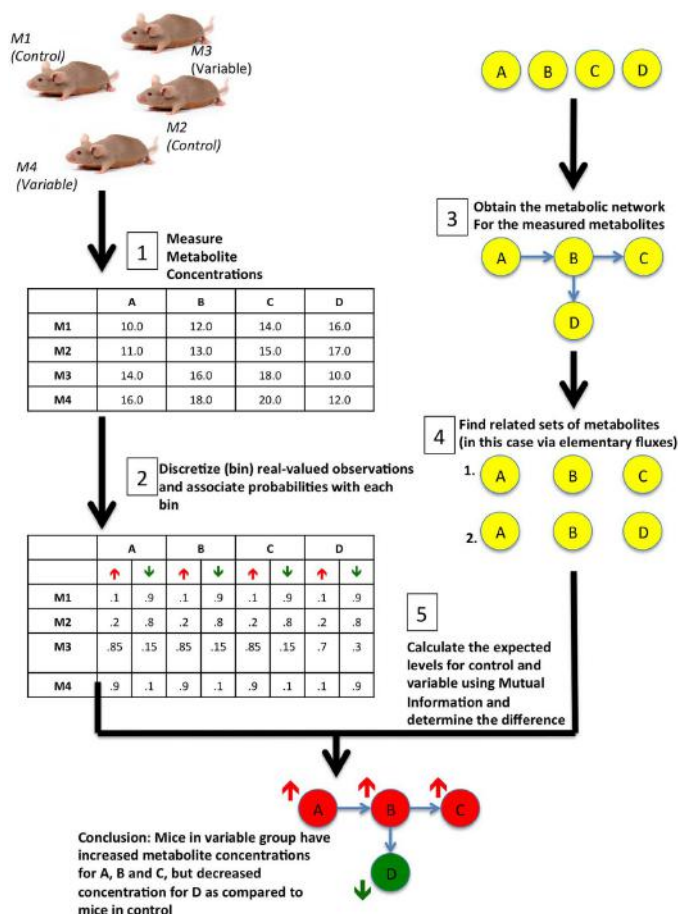


FIGURE 3.18 – Un aperçu d’ADEMA (figure extraite de Çiçek A.E *et al.*, 2013 [5]). La première étape est de construire une population qui contient de multiples individus (dans ce cas $M1$ et $M2$ sont dans le groupe contrôle et $M3$ et $M4$ dans le groupe cas). Les concentrations des métabolites d’intérêt sont déterminées pour tous les individus (dans ce cas, concentrations des métabolites A , B , C et D). Ensuite, pour la seconde étape, chaque observation est assignée à une probabilité d’être dans un intervalle de classe discret (*bins*) (seuls deux *bins* sont considérés, à savoir, vers le haut et vers le bas). La troisième étape est de construire le réseau métabolique afin de déterminer les associations entre les métabolites mesurés. Dans cette figure les cercles représentent les métabolites, et les flèches les réactions qui les relient. Quant à la quatrième étape, elle détermine les sous-ensembles de métabolites qui sont reliés dans le réseau métabolique. Deux ensembles ont été trouvés, $\langle A, B, C \rangle$ et $\langle A, B, D \rangle$, et sont les seuls sous-ensembles qui sont reliés. En utilisant les probabilités trouvées dans l’étape 2 et les sous-ensembles reliés trouvés dans l’étape 4, ADEMA détermine les niveaux de métabolites spécifique-cas et spécifique-contrôle, et compare les changements dans le groupe cas par rapport au groupe contrôle. Dans cet exemple, ADEMA conclut que A , B et C sont augmentés et D diminué dans le groupe cas par rapport au groupe contrôle.

Finalement, l’algorithme détermine que les souris dans le groupe cas ont des niveaux plus élevés de A , B , C et des niveaux plus faibles de D en comparaison avec les souris du groupe contrôle. Plus précisément, ADEMA suit les étapes suivantes consistant à :

- discrétiser (*bins*) les observations de métabolites en utilisant les courbes *B-Splines* ;

- identifier les sous-ensembles de métabolites, en dehors des métabolites observés en générant un mode élémentaire de flux (*elementary flux mode, EFM*);
- trouver les combinaisons de métabolites qui sont informatifs par rapport à une condition ;
- calculer les niveaux de métabolites attendus pour les groupes cas et contrôle, basés sur l'information mutuelle fournie ;
- comparer les niveaux de métabolites attendus entre eux.

En utilisant les niveaux attendus identifiés, *ADEMA* peut alors être utilisé comme un classificateur. Pour résumer, *ADEMA* évalue les changements dans les groupes de métabolites, entre le groupe cas et le groupe contrôle au lieu d'analyser les métabolites un par un. L'algorithme *ADEMA* inclut la topologie du réseau métabolique et utilise l'information mutuelle pour trouver si ces métabolites sont des biomarqueurs quand ils sont considérés ensemble et enfin, *ADEMA* peut prédire la direction de changement attendu par métabolite, quand la topologie du réseau métabolique est considérée. Le réseau a été construit en utilisant la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* [144], [145] et le travail de Salway [146].

En comparaison avec des analyses univariées (test U de Mann-Whitney, ..) où des différences significatives peuvent ne pas être relevées entre le groupe cas et le groupe contrôle (nous en verrons des exemples en Chapitre 4), *ADEMA* reporte des changements pour ces métabolites. Par conséquent, *ADEMA* apparaît plus efficace car il compare les différents groupes de métabolites, utilise l'information mutuelle et ne requiert pas une population importante d'échantillons.

Le réseau sur lequel est basée l'analyse de réseau est représenté en figure 3.19. Ce réseau est adapté selon les études.

3.3.4.4.2 Étapes d'*ADEMA* Observations des intervalles de classe

L'information mutuelle travaille sur des valeurs discrètes, tandis que les mesures de concentration des métabolites sont des nombres réels entiers. Par conséquent, afin de travailler avec l'information mutuelle, il est nécessaire de discrétiser les valeurs réelles en valeurs discrètes. Les différentes méthodes utilisées dans la littérature et le raisonnement qui a conduit à l'utilisation des fonctions *B-splines* seront discutées dans cette partie.

Il existe deux types de méthodes dans la littérature afin d'estimer les densités de probabilités de valeurs continues : les méthodes paramétriques et non-paramétriques [147].

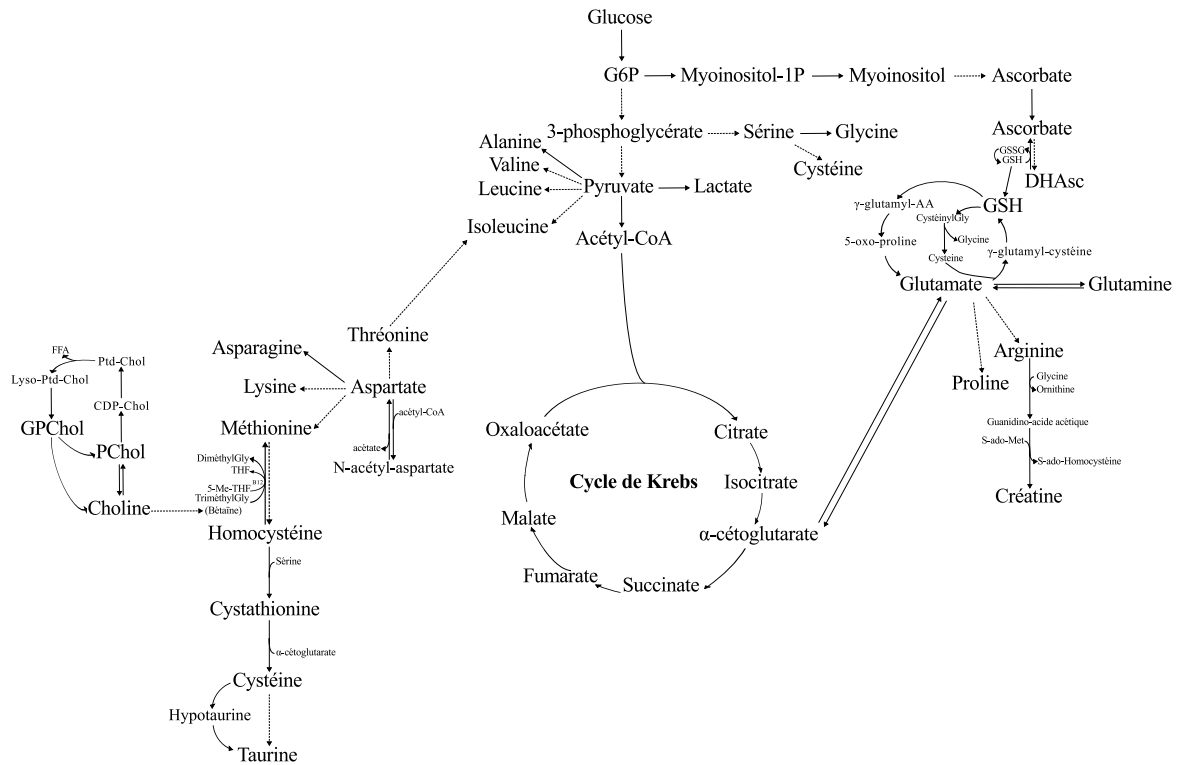


FIGURE 3.19 – Réseau Métabolique établi en collaboration avec le Dr N. Dali-Youcef.

Cette dernière part du principe que les observations proviennent d'une famille connue de distribution. Comme dans ce cas les distributions des observations ne sont pas connues, la dernière approche a été utilisée.

La première méthode est l'estimation de la densité par la méthode du noyau (*kernel density estimation, KDE*). Cette dernière estime une densité pour chaque observation x en comptant le nombre de points dans la fenêtre, pondérés par leur distance en utilisant un noyau présélectionné [148]. Les résultats dépendent de la longueur de la fenêtre ainsi que du noyau utilisé, *KDE* demandant une forte exigence informatique. Par conséquent Çiçek *et al.* n'ont pas choisi cette méthode.

La deuxième méthode est une approche basée sur un histogramme où les observations sont simplement discrétisées. Comme les mesures des concentrations de métabolites présentent une incertitude de mesure, les observations près des bords peuvent être aisément mal classées lorsque des niveaux prédéterminés sont utilisés [149], [150].

Pour régler ce problème, Çiçek *et al.* ont choisi d'utiliser les fonctions *B-Splines* [151]. En étant pondérée par la fonction *B-Spline*, chaque observation peut être assignée à de multiples *bins* (au lieu de ne placer qu'une seule observation par *bin* en étant pondérée). Dans ce cas, les *bins* sont convertis en fonctions polynomiales se chevauchant, (cf.

fig.3.20). La figure 3.20 montre une fonction *B-spline* basique pour 6 *bins*. Dans cette figure, chaque courbe représente un *bin*. Chaque observation est assignée à un *bin* représenté par la fonction *B-Spline*, avec la probabilité correspondante pour chacune d'elle. La somme des probabilités pour chaque *bin* est égale à 1 pour cette observation. Pour une valeur spécifique x de la figure 3.20, les valeurs y sont trouvées en utilisant les courbes *B-Splines* dont la somme atteint 1.

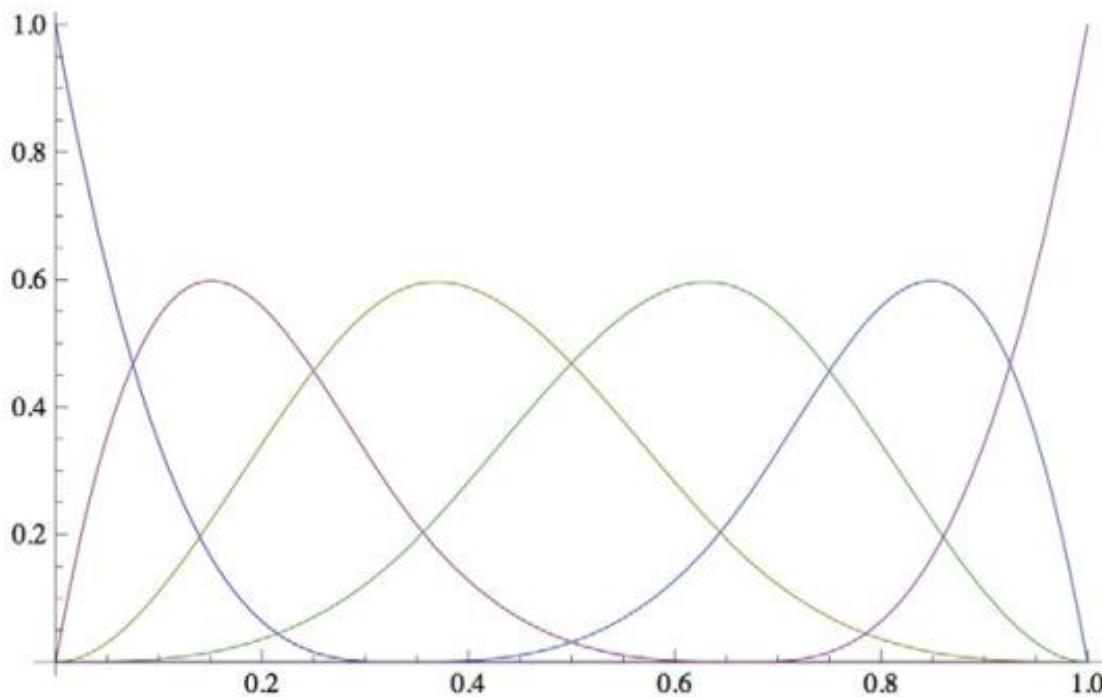


FIGURE 3.20 – Un exemple de fonction *B-spline*. Ici les fonctions basiques *B-splines* sont représentées pour 6 *bins*. Chaque courbe représente un *bin*. Pour chaque observation (axe- x), la valeur y correspondante sur chaque courbe donne la probabilité de cette observation d'être dans ce *bin*. La somme des valeurs y correspondant à une valeur x pour tous les *bins* vaut 1 (Figure extraite de Çiçek *et al.* [5]).

En comparaison, l'approche basée sur l'histogramme diviserait la plage $[0,1]$ dans la figure 3.20 en 6 morceaux (par exemple, $0-0,16-0,33-0,5-0,66-0,83-1$) et assignerait les observations au seul et unique *bin* (par exemple avec la probabilité 1 au *bin* assigné). Donc, dans leur article, Cicek *et al.* ont utilisé la fonction *B-Spline* pour le *binning*. L'utilisation des fonctions *B-Splines* dans la formulation du problème de Çiçek *et al.* nécessite deux paramètres, M et k . Le paramètre M indique le nombre de *bins* et k ($k \in [1, M]$), indique le nombre de *bins* auquel une observation peut être assignée. Les paramètres M et k étant

définis, le vecteur « *knot* » t de longueur $M + k + 1$ est défini comme ci-dessous par :

$$t_i = \begin{cases} 0, & i < k \\ i - k + 1, & k \leq i \leq M \\ i = 1, 2 & M < i \end{cases} \quad (3.1)$$

C'est ce qu'on appelle un vecteur « *knot* » non périodique et uniforme [151], [152], [153]. Après avoir obtenu le vecteur « *knot* », les fonctions *B-Splines* sont définies de manière récursive en étant basées sur le vecteur « *knot* » comme ci-dessous :

$$B_{i,1}(z) = \begin{cases} 1 & \text{si } t_i \leq z \leq t_{i+1} \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (3.2)$$

$$B_{i,k}(z) = B_{i,k-1}(z) \left[\frac{z - t_i}{t_{i+k-1} - t_i} \right] + B_{i+1,k}(z) \left[\frac{t_{i+k} - z}{t_{i+k} - t_{i+1}} \right] \quad (3.3)$$

En partant du principe que nous avons une population P et n métabolites observés, m_1, m_2, \dots, m_n , pour chaque s spécifique dans la population P . Alors $s[m_j]$ est la valeur du j^{ieme} métabolite pour un s particulier, où $J \in [1, n]$. Il est à noter que le domaine de z dans les équations 2 et 3 est différent du domaine du métabolite m_j .

D'où l'utilisation par les auteurs de la transformation linéaire dans l'équation 4 . Les valeurs m_j^{min} et m_j^{max} sont les valeurs minimales et maximales observées dans la population pour m_j respectivement. La valeur $z_{s[m_j]}$ correspond à la valeur transformée.

$$z_{s[m_j]} = (M - k + 1) \frac{s[m_j] - m_j^{min}}{m_j^{max} - m_j^{min}} \quad (3.4)$$

La probabilité de $s[m_j]$ étant assignée au *bin* i est notée $p(s[m_j]^i)$ et est calculée comme dans l'équation 5 ci-dessous :

$$p(s[m_j]^i) = B_{i,k}(z_{s[m_j]}) \quad (3.5)$$

Il est à noter que $\sum i = 1^M B_{i,k}(z_{s[m_j]}) = 1$ autrement dit les probabilités associées à chaque *bin* pour une observation peuvent aller jusqu'à 1. Ensuite, pour un s particulier, la probabilité que chaque sous-ensemble de métabolite soit dans les *bins* donnés, est trouvée

en multipliant les probabilités de chaque métabolite dans le sous-ensemble pour être dans les *bins* correspondants.

Une fois que toutes les mesures de métabolites sont associées avec les *bins* correspondants, l'étape suivante dans l'algorithme est de trouver les métabolites liés afin qu'ils soient considérés ensemble.

Sélection des sous-ensembles de métabolites

ADEMA est une méthode multivariée qui prend en compte plusieurs métabolites en même temps afin de considérer les interdépendances entre les molécules. Il y a deux façons de procéder :

- calculer les niveaux attendus par métabolite, mais les interdépendances entre les métabolites eux-mêmes ne seraient pas prises en compte (c'est-à-dire en considérant tous les sous-ensembles de taille 1), ou
- chercher les états attendus de tous les métabolites observés ensembles (qui ont seulement un sous-ensemble qui contient tous les métabolites), mais cette fois, ce ne serait pas utile de prendre en compte les métabolites qui ne sont pas liés en même temps.

De plus, pour n métabolites et M intervalles de classe, il y a M^n combinaisons possibles de métabolites et de leurs niveaux correspondants (comme chaque métabolite peut être dans différents niveaux M). Puisque la méthode souffre d'un problème de dimensionnalité, le sous-ensemble de métabolites à considérer ensemble doit être choisi avec soin. Les trois manières de choisir des sous-ensembles de métabolites reliés entre eux seront discutées plus tard.

Les réseaux métaboliques fournissent une bonne compréhension des dépendances entre les métabolites en définissant les relations directes entre « producteurs et consommateurs ». L'analyse en mode élémentaire est une technique qui identifie les ensembles de réactions minimales qui sont actifs à un état stationnaire d'un organisme et un réseau métabolique d'intérêt [154]. Chaque ensemble est appelé un mode de flux élémentaire (*EFM*), et chaque distribution de flux sur le réseau métabolique à un état stationnaire peut être représentée comme une combinaison de modes élémentaires. Par définition, les modes élémentaires définissent le sous-ensemble de réactions qui forment la base du flux traversant

le réseau métabolique d'intérêt. Ainsi, en considérant la mesure de dépendance entre les métabolites, notre première stratégie pour sélectionner les sous-ensembles de métabolites reliés, est d'utiliser les modes élémentaires et de considérer tous les métabolites associés aux réactions dans un mode élémentaire en tant que sous-ensemble. Dans notre contexte, l'association d'un métabolite avec une réaction signifie qu'il en est un substrat ou un produit. Une remarque : les modes élémentaires devraient contenir les métabolites dans l'ordre de $O(n)$. Dans ce cas, les *EFMs* sont décomposés en éléments, en utilisant un niveau prédéfini qui limite le nombre maximal de métabolites qui peut exister dans un sous-ensemble.

Maintenant décrivons la deuxième stratégie qui permet de sélectionner les sous-ensembles de métabolites reliés. Cette méthode permet de grouper les métabolites qui sont proches les uns des autres dans un réseau métabolique. Pour chaque métabolite, un sous-ensemble qui contient tous les métabolites au sein de la distance avec ce métabolite (par exemple ceux qui peuvent être atteints par une seule réaction). Le métabolite d'origine lui-même est aussi ajouté à l'ensemble. Il est utile de noter que dans le cas de métabolites centraux, le nombre de métabolites au sein d'un sous-ensemble peut encore être grand. Ainsi, la stratégie de seuil utilisée pour les *EFMs* a été appliquée également. Comparativement à la première approche qui repère les métabolites reliés en utilisant les flux élémentaires qui traversent le réseau, cette seconde approche ignore les flux à l'état d'équilibre et se focalise purement sur la proximité topologique afin de déterminer les sous-ensembles.

La troisième stratégie consiste à sélectionner au hasard différents métabolites afin de former des sous-ensembles de métabolites reliés. Cette stratégie ne nécessite aucune connaissance préalable du réseau métabolique et néglige tous les flux ou topologie basés sur les liens parmi les métabolites. Le nombre de métabolites est encore limité par un seuil. Un des avantages de cette stratégie est qu'elle peut être utilisée quand il n'y a, aucune connaissance, des connaissances limitées sur le réseau métabolique, ou quand le réseau est très complexe ou grand.

Les auteurs ont comparé les performances de ces trois stratégies en terme de performance de classification d'*ADEMA* et ont reporté leurs conclusions sur la sélection du seuil et leurs effets sur l'efficacité de l'algorithme. Ensuite, les sous-ensembles de métabolites reliés sont déterminés, les observations sont discrétisées et l'algorithme mesure à quel point les sous-ensembles déterminés sont informatifs et concernés par la variable classe (cas *vs.*

contrôle) en utilisant l'information mutuelle.

Détermination des niveaux de métabolites attendus par classe

L'information mutuelle est une technique théorique d'information qui permet de déterminer les dépendances statistiques linéaires ou non-linéaires des variables. Dans l'exemple de Çiçek *et al.*, les auteurs voulaient déterminer comment le génotype contrôle et cas est reflété par les mesures discrètes des sous-ensembles de métabolites. L'information mutuelle est basée sur l'entropie de Shannon, qui mesure l'incertitude associée à une variable aléatoire. Pour une variable aléatoire X donnée, l'entropie de X est notée $H(X)$. Elle est définie dans l'équation 6 où $p(x)$ désigne la probabilité d'observer $x \in X$.

$$H(X) = - \sum_{x \in X} p(x) \times \log(p(x)) \quad (3.6)$$

L'entropie conditionnelle pour un X et un Y donnés, comptabilise l'incertitude de X quand Y est connu, et est dérivé comme dans l'équation 3.7 :

$$H(X) = \sum_{y \in Y} \sum_{x \in X} p(x, y) \times \log\left(\frac{p(x)}{p(x, y)}\right) \quad (3.7)$$

L'information mutuelle $I(X; Y)$ peut être définie comme la réduction de l'incertitude d'une variable aléatoire quand l'autre variable aléatoire est connue (éq. 3.8). $I(X; Y)$, une valeur réelle dans l'intervalle $[0, 1]$, vaut 0 quand l'observation d'une variable aléatoire ne nous donne pas plus d'information sur l'autre.

$$I(X; Y) = H(X) - H(X|Y) = H(Y) - H(Y|X) \quad (3.8)$$

Pour le sous-ensemble Sub de métabolites observés, Çiçek *et al.* se sont intéressés à la réduction de l'incertitude de la variable de classe C . Ceci en donnant les versions échantillonnées des observations pour Sub , à savoir O_{Sub} . L'équation 8 est équivalente à l'équation 9 ci-dessous (les variables ont été renommées en fonction).

$$I(C; O_{Sub}) = \sum_{o \in O_{Sub}} \sum_{c \in C} p(c) \times p(o|C) \times \log\left(\frac{p(o|c)}{p(o)}\right) \quad (3.9)$$

Il y a $M^{|Sub|}$ combinaisons possibles dans O_{Sub} . Il est à noter que la combinaison 0

du *bin* dans O_{Sub} peut être représentée comme un tableau de longueur $|Sub|$, où chaque $o[m_j] \in [1, |Sub|]$ représente le *bin* pour le métabolite $m_j \in Sub$. La probabilité d'observer la combinaison 0 pour l'individu $s(p_s(0))$ est trouvée selon l'équation 3.10. La probabilité d'observer 0 dans la population $P(p_0(0))$ est trouvée comme montrée dans l'équation 3.11.

$$p_s(o) = \prod_{m_j \in Sub} p(s[m_j]^{o[m_j]}) \quad (3.10)$$

$$p(0) = \frac{\sum_{s \in P} p_s(o)}{|P|} \quad (3.11)$$

Sans réduire le caractère général de l'équation, les auteurs supposent que c'est une variable aléatoire binaire, qui peut être soit le groupe contrôle ou le groupe cas. Il est à noter que, par souci de clarté, les auteurs ont choisi la liberté d'utiliser une variable aléatoire binaire. Leur méthode peut être généralisée au-delà de C étant binaire. Comme les auteurs comparent les souris témoins (*wild type*, *WT*) avec les souris souffrant de fibrose cystique (*cystic fibrosis*, *CF*), ce sont ces dénominations qui seront adoptées dans la suite du manuscrit. Chaque combinaison o contribue légèrement à $I(C; O_{Sub})$, qui est égal à la somme des informations fournies par le groupe cas et le groupe contrôle (cf. équation 3.9). Les auteurs appellent cette information marginale pour o et la désigne tel que I_o .

$$I_o = p(WT) \times p(o|WT) \times \log\left(\frac{p(o|WT)}{p(o)}\right) + p(CF) \times p(o|CF) \times \log\left(\frac{p(o|CF)}{p(o)}\right) \quad (3.12)$$

Notons que

$$I(C; O_{Sub}) = \sum_{o \in O_{Sub}} I_o$$

Dans l'algorithme *CRANE* de Chowdhury *et al.* [155], chaque combinaison 0 est appelée un sous-état. *CRANE* cherche et utilise les « sous-états informatifs » afin de former un réseau neuronal qui classe les échantillons dans l'analyse de l'expression des gènes. Pour *ADEMA*, les auteurs ont choisi de classifier les « sous-états » eux-mêmes en se basant sur l'information marginale qu'ils fournissent pour chaque classe. *ADEMA* utilise tous les « sous-états » au lieu de chercher ceux qui sont informatifs. L'approche de Çiçek *et*

al. a été :

- d'utiliser les fonctions *B-Splines* ;
- d'accorder un poids à chaque combinaison de *bin* même quand une combinaison a une faible probabilité de se réaliser.

Ce qui permet à *ADEMA* d'utiliser ces sous-états dans un but de classification au lieu de former une troisième partie dans la classification. Les auteurs Çiçek *et al.* ont exploité les théorèmes suivants :

Théorème 1

$$\begin{aligned}
 & p(WT) \times p(o|WT) \times \log\left(\frac{p(o|WT)}{p(o)}\right) \geq 0 \\
 \text{si } & p(CF) \times p(o|CF) \times \log\left(\frac{p(o|CF)}{p(o)}\right) \leq 0 \\
 \text{et } & p(CF) \times p(o|CF) \times \log\left(\frac{p(o|CF)}{p(o)}\right) \geq 0 \\
 \text{si } & p(WT) \times p(o|WT) \times \log\left(\frac{p(o|WT)}{p(o)}\right) \leq 0
 \end{aligned}$$

Preuve du théorème 1

En suivant le théorème 1, quand un des deux termes est positif (c'est-à-dire qu'il est plus fréquemment observé dans cette classe), l'autre terme est forcé d'être moins que cela (c'est-à-dire qu'il est moins fréquent dans cette classe). Le but est de trouver les niveaux attendus des métabolites pour le groupe cas et le groupe contrôle. Çiçek *et al.* prétendent donc que :

- l'état métabolique attendu se produit dans le groupe cas, mais pas dans le groupe contrôle ;
- l'état métabolique attendu pour qu'il se produise dans le groupe contrôle mais pas dans le groupe cas.

Afin de le faire, les auteurs ont classifié chaque $o \in O_{Sub}$ en une des deux variables aléatoires suivantes. O_{Sub}^{CF} et O_{Sub}^{WT} comme indicateur, respectivement, du groupe cas (*CF*) et du groupe contrôle (*WT*), basés sur I_0 . Pour cela Çiçek *et al.* ont utilisé la fonction de classification suivante, qu'ils ont appelée *Classify Combination* :

$$\begin{cases} o \in O_{Sub}^{WT}, p(WT) \times p(o|WT) \times \log\left(\frac{p(o|WT)}{p(o)}\right) \geq 0 \\ o \in O_{Sub}^{CF}, p(CF) \times p(o|CF) \times \log\left(\frac{p(o|CF)}{p(o)}\right) \geq 0 \end{cases} \quad (3.13)$$

Il est à noter que $I(C; O_{Sub}^{WT}) + I(C; O_{Sub}^{CF}) = I(C; O_{Sub})$

Ensuite, les niveaux attendus pour chaque métabolite dans *Sub* sont calculés. Une prévision pour le groupe cas et une prévision pour le groupe contrôle a été trouvée en utilisant, respectivement, les jeux O_{Sub}^{CF} et O_{Sub}^{WT} . Intuitivement, la probabilité associée à chaque combinaison $o \in O_{Sub}^C$ est définie comme étant

$$E[O_{Sub}^C] = \sum_{o \in O_{Sub}^C} \frac{I_o}{I(C; O_{Sub}^C)} \times o \tag{3.14}$$

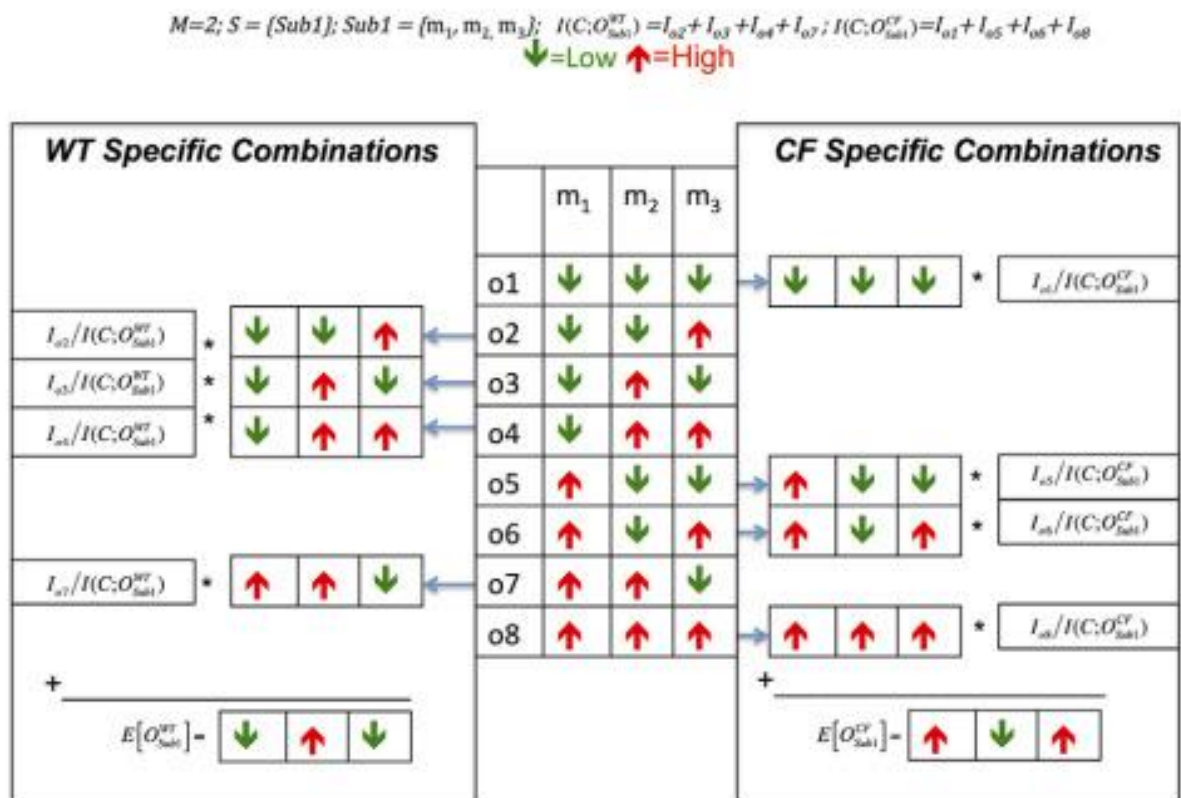


FIGURE 3.21 – Illustration des combinaisons possibles pour les niveaux de métabolites de chaque groupe : cas et contrôle. Trois métabolites sont analysés afin de déterminer les niveaux attendus pour le groupe cas et le groupe contrôle. Dans cet exemple il y a juste un sous-ensemble de métabolites considérés, et il y a 2 bins (par exemple, soit vers le haut, soit vers le bas). En utilisant la fonction « *Classify-Combination* », il est déterminé que les combinaisons o2, o3, o4 et o7 sont contrôle-spécifiques (sur la gauche) et les combinaisons o1, o5, o6 et o8 sont cas-spécifiques (sur la droite). Quand des jeux de combinaisons sont pondérés séparément par leur information marginale, les niveaux attendus pour ces métabolites dans les groupes cas et contrôle sont attendus. (Figure extraite de Çiçek *et al.* [5]).

La figure 3.21 illustre l'essence même d'ADEMA avec un exemple simple. Dans cette illustration, un seul sous-ensemble de métabolites est considéré (par exemple, un seul

EFM).

Il y a trois métabolites dans le sous-ensemble *Sub1*. Deux *bins* sont considérés (par exemple, soit vers le haut, soit vers le bas). Donc, huit combinaisons allant vers le haut et bas pour ces trois métabolites sont possibles. Dans l'exemple hypothétique, les auteurs ont déterminé que les combinaisons *o2*, *o3*, *o4* et *o7* sont contrôle-spécifiques et les combinaisons *o1*, *o5*, *o6* et *o8* sont cas-spécifiques (en utilisant la fonction « *Classify-Combination* »). Ensuite, pour chaque groupe (cas *vs.* contrôle), chaque combinaison est pondérée par l'information marginale qui fournit et somme jusqu'à trouver le niveau d'agrégation. Les niveaux finaux de métabolites trouvés par groupe sont considérés comme les niveaux attendus représentatifs des groupes cas et contrôle pour cette combinaison de métabolites.

Pour rappel, *ADEMA* peut obtenir plus qu'un sous-ensemble de métabolites en utilisant les *EFMs*. Après avoir obtenu $E[O_{Sub}^{CF}]$ et $E[O_{Sub}^{WT}]$ pour chaque *Sub_i*, *ADEMA* effectue la tâche suivante d'unification trouvée par les *EFMs*. Tout d'abord, pour chaque métabolite m_j observé, *ADEMA* trouve tous les *Sub_i* tel que $m_j \in Sub_i$. Cet ensemble de sous-ensembles a été appelé par les auteurs S_{m_j} . Ensuite *ADEMA* trouve le niveau attendu pour chaque m_j , pour chaque classe (cf. équation 16, noté $E[m_j^C]$). Les valeurs réelles sont arrondies aux entiers les plus proches. L'idée est de pondérer le *bin* trouvé par chaque *EFM* avec la valeur de l'information mutuelle fournie.

$$E[m_j^C] = \frac{\sum_{Sub_i \in S_{m_j}} [I(C; O_{Sub_i}) \times E[O_{Sub_i}^C][m_j]]}{\sum_{Sub_i \in S_{m_j}} I(C; O_{Sub_i})} \quad (3.15)$$

La figure 3.22 montre un exemple de ce cas. Dans cet exemple, il y a 8 métabolites dans l'ensemble analysé et 6 sous-ensembles de métabolites qui sont obtenus en utilisant les *EFMs*.

Ensuite, chaque sous-ensemble est évalué comme dépeint dans la figure 3.22. Leurs résultats sont combinés en utilisant l'équation 16 afin d'obtenir un niveau contrôle-spécifique et cas-spécifique pour chaque métabolite. Chaque sous-ensemble de métabolites contient une combinaison différente de métabolites. Pour chaque métabolite, tous les sous-ensembles qui incluent ce métabolite sont déterminés.

Puis, chaque sous-ensemble a un rôle dans la prédiction finale des niveaux de métabolite. Les prédictions sont pondérées par le rapport de l'information mutuelle fournie par le sous-ensemble et divisée par l'information mutuelle fournie par tous les sous-ensembles.

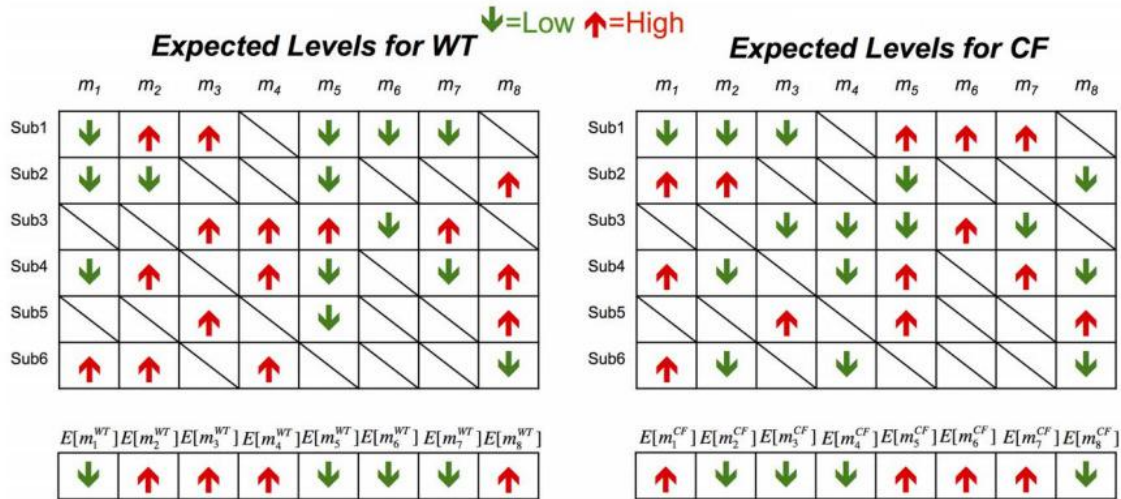


FIGURE 3.22 – Illustration des combinaisons des niveaux attendus trouvés pour chaque *EFM*. Dans cette illustration, 8 métabolites ont été analysés. Il y a 6 sous-ensembles différents de métabolites qui ont été trouvés en utilisant les *EFMs*. Pour chacun d’eux, les niveaux attendus pour le groupe cas (à droite) et le groupe contrôle (à gauche) sont trouvés comme expliqué dans la figure précédente. (Figure extraite de Çicek *et al.* [5]).

Ensuite, plus les sous-ensembles sont informatifs, plus la prédiction est précise. Finalement *ADEMA* trouve le changement dans le groupe cas par rapport au groupe contrôle comme la distance entre $E[m_j^{CF}]$ et $E[m_j^{WT}]$. Le signe de $E[m_j^{CF}] - E[m_j^{WT}]$ montre la direction du changement (augmentation, diminution ou aucun changement). Et l’ampleur montre la significativité du changement.

Pour résumer, *ADEMA* classe d’abord chaque combinaison de *bin o* comme un indicateur de groupe cas ou groupe contrôle selon I_0 .

Pour chaque classe, *ADEMA* détermine la combinaison de *bin* attendue comme une somme pondérée de combinaisons classées. Elles sont pondérées par le pourcentage d’information qu’elles fournissent parmi toutes les combinaisons qui sont indicatives de la classe. Ceci est fait pour chaque sous-ensemble de métabolites considéré.

Finalement, tous les niveaux attendus trouvés pour chaque métabolite sont combinés comme une somme pondérée de sous-ensembles considérés. Ils sont pondérés par le pourcentage d’information mutuelle que chaque sous-ensemble de métabolites fournit parmi tous les sous-ensembles considérés. *ADEMA* trouve un niveau attendu par classe pour chaque métabolite. Ensuite, les niveaux de chaque métabolite peuvent aussi être utilisés pour former le classificateur *ADEMA* à caractériser des individus inconnus.

système de classification d'ADEMA

L'algorithme commence par générer les niveaux attendus pour le groupe cas et le groupe contrôle comme défini dans l'équation 3.16. Le profil des x individuels afin d'être classifiés est échantillonné en utilisant les mêmes valeurs M et k que dans l'échantillon initial.

Une fois l'échantillonnage réalisé, pour chaque combinaison 0 de bin , $p_x(0)$ est trouvé comme montré dans l'équation 3.16 ci-dessous. Finalement, x est classifié en utilisant la fonction suivante, où S est l'ensemble de tous les sous-ensembles de métabolites considérés :

$$\begin{cases} WT, \sum_{Sub_i \in S} \sum_{O_{Sub_i}^{WT} \in O_{Sub_i}^{WT}} \frac{I_0}{I(C; O_{Sub_i}^{WT})} \times p_x(O_{WT}) > \sum_{Sub_i \in S} \sum_{O_{Sub_i}^{CF} \in O_{Sub_i}^{CF}} \frac{I_0}{I(C; O_{Sub_i}^{CF})} \times p_x(O_{CF}) \\ CF, \text{sinon} \end{cases} \quad (3.16)$$

Principalement, la fonction calcule la probabilité pour x d'être dans les combinaisons qui sont indicatives du groupe cas (CF dans le travail de Çiçek *et al.*) et du groupe contrôle (WT), et pondérées par l'information marginale par combinaison, de manière très comparable au calcul des états attendus comme dans l'équation 3.16. S'il est plus probable d'être dans des états « contrôle-indicatifs », alors x est classé pour être groupe contrôle, sinon, il est classé dans le groupe cas.

ADEMA : développement du code sous R

L'algorithme *ADEMA* créé par Çiçek *et al.* a été implémenté en langage C# et .NET Framework 4.0. Nous avons, à partir de l'article consacré à *ADEMA*, et en collaboration avec son auteur, choisi d'adapter *ADEMA* en langage R (R version 3.2.3 [6]). En effet, ce langage a été particulièrement conçu pour le traitement statistique des données. Cette adaptation a été réalisée dans un environnement Windows (Windows 7) avec l'éditeur de texte Tinn-R (Tinn-R version 3.0.3.6). Ci-dessous, la figure 3.23 illustre l'organisation du code :

Pour des raisons de confidentialité, et de propriété, nous ne pouvons pas mettre le code dans son intégralité. Cependant, voici l'organisation du script :

```

70 }
71 if (!require("prob")) #for probabilities calculation
72 {
73   install.packages("prob", dependencies = TRUE)
74   library(prob)
75 }
76
77 #####
78 # Working directory #
79 #####
80
81 setwd("C:/Users/Standard/Documents/Documents_S_Battini/ADEMA") # Dropbox
82 # Stephanie
83 source("SourceADEMA.R")
84
85 #####
86 # Calling functions #
87 #####
  
```

```

2 #####
3 # Function to read the matrix #
4 #####
5 ReadMatrix <- function(filename)
6 {
7   data <- read.table(sep=";", filename, header=T)
8   return(data)
9 }
10
11 #####
12 # Function for probabilities calculation #
13 #####
14 ProbaMatrix <- function(entry, mx, mn, M, R)
15 {
16   result = rep(0, M)
17   diff = mx - mn
18   if (diff == 0)
19 {
  
```

FIGURE 3.23 – Capture écran montrant l’organisation du code permettant de réaliser l’analyse *ADEMA* avec le logiciel *R* [6].

- un fichier « Main » dans lequel toutes les fonctions sont appelées (160 lignes) ;
- un fichier « SourceADEMA » dans lequel toutes les fonctions sont définies (650 lignes).

ADEMA dans les glandes parathyroïdes

Dans le but de comparer :

- les patients présentant une *HPT1* et les patients présentant une *HPT* rénale ;
- les patients présentant une *PUG* et les patients présentant une *PMG* dans un contexte d’*HPT1*.

les groupes suivants de métabolites ont été définis :

- choline, phosphocholine, glycérophosphocholine ;
- glutamine, glutamate ;

- glucose, alanine, lactate ;
- succinate, fumarate ;
- glutathion, glutamate ;
- glutathion, ascorbate.

ADEMA dans les adénocarcinomes pancréatiques

Dans le but de comparer :

- les échantillons de parenchyme pancréatique provenant de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante et les échantillons de ceux n'en ayant pas reçue dans un contexte d'adénocarcinome pancréatique ;
- les échantillons d'adénocarcinome pancréatique provenant de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante et les échantillons de ceux n'en ayant pas reçue dans un contexte d'adénocarcinome pancréatique ;
- les patients appelés dans la littérature longs et courts-survivants dans un contexte d'adénocarcinome pancréatique.

les groupes suivants de métabolites ont été définis :

- choline, phosphocholine, glycérophosphocholine, éthanolamine ;
- glycérol, glucose ;
- glucose, lactate ;
- aspartate, thréonine ;
- glucose, glycine ;
- aspartate, taurine ;
- aspartate, succinate ;
- glucose, ascorbate, glycine, glutamate ;
- glutamate, glutamine ;
- glutamate, glutamine, glycine ;
- glutamate, glycine, créatine ;
- tyrosine, phenylalanine.

ADEMA dans les TIPMP

Dans le but de comparer :

- les patients présentant un risque moyen de dégénérescence en cancer et les patients présentant une TIPMP dégénérée en cancer dans un contexte de TIPMP ;
- les patients présentant un risque fort de dégénérescence en cancer et les patients

présentant une *TIPMP* dégénérée en cancer dans un contexte de *TIPMP* ;

- les patients présentant un risque moyen de dégénérescence en cancer et les patients présentant un risque fort de dégénérescence en cancer dans un contexte de *TIPMP*.

les groupes suivants de métabolites ont été définis :

- choline, phosphocholine, glycérophosphocholine, éthanolamine ;
- choline, bêtaïne, méthionine ;
- tyrosine, phenylalanine ;
- glycérol, glucose ;
- glucose, lactate ;
- aspartate, thréonine, isoleucine ;
- tryptophane, alanine ;
- alanine, valine, lactate ;
- taurine, hypotaurine, aspartate, méthionine ;
- 3-hydroxybutyrate, succinate ;
- glutamate, glutamine ;
- fumarate, succinate ;
- aspartate, asparagine ;
- isobutyryl-L-carnitine, valine ;
- aspartate, lysine.

Pour la discrétisation des observations des métabolites, nous avons établi un nombre de niveaux (M) comme étant égal à 6 et un nombre de niveaux pouvant être attribués à l'observation (k) comme étant égal à 4. En utilisant les groupes de métabolites et paramètres mentionnés ci-dessus, un niveau de métabolite attendu pour les cas et pour les contrôles est obtenu par métabolite. La direction du changement des métabolites est obtenue en comparant les niveaux attendus. Cette méthode a été utilisée pour le travail sur l'hyperparathyroïdie, les adénocarcinomes du pancréas et les *TIPMP*.

3.3.4.5 Analyses statistiques univariées

Le test U de Mann-Whitney a été utilisé afin de comparer les concentrations des métabolites. Ces analyses statistiques univariées ont été réalisées avec le logiciel R [6].

3.3.4.6 Analyses de survie

Les courbes ROC et Kaplan-Meier ont été utilisées afin de réaliser une analyse de survie chez des patients souffrant d'un adénocarcinome pancréatique (étude des courts et longs-survivants. Ces analyses permettent d'évaluer l'utilité clinique de la quantification des métabolites, et ont été réalisées avec le logiciel R [6].

3.3.5 Analyses histologiques

Une fois toutes les analyses *RMN HRMAS* effectuées, une analyse histologique est réalisée pour chaque insert de biopsie. Ceci nous permet de contrôler histologiquement le contenu de nos inserts.

Dans l'étude sur les glandes parathyroïdes hypersécrétantes, ont été relevés :

- le pourcentage de cellules parathyroïdiennes ;
- le pourcentage d'éventuelles nécroses.

Dans le cadre du travail sur les adénocarcinomes pancréatiques, ont été relevés :

- le nombre d'éléments lymphocytaires ;
- le pourcentage d'infiltration tumorale ;
- le pourcentage de stroma ;
- le pourcentage d'acini ;
- le pourcentage de nécrose ;
- le pourcentage d'adipocytes ;
- le pourcentage de mucus ;
- le pourcentage de nerfs.

Pour commencer, les inserts sont coupés afin de récupérer le matériel à analyser. Ensuite, le matériel histologique est fixé, inclus, coupé et coloré (Hématoxyline-Eosine (*HE*)) afin de pouvoir l'observer au microscope. Afin d'avoir une vision globale de la morphologie des tissus, la coloration retenue a été la coloration à l'*HE*.

Chapitre 4

Résultats et Discussion

4.1 Les glandes parathyroïdes

4.1.1 Généralités

Les glandes parathyroïdes sont au minimum au nombre de 4, pèsent de 30 à 50 mg ($6 \times 4 \times 2\text{mm}$) chacune. Pour 80 % des sujets elles sont plaquées contre la face postérieure de la thyroïde comme illustré sur la figure. 4.1. Il y a 2 glandes parathyroïdes inférieures, appelées *P3*, droite et gauche (*P3D* et *P3G*) et 2 glandes parathyroïdes supérieures, appelées *P4*, droite et gauche (*P4D* et *P4G*).

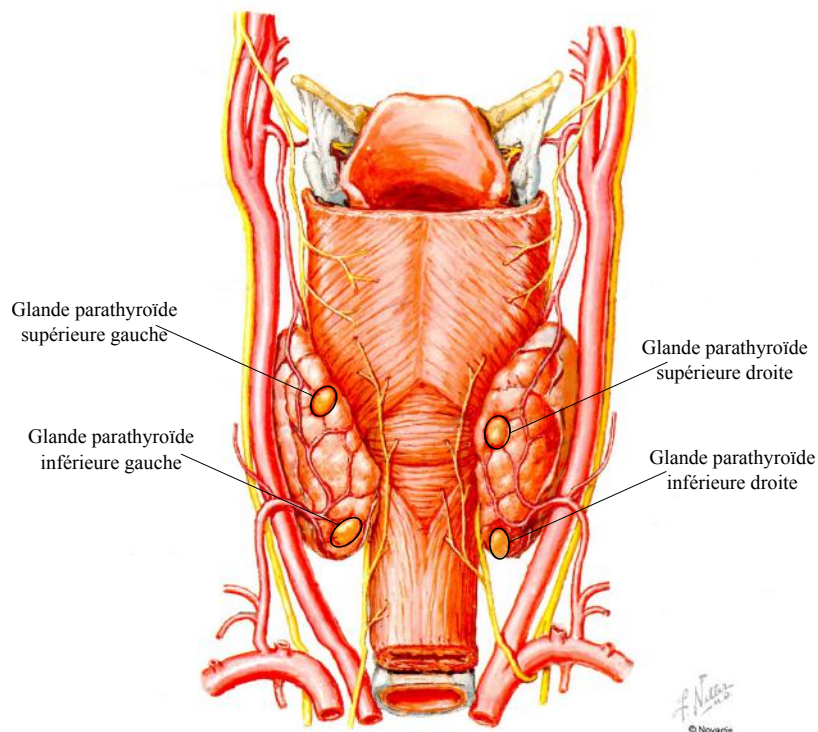


FIGURE 4.1 – Anatomie des glandes parathyroïdes d’après Frank H. Netter, Atlas d’anatomie humaine [7].

Les parathyroïdes sécrètent la parathormone (*PTH*) qui est un polypeptide de 84 acides aminés. La *PTH* régule le calcium sérique. Lors d’une hypocalcémie, il y a sécrétion de *PTH*. La *PTH* permet la mobilisation du calcium osseux : elle augmente le passage du Ca^{2+} de l’os vers le plasma. Elle est responsable de l’augmentation de la réabsorption rénale du Ca^{2+} et de l’excrétion de phosphore. Elle est également responsable de l’augmentation de l’absorption intestinale du Ca^{2+} . Elle est enfin responsable de la

production de la $1\alpha 25 - (OH)_2D_3$ (forme biologique la plus active de la vitamine *D*). L'hyperparathyroïdie primaire (*HPT1*) est la 3^{ème} maladie endocrinienne en fréquence après l'hyperthyroïdie et le diabète. Elle concerne environ 0,3 % de la population.

L'*HPT1* est classiquement associée à un calcium sérique total élevé (après la concentration d'albumine) et une élévation de la parathormone (*PTH*) sérique. Dans quelques cas, la concentration de *PTH* peut être normale mais en discordance avec l'hypercalcémie. L'hyperparathyroïdie secondaire (*HPT2*) est causée par une hyperplasie compensatoire. Si elle n'est pas traitée, l'hyperplasie secondaire peut «s'autonomiser» en hyperparathyroïdie tertiaire (*HPT3*).

4.1.2 Problématique

La chirurgie est le seul traitement curatif de l'*HPT1*. Selon de récentes recommandations [156], la chirurgie est indiquée chez les patients de moins de 50 ans, chez les patients symptomatiques et chez les patients asymptomatiques qui remplissent quelques critères. Bien que l'adénome parathyroïdien unique (pathologie uniglandulaire, *PUG*) soit la forme la plus fréquente, la pathologie multiglandulaire (*PMG*) avec des adénomes multiples ou une hyperplasie multiglandulaire est présente dans 15-20 % des cas. La chirurgie conventionnelle de l'*HPT1* repose sur l'inspection des 4 glandes parathyroïdes lors d'une exploration cervicale bilatérale. Ces dernières années, un mouvement vers les opérations ciblées a été proposé s'appuyant sur la caractérisation précise des glandes parathyroïdes (*PUG vs. PMG*) par imagerie préopératoire. Cependant, les études sur l'imagerie préopératoire montrent une performance limitée dans la distinction entre *PUG* et *PMG* (précision de prévision des *PUG* de l'ordre de 70-80 %) [157].

Dans le but de continuer à réduire le risque d'échec chirurgical, plusieurs institutions pratiquent en routine le dosage de la *PTH* per-opératoire en complément de la chirurgie. Cependant, le dosage de la *PTH* en per-opératoire n'a pas de définition consensuelle dans la prévision du traitement chirurgical et il est toujours associé au risque de pratiquer une exploration cervicale bilatérale qui peut ne pas avoir les résultats escomptés. Au-delà d'un marqueur sérique une meilleure caractérisation du tissu parathyroïdien serait d'un intérêt tout particulier dans l'*HPT1*.

L'examen médical et l'analyse microscopique réalisée en extemporanée pendant la chirur-

gie ne sont pas toujours fiables. Par conséquent, il y a un besoin de trouver des biomarqueurs précis qui pourraient aider les chirurgiens afin de distinguer les *PUG* des *PMG* par *RMN HRMAS*. Les buts de cette étude étaient :

- d'évaluer si les profils métabolomiques étaient différents entre l'*HPT1* et les *HPT* rénales (*HPT2* et *HPT3*);
- de comparer les *PUG* avec les *PMG* chez les patients présentant une *HPT1* en utilisant une analyse métabolomique.

4.1.3 Résultats et discussion

4.1.3.1 Préambule

4.1.3.1.1 Population de patients Quarante-trois échantillons de tissu parathyroïdien hypersécrétant ont été analysés et rétrospectivement sélectionnés à partir de 32 patients présentant une hyperparathyroïdie (cf. fig.4.2) et étant opérés entre janvier 2013 et novembre 2014 dans 2 centres académiques de tumeurs endocrines (Hôpital Universitaire de Brabois à Nancy et Hôpital Universitaire de La Timone à Marseille). Seuls les patients qui remplissaient les critères suivants ont été inclus dans notre étude :

- diagnostic d'hyperparathyroïdie (*HPT1 vs. HPT2 vs. HPT3*);
- six mois de suivi après la parathyroïdectomie chez les *HPT1* dans le but de distinguer les *PUG* des *PMG*;
- absence d'exposition aux radiations antérieures;
- glandes parathyroïdes collectées juste après résection et congelées dans l'azote liquide à $-196^{\circ}C$ avant stockage à $-80^{\circ}C$.

Un consentement écrit a été obtenu pour tous les patients inclus dans cette étude. Pour ce travail, les échantillons tissulaires ont été obtenus depuis les tumorothèques de Nancy (n BB-0033-00035) et de Marseille (AP-HM, AC 2013-1786), au sein des Hôpitaux Universitaires.

4.1.3.1.2 État de la maladie Pour l'*HPT1*, la *PUG* était définie quand une seule glande anormale était retirée et le patient guéri (normalisation du calcium sérique dans les 6 mois suivant la parathyroïdectomie). Quand plus d'une glande était impliquée histologiquement (adénome ou hyperplasie), le patient était considéré atteint de *PMG*, en

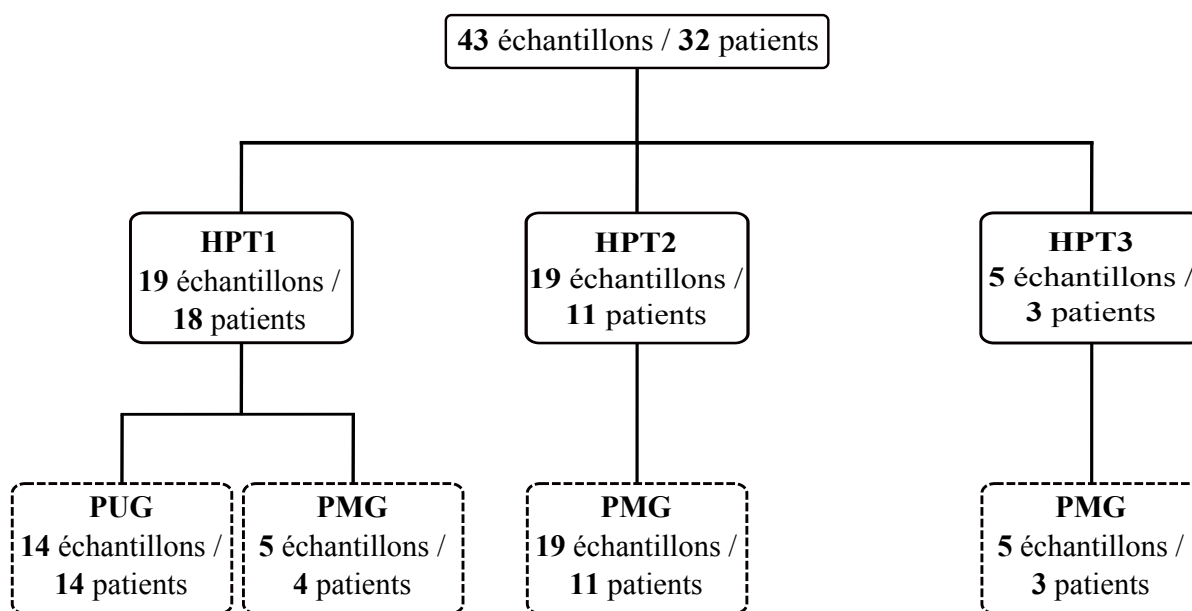


FIGURE 4.2 – Population de patients étudiée et échantillons tissulaires examinés.

incluant les hyperplasies des glandes parathyroïdes multiples. La population de patients et les caractéristiques des glandes sont détaillées dans la table.4.1.

Patients	Sexe	Age	Pathologie	Localisation	Masse (g)
1	M	54	HPT1-PUG	P3G	0,080
2	M	62	HPT1-PUG	P3D	1,350
3	F	56	HPT1-PUG	P4G	1,390
4	F	76	HPT1-PUG	P4G	ND
5	F	61	HPT1-PUG	P4D	0,250
6	F	66	HPT1-PUG	P3D	2,230
7	F	59	HPT1-PUG	P4G	ND
8	F	55	HPT1-PUG	P4D	3,400
9	F	55	HPT1-PUG	P4D	0,600
10	F	65	HPT1-PUG	P3G	ND
11	F	71	HPT1-PUG	P3G	0,320
12	F	66	HPT1-PUG	P4G	1,8880
13	F	67	HPT1-PUG	P3D	ND
14	F	57	HPT1-PUG	P3G	9,600
15	H	77	HPT1-PMG	P4G	3,800
16	F	78	HPT1-PMG	P4G	ND

17	F	79	HPT1-PMG	P3G	ND
18	F	67	HPT1-PMG	P4D P4G	1,000 ND
19	F	40	HPT2-PMG	P4D P3G P4G	0,125 0,316 0,282
20	H	59	HPT2-MGD	P3D P3G	0,700 0,650
21	H	56	HPT2-PMG	P4D P3D P3G	0,690 0,150 0,230
22	H	45	HPT2-PMG	P3G	ND
23	H	37	HPT2-PMG	P3D P4D	ND ND
24	H	32	HPT2-PMG	P3G	ND
25	H	54	HPT2-PMG	P3D	0,722
26	H	30	HPT2-PMG	P3D P4G	ND ND
27	F	70	HPT2-PMG	P3D P4G	0,840 0,660
28	F	39	HPT2-PMG	P4D	ND
29	F	58	HPT2-PMG	P3D	0,200
30	F	62	HPT3-PMG	P4G P4D	0,063 0,780
31	H	56	HPT3-PMG	P3G P4G	1,400 0,150
32	F	60	HPT3-PMG	P4D	0,200

TABLE 4.1: Caractéristiques des 43 échantillons provenant de 32 patients présentant une hyperparathyroïdie. F, femme; H, homme; HPT1, hyperparathyroïdie primaire; HPT2, hyperparathyroïdie secondaire; HPT3, hyperparathyroïdie tertiaire; PUG, pathologie uniglandulaire; PMG, pathologie multiglandulaire; P3, glande parathyroïde inférieure; P4, glande parathyroïde supérieure; D, droite; G, gauche; ND, non déterminée.

4.1.3.2 Résultats

4.1.3.2.1 Échantillons tissulaires Par conséquent, 19 échantillons ont été obtenus de 18 patients présentant une *HPT1*, 19 échantillons provenant de 11 patients présentant une *HPT2* et 5 échantillons de 3 patients présentant une *HPT3*. Parmi les 19 échantillons obtenus des patients présentant une *HPT1*, 14 étaient classés comme *PUG* alors que les 5 autres avaient une *PMG*. Toutes étaient décrites comme des glandes hyperplasiques par le pathologiste. Tous les patients étaient guéris 6 mois après l'opération.

4.1.3.2.2 Qualité des spectres Tous les spectres obtenus des 43 échantillons analysés étaient de grande qualité sans aucun signe de nécrose tissulaire. La région spectrale entre 0 – 2,32 ppm a été volontairement exclue de l'analyse à cause de l'important recouvrement du signal dû à la présence de signaux complexes des acides gras. Le spectre *RMN HRMAS* représentatif de chaque classe d'échantillon est montré en figure 4.3).

Un total de 25 métabolites a été identifié au sein de la région spectrale 2,32 – 6,54 ppm depuis les spectres obtenus depuis les 43 échantillons (cf. fig.4.3 et table.3.1, Chapitre 1). Les spectres obtenus des différentes glandes au sein d'un même patient montrent un profil similaire.

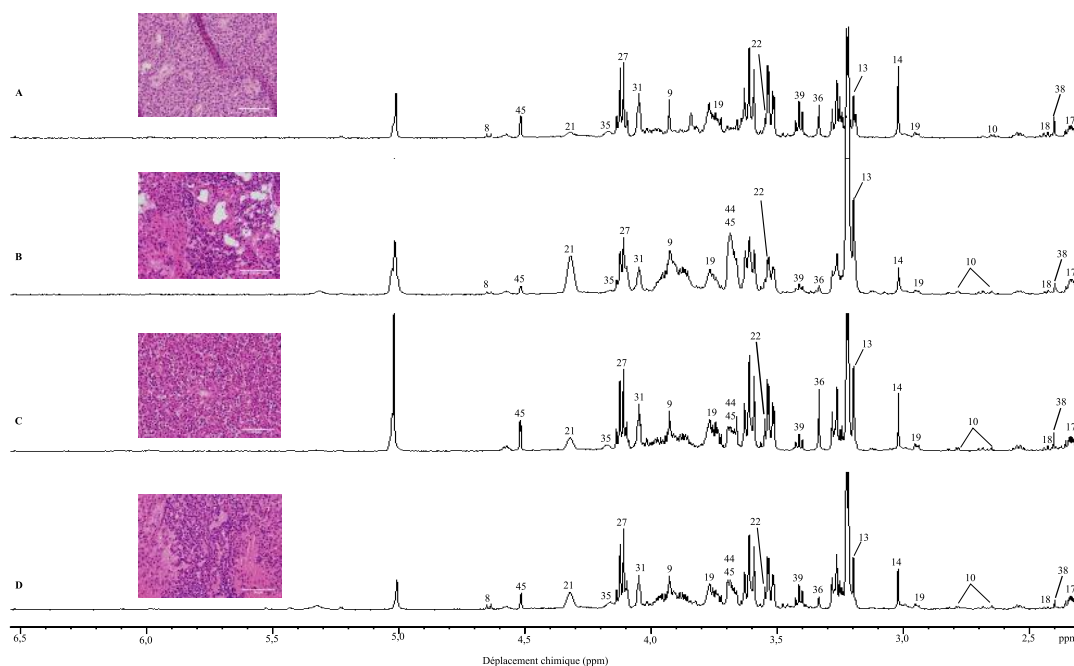


FIGURE 4.3 – Spectre 1D ^1H RMN HRMAS obtenu de l'analyse de glandes parathyroïdes hypersécrétantes. (A) *PUG HPT1*; (B) *PMG HPT1*; (C) *PMG HPT2*; (D) *PMG HPT3*. Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Pour des raisons d'affichage, l'amplitude du pic du lactate à 4,09 ppm et du pic de la glycérophosphocholine à 3,21 ppm, a été graphiquement réduite. Les identifications des métabolites sont données dans la table 3.1 au Chapitre 3. Les caractéristiques histologiques des glandes parathyroïdes hypersécrétantes correspondant à chaque spectre sont dépeintes dans le côté gauche de la figure (HE \times 400 ; échelle, 50 μm). Les images ont été calibrées avec le logiciel ImageJ [3].

4.1.3.2.3 *HPT1 vs. HPT rénale*

Résultats de l'OPLS – DA Quarante-trois échantillons ont été étudiés dans ce modèle à deux classes. Dix-neuf échantillons étaient obtenus de patients avec une *HPT1* et 24 de patients avec une *HPT* rénale (11 patients/19 échantillons *HPT2* et 3 patients/5 échantillons *HPT3*). L'ACP a montré une population homogène sans aucune valeur atypique. Les 2 classes étaient clairement séparées par l'OPLS – DA à deux composantes qui était basée sur les *variable importance for the projection (VIP)*. A savoir que la valeur *VIP* est une somme pondérée des carrés de points de la *PLS*, qui prend en compte la variance explicative de chaque dimension *OPLS*. Les valeurs *VIP* ont été utilisées pour identifier les variables contribuant à la séparation des groupes (cf. fig.4.4) montrant une

représentation précise des données et une grande qualité d'ajustement ($R^2Y = 0,85$) et de prédiction ($Q^2 = 0,63$). Un niveau élevé de glucose, ascorbate, phosphocholine, choline, taurine, GSH, myo-inositol et glutamate a été relevé dans les échantillons provenant de patients présentant une *HPT1*. Au contraire, une concentration élevée de fumarate, sérine, glycérophosphocholine, aspartate et glutamine a été montrée dans les échantillons provenant de patients présentant une *HPT* rénale.

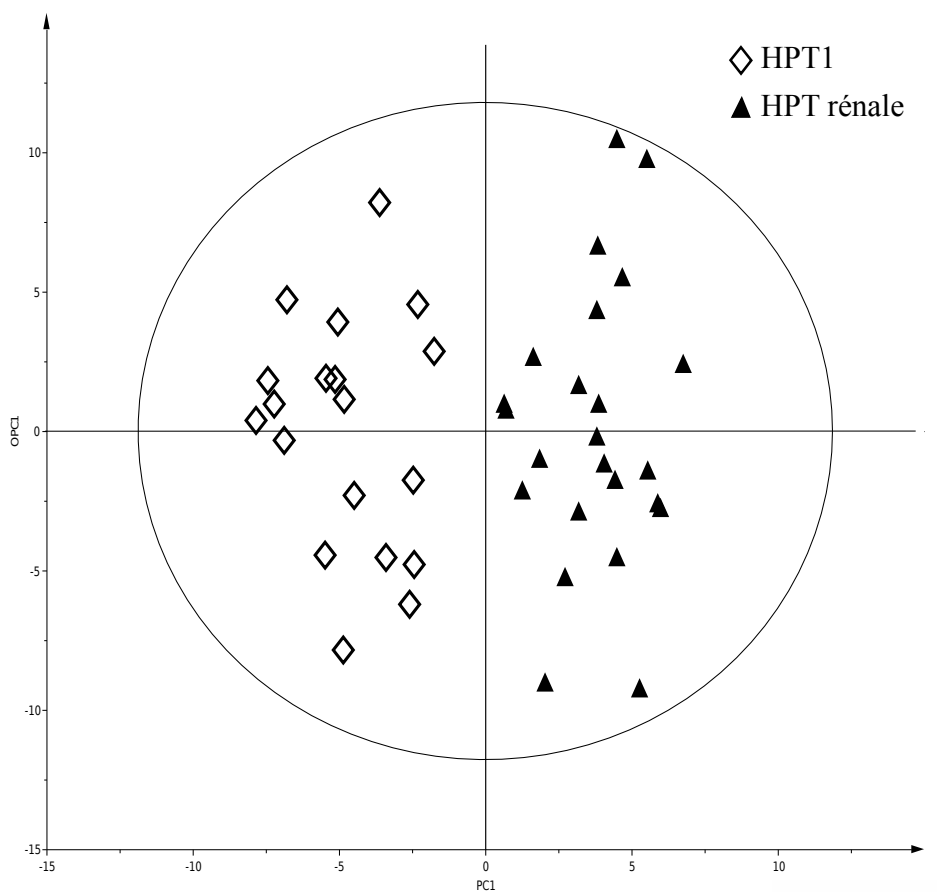


FIGURE 4.4 – Résultats de l'OPLS – DA à deux composantes basée sur les métabolites *VIP* : Modèle à deux classes incluant 43 échantillons dont 19 échantillons provenant de patients avec une *HPT1* et 24 échantillons provenant de patients avec une *HPT* rénale. Une nette séparation entre les différentes classes est visible dans ce modèle.

Résultats de l'analyse de réseaux Quand les données ont été analysées en utilisant l'algorithme *ADEMA*, un niveau plus élevé de phosphocholine, succinate alanine, glucose, ascorbate, GSH et glutamate était prédit dans les échantillons provenant de patients présentant une *HPT1*. Finalement, la glycérophosphocholine, la taurine, l'acétate, l'aspartate, la valine, le lactate, le myo-inositol et la créatine étaient prédits comme étant équivalents dans les deux groupes (cf. fig.4.5).

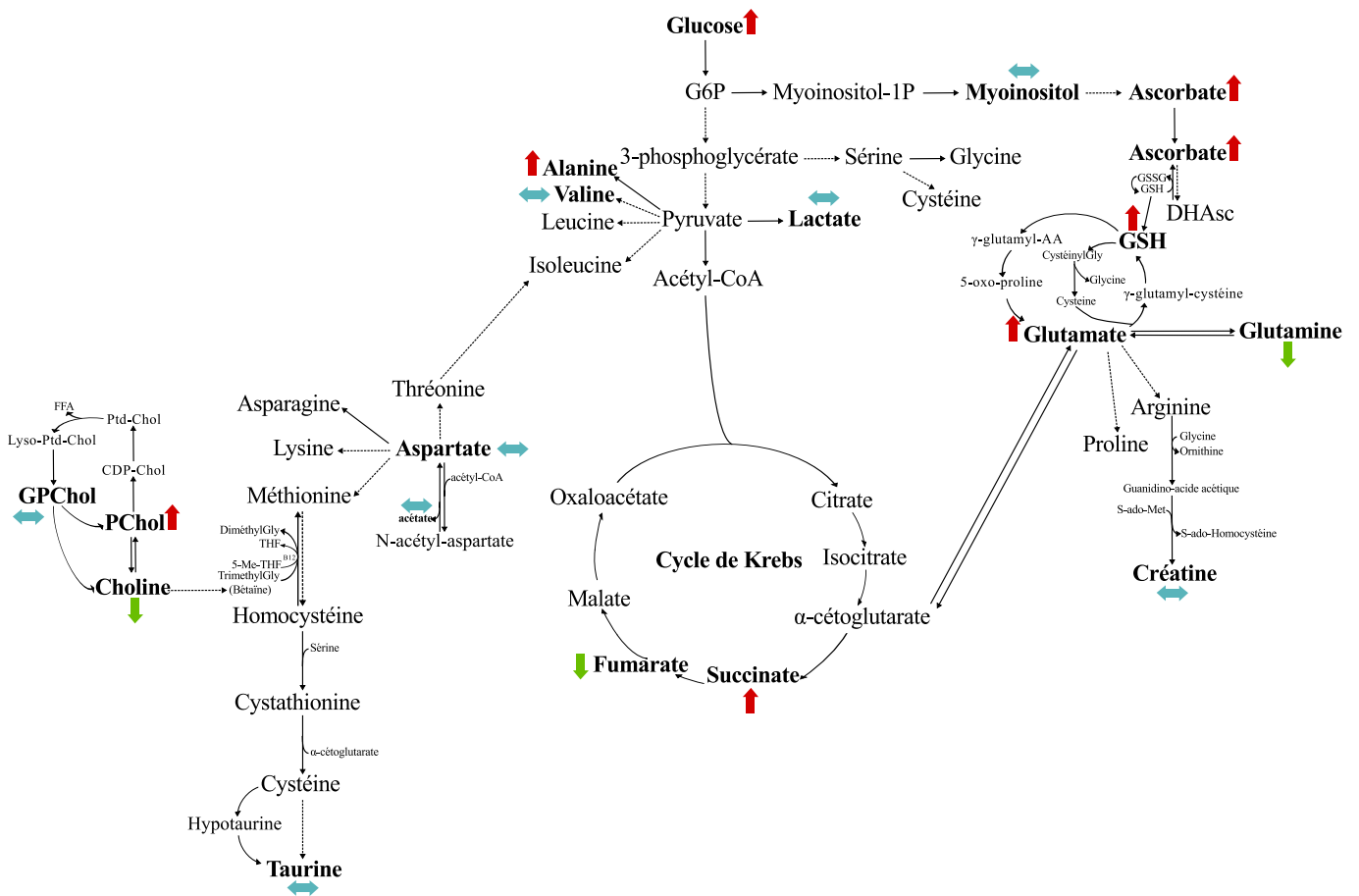


FIGURE 4.5 – Analyse du réseau métabolique selon l’algorithme *ADEMA* comparant les échantillons provenant de patients présentant une *HPT1* (n = 19) et les échantillons de patients présentant une *HPT* rénale (n = 24). Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d’augmenter ou de diminuer dans les échantillons provenant de patients présentant une *HPT1*, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes.

4.1.3.2.4 *PUG vs. PMG* au sein de l’*HPT1*

Résultats de l’*OPLS-DA* Quatorze échantillons de patients avec une *PUG* étaient secondairement comparés à 5 échantillons de patients avec une *PMG*. Aucune valeur atypique n’a été montrée par l’ACP. Cette population était aussi homogène. Une analyse *OPLS-DA* à deux composantes basée sur les *VIP* (cf. fig. 4.6) a clairement séparé les deux classes de tissus analysés ($R^2Y = 0,96$, $Q^2 = 0,55$) révélant une concentration élevée de fumarate, glucose, ascorbate, myo-inositol, glycine, scyllo-inositol et de choline dans les échantillons provenant de patients avec une *PUG*. D’autre part, les échantillons provenant de patients avec une *PUG* ont révélé un plus haut niveau de glutamate, lactate,

taurine, GSH et d'aspartate en comparaison avec les échantillons provenant de patients avec une *PMG*.

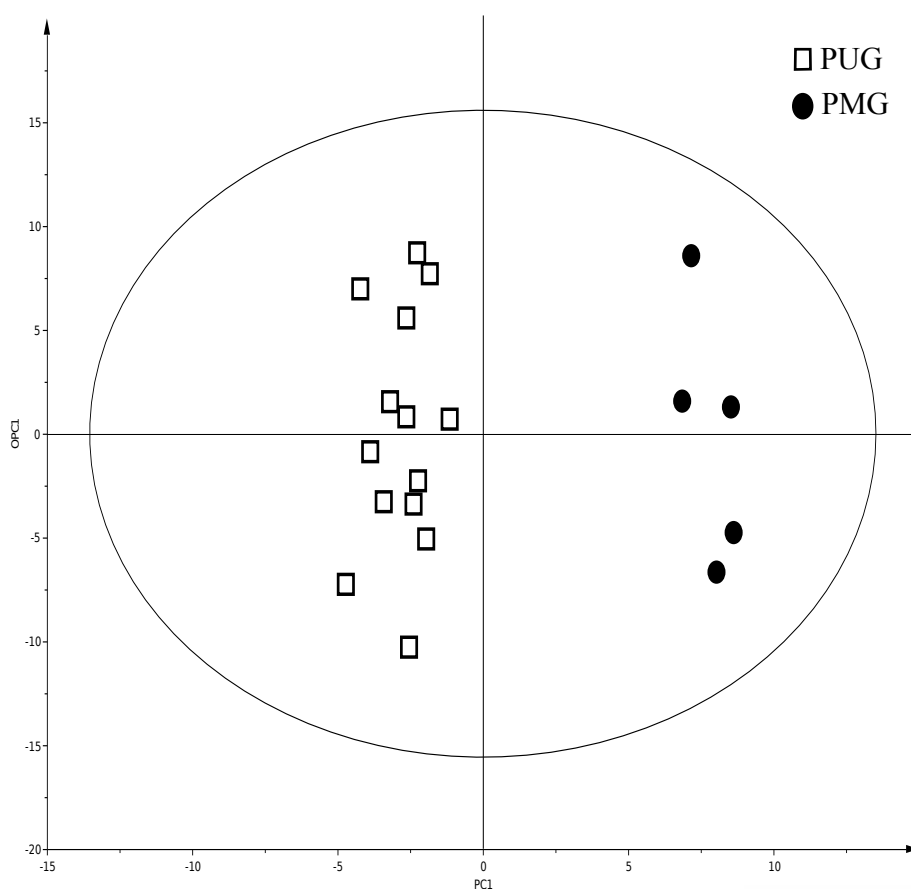


FIGURE 4.6 – Résultats de l'OPLS-DA à deux composantes basée sur les métabolites *VIP* : Modèle à deux classes incluant 14 et 5 échantillons respectivement de patients avec une *PUG* et une *PMG*, provenant de patients présentant une *HPT1*. Une nette séparation entre les différentes classes est visible dans ce modèle.

Résultats de l'analyse de réseaux En utilisant l'algorithme *ADEMA*, le réseau métabolique a mis en évidence la prédiction d'un niveau plus élevé de phosphocholine, choline, glycérophosphocholine, fumarate, succinate, lactate, glucose, glutamine et ascorbate dans les échantillons provenant de patients avec une *PUG* (cf. fig.4.7).

De plus, le modèle prédit avec précision un niveau plus bas d'alanine, de glutamate et de GSH dans les échantillons de patients avec une *PUG*. Finalement, la taurine, l'acétate, l'aspartate, la valine, le myo-inositol et la créatine sont prédits comme étant équivalents entre les échantillons provenant de patients avec une *PUG* et avec une *PMG*.

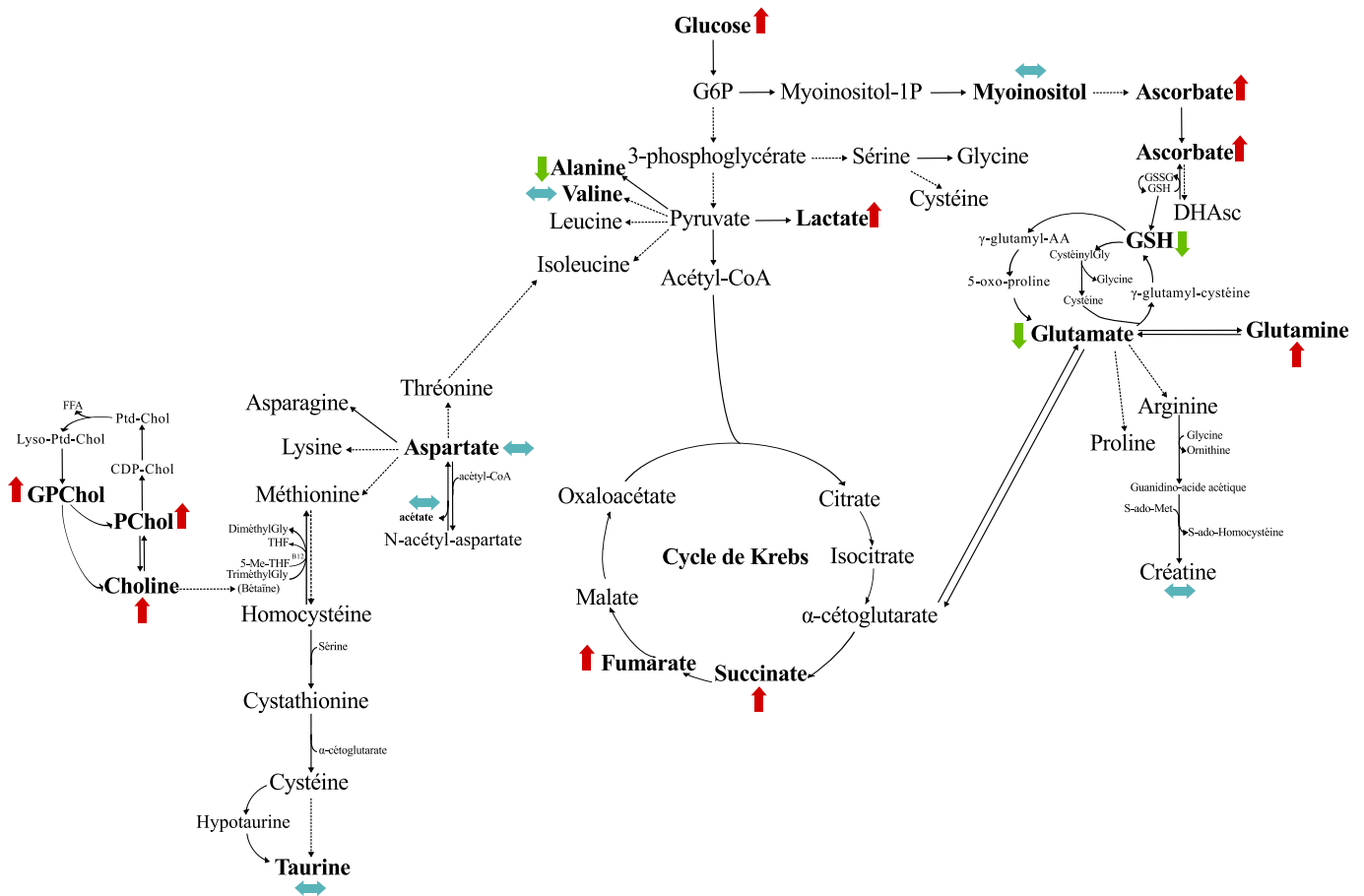


FIGURE 4.7 – Analyse du réseau métabolique selon l’algorithme *ADEMA* comparant les échantillons provenant de patients avec une *PUG* (n = 19) et les échantillons provenant de patients avec une *PMG* (n = 5), chez les patients présentant une *HPT1*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d’augmenter ou de diminuer dans les échantillons provenant de patients avec une *PUG*, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes.

4.1.3.3 Discussion

A notre connaissance, c’est la première étude qui a évalué le métabolome des glandes parathyroïdes hypersécrétantes dans le contexte des troubles d’hypersécrétion des glandes parathyroïdes. Les principales conclusions qui peuvent être tirées de cette étude préliminaire :

- il y a des différences entre l’*HPT1* et les *HPT* rénales d’un point de vue métabolomique ;
- les *PUG* et *PMG* peuvent être distinguées par profilage métabolomique et évaluées avec précision par notre modèle ;
- cette approche nous fournit des éclaircissements sur la relation entre les voies métaboliques et les troubles des glandes parathyroïdes.

Il est très largement accepté que l'exploration bilatérale des glandes parathyroïdes n'est plus la seule solution pour tous les patients présentant une *HPT1*, et ceux présentant une *PUG* dans des explorations par imagerie peuvent être aussi des candidats pour une approche ciblée. La scintigraphie parathyroïdienne (*SP*) et l'échographie des glandes parathyroïdes sont les approches privilégiées répertoriées par les chirurgiens endocriniens afin de sélectionner les candidats pour une approche ciblée [158], [159]. La valeur prédictive positive pour une *PUG* dans les cas de résultats concordants entre l'échographe et la scintigraphie parathyroïdienne pour une glande unique anormale est d'environ 90 %. Dans le but de réduire le risque d'échec chirurgical, plusieurs institutions pratiquent le dosage de la *PTH* per-opératoire [160]. Selon les critères de Miami [161], une diminution de 50 % du taux de *PTH* dans les 10 minutes après la résection de la glande suggère une chirurgie curatrice. Cependant, cette pratique peut quelques fois rapporter des résultats inexacts [162], [163], [164], [165], aussi la concentration de *PTH* peut diminuer même en présence de *PMG*. Le dosage de la *PTH* per-opératoire pourrait donc mener à tort à une chirurgie bilatérale. Finalement, un des principaux inconvénients du dosage de la *PTH* per-opératoire est que sa précision est largement dépendante du niveau de la *PTH* per-opératoire, de la taille des glandes et de la sensibilité du tissu parathyroïdien au calcium sérique. Au-delà du dosage de la *PTH* en per-opératoire, l'utilisation d'un marqueur plus spécifique étroitement lié à la physiopathologie de la pathologie des glandes parathyroïdes serait d'un intérêt particulier. Puisque la spectroscopie *RMN HRMAS* permet une rapide caractérisation du tissu intact, cette technique pourrait être utilisée comme une méthode per-opératoire. Dans notre hôpital, une analyse per-opératoire en temps réel est pratiquée pour les gliomes en neurochirurgie (Projet ExtempoRMN). Le transport rapide des échantillons est réalisé par un système pneumatique.

La préparation des échantillons est facile et rapide puisque cela ne prend pas plus de 2 minutes en prenant en compte la congélation de la biopsie dans l'azote liquide et l'insertion d'environ 20 mg de tissu parathyroïdien dans l'insert. L'analyse *RMN HRMAS* prend 10 minutes pour les réglages, 10 minutes d'acquisition. L'analyse des données est aussi très rapide (moins de 10 minutes). Si c'est confirmé, cette approche pourrait être utilisée en routine clinique pour la classification des *PUG vs. PMG* et même coexister avec le dosage per-opératoire de la *PTH*. De plus, le coût d'une analyse d'un échantillon est estimé inférieur à 50 euros.

Basé sur nos résultats préliminaires, il est attendu que le profilage métabolomique serait capable de faire la distinction entre les *PUG* et les *PMG*. La comparaison entre le dosage per-opérateur de la *PTH* et la *RMN HRMAS* pourrait être d'un intérêt tout particulier chez les patients présentant des résultats d'imagerie concordants mais aussi dans les cas de doutes ou de résultats d'imagerie discordants. La *RMN HRMAS* fournit aussi de nouvelles informations sur les liens entre les voies métaboliques et les troubles des glandes parathyroïdes. Dans le cadre de l'*HPT1*, nous avons mis en évidence une concentration plus élevée de myo-inositol, scyllo-inositol, choline, phosphocholine et glycérophosphocholine dans les *PUG* (tous des adénomes) que dans les glandes hyperplasiques. Ces métabolites sont des composantes structurelles des membranes cellulaires [166]. Le Myo-inositol est le précurseur du phosphatidylinositol, un constituant des membranes phospholipidiques et est impliqué dans les voies de signalisation cellulaires [167]. De façon intéressante, de récentes études ont montré que la tomographie en émission de positons (*TEP*) à la ^{18}F -fluorocholine est une méthode d'imagerie très prometteuse dans la localisation des adénomes parathyroïdiens [168], [169], [170], [171], [172], [173]. Nos résultats sont en accord avec ces observations et pourraient représenter le substrat biologique et la justification de l'utilisation de la *TEP* à la ^{18}F -fluorocholine dans l'hyperparathyroïdie. De plus, une plus grande quantité de succinate et fumarate a été montrée par l'analyse de réseaux au sein des *PUG* en comparaison aux *PMG*, suggérant une activité augmentée du cycle de Krebs. En revanche, une plus grande quantité de glutamate, de GSH et d'ascorbate, qui agissent comme des antioxydants, était mise en évidence dans les *PMG*. Les glandes hyperplasiques des *HPT1* ont également une plus grande quantité de GSH, d'aspartate et de glutamate, en comparaison à celles d'*HPT* rénales.

Nous reconnaissons des limites à cette présente étude. D'abord, il y a un nombre limité de patients inclus dans notre étude ainsi que d'échantillons analysés. Nous croyons que ces données sont préliminaires et devraient être validées dans des études ultérieures. Ensuite, les patients souffrant d'hyperparathyroïdie primaire et d'une pathologie multiglandulaire peuvent avoir des adénomes multiples dans 5-7 % des cas. Cette partie de patients est considérée comme étant difficile à diagnostiquer en utilisant le dosage de la *PTH* per-opérateur. Mais cette difficulté pourrait aussi être similaire en utilisant la spectroscopie *RMN HRMAS*. Cependant, les patients inclus avec une pathologie multi-glandulaire n'avaient pas d'adénomes multiples qui auraient pu mener à de fausses conclusions à

propos de cette étude. Enfin, nous reconnaissons qu'une étude comparative d'efficacité devrait être pratiquée en temps réel pour évaluer le dosage de la *PTH* en parallèle de la spectroscopie *RMN HRMAS* avant de tirer des conclusions définitives.

4.2 Les adénocarcinomes pancréatiques

4.2.1 Généralités

Le pancréas est profondément situé dans la cavité abdominale. Il comporte plusieurs parties : la tête, l'isthme, le corps et la queue. Il est enchâssé au niveau du duodénum et des voies biliaires et en arrière il y a des plexus nerveux ce qui explique beaucoup de la symptomatologie présentée par les patients présentant un adénocarcinome du pancréas du fait de sa localisation (cf. fig.4.8).

Ceci explique notamment le retard du diagnostic qui se fait sur les symptômes et ces symptômes sont liés à des phénomènes de compression. C'est pour cela que ce cancer a en particulier un très mauvais pronostic. C'est un cancer en augmentation constante et malgré le nombre d'études faites à ce sujet, la cause n'en est pas encore clairement connue, des problèmes nutritionnels ont été évoqués mais ce n'est pas du tout évident. Il y a 11600 nouveaux cas en France par an tous stades confondus. C'est le 6^{eme} cancer en incidence après les cancers de la prostate, du sein, du colon-rectum, des poumons et de la vessie. Le facteur de risque le plus reconnu de façon formelle est le tabagisme. Le pronostic reste, même avec les progrès thérapeutiques de ces dernières années, toujours très péjoratif puisque la survie pour les patients qui ont pu avoir une exérèse, ce qui n'est pas la majorité (5-10 %), la survie est de l'ordre de 20 % à 5 ans. Pour ceux qui n'ont pas pu bénéficier de résection chirurgicale, cancers localement avancés ou métastatiques, la médiane de survie est autour de 10-12 mois au maximum, et de 4 mois en l'absence de tout traitement. Le seul traitement qui permet une issue favorable, voir dans certains cas une guérison, est la résection chirurgicale complétée par d'éventuels traitements par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Les premiers symptômes du cancer pancréatique sont très vagues, c'est pour cela qu'il y a beaucoup d'errance dans le diagnostic de départ. Les symptômes sont des douleurs abdominales, des réveils nocturnes, une perte de poids. Le

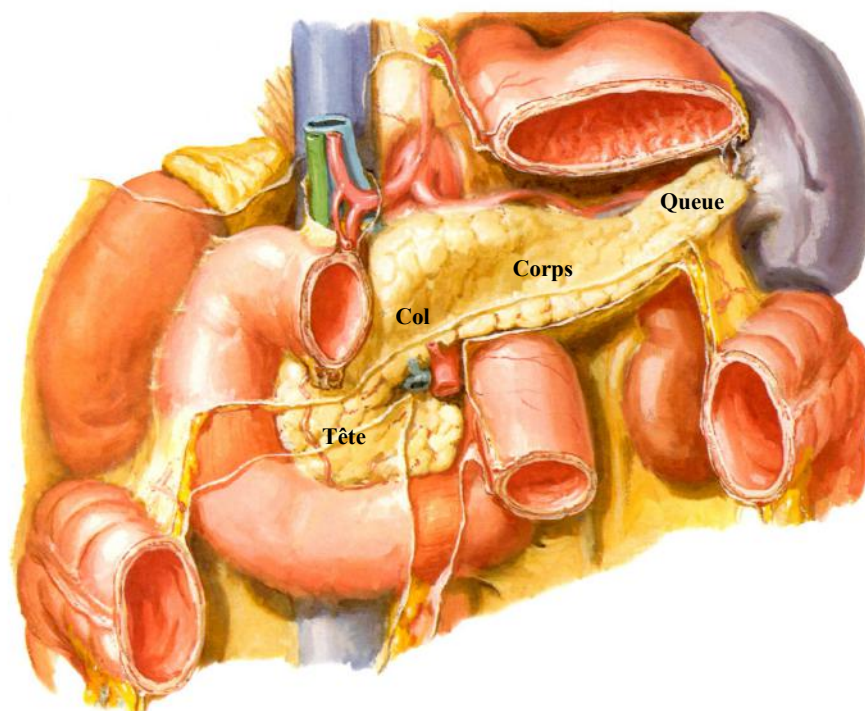


FIGURE 4.8 – Anatomie du pancréas d’après Frank H. Netter, Atlas d’anatomie humaine [7].

plus parlant dans les symptômes au niveau de la tête du pancréas, du fait de la proximité des voies biliaires qui passent par-là, est un ictère qui s’installe. La douleur est présente 9 fois sur 10 et constitue le premier symptôme dans près de 2/3 des patients. Une douleur qui est transfixiante (va dans le dos et irradie dans une ceinture) est ressentie par les patients.

4.2.2 Problématique

Les adénocarcinomes pancréatiques sont des cancers très agressifs et ont un des plus mauvais pronostics parmi tous les cancers [174]. Avec un nombre de nouveaux cas estimés à 48960 en 2015 aux Etats-Unis, le cancer pancréatique est le douzième cancer le plus commun représentant 3 % de tous les nouveaux cancers diagnostiqués aux Etats-Unis [65]. La majorité des cancers pancréatiques sont un adénocarcinome ductal pancréatique et sont

localisés dans la tête du pancréas [175], [176].

La chirurgie est le seul traitement potentiellement curatif des cancers du pancréas. La chirurgie pancréatique est associée à une morbidité et une mortalité importantes. En effet, le taux de mortalité, même dans les centres hautement spécialisés, varie de 2 à 5 % et le taux de morbidité peut atteindre 70 % spécialement dans les résections pancréatiques gauches [177], [178].

L'extension de lymphadénectomie est un sujet de débat sur la morbidité et sur les faibles données pour sa réalisation [179], [180]. Ces dernières années, un mouvement vers les opérations ciblées a été proposé s'appuyant sur la caractérisation précise des adénocarcinomes pancréatiques par imagerie préopératoire dans le but d'évaluer sa résécabilité [181]. Cependant, les études sur le scanner X et l'IRM n'ont pas montré la possibilité de prédire précisément la longue survie des patients. Les principaux facteurs pronostiques de la survie après une duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC) sont des paramètres histologiques, à savoir les marges R0 (marges de résection saines), l'envahissement ganglionnaire et la différenciation. Bien que de nombreux progrès techniques aient été réalisés dans le champ de la chirurgie pancréatique, il a été montré que le taux de résection R0 est rarement de plus de 20 %, ce qui a un impact systématique sur la survie [182], [183]. L'extension aux ganglions dépend de l'extension de la lymphadénectomie comme montré par l'impact de ganglion entré au rapport de ganglions examinés au total [184], [185]. Cependant, le bénéfice d'une lymphadénectomie étendue dans le cadre du cancer du pancréas n'a pas été démontré. Dès lors, il y a un manque de facteurs pronostiques précis et actuellement aucun biomarqueur tissulaire n'a été identifié pour prédire la longue survie chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique.

Au-delà des marqueurs sériques, une meilleure caractérisation du tissu pancréatique serait d'un intérêt particulier dans les adénocarcinomes pancréatiques. Un examen primaire et un examen microscopique extemporané en per-opératoire sont fiables pour le diagnostic mais ne peuvent pas prédire la survie globale des patients. Aucun biomarqueur tissulaire prédisant la survie n'existant, par conséquent, il y a un besoin de déterminer des biomarqueurs qui pourraient aider les chirurgiens à distinguer les patients avec une survie relativement longue et une survie très courte (appelés dans la littérature : "longs-survivants" et "courts-survivants"). Les buts de cette étude sur l'adénocarcinome pancréatique étaient alors de :

- définir le métabolome du parenchyme pancréatique ;
- déterminer l'impact de la chimiothérapie néo-adjuvante sur le parenchyme pancréatique et sur l'adénocarcinome pancréatique ;
- chercher des biomarqueurs métaboliques associés à la longue survie des patients présentant un adénocarcinome pancréatique en utilisant une analyse métabolomique.

4.2.3 Résultats et discussion

4.2.3.1 Préambule

4.2.3.1.1 Population de patients Cent vingt-trois échantillons obtenus de 106 patients, rétrospectivement sélectionnés, après avoir subi une DPC entre mai 2000 et mars 2011 au sein du Service de Chirurgie Viscérale et de Transplantation (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg) ont été inclus dans cette étude (cf. fig. 4.9). Les patients remplissaient les critères suivants :

- diagnostic histologique d'adénocarcinome pancréatique ;
- aucun patient perdu de vue ;
- traitement adjuvant homogène avec l'utilisation de la même chimiothérapie (Gemcitabine) pour tous les patients (et pas de radiothérapie) ;
- les échantillons de tissu pancréatique ont été collectés juste après leur résection et congelés dans de l'azote liquide avant leur stockage dans un congélateur à $-80^{\circ}C$.

Parmi les 106 échantillons provenant de patients présentant un adénocarcinome pancréatique (PA) :

- 44 échantillons provenaient de patients n'ayant reçu aucune chimiothérapie néo-adjuvante ;
- 62 échantillons provenaient de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante.

Parmi les 17 échantillons provenant du parenchyme pancréatique (PP) :

- 9 échantillons provenaient de patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie néo-adjuvante ;
- 8 échantillons provenaient de patients ayant eu une chimiothérapie néo-adjuvante administrée.

Finalement, deux groupes avec des pronostics extrêmement différents (adénocarcinomes pancréatiques) ont été comparés (4.2) :

- patients avec une relative longue survie (survie > 3 ans), appelés dans la littérature "longs-survivants", 8 échantillons, pas de chimiothérapie néo-adjuvante ;
- patients avec une très courte survie (survie < 1 an), appelés dans la littérature "courts-survivants", 9 échantillons, pas de chimiothérapie néo-adjuvante.

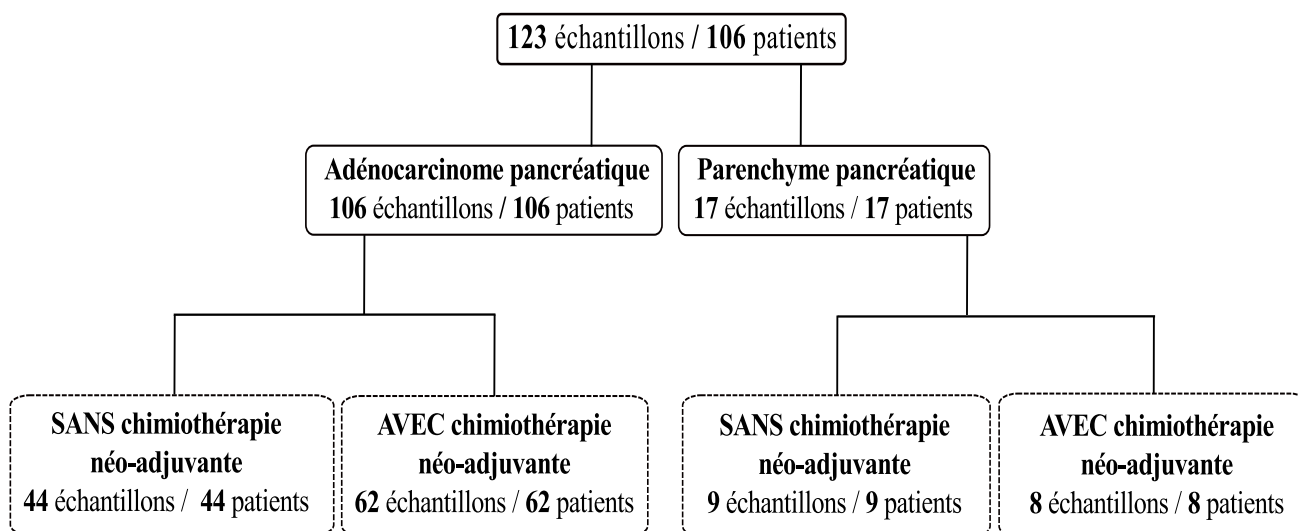


FIGURE 4.9 – Population de patients étudiée et échantillons d'adénocarcinome et de parenchyme pancréatique examinés.

	Âge	Sexe	Taille tumeur (mm)	ACE	CA 19-9	T	N	Marges (mm)	Diff	Invas vasc
LS1	70	F	50	8	52,3	3	1	2	B	Non
LS2	70	H	25	2,1	20256	3	0	1	M-P	Non
LS3	63	H	35	2	200	4	0	3	M	Veine
LS4	66	F	50	1,1	1007	3	1	0	B-M	Veine
LS5	59	H	40	ND	ND	4	1	3	B-M	Non
LS6	76	H	40	1,8	43,2	3	1	2	P	Veine
LS7	67	F	60	3,6	1626	3	1	3	M	Non
LS8	69	F	25	1,4	220,4	3	0	3	M	Non
CS1	47	H	40	ND	112	3	1	2	P	Non
CS2	65	H	30	144	97,4	3	1	2	P	Non
CS3	78	F	30	3,6	250	3	1	2	M	Non
CS4	72	F	35	2	13	3	1	0	M-P	Non
CS5	82	F	25	ND	178	3	0	0	B	Veine

CS6	49	F	30	2,3	451,5	3	1	1	P	Veine
CS7	62	H	70	4,5	293,7	4	1	0	B	Veine
CS8	60	M	40	4,2	916	3	1	0	Coll	Veine
CS9	61	F	30	4,7	246,4	3	1	0	M	Veine

TABLE 4.2: Caractéristiques des patients. Dix-sept échantillons provenant de patients présentant un adénocarcinome pancréatique. Huit patients étaient classés longs-survivants tandis que les 9 autres étaient classés courts-survivants. LS ; "longs-survivants" ; CS, "courts-survivants" ; T, tumeur ; N, ganglions lymphatiques ; Diff, différenciation ; B, bien ; M, modérément ; P, peu ; Coll, colloïde ; Invas Vasc, invasion vasculaire ; ND, non déterminée.

Pour cette étude, les échantillons tissulaires ont été obtenus du Centre de Ressources Biologiques des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Un consentement écrit a été obtenu pour tous les patients inclus.

4.2.3.2 Résultats

4.2.3.2.1 Qualité des spectres Tous les spectres obtenus des 123 échantillons analysés étaient de grande qualité sans aucune marque de nécrose.

Trente et un métabolites ont été identifiés au sein de la région 0,70-7,50 ppm du spectre. Parmi les 31 métabolites, 18 ont été quantifiés. En effet, seuls les métabolites ne présentant pas de recouvrement de leur signal dans leurs spectres *1D CPMG* ont été sélectionnés pour la quantification.

Les spectres représentatifs *RMN HRMAS* en *1D* du parenchyme pancréatique et de l'adénocarcinome pancréatique sont représentés en figure 4.10 et 4.11.

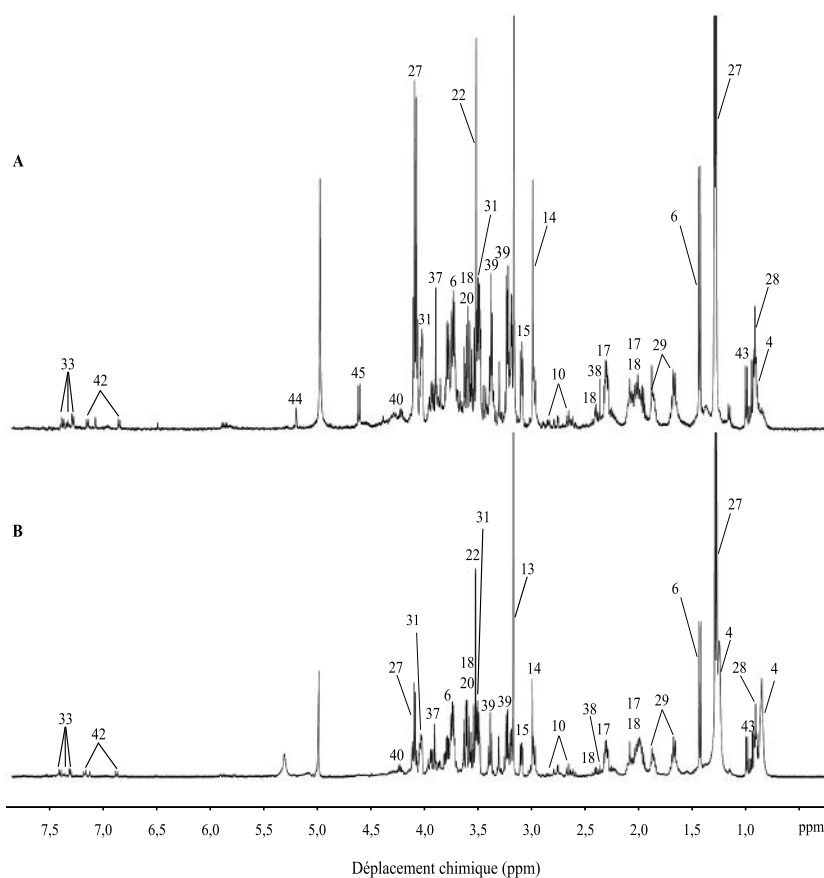


FIGURE 4.10 – Spectre $1D\ ^1H\ RMN\ HRMAS$ obtenu de l'analyse de tissu pancréatique (A) PP sans chimiothérapie néo-adjuvante ($n = 9$); (B) PP avec chimiothérapie néo-adjuvante. Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Pour des raisons d'affichage, l'amplitude du pic de la choline à 3,23 ppm, du pic de la glycine à 3,56 ppm et du pic du lactate à 1,33 ppm, a été graphiquement réduite. Les identifications des métabolites sont données dans le tableau 3.1 (Chapitre 3).

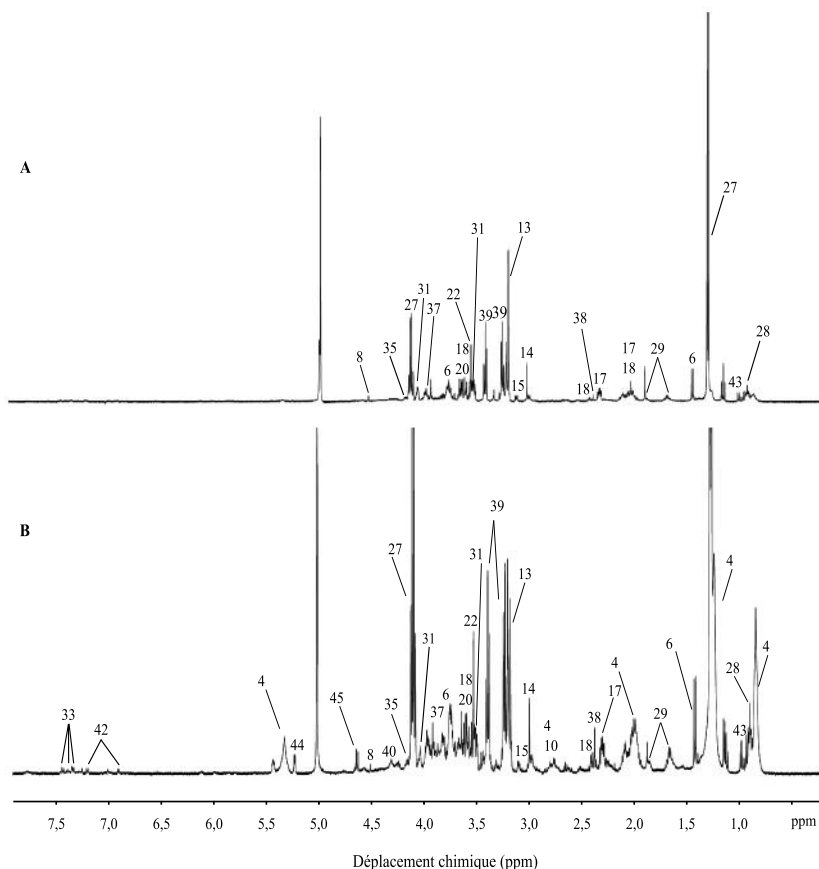


FIGURE 4.11 – Spectre $1D\ ^1H\ RMN\ HRMAS$ obtenu de l'analyse de tissu pancréatique (A) PA sans chimiothérapie néo-adjuvante ; (B) PA avec chimiothérapie néo-adjuvante. Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Pour des raisons d'affichage, l'amplitude du pic du lactate à 1,33 ppm, a été graphiquement réduite. Les identifications des métabolites sont données dans le tableau 3.1 (Chapitre 3).

Les profils métabolomiques du parenchyme pancréatique et de l'adénocarcinome pancréatique ont été clairement séparés par une *OPLS - DA* à deux composantes ($R^2Y = 0,82$; $Q^2 = 0,69$) (cf. fig.4.12). Une concentration plus élevée de myo-inositol et de glycérol a été montrée dans les échantillons de parenchyme pancréatique. D'autre part, une concentration plus élevée de glucose, d'ascorbate, d'éthanolamine, de lactate et de taurine, a été révélée dans les échantillons d'adénocarcinome pancréatique.

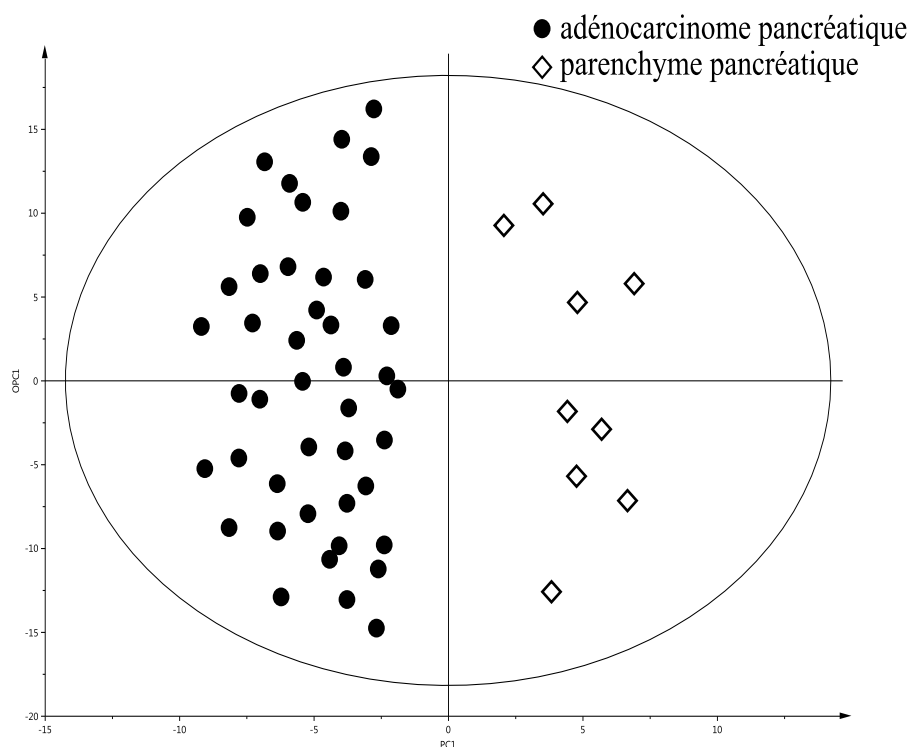


FIGURE 4.12 – Résultats de l'*OPLS - DA* à deux composantes basée sur les métabolites *VIP* : Modèle à deux classes incluant 44 et 9 échantillons respectivement d'adénocarcinome pancréatique (sans chimiothérapie néo-adjuvante) et de parenchyme pancréatique (sans chimiothérapie néo-adjuvante) provenant de patients souffrant d'un cancer du pancréas. Une nette séparation entre les différentes classes est visible dans ce modèle.

4.2.3.2.2 Impact de la chimiothérapie sur le parenchyme pancréatique et l'adénocarcinome pancréatique Dix-sept échantillons de parenchyme pancréatique ont été inclus : 8 échantillons provenaient de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante tandis que les 9 autres provenaient de patients n'en ayant pas reçue. Le test U de Mann-Whitney n'a pas permis de trouver de métabolites discriminants (cf. table 4.3).

Métabolites	CT néo-adj	Moyenne (nmol/mg)	Ecart-type (nmol/mg)	valeur p
Ascorbate	Non	0,3488	0,2191	0,6730
	Oui	0,3592	0,1671	
Aspartate	Non	0,7577	0,3284	0,9626
	Oui	0,6730	0,1776	
Choline	Non	1,5580	0,5921	0,7430
	Oui	0,7649	0,7624	
Créatine	Non	1,7371	0,9568	0,5414
	Oui	1,7760	0,6579	
Éthanolamine	Non	0,9314	0,4502	0,6058
	Oui	1,1115	0,5408	
Glutamate	Non	2,9830	0,8698	0,8148
	Oui	2,3800	0,4264	
Glycérol	Non	8,1840	7,3988	0,6730
	Oui	8,2990	7,2904	
Glycine	Non	6,0920	5,0908	0,5414
	Oui	6,5590	5,7401	
Glycérophosphocholine	Non	2,4215	2,6084	0,9626
	Oui	2,2208	2,1689	
Lactate	Non	11,0040	2,4733	0,7969
	Oui	9,6770	2,1588	
Phosphocholine	Non	1,1690	0,6396	0,3704
	Oui	0,9469	0,3644	
Taurine	Non	2,9660	1,9594	0,8148
	Oui	2,7060	1,3103	
Thréonine	Non	1,1202	0,2821	0,9626
	Oui	1,1678	0,2801	
Glutamine	Non	0,6855	0,2518	0,5414
	Oui	0,5633	0,1466	
Succinate	Non	0,3069	0,2121	0,8884

	Oui	0,2595	0,1406	
Glucose	Non	1,2247	0,6158	0,4807
	Oui	1,0736	0,7355	
Tyrosine	Non	0,0520	0,0442	0,6058
	Oui	0,0552	0,0599	
Phénylalanine	Non	0,1449	0,0771	0,8148
	Oui	0,1495	0,0880	

TABLE 4.3: Impact de la chimiothérapie néo-adjuvante sur le *PP*. Résultats du test U de Mann Whitney. CT néo-adj, chimiothérapie néo-adjuvante.

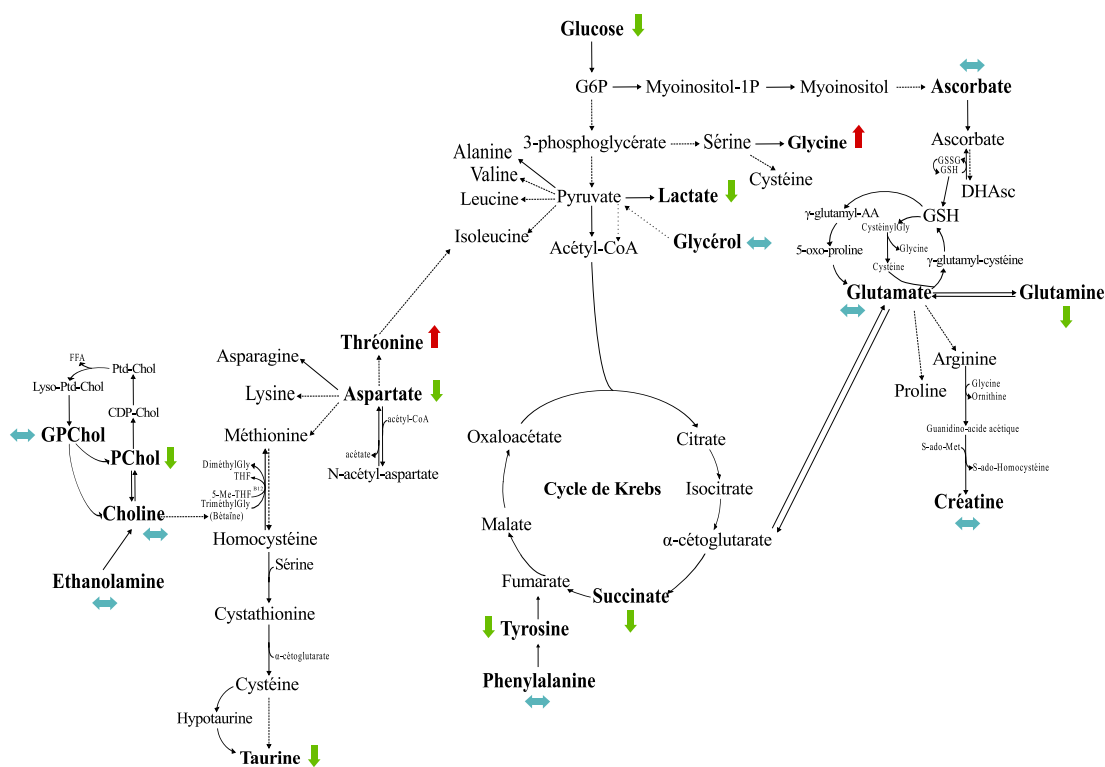


FIGURE 4.13 – Impact de la chimiothérapie sur le parenchyme pancréatique. Les échantillons de *PP* provenant de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante (n = 8) ont été comparés à ceux provenant de patients n’en ayant pas reçue (n = 9). Résultats de l’analyse de réseaux selon l’algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d’augmenter ou de diminuer dans les échantillons provenant de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stable entre les deux groupes.

L’analyse de réseaux a montré qu’un niveau plus faible de succinate, d’aspartate, de

taurine, phosphocholine, glucose, tyrosine, lactate et glutamine, a été prédit dans les échantillons de parenchyme pancréatique de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante. De plus, un niveau plus élevé de thréonine et glycine a été prédit dans les échantillons de parenchyme pancréatique de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante. Finalement les autres métabolites ont été prédits équivalents entre les deux groupes (cf. fig.4.13).

Parmi les 106 échantillons d'adénocarcinome pancréatique, 62 ont reçu une chimiothérapie néo-adjuvante tandis que les 44 autres, non. Un métabolite discriminant a été mis en lumière par le test U de Mann-Whitney. L'aspartate ($p = 0,0017$) était statistiquement significatif entre les échantillons d'adénocarcinome pancréatique de patients qui ont reçu une chimiothérapie néo-adjuvante et ceux qui n'en ont pas reçue (cf. table.4.4).

Métabolites	CT néo-adj	Moyenne (nmol/mg)	Ecart-type (nmol/mg)	valeur p
Ascorbate	Non	0,3988	0,2221	0,6648
	Oui	0,4062	0,2227	
Aspartate	Non	0,6229	0,2255	0,0017
	Oui	0,9658	0,6074	
Choline	Non	0,8849	0,3887	0,6600
	Oui	0,9359	0,4702	
Créatine	Non	1,3561	0,5057	0,4285
	Oui	1,4464	0,5971	
Éthanolamine	Non	0,6148	0,2620	0,1958
	Oui	0,7511	0,4177	
Glutamate	Non	2,4650	0,7699	0,0908
	Oui	2,8070	0,9767	
Glycérol	Non	2,7550	1,1994	0,1339
	Oui	3,5300	2,6914	
Glycine	Non	2,2663	0,8577	0,1265
	Oui	2,9025	1,8798	
Glycérophosphocholine	Non	1,0319	0,5029	0,7421
	Oui	1,0810	0,7982	
Lactate	Non	16,1370	4,7272	0,7969
	Oui	15,9030	5,3324	
Phosphocholine	Non	0,9764	0,5008	0,9092
	Oui	0,9518	0,4822	
Taurine	Non	4,4630	1,4062	0,8886
	Oui	4,3490	1,3425	

Thréonine	Non	4,4630	1,4062	0,8886
	Oui	1,2957	0,6961	
Glutamine	Non	0,6394	0,2272	0,5864
	Oui	0,6870	0,2668	
Succinate	Non	0,1762	0,0763	0,4400
	Oui	0,1866	0,0739	
Glucose	Non	1,3141	1,1020	0,0813
	Oui	2,3227	2,7375	
Tyrosine	Non	0,0730	0,0493	0,3140
	Oui	0,1097	0,1479	
Phénylalanine	Non	0,1789	0,0811	0,1622
	Oui	0,1097	0,1958	

TABLE 4.4: Impact de la chimiothérapie néo-adjuvante sur le *PA*. Résultats du test U de Mann Whitney. CT néo-adj, chimiothérapie néo-adjuvante.

Comme montré en figure. 4.14, l'analyse de réseaux a révélé un niveau plus faible de lactate, qui a été prédit chez les patients ayant eu une chimiothérapie néo-adjuvante. De plus, un niveau plus élevé d'éthanolamine, de tyrosine, phénylalanine, d'aspartate, de glucose, glycérol, succinate, glycine, glutamate, glutamine et de créatine, a été prédit dans les échantillons d'adénocarcinome pancréatique provenant de patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante. Finalement, les autres métabolites étaient prédits équivalents entre les deux groupes.

Pour certaines de ces analyses, le test U de Mann-Whitney n'a pas relevé de différences significatives entre les groupes, alors qu'*ADEMA* reporte des changements pour ces métabolites. Par conséquent, *ADEMA* apparaît plus efficace car il compare les différents groupes de métabolites, utilise l'information mutuelle et ne requiert pas une population importante d'échantillons.

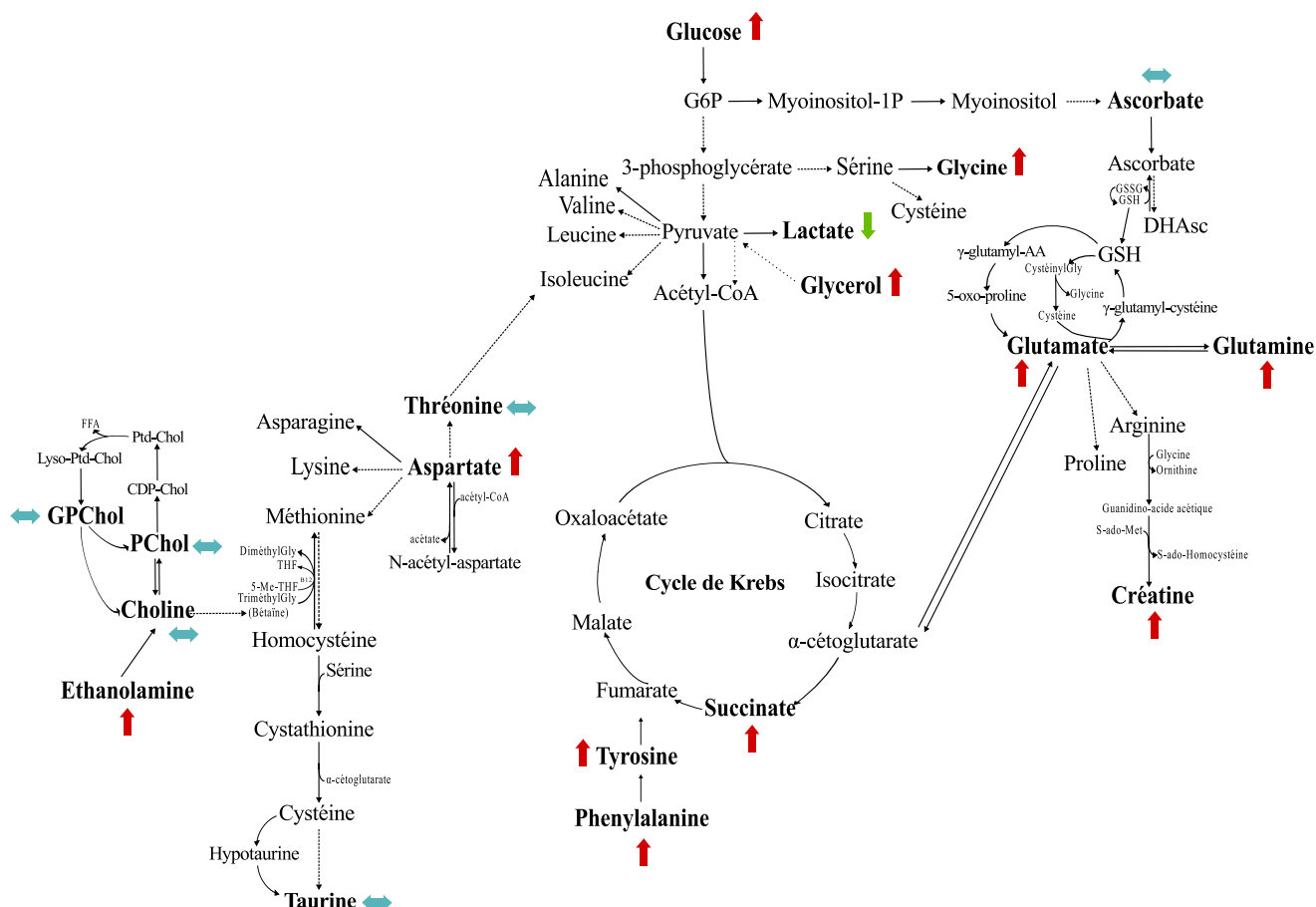


FIGURE 4.14 – Impact de la chimiothérapie sur l'adénocarcinome pancréatique. Les échantillons de *PA* avec chimiothérapie néo-adjuvante ($n = 44$) ont été comparés à ceux sans chimiothérapie néo-adjuvante ($n = 62$). Résultats de l'analyse de réseaux selon l'algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans la population qui a reçu une chimiothérapie néo-adjuvante, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes.

4.2.3.2.3 "Longs-survivants" vs. "courts-survivants" Les caractéristiques des patients sont décrites en table 4.2. Les spectres représentatifs *RMN HRMAS* en 1D des "longs" et "courts-survivants" sont montrés respectivement en figure 4.15.A et figure 4.15.B. Dix-sept échantillons ont été étudiés : 8 "longs-survivants" et 9 "courts-survivants" (aucun des patients de ces 2 groupes n'a reçu de chimiothérapie).

Métabolites	Pas de CT néo-adj	Moyenne (nmol/mg)	Ecart-type (nmol/mg)	valeur p
Ascorbate	LongsSurv	0,3897	0,2403	0,5414
	CourtsSurv	0,3002	0,1524	
Aspartate	LongsSurv	0,6019	0,2730	0,7430

	CourtsSurv	0,6098	0,2343	
Choline	LongsSurv	0,6787	0,2231	0,0150
	CourtsSurv	1,0443	0,2985	
Créatine	LongsSurv	1,0755	0,2421	0,2766
	CourtsSurv	1,4130	0,5110	
Éthanolamine	LongsSurv	0,4781	0,1790	0,0078
	CourtsSurv	0,8231	0,2450	
Glutamate	LongsSurv	2,2060	0,7227	0,2766
	CourtsSurv	2,5220	0,5562	
Glycérol	LongsSurv	2,7580	1,2039	0,6730
	CourtsSurv	3,1170	1,4576	
Glycine	LongsSurv	1,8810	0,7959	0,2359
	CourtsSurv	2,4580	0,9537	
Glycérophosphocholine	LongsSurv	0,8421	0,3262	0,7430
	CourtsSurv	1,0964	0,6795	
Lactate	LongsSurv	12,9750	2,9930	0,0360
	CourtsSurv	16,9700	4,1860	
Phosphocholine	LongsSurv	0,7452	0,3123	0,6730
	CourtsSurv	0,8240	0,2944	
Taurine	LongsSurv	4,7320	1,5160	0,4807
	CourtsSurv	4,0020	1,6747	
Thréonine	LongsSurv	0,9846	0,3281	0,3213
	CourtsSurv	1,1849	0,2640	
Glutamine	LongsSurv	0,5133	0,1734	0,1672
	CourtsSurv	0,6501	0,2559	
Succinate	LongsSurv	0,1338	0,0531	0,0747
	CourtsSurv	0,2030	0,1074	
Glucose	LongsSurv	1,4845	1,3667	0,4807
	CourtsSurv	1,0641	0,7318	
Tyrosine	LongsSurv	0,0480	0,0243	0,0592
	CourtsSurv	0,0846	0,0395	
Phénylalanine	LongsSurv	0,1267	0,0369	0,0055

	CourtsSurv	0,2027	0,0739	
--	------------	--------	--------	--

TABLE 4.5: Différences de métabolites selon le taux de survie. Résultats du test U de Mann-Whitney (analyse univariée, test non paramétrique). Pas de chimiothérapie néoadjuvante. LongsSurv, "longs-survivants"; CourtsSurv, "courts-survivants"; CT néo-adj, chimiothérapie néo-adjuvante.

Des métabolites discriminants ont été mis en lumière en utilisant le test U de Mann-Whitney. La choline ($p = 0,0150$), l'éthanolamine ($p = 0,0078$), le lactate ($p = 0,0360$), et la phénylalanine ($p = 0,0055$), étaient statistiquement significatifs entre les "longs" et "courts-survivants" chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique (cf. table 4.5).

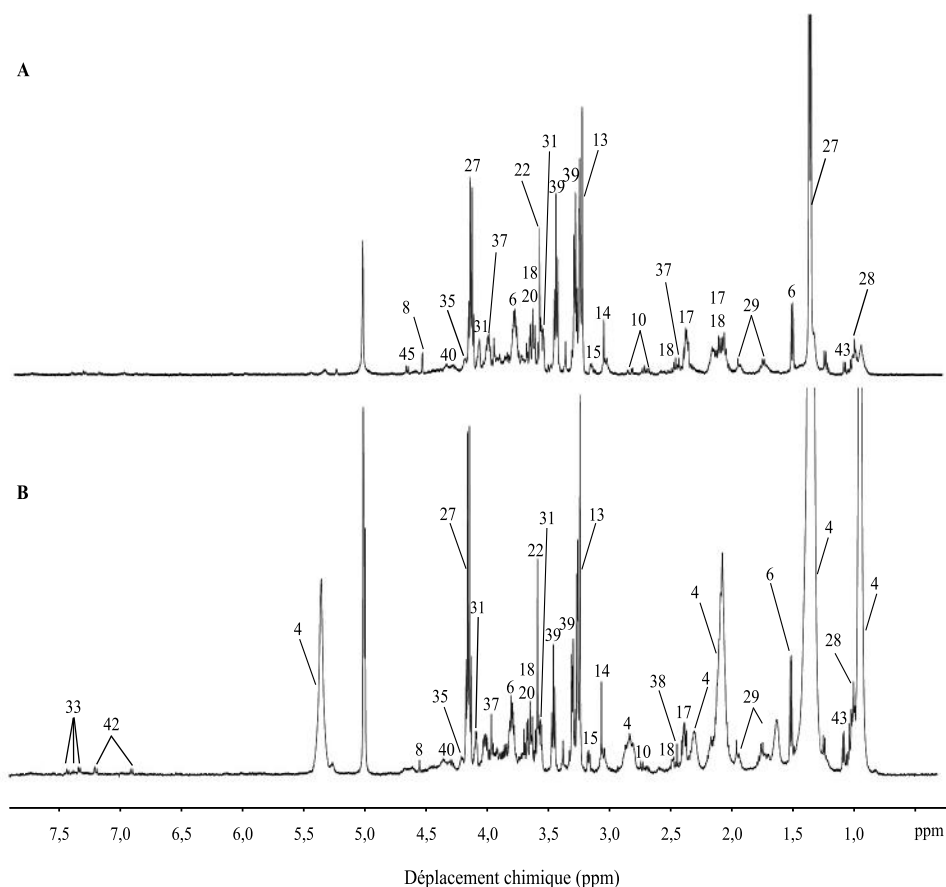


FIGURE 4.15 – Spectre $1D\ ^1H\ RMN\ HRMAS$ obtenus de l'analyse des longs et courts-survivants. (A) adénocarcinome pancréatique avec une longue survie ($n = 8$); (B) adénocarcinome pancréatique avec une courte survie ($n = 9$). Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Pour des raisons d'affichage, l'amplitude du pic du lactate à 1,33 ppm, du pic de la choline à 3,23 ppm, du pic des acides gras à 1,30 ppm, a été graphiquement réduite. Les identifications des métabolites sont données en table 4.1 (Chapitre 3).

L'analyse de réseaux a montré une concentration plus élevée de glucose, d'ascorbate et de taurine, qui a été prédite dans les échantillons provenant de patients "longs-survivants". De plus, une concentration plus faible de choline, d'éthanolamine, de glycérophosphocholine, de phénylalanine, de tyrosine, d'aspartate, de thréonine, de succinate, de glycérol, de lactate, de glycine, de glutamate, de glutamine et de créatine a été prédite dans les échantillons de patients "longs-survivants". Finalement, la phosphocholine a été prédite inchangée entre les deux groupes (cf. fig.4.16).

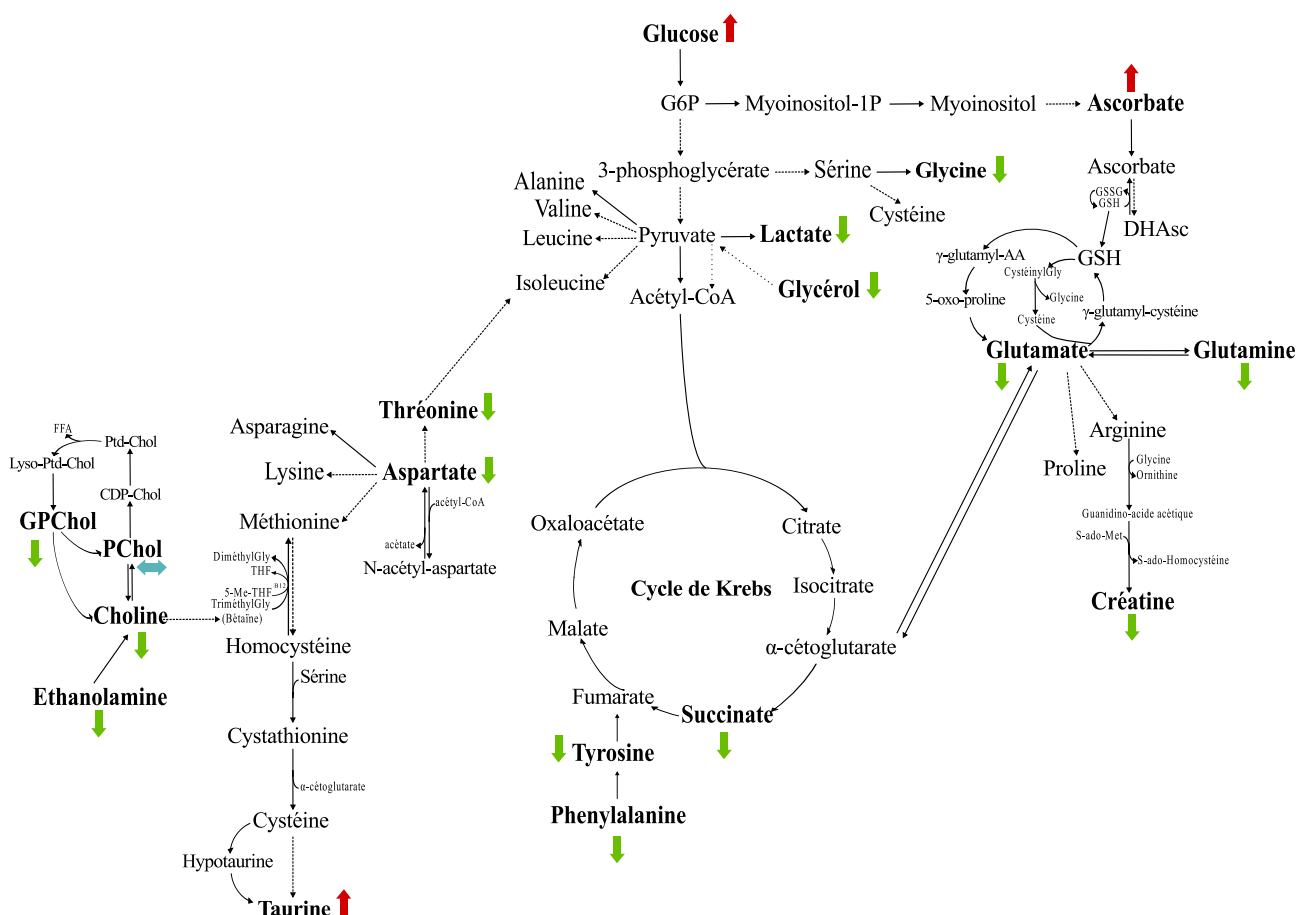


FIGURE 4.16 – L'analyse de réseaux permet d'établir le pronostic des patients. Les échantillons provenant de patients "longs-survivants" (n = 8) ont été comparés aux échantillons provenant de patients "courts-survivants" (n = 9) selon les résultats d'ADEMA. Aucune chimiothérapie néo-adjuvante n'a été administrée à ces patients. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits en augmentation ou diminution, les flèches bleues indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits stables entre les deux groupes.

4.2.3.2.4 Analyse de survie Quand les patients "longs" et "courts-survivants" ont été comparés, l'utilisation de l'éthanolamine comme un test de dépistage unique a montré une plus grande précision dans le but de distinguer les longs-survivants des courts-survivants. Comme montré en figure 4.17, les échantillons avec un niveau d'éthanolamine plus faible avaient une forte probabilité d'être assignés à une longue survie. Tous les patients montrant un niveau bas d'éthanolamine étaient des patients "longs-survivants". La valeur seuil était 0,740 nmol/mg dans le but de distinguer longs et courts-survivants. Avec ce seuil, la sensibilité (*Se*) et la spécificité (*Sp*) étaient respectivement égales à 77,80 % et 75 %.

La valeur prédictive positive était égale à 47 % et la valeur prédictive négative était

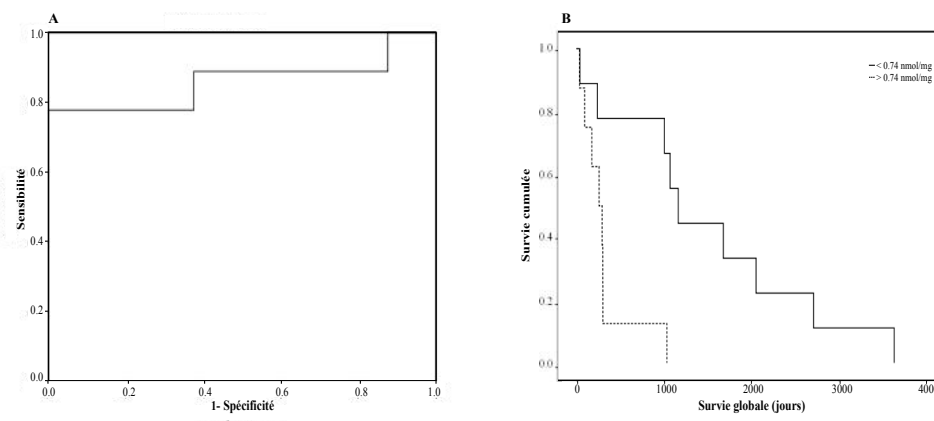


FIGURE 4.17 – La concentration d'éthanolamine : un biomarqueur unique prédisant la survie globale chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique. (A) courbe ROC et (B) courbes Kaplan-Meier obtenues de l'analyse des concentrations d'éthanolamine pour le diagnostic de longue survie chez des patients présentant un cancer du pancréas. L'aire sous la courbe était $0,861 \pm 0,101$, la valeur seuil était $0,740$ nmol/mg, la sensibilité et la spécificité étaient respectivement égales à $77,80\%$ et 75% . A droite la courbe de Kaplan-Meier montre des différences entre "longs" et "courts-survivants". La valeur p était $0,005$ pour le test log-rangs (test logarithmique par rangs).

égale à $52,90\%$. L'analyse de Kaplan-Meier a montré que les probabilités de la survie globale étaient significativement plus élevées chez les patients avec une concentration plus faible d'éthanolamine dans la tumeur en comparaison de ceux qui ont une concentration plus élevée (cf. fig.4.17.B).

4.2.3.3 Discussion

Plusieurs études ont utilisé la métabolomique dans un contexte de pancréatite chronique ou de lésions kystique du pancréas. Mais aucune n'a travaillé sur du tissu intact afin d'évaluer le métabolome du parenchyme pancréatique et de l'adénocarcinome pancréatique dans le cadre de patients longs-survivants.

L'évaluation de la résecabilité per-opératoire des adénocarcinomes pancréatiques n'est pas encore un moyen adéquat pour prédire la survie. Cependant, la morbidité et la mortalité lors des *DPC*, une meilleure évaluation de la balance des risques et des bénéfices, est une quête complexe. En effet, les marqueurs sériques tels que l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) ou l'antigène carbohydate (CA 19.9) sont très peu corrélés aux résultats de longue survie et ne devraient pas être utilisés pour contre-indiquer le seul traitement potentiellement curatif de cette maladie souvent fatale. Jusqu'à présent seuls des paramètres

histologiques sont capables d'évaluer rétrospectivement le bénéfice potentiel de la DPC mais ces derniers ne sont disponibles qu'après la chirurgie. De plus, aucun de ces paramètres ne sont spécifiques pour prédire la nécessité de la résection pancréatique. Dans le but d'évaluer le bénéfice de la résection pancréatique, les patients avec une longue survie ont été comparés aux courts-survivants. Parmi les longs-survivants, deux patients présentaient une marge infra-millimétrique et 3 avaient une invasion histologique de la veine portale. Alors, l'utilisation de facteurs prédictifs décrits à présent ne devrait pas mener à la contre-indication chez des patients qui autrement pourraient tolérer la chirurgie. L'utilisation d'un marqueur plus spécifique étroitement lié à la physiopathologie du cancer du pancréas serait d'un intérêt tout particulier.

La *RMN HRMAS* fournit aussi de nouvelles perspectives dans les relations entre voies métaboliques et cancers pancréatiques. L'identification de phospholipides de la membrane cellulaire, de la production d'énergie cellulaire *via* la néoglucogenèse et le cycle de Krebs, et le stress oxydatif.

Nos résultats concernant le métabolome du parenchyme pancréatique montrent un taux plus élevé de lactate, de glucose, de phosphocholine, de taurine, d'aspartate, de lactate, de glutamine et de succinate, chez les patients ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante. Des mutations dans le cycle de Krebs sont connues afin de favoriser le développement et la croissance du cancer. Par exemple, les mutations de la *SDH*, de la fumarate hydratase (*FH*) et de l'isocitrate dehydrogenase 1 et 2 (*IDH1*, *IDH2*) peuvent être citées [186], [187]. De plus, ces mutations ont été associées avec des sous-ensembles de cancers et différents pronostics de patients [188], [189]. Des mutations dans le cycle de Krebs ont aussi été associées avec des changements de mesures dans le niveau des métabolites. Néanmoins, ces mutations ne font pas partie des caractéristiques de l'adénocarcinome pancréatique. Le métabolisme cellulaire reprogrammé est devenu d'autant plus évident dans la recherche sur le cancer du pancréas. La recherche s'est focalisée aussi sur les modifications qui impliquent le cycle de Krebs et les gènes *KRAS* mutants induits avec des dépendances cellulaires pour le glucose, la glutamine et les protéines extracellulaires.

Nos résultats sur le métabolome de l'adénome pancréatique montrent un niveau plus élevé de lactate dans les échantillons provenant de patients qui n'ont pas reçu de chimiothérapie néo-adjuvante. Une expression élevée de la *LDHA* est mise en lumière dans les cancers du sein et les cancers colorectaux. Cela a également été identifié dans les cancers

pancréatiques. Des études ont récemment montré les différentes étapes où la *LDHA* est impliquée (formation, maintien et progression de la tumeur) [190], [191], [192]. Au vue de la glycolyse élevée dans l'adénocarcinome pancréatique, menant à une augmentation de la production de lactate, la possibilité d'utiliser le lactate pourrait fournir un avantage supplémentaire aux cellules des adénocarcinomes pancréatiques. En effet, l'inhibition de la glycolyse à travers la suppression de l'expression de la *LDHA* par l'interférence *ARN* a diminué la croissance des cellules des adénocarcinomes pancréatiques. Un niveau plus faible de glucose a aussi été montré dans les adénocarcinomes pancréatiques chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie néo-adjuvante. Comme décrit dans le travail de Koong *et al.* [45] et Guillaumond *et al.* [27], les zones au sein des adénocarcinomes pancréatiques sont hypoxiques ce qui a des implications sur le métabolisme cellulaire. L'hypoxie favorise la croissance tumorale en stimulant particulièrement la glycolyse.

Nos résultats concernant le métabolome des adénocarcinomes pancréatiques chez les patients "courts-survivants" sont en accord avec d'autres études qui ont trouvé un niveau plus élevé de choline dans plusieurs types de cancers. Le rôle de la choline kinase α (*Chk - \alpha*), dans la transformation et la progression malignes dans plusieurs cancers, a été bien décrit dans la littérature. Une augmentation du niveau et de l'activité de la *Chk - \alpha* ont été observées dans les cancers du sein [193], colorectaux [194], pulmonaires [195], prostatiques [194], ovariens [196] et plus récemment dans les cancers de l'endomètre [197] et du pancréas [198]. De plus, l'analyse de réseaux a montré une diminution du succinate dans les échantillons provenant de patients "longs-survivants", suggérant une diminution de l'activité du cycle de Krebs. Les échantillons provenant de patients "longs-survivants" ont aussi montré des niveaux plus faibles de thréonine, d'aspartate, de glycérol, de glutamate et de glutamine, comparés à ceux des courts-survivants. La glutamine a particulièrement été étudiée pour son rôle dans le métabolisme du cancer parce qu'il s'avère qu'elle est requise pour la croissance de plusieurs types de tumeurs [199]. Des niveaux plus faibles de créatine et de lactate ont également été mis en évidence chez les "longs-survivants". D'autres études ont montré le lien entre de faibles niveaux de créatine, de lactate, de choline et la survie globale des patients [200]. La compréhension des différents liens métaboliques au sein du cancer du pancréas est une approche prometteuse afin d'identifier de nouveaux marqueurs pronostiques (de la longue survie) et des programmes thérapeutiques dans la prise en charge des patients [65]. Les échantillons provenant de patients

"courts-survivants" ont montré des niveaux plus élevés de choline, glycérophosphocholine, éthanolamine et d'acides gras comme dépeint en fig.4.16 (respectivement, n 19, 25 et 21-22). Les acides gras sont un facteur majeur dans la croissance cellulaire tumorale. Des explorations ont commencé dans le but d'étudier le métabolisme de l'adénocarcinome pancréatique et plus précisément le rôle des acides gras. En effet, comme détaillé dans les travaux de Guo *et al.* ([69]) et de Zadra *et al.* [70], les acides gras peuvent être pro-tumorigène ou anti-tumorigène, comme décrit dans plusieurs cancers, rendant leur biologie complexe. Réduire le niveau de certains acides gras semble être important dans les adénocarcinomes pancréatiques. Mais nous devons d'abord déterminer quels acides gras sont cytotoxiques pour les cellules tumorales et quels acides gras fournissent la tumeur en substrats métaboliques [65]. En se concentrant sur l'éthanolamine, l'analyse de la survie a montré que la survie était plus longue dans les échantillons provenant de patients avec une concentration intra-tumorale d'éthanolamine plus faible. L'évaluation de la concentration d'éthanolamine peut être pertinente sur le plan clinique en tant que biomarqueur métabolique unique afin de distinguer les "longs-survivants" des "courts-survivants" chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique.

L'étude actuelle démontre que le profilage métabolomique peut fournir une information pronostique chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique. La recherche se concentre en général sur les étapes enzymatiques au sein du cycle de Krebs et de leurs potentielles influences sur la progression de la maladie et aussi sur les modifications du métabolisme phospholipidique au sein de la membrane.

Peu de patients sont nécessaires afin de construire un modèle qui peut prédire avec précision le devenir oncologique dans le cancer du pancréas ; cela devrait aider à promouvoir notre technique. Nous reconnaissons qu'une étude de l'efficacité comparative devrait être réalisée en temps-réel dans le but d'évaluer les marqueurs sériques usuels *vs.* la spectroscopie *RMN HRMAS* avant de tirer des conclusions définitives.

L'analyse métabolomique pourrait être validée en tant que méthode discriminante per-opératoire pour distinguer les tissus « sains » des tissus tumoraux. Cela pourrait approfondir notre connaissance du métabolisme de l'adénocarcinome pancréatique et pourrait aussi conduire à l'identification de nouvelles cibles pour le diagnostic, l'imagerie ou les futures options thérapeutiques. Si ces résultats sont confirmés par plusieurs études ; il est attendu que le rôle de la spectroscopie *RMN HRMAS* pourrait être évalué dans le cadre

de l'adénocarcinome pancréatique.

4.3 Les *TIPMP*

4.3.1 Généralités

Les lésions de tumeurs intra-canaliaires, papillaires et mucineuses du pancréas (*TIPMP*) font partie des lésions kystiques du pancréas dont la prévalence globale est d'environ 1 % pour les données les plus anciennes et les séries récentes ont montré une prévalence de 2,4 % en *IRM* [201] et de 14 % en scanner X [202]. Les *TIPMP* représenteraient la moitié de tous les « kystes » confondus. Mais l'incidence des *TIPMP*, reste difficile à évaluer car, dans la plupart des cas, elles sont asymptomatiques.

Elles sont dues à la prolifération de l'épithélium canalaire, pathologique, qui sécrète un liquide mucineux épais en quantité variable et qui va être responsable de la dilatation des canaux secondaires et/ou du canal pancréatique principal, par un phénomène de concrétion. Cette dilatation est souvent appelée par abus de langage « kyste » (cf. fig.4.18).

Elle concerne des personnes de tout âge, mais plus particulièrement la 6^{eme} et la 7^{eme} décade. Les *TIPMP* semblent plus fréquentes chez l'homme en Asie avec un sex-ratio de 1,5 alors qu'il serait de 0,66 en Europe [203]. Des facteurs de prédispositions ont été suggérés dans la littérature comme le tabac, mais n'ont pu être affirmés [204], [205], [206], [207], [208].

Les *TIPMP* sont découvertes fortuitement dans 60 % des cas au cours d'un examen d'imagerie réalisé dans le cadre de symptômes digestifs autres [209]. Lorsque son diagnostic est associé à des symptômes, dans 15-34 %, il s'agit de pancréatite aiguë de cause non évidente [210], [211], les douleurs abdominales non spécifiques, la perte de poids, ou plus tardivement l'ictère, la stéatorrhée ou le diabète [212], [213].

4.3.2 Problématique

Les *TIPMP* sont des lésions précancéreuses, relativement fréquentes (1 % de la population générale). Elles sont dues à la prolifération de l'épithélium canalaire. Cet épithélium

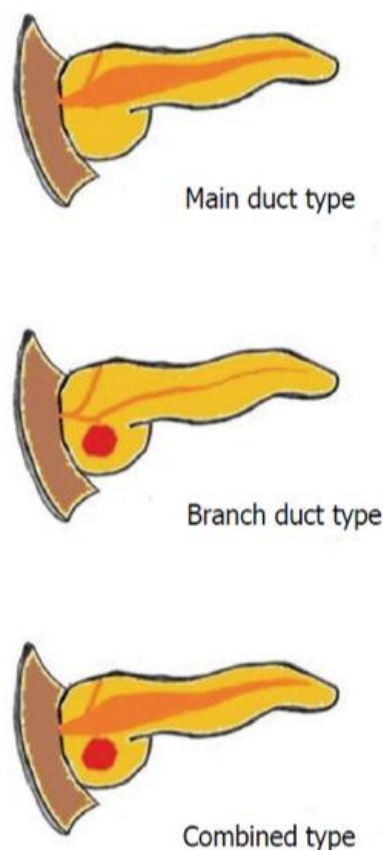


FIGURE 4.18 – Classification internationale, d'après Castellano-Megías VM *et al.* [8].

pathologique sécrète un liquide mucineux en quantité variable qui va être responsable de la « kystisation » des canaux secondaires et/ou de la dilatation du canal pancréatique principal. Les *TIPMP* peuvent concerner le canal pancréatique principal, les canaux secondaires ou être mixtes. Elles ont un potentiel dégénératif avec un risque de survenue de dysplasie de haut grade (panIN-3), estimé à $> 60\%$ à 5 ans du diagnostic initial lors de l'atteinte du canal principal et à $15-20\%$ lorsqu'elles concernent les canaux secondaires. Le stade panIN-3 est associé à la présence d'un carcinome *in situ*. Le type histologique (gastrique, intestinale, pancréato-biliaire, oncocytique) influence également le pronostic [214]. Le type pancréato-biliaire a un pronostic péjoratif par rapport au type intestinal. Le scanner X ou l'*IRM* identifient dans 40% des cas le type de lésion kystique [215]. C'est l'association de plusieurs examens morphologiques scanner X, *IRM* et écho-endoscopie qui permet de poser le diagnostic avec certitude dans $85-90\%$ des cas [216]. Plusieurs études ont tenté d'identifier des critères de mauvais pronostic de façon à orienter le plus précocement possible les patients vers la chirurgie. Ainsi l'imagerie des *TIPMP*,

a montré que le scanner X était un excellent examen avec une performance quasi similaire à l'IRM pour identifier le type de lésion, l'aspect bénin ou malin estimé dans 80 % des cas [217], [218]. Il existe une légère supériorité de l'IRM dans l'identification des communications intra-canalaires [219], [220]. Il n'y a pas d'intérêt à réaliser des examens 3D, ils n'augmentent pas la performance diagnostique [221]. L'écho-endoscopie permet d'identifier le type des lésions, quand il s'agit de TIPMP, de connaître les canaux atteints, de décrire les lésions avec une bonne précision (nodule muraux, tailles, paroi des canaux. . .) La sensibilité de l'écho-endoscopie est de 86 %, la spécificité de 99 %. Celle-ci est améliorée par l'utilisation de mini-sondes intra canalaires mais au prix d'une morbidité sous forme de pancréatites aiguës car elle impose le cathétérisme du canal pancréatique principal. L'écho-endoscopie avec injection IV de contraste SONOVUE © permet de différencier les nodules tissulaires des gouttes de mucus. Les ponctions à l'aiguille fine de 22 G sous écho-endoscopie restent utilisées mais leurs résultats sont décevants. L'analyse cytologique et histopathologique sous écho-endoscopie est difficile : en effet le caractère visqueux du liquide intra-kystique limite la cellularité du prélèvement (75 % des cas le prélèvement est négatif [222], [223] ; la sensibilité de l'histologie dans l'évaluation de la malignité n'est que de 44 % [222].

Le dosage intra-kystique des marqueurs tumoraux ACE, CA 72-4 s'est avéré décevant également ; une Se et une Sp d'environ 40 % dans le dépistage des TIPMP (*vs.* cystadénome) [224], un taux ACE intra kystique > 200 ng/ml permet dans 52,4 % d'identifier la malignité de la lésion [225]. Le dosage de l'ACE intra-kystique est malgré ces résultats, réalisé en routine dans les suivis des TIPMP, par prélèvement sous écho-endoscopie.

Ont été identifiés comme facteurs de mauvais pronostic nécessitant une surveillance :

- être âgé de moins de 65 ans et avoir des antécédents familiaux de cancer du pancréas au 1^{er} ou 2^{eme} degré ;
- la survenue de nodule muraux intra-kystiques > 5 mm ;
- la dilatation du canal pancréatique principal > 6 mm ;
- la taille de kyste > 30 mm ;
- un antécédent personnel de résection pour TIPMP avec au moins dysplasie de haut grade.

et les facteurs posant l'indication chirurgicale :

- trois épisodes de pancréatite aiguë ;

- la survenue de nodule muraux intra-kystiques > 5 mm ;
- l'atteinte nodulaire ou la dilatation du canal pancréatique principal > 6 mm.

Cependant ces critères ne reposent pas sur des recommandations et il est donc difficile d'établir une prise en charge consensuelle, et tous les dossiers pouvant faire suspecter une évolution cancéreuse sont discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire de cancérologie digestive.

Le traitement curateur envisageable est la résection chirurgicale, mais cette dernière est grevée d'une mortalité opératoire (2 à 5 % selon les études) et d'une morbidité estimée à 30 % [177], [178].

Il existe une grande disparité des lésions, d'évolution et de pronostic ; il est donc indispensable d'identifier précocement les lésions à haut risque de dégénérescence, pour guider la surveillance et orienter de façon à cibler ces patients vers la chirurgie.

Les objectifs de cette étude étaient d'examiner s'il y avait une différence de profil métabolomique entre :

- les *TIPMP* non dégénérées à *RM* de dégénérescence en cancer et les *TIPMP* dégénérées en cancer ;
- les *TIPMP* non dégénérées à *RF* de dégénérescence en cancer et les *TIPMP* dégénérées en cancer ;
- les *TIPMP* à risque différent de dégénérescence en cancer (*RM vs. RF*).

4.3.3 Résultats et discussion

4.3.3.1 Préambule

4.3.3.1.1 Population de patients Trente-neuf échantillons provenant de patients qui ont subi une ponction sous écho-endoscopie entre mars 2014 et février 2015 au sein de du Centre Hospitalo-Universitaire Régional de Besançon ont été analysés et sélectionnés de manière prospective. Seuls les patients remplissant les critères suivants ont été inclus :

- âge compris entre 18 et 85 ans ;
- pas de grossesse ;
- diagnostic de *TIPMP* confirmé sur 3 examens (scanner X abdominal, pancréato IRM et écho-endoscopie) ;
- taille du kyste > 10 mm ;

— recueil de non-opposition à la participation à l'étude.

Parmi ces 39 patients :

— 16 patients présentaient une *TIPMP* à risque moyen (*RM*) de développer un cancer ;

RM : taille du kyste comprise entre 10 et 30 mm, pas de facteur de risque ;

— 14 patients présentaient une *TIPMP* à risque fort (*RF*) de développer un cancer ;

RF : au moins un facteur de risque ;

— 9 patients présentaient une *TIPMP* dégénérée en cancer (*ADK*).

4.3.3.2 Résultats

4.3.3.2.1 Qualité des spectres Tous les spectres obtenus des 39 échantillons analysés étaient de grande qualité.

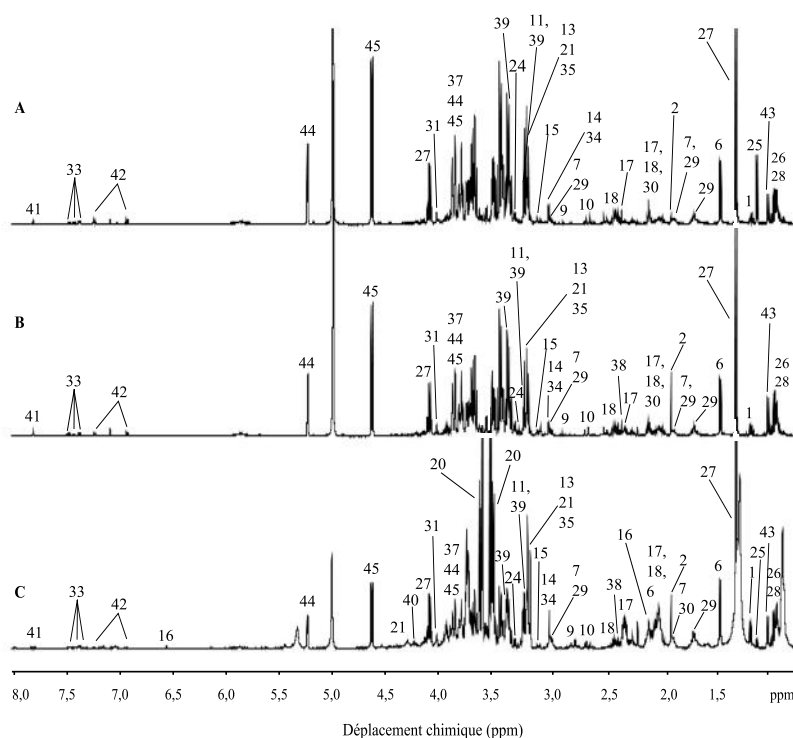


FIGURE 4.19 – Spectres 1D ^1H RMN HRMAS obtenus de l'analyse de *TIPMP* (A) *TIPMP* non dégénérées en cancer à *RM*; (B) *TIPMP* non dégénérées en cancer à *RF*; (C) *TIPMP* dégénérées en cancer. Les contenus métaboliques des spectres sont directement comparables car l'intensité de chaque spectre a été normalisée par rapport au poids de l'échantillon analysé. Les identifications des métabolites sont données dans le tableau 3.1 (Chapitre 3).

Tous les spectres obtenus des 39 échantillons analysés étaient de grande qualité. Le spectre 1D RMN HRMAS représentatif de chaque classe d'échantillon est montré en

figure. 4.19 (*RM vs. RF vs. ADK*).

Un total de 37 métabolites a été identifié dans la région spectrale 0,90-8,00 ppm des spectres obtenus des 39 échantillons.

4.3.3.2 *TIPMP à RM de dégénérescence en cancer vs. TIPMP dégénérées en cancer*

Résultats de l'OPLS-DA Vingt-cinq échantillons ont été étudiés dans ce modèle à deux classes. Seize échantillons ont été obtenus de patients présentant une *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer et 9 de patients présentant une *TIPMP* dégénérée en cancer. Une *ACP* a été premièrement appliquée à nos données montrant une population homogène sans aucune valeur extrême. Les deux classes ont clairement été séparées par une *OPLS-DA* à deux composantes basée sur les métabolites *VIP*. Les valeurs *VIP* ont été employées afin d'identifier les caractéristiques contribuant à la séparation des groupes (cf. fig.4.20), montrant une représentation précise des données et un bon critère d'ajustement ($R^2Y = 0,94$) et prédiction ($Q^2 = 0,57$).

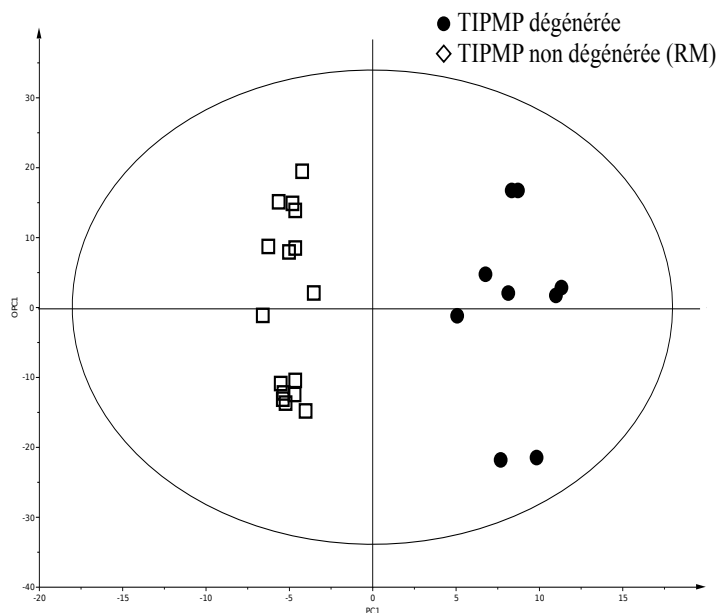


FIGURE 4.20 – Résultats de l'OPLS-DA à deux composantes basée sur les métabolites *VIP*. Un modèle à deux classes incluant 25 échantillons de *TIPMP* (*TIPMP* non dégénérées à *RM* ($n = 16$) et *TIPMP* dégénérées ($n = 9$)). Une distinction nette entre les classes est montrée.

Une plus grande concentration de thréonine, sérine, leucine, isoleucine, créatine, mé-

thionine et lysine a été montrée dans les échantillons de *TIPMP* non dégénérées à *RM* de dégénérescence en cancer. Inversement, une plus grande concentration de choline, succinate, lactate et d'isobutyryl-L-carnitine a été révélée dans les échantillons de *TIPMP* dégénérées en cancer.

Résultats de l'analyse de réseaux Les données ont été analysées en utilisant l'algorithme *ADEMA* (cf. fig.4.21).

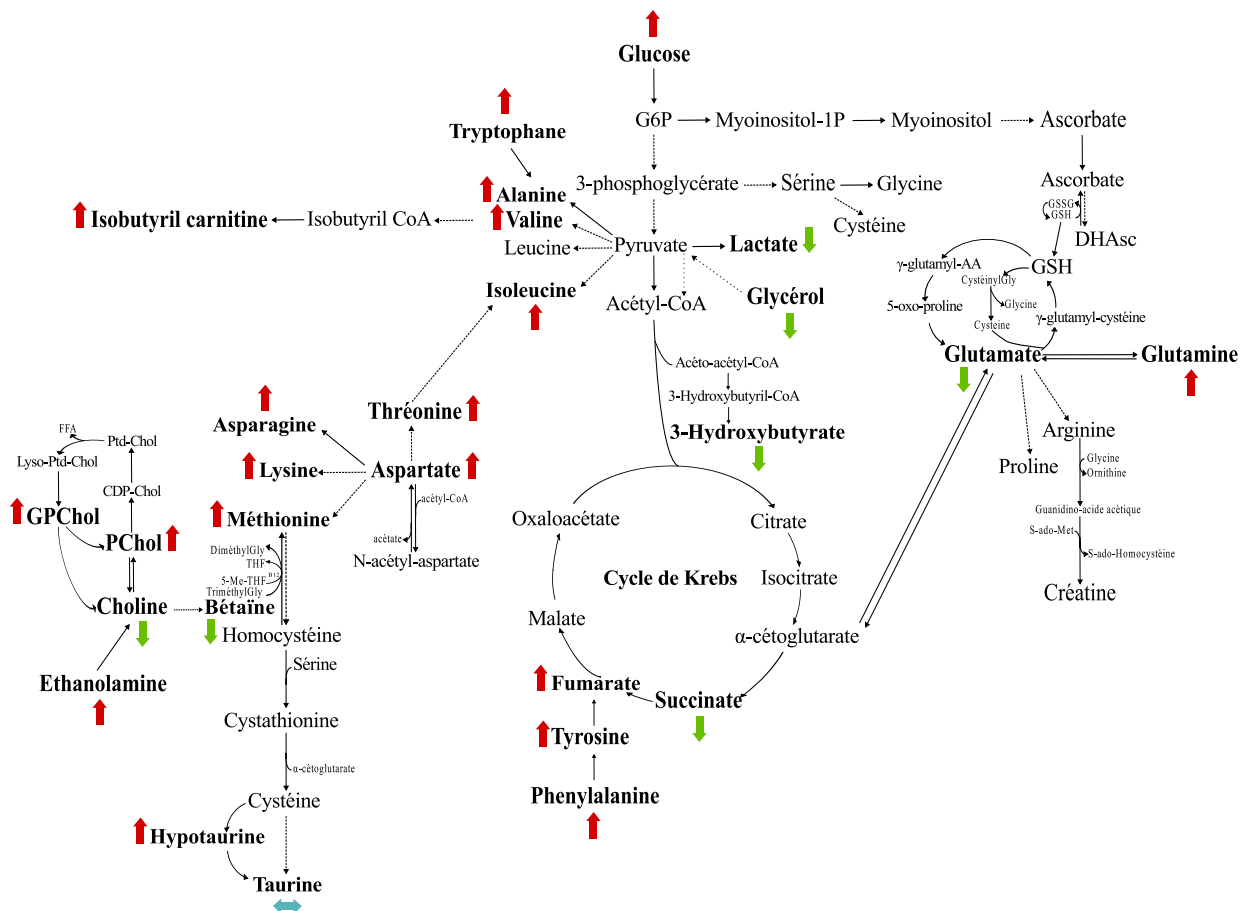


FIGURE 4.21 – Les échantillons de *TIPMP* avec *RM* ($n = 16$) ont été comparés aux *TIPMP* dégénérées ($n = 9$). Résultats de l'analyse de réseaux selon l'algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans la population de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes.

Une concentration plus élevée de phosphocholine, glycérophosphocholine, d'éthanolamine, de méthionine, tyrosine, phénylalanine, glucose, aspartate, thréonine, isoleucine, tryptophane, d'alanine, de valine, d'hypotaurine, de glutamine, fumarate, d'asparagine,

d'isobutyryl-L-carnitine et de lysine a été prédite dans les échantillons de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer. De plus, une concentration plus faible de choline, bétaïne, glycérol, lactate, 3-hydroxybutyrate, succinate et de glutamate a été prédite dans les échantillons de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer. Finalement, la taurine a été prédite équivalente entre les deux groupes.

4.3.3.2.3 *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer vs. *TIPMP* dégénérées en cancer

Résultats de l'OPLS – DA Vingt-trois échantillons ont été étudiés dans ce modèle à deux classes.

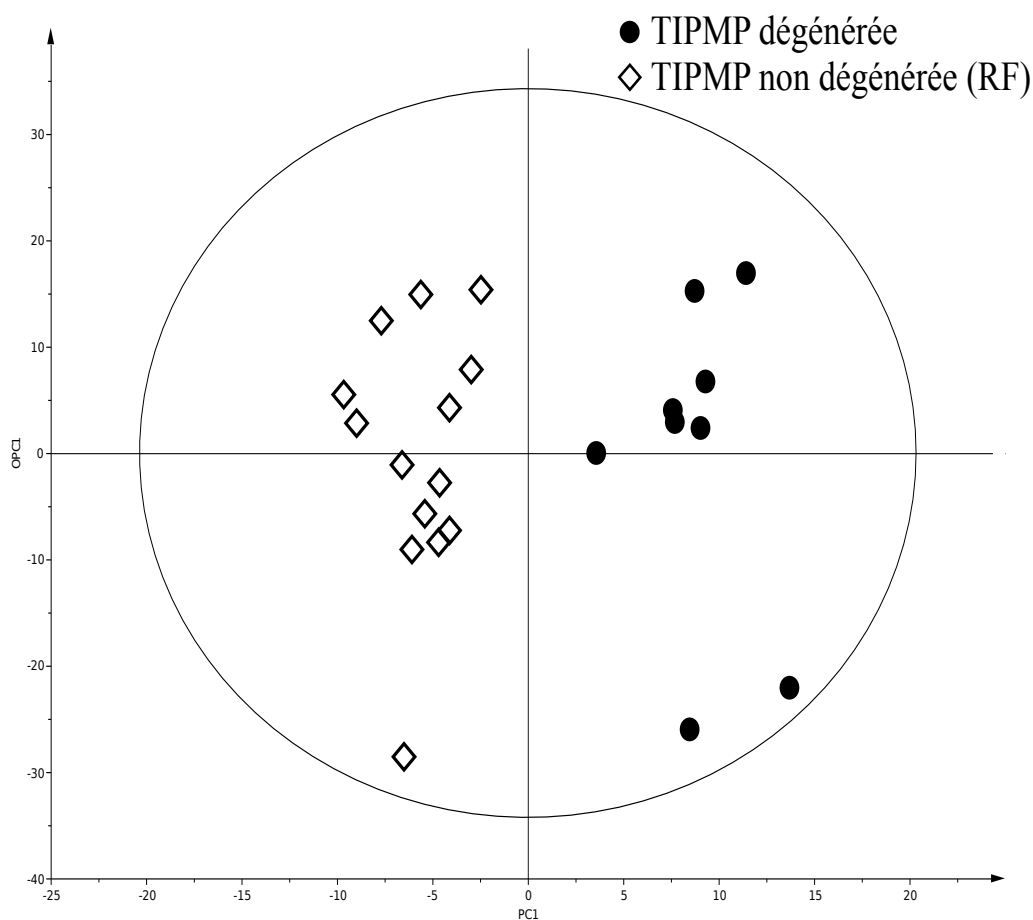


FIGURE 4.22 – Résultats de l'OPLS – DA à deux composantes basée sur les métabolites *VIP*. Un modèle à deux classes incluant 14 échantillons de *TIPMP* (*TIPMP* non dégénérées en cancer à *RF* ($n = 14$) et *TIPMP* dégénérées en cancer ($n = 9$)). Une distinction nette entre les classes est montrée.

Quatorze échantillons ont été obtenus de patients présentant un *RF* de dégénérescence en cancer et 9, de patients présentant une *TIPMP* dégénérée en cancer. Une *ACP* a été premièrement appliquée à nos données montrant une population homogène sans aucune valeur extrême. Les deux classes ont clairement été séparées par une *OPLS-DA* à deux composantes basée sur les métabolites *VIP*. Les valeurs *VIP* ont été employées afin d'identifier les caractéristiques contribuant à la séparation des groupes (cf. fig.4.22), montrant une représentation précise des données et un bon critère d'ajustement ($R^2Y = 0,97$) et prédiction ($Q^2 = 0,69$).

Une plus grande concentration de thréonine, sérine, aspartate, méthionine, lysine et alanine a été montrée dans les échantillons de *TIPMP* non dégénérées en cancer à *RF*. Inversement, une plus grande concentration de choline, succinate, lactate a été révélée dans les échantillons de *TIPMP* dégénérées en cancer.

Résultats de l'analyse de réseaux Les données ont été analysées en utilisant l'algorithme *ADEMA* (cf. fig.4.23).

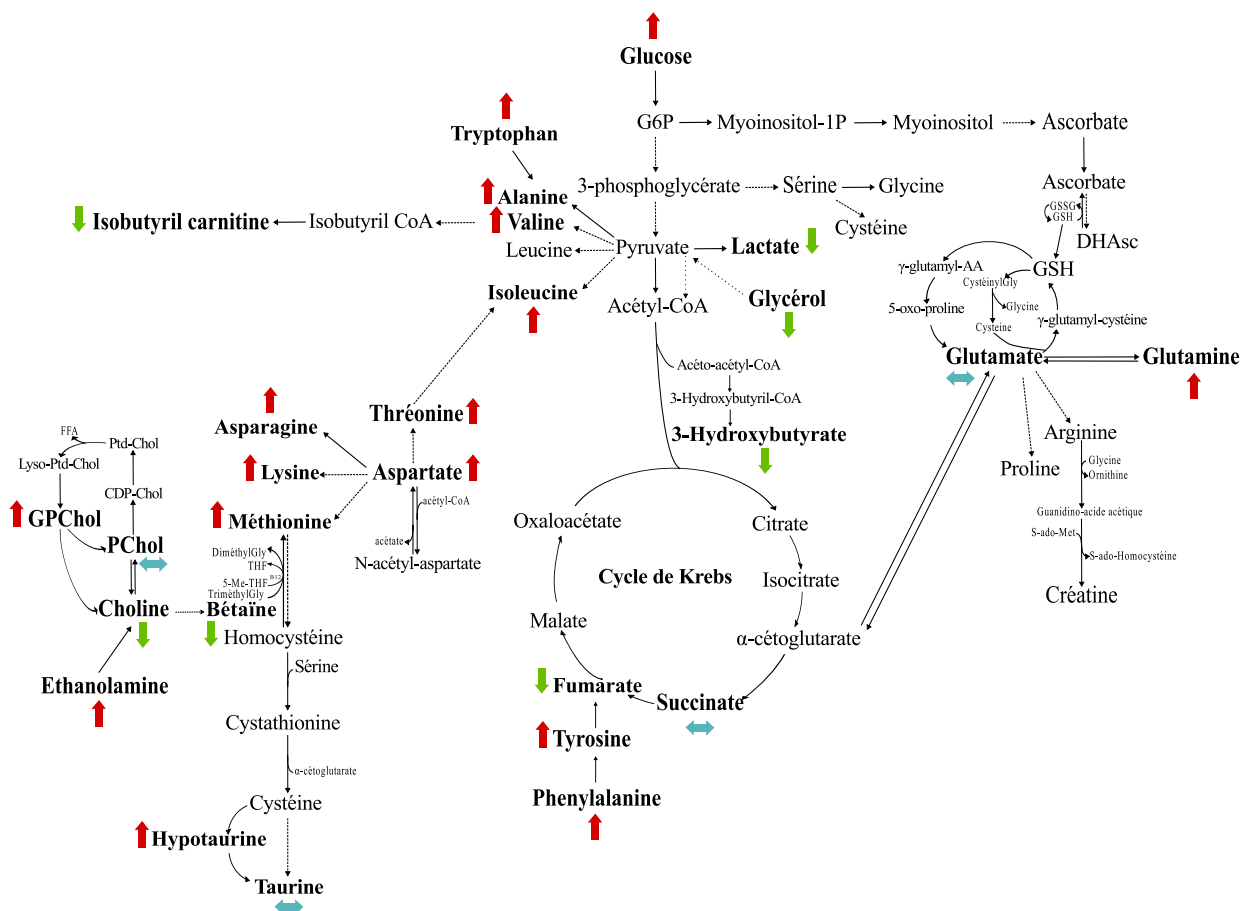


FIGURE 4.23 – Les échantillons de *TIPMP* avec *RF* de dégénérescence en cancer ($n = 14$) ont été comparés aux *TIPMP* dégénérées en cancer ($n = 9$). Résultats de l'analyse de réseaux selon l'algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d'augmenter ou de diminuer dans la population de *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes.

Une concentration plus élevée d'hypotaaurine, éthanolamine, de glycérophosphocholine, méthionine, lysine, d'asparagine, aspartate, de thréonine, d'isoleucine, de valine, d'alanine, de tryptophane, glucose, phénylalanine, tyrosine, et de glutamate a été prédite dans les échantillons de *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer. De plus, une concentration plus faible de choline, bétaïne, d'isobutyryl-L-carnitine, de fumarate, 3-hydroxybutyrate, lactate et de glycérol, a été prédite dans les échantillons de *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer. Finalement, les autres métabolites ont été prédits d'être équivalents entre les deux groupes.

4.3.3.2.4 *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer *vs.* *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer

Résultats de l'OPLS – DA Trente échantillons ont été étudiés dans ce modèle à deux classes.

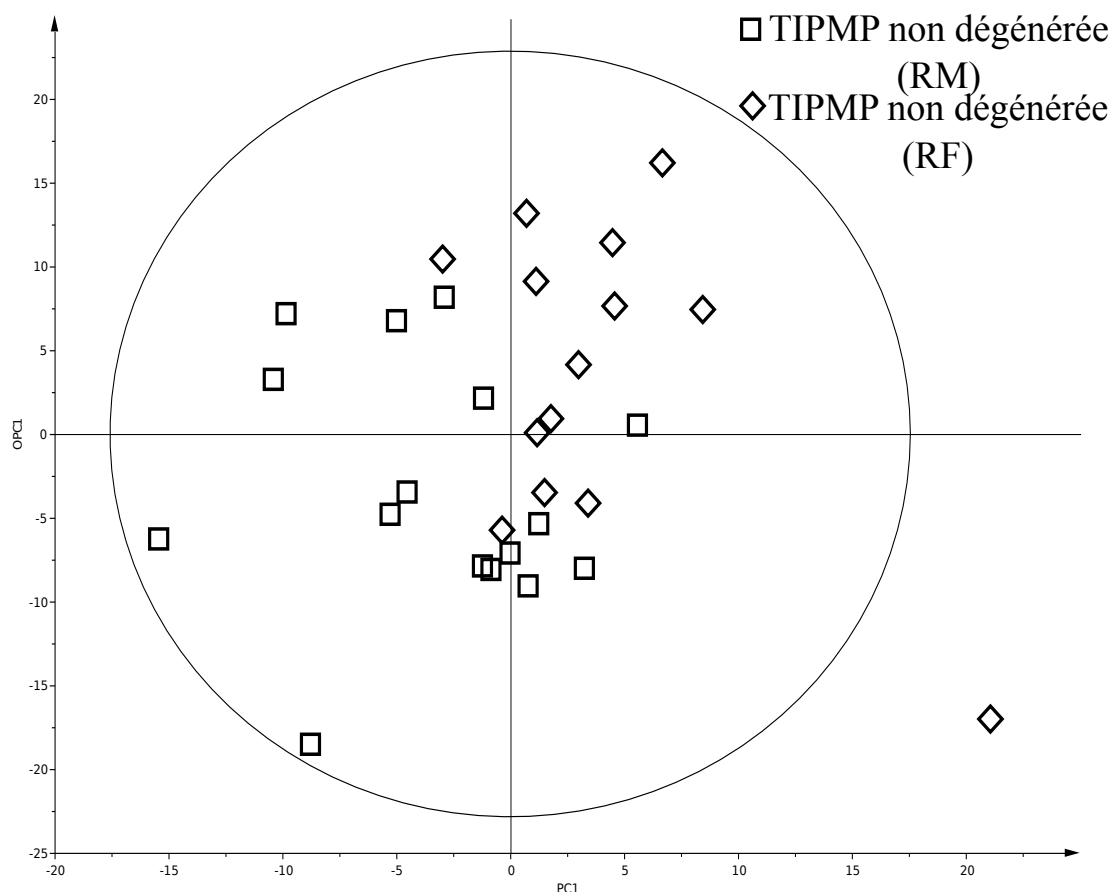


FIGURE 4.24 – Résultats de l'OPLS – DA à deux composantes. Un modèle à deux classes incluant trente échantillons de *TIPMP* non dégénérée en cancer (*RM* ($n = 16$) et *RF* ($n = 14$)). Aucune distinction n'est possible entre les deux classes.

Seize échantillons ont été obtenus de patients présentant un *RM* de dégénérescence en cancer et 14 de patients présentant un *RF* de dégénérescence en cancer. Les 2 classes n'ont pas pu être séparées par une OPLS – DA à deux composantes ($R^2Y = 0,56$; $Q^2 = 0,15$) (cf. fig.4.24).

Résultats de l'analyse de réseaux Les données ont été analysées en utilisant l'algorithme *ADEMA* (cf. fig.4.25).

Une concentration plus élevée de choline, phosphocholine, bétaïne, d'isobutyryl-L-carnitine, de lysine, thréonine, tryptophane, glucose, glycérol, fumarate et de phényla-

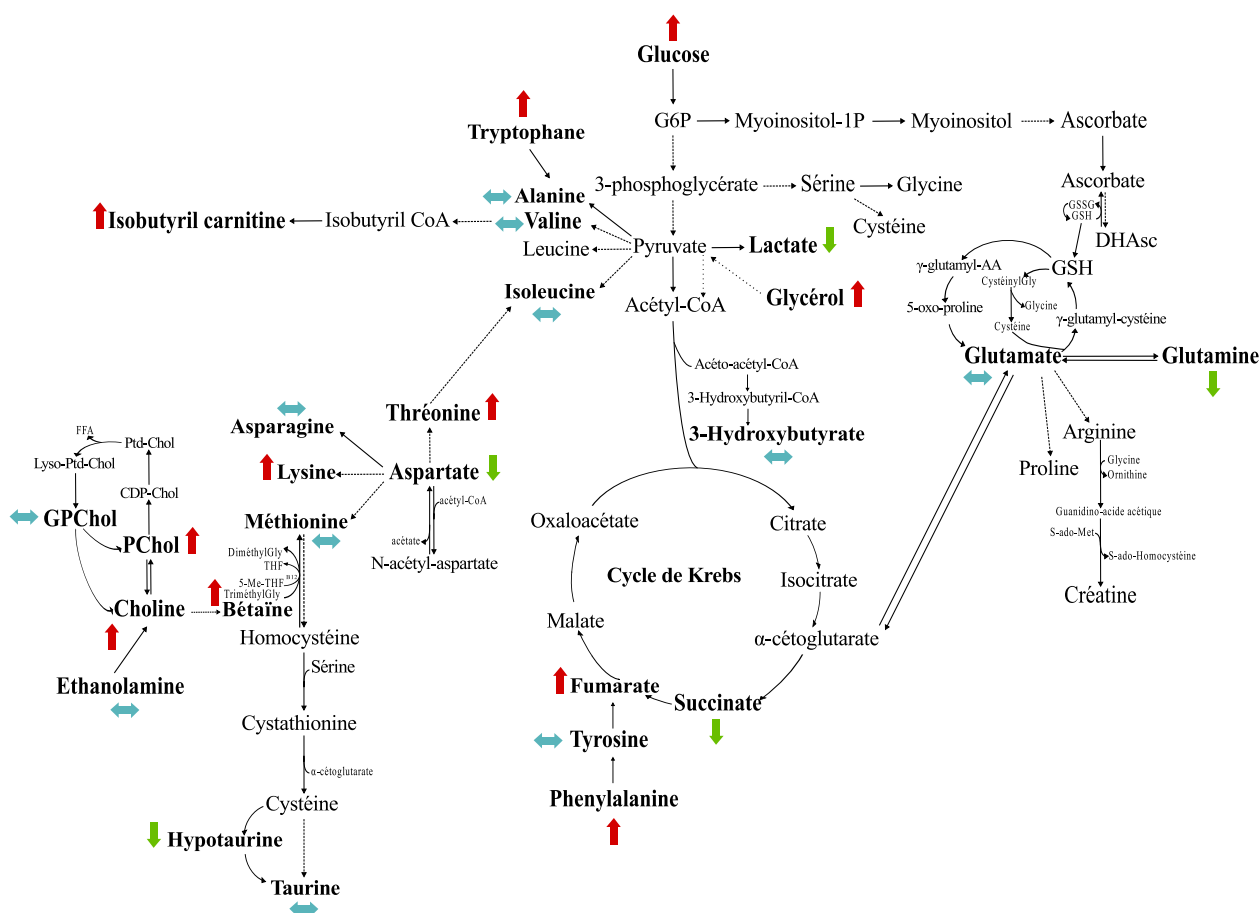


FIGURE 4.25 – Les échantillons de *TIPMP* avec *RM* (n = 16) ont été comparés aux échantillons de *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer (n = 14). Résultats de l’analyse de réseaux selon l’algorithme *ADEMA*. Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement les métabolites qui sont prédits d’augmenter ou de diminuer dans la population de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer, les flèches bleues indiquent les métabolites qui sont prédits de rester stables entre les deux groupes.

lanine, a été prédite dans les échantillons de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer. De plus, une concentration plus faible d’hypotaurine, aspartate, de succinate, glutamine et lactate, a été prédite dans les échantillons de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer. Finalement, les autres métabolites ont été prédits d’être équivalents entre les deux groupes.

4.3.3.3 Discussion

L’utilité potentielle clinique par *RMN HRMAS* via une analyse métabolomique dans le but d’identifier de nouveaux biomarqueurs "kystiques" a été étudiée. L’identification de ces métabolites permet de mieux comprendre l’altération des métabo-

lismes cellulaires au cours de l'oncogenèse [226].

Ces dernières années il y a un intérêt croissant pour les biomarqueurs kystiques, en utilisant des méthodes de profilage basée sur l'ADN, l'ARN et les cytokines. En effet, les médecins sont maintenant de plus en plus souvent amenés à diagnostiquer des kystes pancréatiques avec un potentiel malin, tels qu'un risque moyen ou fort de dégénérescence en *ADK* du pancréas, il y a une demande importante des médecins afin de trouver de nouveaux biomarqueurs du risque de dégénérescence.

La *RMN HRMAS* fournit de nouvelles perspectives dans les relations entre les voies métaboliques et les *TIPMP*. Cette méthode permet l'identification de l'effet du métabolisme sur les membranes cellulaires, le métabolisme phospholipidique, la production d'énergie *via* la néoglucogénèse, le cycle de Krebs et le stress oxydatif.

La plupart des *TIPMP* sont trouvés fortuitement dans 60 % des cas, la moyenne d'âge de ces patients étant de 65.

Actuellement, les patients souffrant de *TIPMP* sont sous surveillance. Cependant, le rythme et la pratique restent à déterminer. Un consensus international est établi pour les patients qui ne présentent pas de symptômes : un contrôle entre 3 et 6 mois *via* une pancréatoIRM ou un scanner X. Mais aujourd'hui, la modalité d'imagerie, la période et le rythme de la surveillance font débat. De plus, la récurrence post-opératoire varie de 10 à 27 % [227]. He *et al.* ont relaté 16 % de récurrence post-opératoire chez les patients présentant des tumeurs non-invasives, et 20 % chez les patients présentant des tumeurs invasives [228]. De plus, les patients présentant une *TIPMP* sont sujet à une surveillance contraignante et stressante, pendant plusieurs années. Qui plus est, la chirurgie pancréatique est associée à une morbidité et une mortalité significatives. En effet, le taux de mortalité, même dans les centres spécialisés varie de 2 à 5 % et la morbidité peut atteindre 70 %. L'utilisation d'un marqueur étroitement lié à la physiopathologie de la progression maligne des *TIPMP* serait d'un intérêt particulier.

Nos résultats sur le métabolome des *TIPMP* dégénérées en cancer, après comparaison avec les *TIPMP* à *RM* et *RF* de dégénérescence en cancer, montrent un niveau plus élevé de choline, bêtaïne, lactate, glycérol et de 3-hydroxybutyrate dans les échantillons de patients présentant une *TIPMP* dégénérée en cancer. Le lactate fait partie des métabolites augmentés dans le cas de cancer, cela s'explique par l'effet Warburg. Les cellules cancéreuses préfèrent métaboliser le glucose par la glycolyse pour générer de

l'*ATP* plutôt que par la phosphorylation oxydative et ce même en présence suffisante d'oxygène. C'est un mécanisme moins performant en terme de production d'énergie, responsable de la production accrue de lactate et une consommation de glucose pour répondre au besoin prolifératif. Nos résultats sont cohérents avec les rapports précédents dans le cancer colorectal, de l'estomac, les pathologies des voies biliaires, le cancer du pancréas [229], [230], [231], [232], [233].

Une surexpression de la *LDHA* est mise en évidence dans les cancers du sein et colorectaux [234], [190] et cela a été récemment identifié dans les cancers pancréatiques [235]. Des études ont récemment montré les différentes étapes dans lesquelles la *LDHA* est impliquée (formation, entretien et progression de la tumeur) [191], [192]. Etant donné la forte glycolyse dans les cancers pancréatiques, conduisant à une augmentation de la production de lactate, la capacité à utiliser ce lactate pourrait fournir un avantage supplémentaire aux cellules tumorales pancréatiques. En effet, l'inhibition de la glycolyse à travers la suppression de l'expression de la *LDHA* par l'*ARN* interférence conduit à la diminution de la croissance des cellules tumorales [236]. Comme décrit dans le travail de Koong *et al.* [45] et Guillaumond *et al.* [27], des zones au sein des tumeurs pancréatiques sont hypoxiques, ce qui a des implications sur le métabolisme cellulaire. L'hypoxie favorise la croissance tumorale particulièrement en stimulant la glycolyse.

Nos résultats sur le métabolome des *TIPMP* dégénérées sont aussi en accord avec d'autres études qui ont trouvé un taux plus élevé de choline dans différents cancers. Le rôle de la choline kinase α (*Chk- α*) dans la transformation et progression maligne est bien décrit dans la littérature, dans plusieurs types de cancers. Une activité augmentée de la (*Chk- α*) a été observée dans les cancer du sein [193], colorectaux [194], des poumons [195], des ovaires [196] et plus récemment dans les cancers de l'endomètre [197] et du pancréas [198]. Par ailleurs, de nombreux travaux ont été réalisés sur l'utilisation de la choline en guise de marqueur radiologique : par PET-scanner employé dans le bilan d'extension du cancer de prostate. La choline couplée à une technique d'imagerie de résonance magnétique nucléaire semble prometteuse pour évaluer la réponse à une chimiothérapie en particulier, évaluée dans le cancer de la prostate et le cancer du sein. Il est possible d'imaginer qu'il serait également possible d'employer un PET-scan à la choline pour surveiller la dégénérescence de *TIPMP*.

Nos résultats sur le métabolome des *TIPMP* dégénérées en cancer sont en accord avec les

études qui ont trouvé un niveau élevé de 3-hydroxybutyrate dans plusieurs cancers [190]. En effet, Martinez-Outschoorn *et al.* ont établi un lien direct de cause à effet entre la production de corps cétoniques, la ré-utilisation et la progression de la tumeur [235]. Ainsi les corps cétoniques, le 3-hydroxybutyrate, et le lactate alimentent la croissance tumorale et les métastases. Cela fournit une preuve de l'"effet Warburg inverse" [235], [191].

Il est intéressant de remarquer dans notre faible effectif d'*ADK*, qu'aucun patient n'avait une consommation alcoolique chronique (définie par > 30 g pour l'homme et 20 g d'alcool pour la femme par jour selon l'*OMS*), mais on peut se poser la question de l'influence des toxiques (tabac, OH, médicaments) sur les métabolismes cellulaires. Il semble intéressant de poursuivre cette étude et chercher à identifier ces facteurs confondants.

Quand les échantillons provenant de patients ayant différents risques de dégénérescence en *ADK*, la distinction a pu être faite entre les *RM* et *RF* de dégénérescence en cancer. Nos résultats montrent un niveau élevé de choline, phosphocholine, bêtaïne, lysine, thréonine, phenylalanine, fumarate, d'isobutyryl-L-carnitine, de tryptophane, glucose et glycérol, dans les échantillons provenant de patients avec un *RM* de dégénérescence en *ADK*. Au contraire, un niveau plus faible d'hypotaurine, aspartate, de lactate succinate, et de glutamine, a été trouvé dans les échantillons provenant de patients avec un *RM* de dégénérescence en *ADK*. La diminution de succinate mis en évidence par *ADEMA* dans les échantillons de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer, suggère une diminution de l'activité du cycle de Krebs. Les études montrent que dans de nombreux cancers la *SDH* est inactivée, notamment dans 50 % des phéochromocytomes et paragangliomes héréditaires; cela concerne également un certain nombre de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST). Les enzymes du cycle de Krebs, la fumarate deshydrogénase (*FH*) et la *SDH* (*SDHB*, *SDHC*, *SDHD*) agissent comme suppresseurs de tumeurs. L'accumulation de succinate conduit d'une part à l'accumulation de radicaux libres produits par une chaîne respiratoire défectueuse (dont nous connaissons les effets néfastes). Le succinate accumulé dans la mitochondrie peut être transporté hors de celle-ci et induire la stabilisation anormale de facteurs de transcription liés à l'hypoxie (comme *HIF* - 1α), grâce à l'inactivation de différentes hydroxylases (notamment prolylhydroxylases ou PhDs). Il y a donc une sur-expression de *HIF* - 1 qui est un facteur de croissance vasculaire endothélial : favorise la prolifération vasculaire.

La glutamine, est particulièrement étudiée pour son rôle dans le métabolisme du cancer

parce qu'elle semble être nécessaire à la croissance de plusieurs types de tumeurs [192]. De plus un taux élevé d'isobutyryl-L-carnitine a été montré chez les patients avec un *RF* de dégénérescence en *ADK*. L'isobutyryl-L-carnitine est un produit dérivé de la dégradation des acides gras ; il participe à la formation d'acétyl-CoA qui est impliqué dans de nombreux métabolismes. Une étude *ex vivo* a constaté que des cellules pancréatiques modifiées présentaient une accumulation significative d'isobutyryl-L-carnitine ; cependant il reste à déterminer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Ce taux élevé d'isobutyryl-L-carnitine suggère un déficit de l'isobutyryl-CoA dehydrogenase [237].

Cette étude montre que le profil métabolomique peut fournir des informations sur le risque de dégénérescence chez les patients présentant une *TIPMP*.

Peu de patients sont nécessaires afin de construire un modèle qui peut prédire les issues médicales/chirurgicales dans les *TIPMP* et les cancers pancréatiques de manière assez précise ; ceci peut contribuer à promouvoir cette technique.

L'analyse métabolomique pourrait approfondir notre connaissance du métabolisme impliqué dans la progression maligne et pourrait aussi conduire à l'identification de nouvelles cibles pour le diagnostic, l'imagerie ou de futures options thérapeutiques.

Il est attendu que le rôle de la spectroscopie *RMN HRMAS* pourrait être évalué en routine clinique dans le cadre des *TIPMP*. Cette nouvelle que nous appelons "chirurgie/médecine guidée par la métabolomique" pourrait aider les médecins à distinguer les patients souffrant de *TIPMP* à *RM* de dégénérescence en cancer de ceux à *RF* de dégénérescence en cancer.

En conclusion, comme nous sommes capables de distinguer :

- les *TIPMP* dégénérées en cancer des *TIPMP* à *RM* et *RF* de dégénérescence en cancer ;
- les *TIPMP* à *RM* des *TIPMP* à *RF* de dégénérescence en cancer.

nous pouvons imaginer utiliser cette technique en routine afin de prédire le risque de dégénérescence. En effet, si ces résultats sont confirmés dans d'autres études, nous pourrions trouver un nouveau biomarqueur qui pourrait être dosé en routine clinique afin de prédire le risque de dégénérescence chez les patients présentant une *TIPMP*.

Par conséquent, cette étape permettrait aux médecins de faire plus facilement la distinction entre *TIPMP* à *RM* et *RF* de dégénérescence en cancer, afin de guider la surveillance des patients et d'identifier les lésions avec un haut-risque de progression maligne très ra-

pidement.

Cela pourrait aider les médecins à recourir à la chirurgie ou pas; et au vu de la haute morbidité/mortalité, cela pourrait avoir un impact positif sur le traitement des patients et même sur leur survie.

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

5.1 Conclusions

En conclusion, ce travail montre que la spectroscopie *RMN HRMAS* fournit des informations uniques, précises et utiles pouvant être appliquées en routine clinique (préparation facile de l'échantillon, analyse rapide et résultats robustes) :

- dans la distinction entre tissus cancéreux et tissus sains ;
permettant le contrôle des marges ;
- dans la distinction entre deux types de pathologies ;
entre bénin et malin par exemple ;
- dans la détection de mauvais pronostic dans le cadre des *ADK* pancréatiques.

Plus précisant dans le cadre de cette thèse :

- **concernant les glandes parathyroïdes hypersécrétantes** : (*HPT1 vs. HPT rénales et PUG vs. PMG*). Il est donc attendu que le rôle de la spectroscopie *RMN HRMAS* per-opératoire pourrait alors être évalué dans le cadre de l'*HPT1* afin de diagnostiquer les *PMG*.
- **concernant les ADK pancréatiques** : comme nous sommes capables de distinguer le parenchyme pancréatique de l'adénocarcinome pancréatique, nous pouvons imaginer utiliser cette technique afin d'analyser plusieurs échantillons prélevés à plusieurs endroits des marges de résection, en plus des échantillons de tissus tumoraux. Cette dernière étape pourrait aider les chirurgiens pour la détection de cellules tumorales résiduelles ainsi que pour le contrôle des marges. Par ailleurs, cette approche peut être également utilisée en routine clinique pour estimer la survie chez les patients présentant un adénocarcinome pancréatique. Finalement, en raison de la forte morbidité et mortalité durant la chirurgie, nous pouvons aussi imaginer utiliser cette technique avant la chirurgie, avec l'utilisation de biopsies percutanées ou endoscopiques. Cela pourrait avoir un impact positif sur la prise en charge des patients.
- **concernant les TIPMP** : la *RMN HRMAS* a montré sa capacité à distinguer les échantillons de *TIPMP* à *RM* et *RF* de dégénérescence en cancer. Ce résultat est très prometteur, et devrait, après une confirmation par d'autres études et une population plus importante, mettre en lumière un biomarqueur lié à la dégénérescence en cancer. Ce dernier pourrait être détecté en *RMN HRMAS* et également dosé en routine clinique afin d'affiner le diagnostic de *TIPMP* quant au risque de

dégénérescence en cancer, et de procéder à une surveillance plus active de patients présentant une *TIPMP*.

5.2 Perspectives

De par sa rapidité de préparation des échantillons, d'acquisition des spectres et de traitement des données, il apparaît que la spectroscopie *RMN HRMAS* pourrait être un outil complémentaire dans la stratégie diagnostique et thérapeutique des patients et notamment en per-opératoire afin de guider le chirurgien par la métabolomique.

Cette approche que nous l'appelons « chirurgie guidée par la métabolomique » est une perspective bien réelle car elle est actuellement utilisée pour la neurochirurgie dans le cadre du projet *ExtempoRMN* (cf. fig.5.1). A ce titre, le transport rapide des échantillons (en 20 s) est assuré par un système pneumatique reliant la salle d'opération et la salle où sont réalisées les analyses *RMN HRMAS*. Le transport rapide des échantillons, ainsi que l'acquisition et le traitement des données en 20 min, rendent notre technique applicable durant une chirurgie.

De plus, le coût est estimé inférieur à 50 euros par échantillon.

Pour finir, ce qui est actuellement réalisé en neurochirurgie peut être étendu dans d'autres domaines comme dans le cadre de l'hyperparathyroïdie et de l'adénocarcinome pancréatique.

Une deuxième perspective serait d'effectuer d'autres analyses dans le cadre de l'organisation des systèmes biologiques (« omiques ») en prenant en compte les interactions entre la métabolomique, la génomique, la transcriptomique et éventuellement la protéomique et la lipidomique.



FIGURE 5.1 – Système pneumatique reliant le bloc opératoire de Neurochirurgie à la salle du spectromètre. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre.

Bibliographie

- [1] Sumner LW, Mendes P, and Dixon RA. Plant metabolomics : large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62 :817–836, 2003.
- [2] Cheng LL, Ma MJ, Becerra L, Ptak T, Tracey I, Lackner A, and et al. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci*, 94 :6408–6413, 1997.
- [3] Schneider CA, Rasband WS, and Eliceiri K. Nih image to imagej : 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9 :671–675, 2012.
- [4] Heude C. *Developpement de nouvelles methodes analytiques dans l'agroalimentaire par RMN*. Universite de Strasbourg, 2015.
- [5] Cicek AE, Bederman I, Henderson L, Drumm ML, and Ozysoyoglu G. Adema : An algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information. *PLoS Comput Biol*, 9 :é1002859, 2013.
- [6] R Development Core Team. A language and environment for statistical computing. Retrieved from <http://www.R-project.org>.
- [7] Netter FH. *Atlas d'anatomie humaine*. Elsevier-Masson, New-York, 2015.
- [8] Castellano-Megias VM, Ibarrola de Andre C, Lopez-Alonso G, and COLina-Ruizdelgado F. Pathological features and diagnosis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *World J Gastrointest Oncol*, 15 :311–324, 2014.
- [9] Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, and Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl acad Sci USA*, 68 :2374–2376, (1971).
- [10] Horning E and Horning MG. Metabolic profiles : gas-phase methods for analysis of metabolites. *AM Assoc Clin Chem*, 17 :802–809, (1971).
- [11] Oliver SG, Winson MK, Kell DB, and Bagnanz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16 :373–378, 1998.
- [12] Tweeddale H, Notley-McRobb L, and Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of escherichia coli, as revealed by global metabolite pool (metabolome) analysis. *Journal of bacteriology*, 180 :5109–5116, 1998.
- [13] Nicholson JK, Lindon JC, and Holmes E. Metabonomics : understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological nmr spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29 :1181–1189, 1999.
- [14] Rainville PD, Murphy JP, Tomany M, Wilson ID, Smith NW, Evans C, and et al. An integrated ceramic, micro-fluidic device for the lc/ms/ms analysis of pharmaceuticals in plasma. *Analyst*, 140 :5546–5556, 2015.

- [15] Dumas ME. Metabolome 2.0 : quantitative genetics and network biology of metabolic phenotypes. *Mol. BioSyst*, 8 :2494–2502, 2012.
- [16] Chen R, Mias GI, Li-Pook-Than J, Jiang L, Lam HYK, Chen R, and et al. Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. *Cell*, 148 :1293–1307, 2012.
- [17] Kaddurah-Daouk R, McEvoy J, Baillie RA, Lee D, Yao JK, Doraiswamy PM, and et al. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 12 :934–945, 2007.
- [18] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, and Holmes E. Metabonomics : a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1 :153–161, 2002.
- [19] Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, and Nicholson JK. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci*, 106 :14728–14733, 2009.
- [20] Santos CF, Kuhranewicz J, Tabatabai ZL, Simko JP, Keshari KR, Gbegnon A, and et al. Metabolic, pathologic, and genetic analysis of prostate tissues : Quantitative evaluation of histopathologic and mrna integrity after hr-mas spectroscopy. *NMR Biomed*, 23 :391–398, 2010.
- [21] DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, and Thompson CB. The biology of cancer : Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7 :11–20, 2008.
- [22] Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, and Thompson CB. Bcl-xl prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial atp/adp exchange. *Mol cell*, 3 :159–167, 1999.
- [23] Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, and et al. The tumor suppressor lkb1 kinase directly activates amp-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 :3329–3335, 2004.
- [24] Izyumov DS, Avetisyan AV, Pletjushkina OY, Sakharov DV, Wirtz KW, Chernyak BV, and et al. Wages of fear : transient threefold decrease in intracellular atp level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1658 :141–147, 2004.
- [25] Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, and et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120 :237–238, 2005.
- [26] Gatenby RA and Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis. *Nat Rev Cancer*, 4 :891–899, 2004.
- [27] Guillaumont F, Leca J, Olivares O, Lavaut MN, Vidal N, Berthezène P, and et al. Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci*, 110 :3919–3924, 2013.
- [28] Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, and et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in ras-transformed cells. *Nature*, 497 :633–637, 2013.
- [29] Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone, and et al. Oncogenic kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149 :656–670, 2012.

- [30] Zhao D, Zou SW, Liu Y, Zhou X, Mo Y, Wang P, and et al. Lysine-5 acetylation negatively regulates lactate dehydrogenase a and is decreased in pancreatic cancer. *Cancer Cell*, 23 :464–476, 2013.
- [31] Lunt SY and Vander-Heiden MG. Aerobic glycolysis : meeting the metabolic requirement of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27 :441–464, 2011.
- [32] Icard P and Lincet H. A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1826 :422–433, 2012.
- [33] Slawson C, Copeland RJ, and Hart GW. O-glcnaC signaling : A metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem Sci*, 35 :547–555, 2010.
- [34] Hanover JA, Krause MW, and Love DC. The hexosamine signaling pathway : O-glcnaC cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta*, 1800 :80–95, 2010.
- [35] Kornfeld S, Kornfeld R, Neufeld AF, and O'Brien PJ. The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci*, 52 :371–379, 1964.
- [36] Wellem KE, Lu C, Mancuso A, Lemons JM, Ryczko M, Dennis JW, and et al. The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev*, 24 :2784–2799, 2010.
- [37] Fuster MM and Esko JD. The sweet and sour of cancer : glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 5 :526–542, 2005.
- [38] Hart GW and Copeland RJ. Glycomics hits the big time. *Cell*, 143 :672–676, 2010.
- [39] Janne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, and Barrios C. Selumetinib plus docetaxel for kras-mutant advanced non-small-cell lung cancer : a randomised multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 14 :38–47, 2013.
- [40] Ghadimi H and Pecora P. Free amino acids of cord plasma as compared with maternal plasma during pregnancy. *Pediatrics*, 33 :500–506, 2013.
- [41] Wise DR and Thompson CB. Glutamine addiction : a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*, 35 :427–433, 2010.
- [42] Hensley Ct, Wasti AT, and DeBernardinis RJ. Glutamine and cancer : cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J Clin Invest*, 123 :3678–3684, 2013.
- [43] Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, and et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a kras-regulated metabolic pathway. *Nature*, 496 :101–105, 2013.
- [44] Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, and et al. Reductive glutamine metabolism by idh1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481 :380–384, 2011.
- [45] Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM, and et al. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48 :919–922, 2000.
- [46] Semenza GL. Hif-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*, 123 :3664–3671, 2013.
- [47] Zhao F, Mancuso A, Bui TV, Tong X, Gruber J, Swider CR, and et al. Imatinib-resistance associated with bcr-abl upregulation is dependent on hif-1- α induced metabolic reprogramming. *Oncogene*, 29 :2962–2972, 2010.

- [48] Dang CV. The interplay between myc and hif in the warburg effect. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 4 :35–53, 2007.
- [49] Chun SY, Johnson C, Washburn JG, Cruz-Correa MR, Dang DT, and Dang LH. Oncogenic kras modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing hif-1- α and hif-2- α target genes. *Mol Cancer*, 9 :293, 2010.
- [50] Fan J, Khamphorst JJ, Mathew R, Chung MK, White E, and Rabinowitz JD. Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major atp source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol Syst Biol*, 3 :712, 2013.
- [51] Chen C and Yu Z. sirna targeting hif-1alpha induces apoptosis of pancreatic cancer cells through nf-kappab-independent and -dependetn pathways under hypoxic conditions. *Anticancer Res*, 29 :1367–1372, 2009.
- [52] Wilkinson S, OPrey J, Fricker M, and Ryan KM. Hypoxia-selective macroautophagy and cell survival signaled by autocrine pdgfr activity. *Genes Dev*, 23 :1283–1288, 2009.
- [53] Rausch V, Liu L, Apel A, Rettig T, Gladkich J, Labsch S, and et al. Autophagy mediates survival of pancreatic tumour-initiating cells in a hypoxic microenvironment. *J Pathol*, 227 :325–335, 2012.
- [54] Guerra C and Barbacid M. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Oncol*, 7 :232–247, 2013.
- [55] Levine AJ and Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*, 330 :1340–1344, 2010.
- [56] Harris CC. p53 tumor suppressor gene : from the basic research laboratory to the clinic - an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17 :1187–1198, 1996.
- [57] Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, and Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20 :1218–1249, 2006.
- [58] Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, and et al. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer : ductal and non ductal tumor progress through different genetic lesions. *Cancer Res*, 15 :1556–1560, 1994.
- [59] Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, and et al. Phosphate-activated glutaminase (gls2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci*, 107 :7461–7466, 2010.
- [60] Kondoh H, Lleonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, and et al. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res*, 65 :177–185, 2005.
- [61] Schwartzberg-Bar-Yoseph F and Armoni M adn Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates gluocse transporters glut1 and glut4 gene expression. *Cancer Res*, 64 :2627–2633, 2004.
- [62] Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, and et al. Tigar, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, 126 :107–120, 2006.
- [63] Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, and et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature Cell Biology*, 13 :310–316, 2011.
- [64] Rosenfeldt MT, OPrey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, and et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*, 504 :296–300, 2013.

- [65] Sousa CM and Kimmelman AC. The complex landscape of pancreatic cancer metabolism. *Carcinogenesis*, 35 :1441–1450, 2014.
- [66] Lizcano JM, Goransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau G, and et al. Lkb1 is a master kinase that activates 13 kinases of the ampk subfamily, including mark/par-1. *EMBO J*, 23 :833–843, 2004.
- [67] Luttgies J, Stigge C, PAcena M, and Kloppel G. Rare ductal adenocarcinoma of the pancreas in patients younger than age 40 years. *Cancer*, 100 :173–182, 2004.
- [68] Lim JP and Gleeson PA. Macropinocytosis : an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*, 89 :836–843, 2011.
- [69] Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, Aisner SC, Kamphorst JJ, Strohecker AM, and et al. Autophagy suppresses progression of k-ras-induced lung tumors to oncotomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev*, 27 :1447–1461, 2013.
- [70] Zadra G, Photopoulos C, and Loda M. The fat side of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1831 :1518–1532, 2013.
- [71] Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Fukuda T, Sumida K, Deguchi Y, and et al. Metabolomic and transcriptomic profiling of human k-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 34 :1251–1259, 2013.
- [72] Zhang G, He P, Tan H, Budhu A, Gaedcke J, Ghadimi BM, and et al. Integration of metabolomics and transcriptomics revealed a fatty acid network exerting growth inhibitory effects in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 19 :4983–4993, 2013.
- [73] Mohammed A, Janakiram NB, Brewer M, Duff A, Lightfoot S, Brush RS, and et al. Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids delay progression of pancreatic ductal adenocarcinoma in fat-1-p48^{Cre/+}-lsl-kras^{G12D/+}. *Neoplasia*, 14 : 1249 – –1259, 2012.
- [74] Philip B, Roland CL, Daniluk J, Liu Y, Chatterjee D, Gomez SB, and et al. A high-fat diet activates oncogenic kras and cox2 to induce development of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Gastroenterology*, 145 :1449–1458, 2013.
- [75] Wang F, Kumagai-Braesch M, Herrington MK, Larsson J, and Permert J. Increased lipid metabolism and cell turnover of miapaca2 cells induced by high-fat diet in an orthotopic system. *Metabolism*, 58 :1131–1136, 2009.
- [76] Pierre AS, Minville-Walz M, Fevre C, Hichami A, Gresti J, Pichon L, and et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species-mediated er stress. *Biochim Biophys Acta*, 1831 :759–768, 2013.
- [77] DiStefano M and Conforti L. Diversification of nad biological role : the importance of location. *FEBS J*, 280 :4711–4728, 2013.
- [78] Cea M, Cagnetta A, Patrone F, Nencioni A, Gobbi M, and Anderson KC. Intracellular nad⁺ depletion induces autophagic death in multiple myeloma cells. *Autophagy*, 9 :410–412, 2013.
- [79] Chini CC, Guerrico AM, Nin V, Camacho-Pereira J, Escande C, Barbosa MT, and et al. Targeting of and metabolism in pancreatic cancer cells : potential novel therapy for pancreatic tumors. *Clin Cancer Res*, 20 :120–130, 2014.
- [80] von Heideman A, Berglund A, Larsson R, and Nygren P. Safety and efficacy of nad depleting cancer drugs : results of a phase i clinical trial of chs 828 and overview of published data. *Cancer Chemother Pharmacol*, 65 :1165–1172, 2010.

- [81] Jordan KW and Cheng LL. Nmr-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer. *Exp Rev Proteomics*, 4 :389–400, 2007.
- [82] Erb G, Elbayed K, Piotto M, Raya J, Neuville A, Mohr M, and et al. Towards improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics. *Magn Reson Med*, 59 :959–965, 2008.
- [83] Opstad KS, Wright AJ, Bell BA Griffiths JR, and Howe FA. Correlations between in vivo (1)h mrs and ex vivo (1)h hrmas metabolite measurements in adult human gliomas. *J Magn Reson Imaging*, 31 :289–297, 2010.
- [84] Dali-Youcef N, Froelich S, Moussallieh FM, Chibbaro S, Noël G, Namer IJ, and et al. Gene expression mapping of histone deacetylases and co-factors and correlation with survival time and 1h-hrmas metabolomics profile in human gliomas. *Sci Rep*, 5 :9087–9097, 2015.
- [85] Cheng LL, Chang IW, Smith BL, and Gonzales RG. Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Res*, 135 :194–202, 1998.
- [86] Sitter B, Sonnewald U, Spraul M, Fjosne HE, and Gribbestad IS. High-resolution magic angle spinning mrs of breast cancer tissue. *NMR Biomed*, pages 327–337.
- [87] Bathen TF, Jensen LR, Sitter B, Fjosne HE, Halgunset J, Axelson DE, and et al. Mr-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, garde, and hormone, and hormone status. *Breast Cancer Res Treat*, 104 :181–189, 2007.
- [88] Stenman K, Stattin P, Stenlund H, Riklund K, Grobner G, and Bergh A. 1h hrmas nmr derived bio-markers related to tumor grade, tumor cell fraction, and cell fraction, and cell proliferation in prostate tissue samples. *Biomark Insights*, 14 :39–47, 2011.
- [89] Maxeiner A, Adkins CB, Zhang Y, Taupitz M, Halpern EF, McDougal WS, and et al. Retrospective analysis of prostate cancer recurrence potential with tissue metabolomic profiles. *Prostate*, 70 :710–717, 2010.
- [90] Bayet-Robert M, Loiseau D, Rio P, Demidem A, Barthomeuf C, Stepien G, and et al. Quantitative two-dimensional hrmas 1h-nmr spectroscopy-based metabolite profiling of human cancer cell lines and response to chemotherapy, journal = Magn Reson Med, pages = 1172-1183, volume = 63, year = 2010,.
- [91] Thysell E, Surowiec I, Hornberg E, Crnalic S, Widmark A, Johansson AI, and et al. Metabolomic characterization of human prostate cancer bone metastases reveals increased levels of cholesterol. *PLoS One*, 5 :e14175, 2010.
- [92] Imperiale A, Moussallieh FM, Roche P, Battini S, Cicek AE, Sebag F, and et al. Metabolome profiling by hrmas nmr spectroscopy of pheochromocytomas and paragangliomas detects sdh deficiency : Clinical and pathophysiological implications. *Neoplasia*, 17 :55–65, 2015.
- [93] Blaise BB, Lopez C, Vercherat C, Lacheretz-Bernigaud A, Bayet-Robert M, Rezig L, and et al. Metabolic expressivity of human genetic variants : Nmr metabotyping of men1 pathogenic mutants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 93 :118–124, 2014.
- [94] Woo HM, Kim KM, Choi MH, Jung BH, Lee J, Kong G, and et al. Mass spectrometry based metabolomic approaches in urinary biomarker study of women’s cancers. *Clin Chim Acta*, 400 :63–69, 2009.
- [95] Fong MY, McDunn J, and Kakar SS. Identification of metabolites in the normal ovary and their transformation in primary and metastatic ovarian cancer. *PLoS One*, 6 :e19963, 2011.

- [96] BenSellem D, Elbayed K, Neuville A, Moussallieh FM, Averous G, Piotto M, and et al. Metabolomic characterization of ovarian epithelial carcinomas by hrmas-nmr spectroscopy. *J Oncol*, 2011 :174019, 2011.
- [97] Zhang T, Wu X, Yin M, Fan L, Zhang H, Zhao F, and et al. Discrimination between malignant and benign ovarian tumors by plasma metabolomic profiling using ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin Chim Acta*, 413 :861–868, 2012.
- [98] Lin L, Huang Z, Gao Y, Chen Y, Hang W, Xing J, and et al. Lc-ms-based serum metabolic profiling for genitourinary cancer classification and cancer type-specific biomarker discovery. *Proteomics*, 12 :2238–2246, 2012.
- [99] Huang Z, Lin L, Gao Y, Chen Y, Yan X, Xing J, and et al. Bladder cancer determination via two urinary metabolites : a biomarker pattern approach. *Mol Cell Proteomics*, 10 :111, 2011.
- [100] Ganti S, Taylor SL, Kim K, Hoppel CL, Guo L, Yang J, and et al. Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer. *Int J Cancer*, 130 :2791–2800, 2012.
- [101] Kim K, Aronov P, Zakharkin SO, Anderson D, Perroud B, Thompson IM, and et al. Urine metabolomics analysis for kidney cancer detection and biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*, 8 :558–570, 2009.
- [102] Lin L, Huang Z, Gao Y, Yan X, Xing J, and Hang W. Lc-ms based serum metabolomics analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery. *J Proteome Res*, 10 :1396–1405, 2011.
- [103] Solinman LC, Hui Y, Hewavitharana AK, and Chen DD. Monitoring potential prostate cancer biomarkers in urine by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr*, 1267 :162–169, 2012.
- [104] Wu H, Xue R, Dong L, Liu T, Deng C, Zeng H, and et al. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 648 :98–104, 2009.
- [105] Zhang J, Bowers J, Liu L, Wei S, Gowda GA, Hammoud Z, and et al. Esophageal cancer metabolite biomarkers detected by lc-ms and nmr methods. *PLoS One*, 7 :e30181, 2012.
- [106] Chen W, Zu Y, Huang Q, Chen F, Wang G, Lan W, and et al. Study on metabonomic characteristics of human lung cancer using high resolution magic-angle spinning 1h nmr spectroscopy and multivariate data analysis. *Magn Reson Med*, 66 :1531–1540, 2011.
- [107] Duarte IF, Rocha CM, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Carreira IM, and et al. Can nuclear magnetic resonance (nmr) spectroscopy reveal different metabolic signatures for lung tumors? *Virchows Arch*, pages 715–725.
- [108] Jordan KW, Adkins CB, Su L, Halpern EF, Mark EJ, Christiani DC, and et al. Comparison of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung by metabolomic analysis of tissue-serum pairs. *Lung Cancer*, pages 44–50.
- [109] Guo Y, Wang X, Qiu L, Qin X, Liu H, Wang Y, and et al. Probing gender-specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Clin Chim Acta*, pages 135–141.
- [110] Cheng Y, Xie G, Chen T, Qiu Y, Zou X, Zheng M, and et al. Distinct urinary metabolic profile of human colorectal cancer. *J Proteome Res*, 11 :1354–1563, 2012.
- [111] Piotto M, Moussallieh FM, Dillmann B, Imperiale A, Neuville A, Brigand C, and et al. Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high-resolution magic angle spinning 1h magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics*, 5 :292–301, 2009.

- [112] Piotta M, Moussallieh FM, Dillmann B, Imperiale A, Neuville A, Brigand C, and et al. Towards real-time metabolic profiling of biopsy specimen during a surgical operation by 1h hrmas-nmr : A case report. *J Med Case Rep*, 6 :22, 2012.
- [113] Ritchie SA, Ahiahonu PW, Jayasinghe D, Heath D, Liu J, Lu Y, and et al. Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients : implications for early screening and detection. *BMC Med*, 15 :8–13, 2010.
- [114] Leichtle AB, Nuoffer JM, Ceglarek U, Kase J, Conrad T, Witzigmann H, and et al. Serum amino acid profiles and their alterations in colorectal cancer. *Metabolomics*, 8 :8–13, 2012.
- [115] Qiu Y, Cai G, Su M, Chen T, Zheng X, Xu Y, and et al. Serum metabolite profiling of human colorectal cancer using gc-tofms and uplc-qtofms. *J Proteome Res*, 8 :4844–4850, 2009.
- [116] Qiu Y, Cai G, Su M, Chen T, Liu Y, Xu Y, and et al. Urinary metabonomic study on colorectal cancer. *J Proteome Res*, 9 :4844–4850, 2010.
- [117] Wu H, Xue R, Tang Z, Deng C, Liu T, Zeng H, and et al. Metabolomic investigation of gastric cancer tissue using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 9 :1385–1395, 2010.
- [118] Wu H, Xue R, Dong L, Liu T, Deng C, Zeng H, and et al. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 19 :98–104, 2009.
- [119] Resson HW, Xiao JF, Tuli L, Varghese RS, Zhou B, Tsai TH, and et al. Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Anal Chim Acta*, pages 90–100.
- [120] OrrGandy KA and Obeid LM. Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease review of sphingosine kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 1831 :157–166, 2013.
- [121] Zhang L, Jin H, Guo X, Yang Z, Zhao L, Tang S, and et al. Distinguishing pancreatic cancer from chronic pancreatitis and healthy individuals by (1)h nuclear magnetic resonance-based metabonomic profiles. *Clin Biochem*, 45 :1064–1069, 2012.
- [122] OuYAng D, Xu J, Huang H, and Chen Z. Metabolomic profiling of serum from human pancreatic cancer patients using 1h nmr spectroscopy and principal component analysis. *Appl Biochem Biotechnol*, 165 :148–154, 2011.
- [123] Urayama S, Zou W, Brooks K, and Tolstikov V. Comprehensive mass spectrometry based metabolic profiling of blood plasma reveals potent discriminatory classifiers of pancreatic cancer. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15 :613–620, 2010.
- [124] Fang F, He X, Deng H, Chen Q, Lu J, Spraul M, and et al. Discrimination of metabolic profiles of pancreatic cancer from chronic pancreatitis by high-resolution magic angle spinning 1h nuclear magnetic resonance and principal component analysis. *Cancer Sci*, 98 :1678–1682, 2007.
- [125] Misra D, Gupta V, Sonkar AA, Bajpai UB, and Roy R. Proton hr-mas nmr spectroscopic characterization of metabolites in various human organ tissues : Pancreas, brain and liver trauma causes. *Physiol Chem Phys Med*, 40 :67–88, 2008.
- [126] Nishiumi S, Shinohara M, Ikeda A, Yoshie T, Hatano N, Kakuyama S, and et al. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*, 6 :518–528, 2010.

- [127] Napoli C, Sperandio N, Lawlor RT, Scarpa A, Molinari A, and Assfalg M. Urine metabolic signature of pancreatic ductal adenocarcinoma by ^1H nuclear magnetic resonance : Identification, mapping and evolution. *J Proteome Res*, 11 :1274–1283, 2011.
- [128] Leichtle AB, Ceglarek U, Weinert P, Nakas CT, Nuoffer JM, Kase J, and et al. Pancreatic carcinoma, pancreatitis, and healthy controls : metabolite models in a three-class diagnostic dilemma. *Metabolomics*, 9 :677–687, 2013.
- [129] He XH, Li WT, Gu YJ, Yang BF, Deng HW, Yu YH, and et al. Metabonomic studies of pancreatic cancer response to radiotherapy in a mouse xenograft model using magnetic resonance spectroscopy and principal component analysis. *World J Gastroenterol*, 14 :4200–2008, 2013.
- [130] Ritchie SA, Akita H, Takemasa I, Eguchi H, Pastural E, Nagano H, Monden M, and et al. Metabolic system alterations in pancreatic cancer patient serum : potential for early detection. *BMC Cancer*, 12 :416, 2010.
- [131] Urayama S. Pancreatic cancer early detection : Expanding higher-risk group with clinical and metabolomics parameters. *World J Gastroenterol*, 21 :1707–1717, 2015.
- [132] Yuan C, Clish CB, Wu C, Mayers JR, Kraft P, Townsend MK, and et al. Circulating metabolites and survival among patients with pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*, 108 :djv409, 2016.
- [133] Carr HY and Purcell EM. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Physical review*, 94 :630–638, 1954.
- [134] Meiboom S and Gill D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times of scientific instruments. *Nature methods*, 29 :688–691, 1958.
- [135] Bodenhausen G and Ruben DJ. Natural abundance nitrogen-15 nmr by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem Phys Lett*, 69 :185–189, 1980.
- [136] Tang CG. An analysis of baseline distortion and offset in nmr spectra. *J Magn Res*, 109 :232–240, 1994.
- [137] Pearson K. Principal component anlysis. *The London, Edinburg, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 6 :559–572, 1901.
- [138] Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J Educ Psychol*, 24 :417–441, 1933.
- [139] Wold S, Hellberg S, and Dunn WJ. Computer methods for the assessment of toxicity. *Acta Pharmacol Toxicol*, 52 :158–189, 1983.
- [140] Wold S. Chemometrics, why, what and where to next ? *J Pharm Biomed Anal*, 9 :589–596, 1991.
- [141] Barker M and Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J Chemom*, 17 :166–173, 2003.
- [142] Trygg J and Wold S. Orthogonal projection to latent structures (o-pls). *J Chemom*, 16 :119–128, 2002.
- [143] Bylesjo M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, and Trygg J. Orthogonal projection to latent structures (o-pls). *J Chemom*, 20 :341–351, 2006.
- [144] Kanehisa M and Goto S. Kegg : Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acid Res*, 28 :27–30, 2000.
- [145] Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M, and et al. Data, information, knowledge and principle : Back to metabolism in kegg. *Nucleic Acid Res*, 42 :D199–D205, 2014.

- [146] Salway ZZ. *Metabolism at a glance*. Wiley-Blackwell, Malden, 2014.
- [147] Silverman BW. *Density estimation for statistics and data analysis*. Chapman and Hall, London, 1986.
- [148] Moon YI, Rajagopalan B, and Lall U. Estimation of mutual information using kernel density estimators. *Phys Rev E*, 52 :2318–2321, 1995.
- [149] Cakmak A, Qi X, Cicek AE, Bederman I, Henderson L, and et al. A new metabolomics analysis technique : Steady state metabolic network dynamics analysis. *J Bioinform Comput Biol*.
- [150] Cicek AE and Ozsoyoglu G. Observations conflict resolution in steady state metabolic network dynamics analysis. *J Bioinform Comput Biol*.
- [151] DeBoor C. *A practical guide to splines*. Springer, New-York, 1978.
- [152] Daub CO, Steuer R, Selbig J, and Kloska S. Estimating mutual information using b-spline functions - an improved similarity measure for analysing gene expression data. *BMC Bioinformatics*, 5 :118, 2004.
- [153] Venelli A. Efficient entropy estimation for mutual information analysis using b-splines. *Lect Notes Comput*, 6033 :17–30, 2010.
- [154] Schuster S and Hilgetag C. On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *J Biol Syst*, 2 :165–182, 1994.
- [155] Chowdhury SA, Nibbe RK, Chance MR, and Koyuturk M. Subnetwork state functions define dysregulated subnetworks in cancer. *Genome Res*, 17 :1537–1545, 2010.
- [156] Tang CG. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism : Summary statement from the fourth international workshop. *J Clin Endocrinol Metab*, 99 :3561–3569, 2014.
- [157] Guerin C, Lowery A, Gabriel S, Castinetti F, Philippon M, Vaillant-Lombard J, and et al. Preoperative imaging for focused parathyroidectomy : Making a good strategy even. *J Clin Endocrinol Metab*, 172 :519–526, 2015.
- [158] Greene AB, Butker RS, McIntyre, Barbosa GF, Mitchell J, Berber E, and et al. National trends in parathyroid surgery from 1998 to 2008 : A decade of change. *J Am Coll Surg*, 209 :332–343, 2009.
- [159] Kunstman JW, Kirsch JD, Mahajan A, and Udelsman R. Clinical review : Parathyroid localization and implications for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab*, 98 :902–912, 2013.
- [160] Udelsman R, Akerstrom G, Biagini C, Duh QY, Miccoli P, Niederle B, and et al. The surgical management of asymptomatic primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 99 :3595–3606, 2014.
- [161] Molinari AS, Irvin GL, Deriso GT, and Bott L. Incidence of multiglandular disease in primary hyperparathyroidism determined by parathyroid hormone secretion. *Surgery*, 120 :934–937, 1996.
- [162] Gauger PG, Agarwal G, England BG, Delbridge LW, Matz KA, Wilkinson M, and et al. Intraoperative parathyroid hormone monitoring fails to detect double parathyroid adenomas : A 2-institution experience. *Surgery*, 130 :1005–1010, 2001.
- [163] Miller BS, England BG, Nehs M, Burney RE, Doherty GM, and Gauger PG. Interpretation of intraoperative parathyroid hormone monitoring in patients with baseline parathyroid hormone levels of <100 pg/ml. *Surgery*, 140 :883–890, 2006.

- [164] Miller BS, England BG, Nehs M, Burney RE, Doherty GM, and Gauger PG. Predicting the success of limited exploration for primary hyperparathyroidism using ultrasound, sestamibi, and intraoperative parathyroid hormone : Analysis of 1,158 cases. *Ann Surg*, 248 :420–428, 2008.
- [165] Weber CJ and Ritchie JC. Retrospective analysis of sequential changes in serum intact parathyroid hormone levels during conventional parathyroid exploration. *Surgery*, 126 :1139–1143, 1999.
- [166] Kreis R, Ross BD, Farrow NA, and Ackerman Z. Metabolic disorders of the brain in chronic hepatic encephalopathy detected with h-1 nmr spectroscopy. *Radiology*, 182 :19–27, 1992.
- [167] Berridge MJ, Downes CP, and Harley MR. Neural and development actions of lithium : A unifying hypothesis. *Cell*, 59 :411–419, 1999.
- [168] Lezaic L, Rep S, Sever MJ, Kocjan T, Hocevar M, Fettich J, and et al. 18f-fluorocholine pet/ct for localization of hyperfunctioning parathyroid tissue in primary hyperparathyroidism. a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 41 :2083–2089, 2014.
- [169] Hindie E, Zanotti-Fregonara P, Tabarin A, Rubello D, Morelec I, and Wagner T. The role of radionuclide imaging in the surgical management of primary hyperparathyroidism. *J Nucl Med*, 56 :737–744, 2015.
- [170] Michaud L, Burgess A, Huchet V, Lefevre M, Tassard M, Ohnona J, and et al. Is 18f-fluorocholine-positron emission tomography/computerized tomography a new imaging tool for detecting hyperfunctioning parathyroid glands in primary or secondary hyperparathyroidism ? *J Clin Endocrinol Metab*, 99 :4531–4536, 2014.
- [171] Kluijfhout WP, Vorselaars WM, Vriens MR, Borel Rinker IH, Valk GD, and de Keizer B. Enabling minimal invasive parathyroidectomy for patients with primary hyperparathyroidism using tc-99m-sestamibi spect-ct, ultrasound and first results of 18f-fluorocholine pet-ct. *Eur J Radiol*, 84 :1745–1751, 2015.
- [172] Paul A, Villepet A, Lefevre M, and Perie S. Oncocytic parathyroid adenoma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 132 :301–303, 2015.
- [173] Michaud L, Balogova, Burgess A, Ohnona, Huchet V, Kerrou K, and et al. A pilot comparison of 18f-fluorocholine pet/ct, ultrasonography and 123i/99mtc-sestamibi dual-phase dual-isotope scintigraphy in the preoperative localization of hyperfunctioning parathyroids glands in primary or secondary hyperparathyroidism : Influence of thyroid anomalies. *Medicine*, 94 :e1701, 2015.
- [174] National Cancer Institute. Seer cancer statistics factsheets : Pancreas cancer. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>.
- [175] Vincent A, Herman J, Schulichk R, Hruban RH, and Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*, 378 :607–620, 2011.
- [176] Li D, Xie K, Wolff R, and Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet*, 363 :1049–1057, 2004.
- [177] McMillan MT, Christein JD, Callery MP, Behrman SW, Drebin JA, and Hollis RH. Comparing the burden of pancreatic fistulas after pancreatoduodenectomy and distalpancreatectomy. *Surgery*, 159 :1013–1022, 2016.
- [178] Vollmer CM jr, Lewis RS, Hall BL, Allendorf JD, Beane JD, Behrman SW, and et al. Establishing a quantitative benchmark for morbidity in pancreatoduodenectomy. *Ann Surg*, 261 :527–536, 2015.

- [179] Pedrazzoli S, DiCarlo V, Dionigi R, Mosca F, Pederzoli P, Pasquali C, and et al. Standard versus extended lymphadenectomy associated with pancreatoduodenectomy in the surgical treatment of adenocarcinoma of the head of the pancreas : a multicenter, prospective, randomized study. *Ann Surg*, 228 :508–517, 1998.
- [180] Jang JY, Kang MJ, Heo JS, Choi SH, Choi DW, and Park SJ. A prospective randomized controlled study comparing outcomes of standard resection and extended resection, including dissection of the nerve plexus and various lymph nodes, in patients with pancreatic head cancer. *Ann Surg*, 259 :656–664, 2014.
- [181] Anderson R, Vagianos CE, and Williamson RCN. Preoperative staging and evaluation of resectability in pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB*, 6 :5–12, 2004.
- [182] Yekebas EF, Bogievski D, Cataldegirmen G, Kunze C, Marx A, Vashist YK, and et al. En bloc vascular resection for locally advanced pancreatic malignancies infiltrating major blood vessels : perioperative outcome and long-term survival in 136 patients. *Ann Surg*, 247 :300–309, 2008.
- [183] Delpero JR, Bachellier P, Regenet N, Le Treut YP, Paye F, Carrer N, and et al. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma : a french multicentre prospective evaluation of resection margin in 150 evaluable specimens. *HPB*, 16 :20–33, 2014.
- [184] Wang F, Gill AJ, Neale M, Puttaswamy V, Ganadha S, Pavlakis L, and et al. Adverse tumor biology associated with mesenterico-portal vein resection influences survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 21 :1937–1947, 2014.
- [185] Schnelldorfer T, Ware AL, Sarr MG, SMyrk TC, Zhang L, Qin R, and et al. Long-term survival after pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma : is cure possible? *Ann Surg*, 247 :456–462, 2008.
- [186] Desideri E, Vegliante R, and Crioliolo MR. Mitochondrial dysfunctions in cancer : genetic defects and oncogenic signaling impinging on tea cycle activity. *Cancer Lett*, 356 :217–223, 2015.
- [187] Morin A, Letouze E, Gimenez-Roqueplo AP, and Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis : from genetics to targeted therapy. *Int J Cancer*, 135 :2237–2248, 2014.
- [188] Hai Y, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed A, Yuan W, and et al. Idh1 and idh2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, 360 :765–773, 2009.
- [189] Srinivasan R, Ricketts CJ, Sourbier C, and Linehan WM. New strategies in renal cell carcinoma : targeting the genetic and metabolic basis of disease. *Clin Cancer Res*, 21 :10–17, 2015.
- [190] Sanchez-Tena S, Alcarraz-Vizan G, Marin S, Torres JL, and Cascante M. Epicatechin gallate impairs colon cancer cell metabolic productivity. *J Agric Food Chem*, 61 :4310–4317, 2013.
- [191] Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, and et al. Inhibition of lactate dehydrogenase a indices oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 :2037–2042, 2010.
- [192] Fantin VR, St-Pierre J, and Leder P. Attenuation of ldh-a expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer cells*, 9 :425–434, 2006.
- [193] Ramirez de Molina A, Gutierrez R, Ramos MA, Silva JM, Bonilla F, Sanchez JJ, and et al. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas : clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene*, 21 :4317–4322, 2002.

- [194] Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Gutierrez R, Martinez-Pineiro L, Sanchez J, Bonilla F, and et al. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 296 :580–583, 2002.
- [195] Ramirez de Molina A, Sarmentero estreda J, Belda-Iniesta C, Taron M, Ramirez de Molina V, Cejas P, and et al. Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer : a retrospective study. *Lancet Oncol*, 8 :889–897, 2007.
- [196] Iorio E, Mezzanzanica D, Alberti P, Spadaro F, Ramoni C, D’Ascenzo A, and et al. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res*, 65 :9369–9376, 2005.
- [197] Trousil S, Lee P, Pinato DJ, Ellis JK, Dina R, Aboagye EO, and et al. Alterations of choline phospholipid metabolism in endometrial cancer are caused by choline kinase alpha overexpression and a hyperactivated deacylation pathway. *Cancer Res*, 74 :6867–6877, 2014.
- [198] Penet MF, Shah T, Bharti S, Krishnamachary B, Artemov D, Mironchik Y, and et al. Metabolic imaging of pancreatic ductal adenocarcinoma detects altered choline metabolism. *Clin Cancer Res*, 21 :386–395, 2015.
- [199] Wise DR and Thompson CB. Glutamine addiction : a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*, 35 :427–433, 2010.
- [200] Yokota H, Guo J, Matoba M, Higashi K, Tonami H, and Nagao Y. Lactate, choline, and creatine levels measured by in vitro 1h-mrs as prognostic parameters in patients with non-small-cell lung cancer. *J Magn Reson Imaging*, 25 :992–999, 2007.
- [201] de Jong K, Nio CY, Hermans JJ, Dijkgraaf MG, Gouma DJ, van Eijck CHJ, and et al. High prevalence of pancreatic cysts detected by screening magnetic resonance imaging examinations. *J Am Gastroenterol Assoc*, 8 :806–811, 2010.
- [202] Laffan TA, Horton KM, Klein AP, Berlanstein B, Siegelman SS, Kawamoto S, and et al. Prevalence of unsuspected pancreatic cysts on mdct. *Am J Roentgenol*, 191 :802–807, 2008.
- [203] Lee KS, Sekhar A, Rofsky NM, and Pedrosa I. Prevalence of incidental pancreatic cysts in the adult population on mr imaging. *AM J Gastroenterol*, 105 :2079–2084, 2010.
- [204] Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Fukushima N, Campbell KA, and et al. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas : an updated experience. *Ann Surg*, 239 :788–797, 2004.
- [205] Reid-Lombardo KM, St Sauver J, Li Z, Ahrens WA, Unni KK, Que FG, and et al. Incidence, prevalence, and management of intraductal papillary mucinous neoplasm in olmsted country. *Pancreas*, 37 :139–144, 2008.
- [206] Kobayashi G, Fujita N, Maguchi H, Tanno S, Mizuno N, Hanada K, and et al. Natural history of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm with mural nodules. *Pancreas*, 43 :532–538, 2014.
- [207] Madura JA, Wiebke EA, Howard TJ, Cummings OW, Hull MT, Sherman S, and et al. Mucin-hypersecreting intraductal neoplasms of the pancreas : a precursor to cystic pancreatic malignancies. *Surgery*, 122 :786–792, 1997.
- [208] Ingkakul T, Warshaw AL, and Fernandez-Del Castillo C. Epidemiology of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas : sex differences between 3 geographic regions. *Pancreas*, 40 :779–780, 2011.

- [209] Fernandez del Castillo C, Targarona J, Thayer SP, Rattner DW, Brugger WR, and Warshaw AL. Incidental pancreatic cysts : clinicopathologic characteristics and comparison with symptomatic patients. *Arch Surg Chic III*, 138 :423–427, 1960.
- [210] Pelletier AL, Hammel P, Rebours V, Couvelard A, Vulierme MP, Maire F, and et al. Acute pancreatitis in patients operated on for intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas : frequency, severity, and clinicopathologic correlations. *Pancreas*, 39 :658–661, 2010.
- [211] Crippa S, Fernandez-Del Castillo C, Salvia R, Finkelstein D, Bassi C, Dominguez I, and et al. Mucin-producing neoplasms of the pancreas : an analysis of distinguishing clinical and epidemiologic characteristics. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 8 :2013–2019, 2010.
- [212] Hirono S adn Tani M, Kawai M, Ina S, Nishioka R, Miyazawa M, and et al. Treatment strategy for intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas based on malignant predictive factors. *Arch Surg*, 144 :349–350, 2010.
- [213] Hwang DW, Jang JY, Lee SE, Lim CS, Lee KU, and Kim SW. Clinicopathologic analysis of surgically proven intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas in snuh : a 15-year experience at a single academic institution. *Langenbecks Arch Surg*, 397 :93–102, 2012.
- [214] Adsay NV, Merati K, Basturk O, Iacobuzio-Donahue C, Levi E, Cheng JD, and et al. Pathologically and biologically distinct types of epithelium in intraductal papillary mucinous neoplasms : delineation of an intestinal pathway of carcinogenesis in the pancreas. *Am J Surg Pathol*, 28 :839–848, 2004.
- [215] Procacci C, Biasutti C, Carbognin G, Accordini S, Bicego E, Guarise A, and et al. Characterization of cystic tumors of the pancreas : Ct accuracy. *J Comput Assist Tomogr*, 23 :906–912, 1999.
- [216] Cheon YK, Cho YD, Jeon SR, Moon JH, Jeong SW, Hur KY, and et al. Pancreatic resection guided by preoperative intraductal ultrasonography for intraductal papillary mucinous neoplasm. *AM J Gastroenterol*, 105 :1963–1969, 2010.
- [217] Sainani NI, Saokar A, Deshpande V, Fernandez del Castillo C, Hahn P, and Sahani DV. Comparative performance of mdct and mri with mr cholangiopancreatigraphy in characterizing small pancreatic cysts. *Am J Roentegenol*, 193 :722–731, 2009.
- [218] Song SJ, Lee LM, Kim YJ, Kim SH, Lee JY, Han JK, and et al. Differentiation of intraductal papillary mucinous neoplasms from other pancreatic cystic masses : comparison of multirow-detector ct and mr imaging using roc analysis. *J Magn Reson*, 26 :86–93, 2007.
- [219] Waters JA, Schmidt CM, Pinchot JX, White PB, Cummings OW, Pitt HA, and et al. Ct vs mrcp : optimal classification of ipmn type and extent. *J Gastrointest Surg Of J soc Surg Aliment Tract*, 12 :101–109, 2008.
- [220] Choi JY, Lee JM, Lee MW, Kim SJ, Choi SY, Kim JY, and et al. Magnetic resonance pancreatography : comparison of two- and three-diensional sequences for assessment of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Eur Radiol*, 19 :2163–2170, 2009.
- [221] Yoon LS ans Catalano OA, Fritz S, Ferrone CR, Hahn PF, and Sahani DV. Another dimension in magnetic resonanc cholangiopancreatography : comparison of 2- and 3-dimensional magnetic resonance cholangiopancreatography for the evaluation of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *J Comput Assist Tomogr*, 33 :363–368, 2009.

- [222] Maire F, Couvelard A, Hammel P, Ponsot P, Palazzo L, Aubert A, and et al. Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas : the preoperative value of cytologic and histopathologic diagnosis. *Gastrointest Endosc*, 58 :701–706, 2003.
- [223] Stelow EB, Stanley MW, Bardales RH, Mallery S, Lai R, Linzie BM, and et al. Intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. the findings and limitations of cytologic samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. *Am J Clin Pathol*, 120 :398–404, 2003.
- [224] Maire F, Voitot H, Aubert A, Palazzo L, OToole D, Couvelard A, and et al. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas : performance of pancreatic fluid analysis for positive diagnosis and the prediction of malignancy. *AM J Gastroenterol*, 103 :2871–2877, 2007.
- [225] Kucera S, Centeno BA, Springett G, Malafa MP, Chen YA, Weber J, and et al. Cyst fluid carcinoembryonic antigen levels is not predictive of invasive cancer in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *J Pancreas*, 13 :409–413, 2012.
- [226] Park WG, Wu M, Bowen R, Zheng M, Fitch WL, Pai RK, and et al. Metabolomic-derived novel cyst fluid biomarkers for pancreatic cysts : glucose and kynurenine. *Gastrointest Endosc*, 78 :295–302, 2013.
- [227] Marchegiani G, Mino-Kenudson M, Ferrone CR, Morales-Oyarvide V, Warshaw AL, and Lillimoe KD. Patterns of recurrence after resection of ipmn : Who, when, and how ? *Ann Surg*, 6 :1108–1114, 2015.
- [228] He J, Cameron JL, Ahuja N, Makary MA, Hirose K, Choti MA, and et al. Is it necessary to follow patients after resection of a benign pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm ? *J Am Coll Surg*, 216 :657–665, 2013.
- [229] Moreno A and Arus C. Quantitative and qualitative characterization of 1h nmr spectra of colon tumors, normal mucosa and their perchloric acid extracts : decreased levels of myo-inositol in tumours can be detected in intact biopsies. *NMR Biomed*, 9 :33–45, 1996.
- [230] Nishijima T, Nishina M, and Fujiwara K. Measurement of lactate levels in serum and bile using proton nuclear magnetic resonance in patients with hepatobiliary diseases : Its utility in detection of malignancies. *J Clin Oncol*, 27 :13–17, 1997.
- [231] Mun CW, Cho JY, Shin WJ, Choi KS, Eun CK, Cha SS, and et al. Ex vivo proton mr spectroscopy (1h-mrs) for evaluation of human gastric carcinoma. *Magn Reson Imaging*, 22 :861–870, 2004.
- [232] Wang H, Wang L, Zhang H, Deng P, Chen J, and et al. Wanghwangl2013. *Mol Cancer*, 12 :121, 2013.
- [233] Zhu J, Djukovic D, Deng L, Gu H, Himmati F, Chiorean EG, and et al. Colorectal cancer detection using targeted serum metabolic profiling. *J Proteome Res*, 13 :4120–4130, 2014.
- [234] Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A, and et al. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 10 :R–84, 2008.
- [235] Lu QY, Zhang L, Lee JK, Go VL, and Lee WN. Metabolic consequences of ldha inhibition by epigallocatechin gallate and oxamate in mia paca-2-pancreatic cells. *Metabolomics*, 11 :71–80, 2015.
- [236] Zhao D, Zou SW, Liu Y, Zhou X, Mo Y, Wand P, and et al. Lysine-5 acetylation negatively regulates lactate dehydrogenase a and is decreased in pancreatic cancer. *Cancer cells*, 23 :464–476, 2006.

- [237] Koeberl DD, Young SP, Gregersen NS, Vockley J, Smith WE, Benjamin DK Jr, and et al. Rare disorders of metabolism with elevated butyryl- and isobutyryl-carnitine detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *Pediatr Res*, 54 :219–223, 2003.

Congrès et publications

PUBLICATIONS

1) Battini S, Imperiale A, Taieb D, Elbayed K, Cicek AE, Sebag F, Brunaud L, Namer IJ

High-Resolution Magic Angle Spinning 1H Magnetic Resonance Spectroscopy Metabolomics of Hyperfunctioning parathyroid glands
Surgery, 2016 ;160 :284-294. doi : 10.1016/j.surg.2016.03.002

Décrit comme «significatif» par le commentaire éditorial de Geoffrey B.Thompson (cf. Annexe 1)

2) Battini S, Faitot F, Imperiale A, Cicek AE, Elbayed K, Heimburger C, Averous G, Bachellier P, Namer IJ

Metabolomics approach in pancreatic adenocarcinoma : tumor metabolism profiling predicts clinical outcome of patients
BMC medicine, 2016 (article soumis) (cf. Annexe 2)

3) Battini S, Bourdeloie M, Cicek AE, Namer IJ, Koch S
Metabolomics profiling of IPMNs distinguishes average-risk from high-risk of malignant progression
(article en préparation)

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

1) Battini S, Imperiale A, Taieb D, Elbayed K, Sebag F, Brunaud L, Namer IJ

Metabolomic profiling by HRMAS NMR spectroscopy in hyperparathyroidism ISMRM 23rd annual meeting

29 mai-6 juin, 2015, Toronto, Ontario, Canada (pitch + poster)

Prix «ISMRM merit award 2015 «magna cum laude»»

2) Battini S, Imperiale A, Taieb D, Elbayed K, Sebag F, Brunaud L, Namer IJ

Metabolomic profiling by HRMAS NMR spectroscopy in hyperparathyroidism

EuCC, 22nd annual meeting

22 mai 2015, Freiburg, Allemagne (poster)

3) Battini S, Faitot F, Imperiale A, Elbayed K, Cicek AE, Averous G, Bachellier P, Namer IJ **Metabolomics distinguishes long-term survival from short-term survival in patients with pancreatic adenocarcinoma**

Pancreas 2016, International Symposium on Pancreatic Cancer

9-12 juin 2016, Glasgow, Ecosse (poster)

Prix «Best Student/Trainee»

COMMUNICATIONS NATIONALES

1) Battini S, Imperiale A, Taieb D, Elbayed K, Sebag F, Brunaud L, Namer IJ

Metabolomic profiling by HRMAS NMR spectroscopy in parathyroid disorders

Oncotrans 2015

25-26 juin 2015, Dijon (poster)

2) Battini S, Imperiale A, Taieb D, Elbayed K, Sebag F, Brunaud L, Namer IJ

Metabolomic profiling by HRMAS NMR spectroscopy in hyperparathyroidism

1^{er} Congrès de Physiologie et de Biologie Intégrative

4-6 mai 2015, Dijon (poster)

3) Battini S, Imperiale A, Taieb D, Elbayed K, Sebag F, Brunaud L, Namer IJ

Étude de l'hypersécrétion des glandes parathyroïdes par spectroscopie RMN HRMAS

8^{eme} Forum du Cancéropôle du Grand-Est

18-19 octobre 2014, Strasbourg (poster)

4) Battini S, Imperiale A, Taieb D, Elbayed K, Sebag F, Brunaud L, Namer IJ

Étude du profil métabolomique par spectroscopie RMN HRMAS dans l'hyperparathyroïdie

Journées du Département d'Imagerie, Robotique, Télédétection et Santé (IRTS)
18 juin 2014, Strasbourg (poster + oral)

5) Battini S, Imperiale A, Elbayed K, Averous G, Bachellier P, Namer IJ
Study of the pancreatic adenocarcinoma's metabolomic profile by HRMAS NMR spectroscopy

9^{eme} Forum du Cancéropôle du Grand-Est
12-13 novembre 2015, Strasbourg (poster)

6) Battini S, Imperiale A, Elbayed K, Averous G, Bachellier P, Namer IJ
Metabolomic profiling by HRMAS NMR spectroscopy in pancreatic adenocarcinoma

Oncotrans 2015
25-26 juin 2015, Dijon (poster)

WORKSHOP

Battini S, Namer IJ
Metabolomics by Nuclear Resonance Magnetic (NMR) in biomedical research

Metabolomics workshop
29 octobre 2015, IGBMC, Illkirch (oral)

PRIX

1) **ISMRM 2015 merit award «magna cum laude»**
Congrès international, ISMRM 2015, Toronto, Canada

2) **Best Student / Trainee**
Congrès international, Pancreas 2016, Glasgow, Ecosse

Annexe 1

High-resolution magic angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolomics of hyperfunctioning parathyroid glands



Stéphanie Battini, PhD Student,^a Alessio Imperiale, MD, PhD,^{a,b,c} David Taïeb, MD, PhD,^d Karim Elbayed, PhD,^a A. Ercument Cicek, PhD,^{f,g} Frédéric Sebag, MD, PhD,^c Laurent Brunaud, MD, PhD,^h and Izzie-Jacques Namer, MD, PhD,^{a,b,c} Strasbourg, Marseille, and Nancy, France, Pittsburgh, PA, and Ankara, Turkey

Background. Primary hyperparathyroidism (PHPT) may be related to a single gland disease or multiglandular disease, which requires specific treatments. At present, an operation is the only curative treatment for PHPT. Currently, there are no biomarkers available to identify these 2 entities (single vs. multiple gland disease). The aims of the present study were to compare (1) the tissue metabolomics profiles between PHPT and renal hyperparathyroidism (secondary and tertiary) and (2) single gland disease with multiglandular disease in PHPT using metabolomics analysis.

Methods. The method used was ^1H high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. Forty-three samples from 32 patients suffering from hyperparathyroidism were included in this study.

Results. Significant differences in the metabolomics profile were assessed according to PHPT and renal hyperparathyroidism. A bicomponent orthogonal partial least square-discriminant analysis showed a clear distinction between PHPT and renal hyperparathyroidism ($R^2Y = 0.85$, $Q^2 = 0.63$). Interestingly, the model also distinguished single gland disease from multiglandular disease ($R^2Y = 0.96$, $Q^2 = 0.55$). A network analysis was also performed using the Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alterations Using Mutual Information (ADEMA). Single gland disease was accurately predicted by ADEMA and was associated with higher levels of phosphorylcholine, choline, glycerophosphocholine, fumarate, succinate, lactate, glucose, glutamine, and ascorbate compared with multiglandular disease.

Conclusion. This study shows for the first time that ^1H high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy is a reliable and fast technique to distinguish single gland disease from multiglandular disease in patients with PHPT. The potential use of this method as an intraoperative tool requires specific further studies. (Surgery 2016;160:384-94.)

From the ICube,^a UMR 7357 University of Strasbourg/CNRS; Department of Biophysics and Nuclear Medicine,^b Hautepierre Hospital, University Hospitals of Strasbourg; and the FMFS, Faculty of Medicine,^c Strasbourg; La Timone University Hospital, European Center for Research in Medical Imaging^d and the Department of Endocrine Surgery,^e Aix-Marseille University, Marseille, France; Lane Center for Computational Biology, School of Computer Science,^f Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA; Computer Engineering Department,^g Bilkent University, Ankara, Turkey; and the Department of Digestive, Hepato-Biliary and Endocrine Surgery,^h Brabois University Hospital, Nancy, France

PRIMARY HYPERPARATHYROIDISM (PHPT) is the 3rd most common endocrine disorder after diabetes and hyperthyroidism. PHPT is classically associated with elevated total serum calcium (after

adjustment for albumin concentration) and elevated serum parathyroid hormone (PTH) level. In some cases, PTH levels may be normal but inappropriate to hypercalcemia.

L.B. and I.-J.N. contributed equally to this article.

The authors declare that there are no competing interests.

Accepted for publication March 7, 2016.

Reprint requests: Izzie-Jacques Namer, MD, PhD, Department of Biophysics and Nuclear Medicine, University Hospital of

Strasbourg, Hautepierre Hospital, Strasbourg Cedex, France.
E-mail: Izzie.Jacques.NAMER@chru-strasbourg.fr.

0039-6060/\$ - see front matter

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2016.03.002>

An operation is the only curative treatment for PHPT. According to recent recommendations,¹ an operation is indicated in any patient younger than 50, in any symptomatic patient, and in asymptomatic patients who meet some criteria. Although a single parathyroid adenoma (single gland disease [SGD]) is the most frequent occurrence, multiglandular disease (MGD) with multiple adenomas or multiglandular hyperplasia is present in 15–20% of cases. A conventional operation for PHPT relies on the inspection of the 4 parathyroid glands through bilateral cervical exploration. In recent years, a significant shift toward targeted operations has been proposed, relying on the accurate characterization of parathyroid glands (SGD versus MGD) by preoperative imaging.

However, first-line imaging studies show limited performance in the distinction between SGD and MGD (accuracy for predicting SGD is about 70–80%).² In order to further reduce the risk for operative failure, several institutions routinely use intraoperative PTH monitoring as an adjunct to determine the extent of the operation. However, intraoperative PTH monitoring does not have a consensual definition for prediction of operative cure and is still associated with the risk of unnecessary bilateral neck exploration.

Beyond a serum marker, better characterization of parathyroid tissue would be of particular interest in PHPT. Gross examination and intraoperative extemporaneous microscopic examination are unreliable. In recent years, metabolomics, or global metabolite profiling, has been used for investigating metabolite changes associated with some pathologic conditions (eg, colorectal cancers,³ breast cancers,⁴ liver cancers,⁵ and pancreatic cancers⁶).

Metabolomics represents the latest stage in the multi-omics approaches and is a growing-up technique behind genomics, transcriptomics, and proteomics, generating great interest in scientific and medical communities over the past few years. Starting from a broad analysis of small molecule metabolites, the metabolomics links cellular phenotype to its genotype and provides biochemical information related to the regulation of specific gene transcripts that are altered in the tumoral genome.⁷

Currently, well-recognized tools for metabolomics are nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and gas–mass spectrometry (GC-MS) or liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). GC-MS and LC-MS are more widely represented in the technical platforms related to metabolomics, mainly because they demonstrate a better sensitivity than does NMR spectroscopy.

However, these technologies generate massive amounts of data that are often difficult to interpret or to use for building predictive models.

However, among NMR techniques, ¹H high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy is especially suited to analyzing a small volume of intact tissue samples and avoiding any chemical extraction procedures or sample manipulation, which are necessary for both MS and liquid-state NMR or well-established immunohistochemistry. HRMAS NMR spectroscopy enables identification and quantification of several metabolites from spectra with excellent resolution and signal-to-noise ratio. Recently, we and other groups have proved that metabolomics is a promising tool in the characterization of some endocrine tumors such as pheochromocytomas/paragangliomas.^{8,9}

Consequently, there is a need for accurate biomarkers that could help surgeons to distinguish between SGD and MGD. The aims of the present study were (1) to evaluate if metabolomics patterns were different between PHPT and renal hyperparathyroidism (secondary and tertiary) and (2) to compare the metabolomic profiles of SGD and MGD in PHPT patients, using metabolomics analysis.

MATERIALS AND METHODS

Patient population. Forty-three tissue samples of sporadic hyperfunctioning parathyroid tissue were analyzed and retrospectively selected from 32 patients (Fig 1) suffering from hyperparathyroidism and operated on between January 2013 and November 2014 in 2 academic endocrine tumor centers (Brabois University Hospital, Nancy, France, and La Timone University Hospital, Marseille, France). Only patients who fulfilled the following criteria were included: (1) diagnosis of hyperparathyroidism (primary versus secondary [SHPT] versus tertiary [THPT]), (2) 6-month follow-up after parathyroidectomy for PHPT in order to distinguish SGD from MGD, (3) absence of personal history of therapeutic radiation, and (4) parathyroid glands collected just after resection and snap-frozen in liquid nitrogen before storage.

A written informed consent was obtained from all the included patients. For this investigation, the tissue samples were obtained from the tumor biobank of Nancy (n° BB-0033-00035) and Marseille University Hospitals (AP-HM tissue bank AC 2013-1786).

Disease status. For PHPT, SGD was defined when only a single abnormal gland was removed

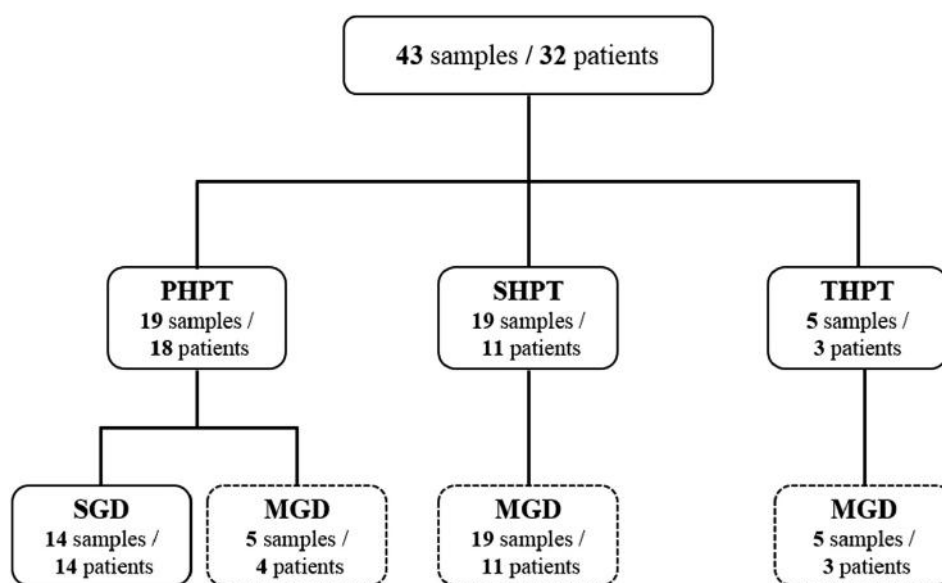


Fig 1. Studied patient population and examined hyperfunctioning parathyroid samples.

and the patient was cured (normalization of serum calcium for ≥ 6 months following parathyroidectomy). When >1 gland was involved histologically (adenoma or hyperplasia), the patient was considered to have MGD, including cases of multiple gland parathyroid hyperplasia. All patients were cured at 6 months postoperatively. Patient and tumor characteristics are detailed in Table I.

Tissue sample preparation for HRMAS NMR spectroscopy. All tissue specimens were collected during the operation just after tumor removal and were snap-frozen in liquid nitrogen until the sample preparation for the HRMAS NMR analysis. The amount of tissue used for HRMAS analysis ranged from 6–20 mg. Each tissue sample was placed in a 30 μL disposable insert. Next, 8 μL of deuterium oxide with 0.75 weight percent 2,2,3,3-D₄-3-(trimethylsilyl) propionic acid were added to every biopsy's insert in order to get a chemical shift reference for the NMR spectrometer.

The exact weight of the sample used was determined by weighing the empty insert and the insert containing the tissue sample. Then, inserts were kept at -80°C until the HRMAS NMR analysis was performed. The insert was stored at -80°C and placed in a 4-mm ZrO_2 rotor just before the HRMAS NMR analysis. The percentage of parathyroid cells in each analyzed sample was estimated on frozen sections using a mirror sample. All examined samples contained $\geq 80\%$ parathyroid cells.

HRMAS NMR data acquisition, spectra processing, and metabolite quantification. All HRMAS NMR spectra were achieved on an Avance

spectrometer (Bruker Avance III 500; Bruker Corporation, Billerica, MA; installed in the Pathological Department of Strasbourg University Hospitals) operating at a proton frequency of 500.13 MHz and equipped with a 4-mm double resonance gradient HRMAS probe (^1H and ^{13}C). The temperature was maintained at 277.15 K throughout the acquisition time in order to reduce the effects of tissue degradation during the spectra acquisition.

A 1-dimensional (1D) proton spectrum using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence and 1,024 transients was acquired for each serum sample.¹⁰ Free induction decays were multiplied by an exponential window function of 0.3 Hz prior to Fourier transformation and were corrected for phase and baseline distortions using TopSpin 3.2 (Bruker GmbH, Bremen, Germany). The chemical shift was calibrated to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 parts per million (ppm).

In order to confirm resonance assignments, 2-dimensional (2D) heteronuclear experiments were also recorded immediately after the end of the 1D spectra acquisition. Because the duration of these experiments is long and significant tissue degradation occurs during NMR acquisition, only a few representative samples were analyzed by 2D experiments. Each peak in the 2D spectra represents a correlation ^1H - ^{13}C . Spectra were referenced by setting the lactate doublet chemical shift to 1.33 ppm in proton dimension and 22.70 ppm in carbon dimension. Metabolites were assigned using a standard metabolite

Table I. Characteristics of 43 samples from 32 patients suffering from hyperparathyroidism

Patients	Sex	Age (y)	Parathyroid disorder	Localization	Mass (g)
1	M	54	PHPT-SGD	Left P3	0.080
2	M	62	PHPT-SGD	Right P3	1.350
3	F	56	PHPT-SGD	Left P4	1.390
4	F	76	PHPT-SGD	Left P4	NA
5	F	61	PHPT-SGD	Right P4	0.250
6	F	66	PHPT-SGD	Right P3	2.230
7	F	59	PHPT-SGD	Left P4	NA
8	F	55	PHPT-SGD	Right P4	3.400
9	F	55	PHPT-SGD	Right P4	0.600
10	F	65	PHPT-SGD	Left P3	NA
11	F	71	PHPT-SGD	Left P3	0.320
12	F	66	PHPT-SGD	Left P4	1.880
13	F	67	PHPT-SGD	Right P3	NA
14	F	57	PHPT-SGD	Left P3	9.600
15	M	77	PHPT-MGD	Left P4	3.800
16	F	78	PHPT-MGD	Left P4	NA
17	F	79	PHPT-MGD	Left P3	NA
18	F	67	PHPT-MGD	Right P4	1.000
				Left P4	NA
19	F	40	SHPT-MGD	Right P4	0.125
				Left P3	0.316
				Left P4	0.282
20	M	59	SHPT-MGD	Right P3	0.700
				Left P3	0.650
21	M	56	SHPT-MGD	Right P4	0.690
				Right P3	0.150
				Left P3	0.230
22	M	45	SHPT-MGD	Left P3	NA
23	M	37	SHPT-MGD	Right P3	NA
				Right P4	NA
24	M	32	SHPT-MGD	Left P3	NA
25	M	54	SHPT-MGD	Right P3	0.722
26	M	30	SHPT-MGD	Right P3	NA
				Left P4	NA
27	F	70	SHPT-MGD	Right P3	0.840
				Left P4	0.660
28	F	39	SHPT-MGD	Right P4	NA
29	F	58	SHPT-MGD	Right P3	0.200
30	F	62	THPT-MGD	Left P4	0.063
				Right P4	0.780
31	M	56	THPT-MGD	Left P3	1.400
				Left P4	0.150
32	F	60	THPT-MGD	Right P4	0.200

M, Male; F, female; PHPT, primary hyperparathyroidism; SHPT, secondary hyperparathyroidism; THPT, tertiary hyperparathyroidism; SGD, single gland disease; MGD, multiglandular disease; P3, inferior parathyroid gland; P4, superior parathyroid glands; NA, not available.

chemical shift table (Table II) available in the literature.¹¹ HRMAS NMR data acquisition and processing have been previously detailed.¹⁰

Metabolite quantification was performed using an external reference standard of lactate (3 μ moles), scanned under the same analytical

conditions. Spectra were normalized according to sample weight. Peaks of interest were automatically defined by an in-house program using MATLAB (MATLAB 7.0; MathWorks, Natick, MA). Peak integration was then compared with the one obtained with the lactate reference and was corrected according to the number of protons. Only well-defined peaks with no overlapping in the 1D CPMG spectra were selected for quantification. Quantification results were expressed as nmol/mg of tissue.

Statistical analysis. The region between 6.54 and 2.32 ppm of each 1D HRMAS NMR spectrum was automatically bucketed into integral regions of 0.01 ppm using AMIX software (AMIX 3.9.14; Bruker GmbH) to reduce the peak shift effect due to pH variations. This procedure generated an X-data matrix with 421 columns (buckets) and 43 rows corresponding to the 43 examined samples of hyperfunctioning parathyroid tissue. In this matrix, each point represents the center of a single bucket of 0.01 ppm in the NMR spectrum. Afterward, the data set was exported and analyzed in SIMCA P (version 13.0.3; Umetrics AB, Umeå, Sweden). The detailed procedure has been previously reported by our team.¹⁰

A combination of principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) was performed to analyze the data matrix.^{12,13} First, a PCA was performed to evaluate the quality of the data and to identify possible outliers. Then an OPLS-DA was employed to optimize the separation between groups and to classify the samples in each model. The following OPLS-DA models were considered: (a) PHPT versus renal HPT and (b) SGD versus MGD in PHPT. OPLS-DA was performed on the whole set of variables (spectral interval of 0.01 ppm) to select those with real discriminating power.¹⁴

Variables corresponding to variable importance for projection (VIP) value ≥ 1 were selected, allowing the selection of the following metabolites: fumarate, phosphorylcholine, glycerophosphocholine, choline, lactate, creatine, aspartate, GSH, glutamine, glutamate, ascorbate, succinate, β -glucose, taurine, scyllo-inositol, and myo-inositol. Cross-validation was used in each OPLS-DA model to determine the number of components and to avoid data overfitting.¹⁵ Two measurements of model quality were reported for OPLS-DA: R^2Y and Q^2 representing, respectively, the accuracy of fit (ie, data variation) and the accuracy of prediction, as estimated by cross-validation. $Q^2 \geq 0.5$ can be considered a good predictor.¹⁶

Table II. ^1H NMR resonance assignments of the metabolites identified in examined samples of hyperfunctioning parathyroid tissue

	Metabolites	Groups	^1H chemical shift (ppm)	^{13}C chemical shift (ppm)
1	Leucine	βCH_2	1.71	42.50
		$\alpha\text{CH-NH}_2$	3.73	56.1
		δCH_3	0.95	23.43
		$\delta'\text{CH}_3$	0.95	24.75
2	Valine	γCH_3	0.98	19.18
		$\gamma'\text{CH}_3$	1.04	20.66
		$\alpha\text{CH-NH}_2$	3.59	63.10
		βCH	2.30	32.0
3	Alanine	βCH_3	1.47	18.86
		αCH	3.78	53.26
4	Lysine	γCH_2	1.43	24.52
		$\gamma'\text{CH}_2$	1.50	24.18
		δCH_2	1.70	29.16
		βCH_2	1.90	32.60
		ϵCH_2	3.00	41.92
5	Arginine	γCH_2	1.91	30.25
		βCH_2	3.23	43.15
		$\epsilon\text{CH-NH}_2$	3.76	57.17
		γCH_2	1.70	26.64
6	Glutathione	$\text{CH}_2\text{-CONH}$	2.55	33.96
		$\text{CH}_2\text{-SH}$	2.95	28.33
		CH-NH_2	3.78	46.04
		CH	4.58	58.44
7	Lactate	CH_3	1.33	22.69
		CH	4.12	71.17
8	Myo-Inositol	C5H	3.27	77.02
		C1H, C3H	3.53	73.84
		C4H, C6H	3.61	75.05
		C2H	4.05	74.93
9	Creatine	CH_3	3.03	39.56
		CH_2	3.93	56.35
10	Taurine	$-\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$	3.26	50.22
		$-\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$	3.41	38.08
11	Glycogen	CH-OH	3.60	73.96
		CH-OH	3.78	63.30
		CH-OH	5.43	102.00
12	Glutamic acid	βCH_2	2.06	29.76
		γCH_2	2.34	35.97
		αCH	3.76	55.17
13	Glutamine	βCH_2	2.16	28.90
		γCH_2	2.44	33.50
		αCH_2	3.77	57.19
14	Choline	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3.21	56.49
		βCH_2	3.52	69.98
		αCH	4.06	58.36
15	Phosphorylcholine	βCH_2	3.61	68.90
		αCH	4.18	60.81
16	Glycerophosphocholine	$-\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$	3.21	56.51
		βCH_2	3.69	68.47
		αCH_2	4.33	62.13
		CH_2OH	3.91	73.29
		$\text{CH}_2\text{-HPO}_4(\text{d})$	3.87	69.20
		$\text{CH}_2\text{-HPO}_4(\text{u})$	3.94	69.20

(continued)

Table II. (continued)

	Metabolites	Groups	^1H chemical shift (ppm)	^{13}C chemical shift (ppm)
17	Ascorbic acid	-CH-OH	4.02	72.16
		C_4H	4.53	80.89
18	Succinic acid	(α,β CH_2)	2.39	34.0

Each peak in the 2D spectrum represents a correlation ^1H - ^{13}C .

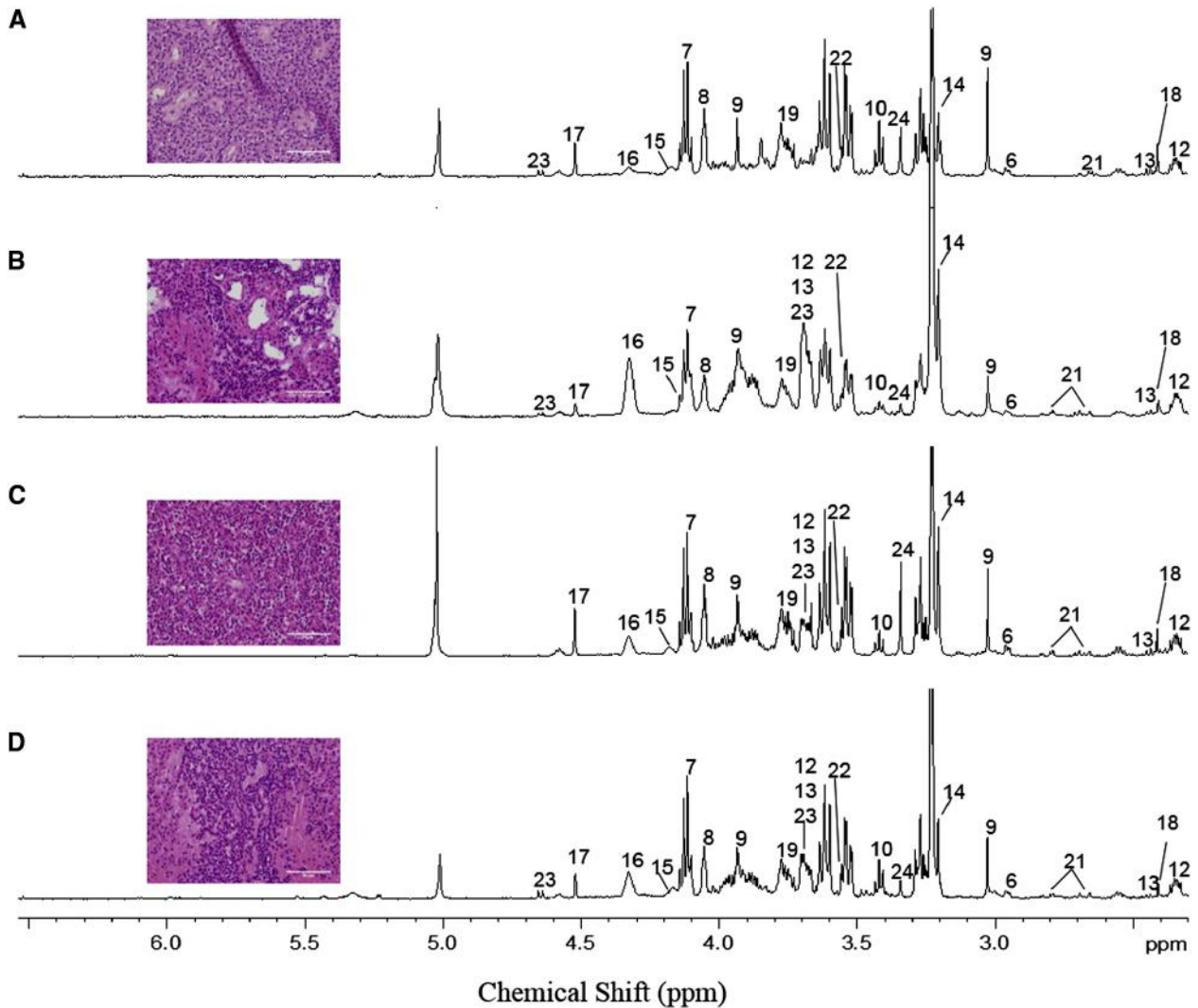


Fig 2. 1D ^1H HRMAS NMR spectra obtained from the analysis of hyperfunctioning parathyroid samples. (A) Primary parathyroid SGD; (B) primary parathyroid MGD; (C) secondary parathyroid MGD; (D) tertiary parathyroid MGD. The spectra metabolic contents are directly comparable, because the intensity of each spectrum has been normalized in respect to the weight of the analyzed sample. For display purposes, the amplitude of the lactate peak at 4.09 ppm and the glycerophosphocholine at 3.21 ppm have been graphically reduced. Metabolite assignments are given in Table I. Histologic features of hyperfunctioning parathyroid glands corresponding to each spectrum are depicted at the left side of the figure (HE \times 400; scale bars, 50 μm). (Color version of this figure is available online.)

Network analysis. The Algorithm to Determine Expected Metabolite Level Alterations Using Mutual Information (ADEMA) has been applied on metabolite quantification values. ADEMA evaluates the changes in groups of metabolites,

between the case and the control, instead of analyzing metabolites one by one.¹⁷ ADEMA includes the metabolic network topology and uses mutual information to find out if those metabolites are biomarkers when considered together

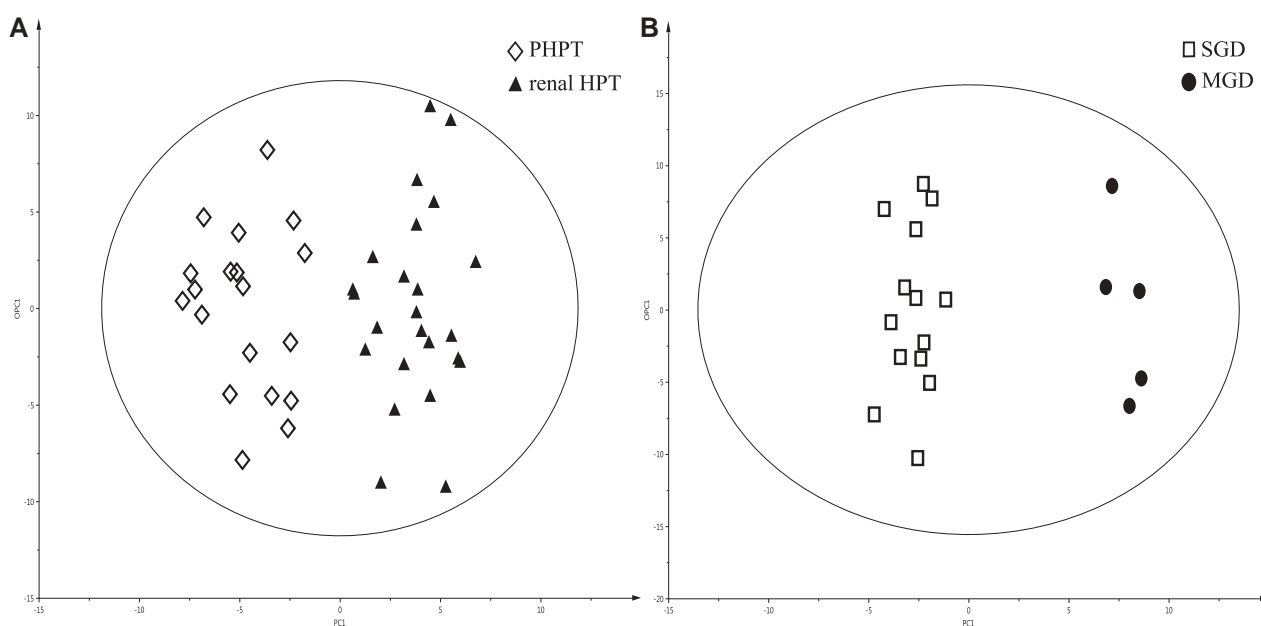


Fig 3. Results of bicomponent OPLS-DA models based on VIP metabolites: (A) Two-class model including 43 samples obtained with PHPT (19 samples) and 24 samples from patients with renal HPT and (B) two-class model including 14 and 5 samples of SGD and MGD from patients with PHPT. A clear distinction between the different classes of tissues is shown in both models.

and can predict the expected change's direction per metabolite, when metabolic network topology is considered. The network was constructed using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes^{18,19} and Selway's work.²⁰

In order to compare the patients suffering from PHPT and SHPT/THPT and the patients suffering from SGD and MGD in the context of PHPT, the following groups of metabolites were defined: (1) Choline, Phosphorylcholine, Glycerophosphocholine, Total Choline; (2) Glutamine, Glutamate; (3) Glucose, Alanine, Lactate; (4) Succinate, Fumarate; (5) Glutathione, Glutamate; and (6) Glutathione, Ascorbate.

For discretization of metabolite observations, we have set a number of levels (M) as 6 and a number of levels that can be assigned to observation (k) as 4. Using the above mentioned metabolite groups and parameters, an expected metabolite level for the case and for the control is obtained per metabolite. The direction of the expected change is obtained by comparing expected levels.

RESULTS

Tissue samples. Accordingly, 19 samples were obtained from 18 patients with PHPT, 19 samples from 11 patients with SHPT, and 5 samples from 3 patients suffering from THPT. Among the 19 samples obtained from patients with PHPT, 14 were classified as SGD, while the 5 others had

MGD (all were described as hyperplastic glands by the pathologist; Fig 1). All patients were cured at 6 months postoperatively.

Spectra quality. All the spectra obtained from the 43 analyzed specimens were of high quality without any signs of tissue necrosis. The spectral region within the range of 2.32–0 ppm has been voluntarily excluded from the analysis because of important signal overlapping related to high and complex fatty acids signals. The representative 1D HRMAS NMR CPMG spectrum for each analyzed sample class is shown in Fig 2. A total of 25 metabolites were identified within the range of 6.54–2.32 ppm from the spectra obtained from all 43 tissue samples. The spectra obtained from different glands within the same patient show similar profiles.

PHPT versus renal HPT. OPLS-DA results. Forty-three samples were studied in this 2-class model. Nineteen samples were obtained from patients with PHPT and 24 from patients with renal HPT (11 patients/19 samples of SHPT and 3 patients/5 samples of THPT). PCA was first applied to our data (43 HPT), showing a homogeneous population without any outliers. The 2 classes were clearly separated by a bi-component OPLS-DA based on the VIP metabolites. (The VIP value is namely a weighted sum of squares of the PLS weights, which takes into account the explained variance of each OPLS dimension.)

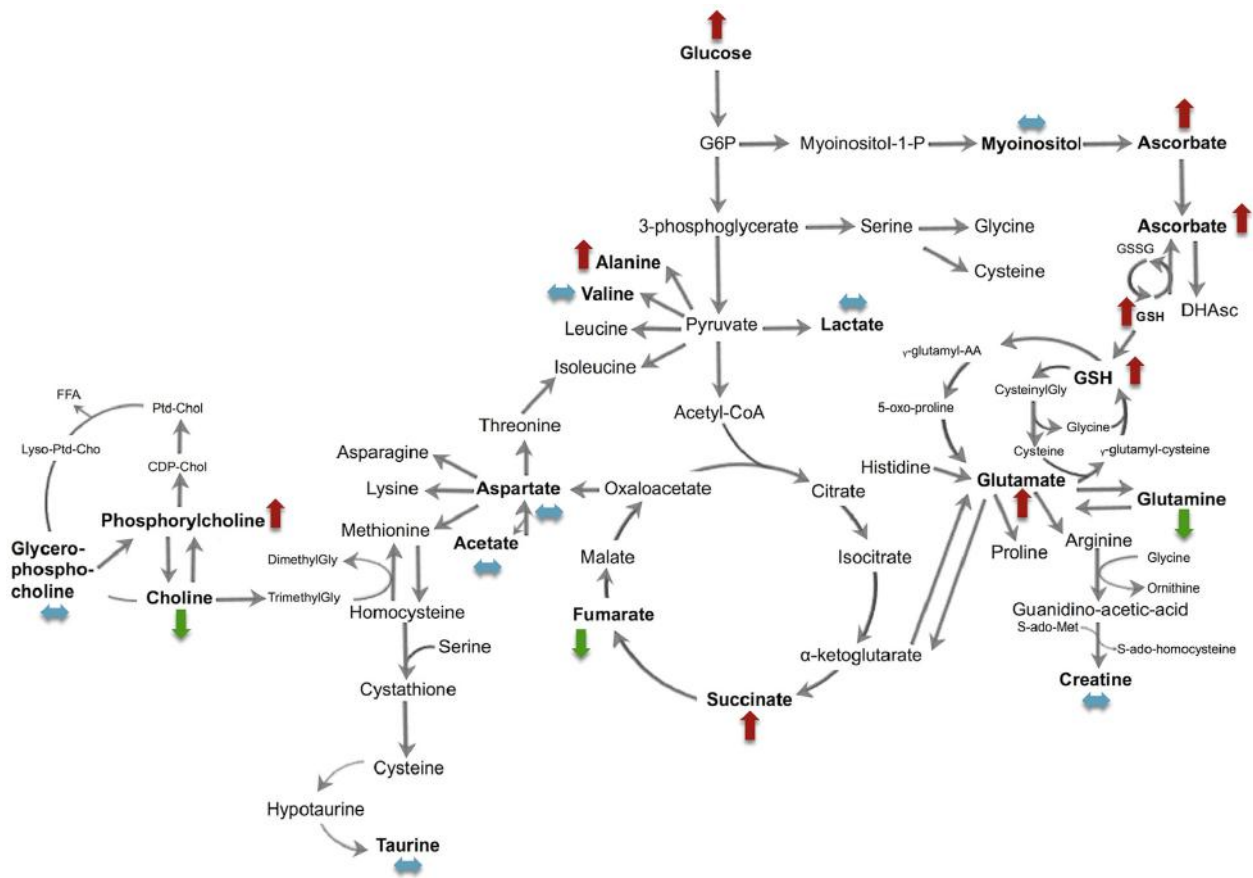


Fig 4. Metabolic network analysis according to ADEMA results comparing PHPT-related samples (19 samples) to renal HPT-related samples (24 samples). The red, green, and blue arrows, respectively, indicate the metabolites that are predicted to increase, decrease, and remain stable between the 2 groups.

The VIP values were employed to identify the features contributing to group separation (Fig 3, A), showing an accurate representation of the data and good cumulative confidence criterion of fit ($R^2Y = 0.85$) and prediction ($Q^2 = 0.63$). A higher level of β -glucose, ascorbate, phosphorylcholine, taurine, GSH, myo-inositol, and glutamate was revealed in patients with PHPT. On the contrary, a higher concentration of fumarate, choline, serine, glycerophosphocholine, aspartate, and glutamine was shown in patients with renal HPT.

Network analysis. When the data were analyzed using the ADEMA algorithm and the metabolic subnetwork depicted in Fig 4, a higher level of phosphorylcholine, succinate, alanine, glucose, ascorbate, GSH, and glutamate was predicted in PHPT. Moreover, a decreased level of choline, fumarate, and glutamine was predicted in PHPT. Finally, glycerophosphocholine, taurine, acetate, aspartate, valine, lactate, myo-inositol, and creatine were predicted to be equivalent between the 2 groups.

SGD versus MGD in PHPT. OPLS-DA results. Fourteen SGD were secondly compared to 5 samples of MGD. No outliers were evident at PCA analysis. The 2nd population was homogeneous, too. A bicomponent OPLS-DA analysis based on VIP metabolites (Fig 3, B) clearly separated the 2 classes of analyzed tissues ($R^2Y = 0.96$, $Q^2 = 0.55$), revealing a higher concentration of fumarate, β -glucose, ascorbate, myo-inositol, glycine, scyllo-inositol, and choline in SGD samples. On the other hand, SGD revealed a higher level of glutamate, glutamine, lactate, taurine, GSH, and aspartate compared with MGD.

Network analysis. Using the ADEMA algorithm, the metabolic subnetwork included a higher level of phosphorylcholine, choline, glycerophosphocholine, fumarate, succinate, lactate, glucose, glutamine, and ascorbate predicted in SGD (Fig 5). Moreover, the model accurately predicted a decreased level of alanine, glutamate, and GSH in MGD. Finally, taurine, acetate, aspartate, valine,

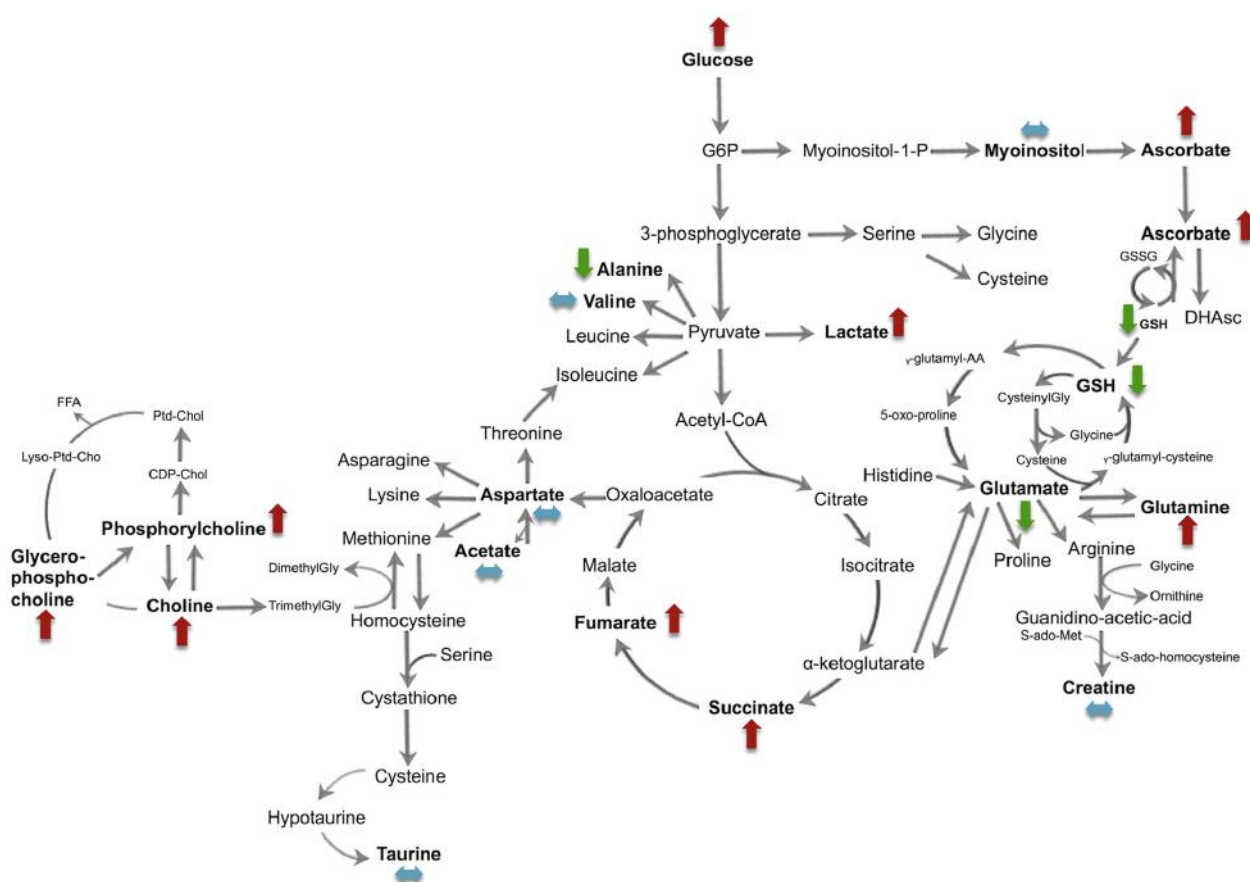


Fig 5. Metabolic network analysis according to ADEMA results, comparing PHPT-related SGD (14 samples) and MGD (5 samples). The red, green, and blue arrows respectively indicate the metabolites that are predicted to increase, decrease, and remain stable between the 2 groups.

myo-inositol, and creatine were predicted to be equivalent between SGD and MGD.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study that has evaluated the metabolome of hyperfunctioning parathyroid glands in the context of parathyroid hyperfunctioning disorders. The principal conclusions that can be drawn from this preliminary study include: (1) There are differences between PHPT and renal HPT from a metabolomic standpoint. (2) SGD and MGD can be distinguished by metabolomic profiling and can be accurately predicted by our model. (3) This approach provides new insights into the relationships between metabolic pathways and parathyroid disorders.

It is widely accepted that bilateral parathyroid exploration is no longer the only option for patients with PHPT, and those with an SGD in imaging studies can also be candidates for focused approaches. Parathyroid scintigraphy (PS) and

parathyroid ultrasonography (US) are the preferred approaches reported by endocrine surgeons for selecting candidates for a focused approach.^{21,22} The Positive Predictive Value for an SGD in cases of concordant results between US and PS for a single gland abnormality is about 90%. In order to reduce the risk of failure, many institutions use intraoperative PTH (IOPTH) monitoring.²³

According to the Miami criteria,²⁴ a 50% decrease in PTH levels 10 minutes after removal of the putative lesion suggests a curative operation. However, the assay might sometimes yield inaccurate results,²⁵⁻²⁸ as when PTH concentrations may decrease even in the presence of MGD. IOPTH monitoring might also wrongly lead to a bilateral operation. Finally, one of the main drawbacks of IOPTH is that its accuracy is widely dependent on preoperative PTH levels, gland sizes, and parathyroid tissues' sensitivity to serum calcium.

Beyond IOPTH, the use of a more specific marker tightly linked to the pathophysiology of the parathyroid disease would be of particular

interest. Because HRMAS NMR spectroscopy enables rapid characterization of intact tissue, it could also be used as an intraoperative method. In our hospital, intraoperative real-time analysis is performed for gliomas in neurosurgery ("ExtempoNMR" project). Fast transportation of samples is performed by a pneumatic tube system.

Sample preparation is quick and easy; it does not take more than 2 minutes to prepare snap-frozen biopsy and inclusion within an insert of a 20-mg parathyroid tissue sample. HRMAS analysis takes 10 minutes for settings and an additional 10 minutes for spectrum acquisition. Data analysis is also very quick (<10 minutes). If confirmed, this approach could be used in clinical routine for classification of SGD versus MGD and could even coexist with IOPTH. Furthermore, the cost is <\$50 per sample.

Based on our preliminary results, we expect that metabolomic profiling could enable the distinction between SGD and MGD. The comparison between IOPTH and HRMAS NMR could be of particular interest in patients with concordant imaging results but also in cases of doubtful or discordant imaging findings. HRMAS NMR also provides new insights into the relationships between metabolic pathways and parathyroid disorders.

In the setting of PHPT, we have found that SGDs (all adenomas) exhibit a higher concentration of myo-inositol, scyllo-inositol, choline, phosphorylcholine, and glycerophosphocholine than hyperplastic glands. These metabolites belong to the structural components of cell membranes.²⁹ Myoinositol is the precursor of phosphatidylinositol, a constituent of phospholipid membranes, and is involved in cell signaling.³⁰ Interestingly, recent studies have shown that ¹⁸F-fluorocholine positron emission tomography (PET) is a very promising imaging method for localization of parathyroid adenomas.³¹⁻³⁶

Our results are in agreement with these observations and could represent the biologic substrate and justification to the use of ¹⁸F-fluorocholine PET imaging in HPT. Moreover, a higher amount of succinate and fumarate was shown by network analysis within SGD compared with MGD, suggesting an increased activity of the tricarboxylic acid cycle. By contrast, MGDs exhibit a higher level of glutamate, GSH, and ascorbate, which act as antioxidants. Hyperplastic glands from PHPT also have higher levels of GSH, aspartate, and glutamate compared with those from renal HPT.

We acknowledge some limitations to the present study. First, there are a limited number of patients included in our study as well as a limited number of analyzed samples. We believe these data are preliminary and should be validated in further series. Second, patients with PHPT and MGD may have multiple adenomas in 5–7% of cases. This subset of patients is considered to be difficult to diagnose using intraoperative PTH, but this difficulty may be similar when using HRMAS NMR spectroscopy.

However, included patients with MGD did not have multiple adenomas, which might have led us to wrong conclusions about this study. Third, we acknowledge that a comparative-effectiveness study should be performed in real time to evaluate IOPTH versus HRMAS NMR spectroscopy before drawing any definitive conclusions. Lastly, this study was retrospective and may involve some bias that would have been unaccounted for.

In conclusion, the present study shows that HRMAS NMR spectroscopy provides unique and accurate information in the metabolomic classification of hyperfunctioning parathyroid glands. Furthermore, this could deepen our knowledge of hyperparathyroidism pathogenesis and may also lead to the identification of new targets for diagnosis, imaging, or future therapeutic options. Finally, if these results are confirmed in further studies, it is expected that the role of intraoperative HRMAS NMR spectroscopy could then be evaluated in the setting of PHPT.

REFERENCES

1. Bilezikian JP, Brandi ML, Eastell R, Silverberg SJ, Udelsman, et al. Guidelines for the Management of Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism: Summary Statement from the Fourth International Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:3561-9.
2. Guerin C, Lowery A, Gabriel S, Castinetti F, Philippon M, Vaillant-Lombard J, et al. Preoperative imaging for focused parathyroidectomy: Making a good strategy even. *Eur J Endocrinol* 2015;172:519-26.
3. Ritchie SA, Ahiahonu PW, Jayasinghe D, Heath D, Liu J, Lu Y, et al. Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: Implications for early screening and detection. *BMC Med* 2010;8:13.
4. Denkert C, Buche E, Hilvo M, Salek R, Oresic M, Griffin J, et al. Metabolomics of human breast cancer: New approaches for tumor typing and biomarker discovery. *Genome Med* 2012;4:37.
5. Duarte IF, Stanley EG, Holmes E, Lindon JC, Gil AM, Tang H, et al. Metabolic assessment of human liver transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy. *Anal Chem* 2005;77:5570-8.

6. Ritchie SA, Akita I, Takemasa I, Eguchi H, Pastural E, Nagano H, et al. Metabolic system alterations in pancreatic cancer patient serum: Potential for early detection. *BMC Cancer* 2013;13:413.
7. Griffin JL, Shocker JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews. Cancer* 2004;4:551-61.
8. Imperiale A, Moussallieh FM, Roche P, Battini S, Cicek AE, Sebag F, et al. Metabolome profiling by HRMAS NMR spectroscopy of pheochromocytomas and paragangliomas detects SDH deficiency: Clinical and pathophysiological implications. *Neoplasia* 2014;17:55-65.
9. Imperiale A, Moussallieh FM, Sebag F, Brunaud L, Barlier A, Elbayed K, et al. A new specific succinate-glutamate metabolomic hallmark in sdhx-related paragangliomas. *PLoS One* 2013;8:e80539.
10. Piotto M, Moussallieh FM, Imperiale A, Benahmed MA, Detour J, Bellocq JP, et al. Reproducible sample preparation and spectrum acquisition techniques for metabolite profiling of human tissues by proton high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance. In: Lutz P, editor. *Methodologies for metabolomics. Experimental strategies and techniques*. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 2012. p. 496-524.
11. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0—The human metabolome database. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D801-7.
12. Seierstad T, Roe K, Sitter B, Halgunset J, Flatmark K, Ree AH, et al. Principal component analysis for the comparison of metabolic profiles from human. *Mol Cancer* 2008; 25:7-33.
13. Wold S, Albano C, Dunn W III, Edlund U, Esbensen K, Geladi P, et al. Multivariate data analysis in chemistry. In: Kowalski BR, editor. *Chemometrics: Mathematics and statistics in chemistry*. Dordrecht (The Netherlands): Reidel; 1984. p. 17-95.
14. Chong IG, Jun CH. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemolab* 2005; 78:103-12.
15. Picard RR, Cook RD. Cross-validation of regression models. *J Am Stat Assoc* 1984;79:575-83.
16. Wold S, Ruhe A, Wold H, Dunn WJ. The collinearity problem in linear regression - the partial least-squares (PLS) approach to generalized inverses. *SIAM J Sci Stat Comput* 1984;5:735-43.
17. Cicek AE, Bederman I, Henderson L, Drumm ML, Ozsoyoglu G. ADEMA: An algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information. *PLoS Comput Biol* 2013;9:e1002859.
18. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000;28:27-30.
19. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 2014;42: D199-205.
20. Selway ZZ. *Metabolism at a glance*. 3rd ed. Malden (MI): Blackwell Publishing; 2014.
21. Greene AB, Butler RS, McIntyre S, Barbosa GF, Mitchell J, Berber E, et al. National trends in parathyroid surgery from 1998 to 2008: A decade of change. *J Am Coll Surg* 2009;209:332-43.
22. Kunstman JW, Kirsch JD, Mahajan A, Udelsman R. Clinical review: Parathyroid localization and implications for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98: 902-12.
23. Udelsman R, Akerstrom G, Biagini C, Duh QY, Miccoli P, Niederle B, et al. The surgical management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Proceedings of the fourth international workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:3595-606.
24. Molinari AS, Irvin GL 3rd, Deriso GT, Bott L. Incidence of multiglandular disease in primary hyperparathyroidism determined by parathyroid hormone secretion. *Surgery* 1996;120:934-7.
25. Gauger PG, Agarwal G, England BG, Delbridge LW, Matz KA, Wilkinson M, et al. Intraoperative parathyroid hormone monitoring fails to detect double parathyroid adenomas: A 2-institution experience. *Surgery* 2001;130: 1005-10.
26. Miller BS, England BG, Nehs M, Burney RE, Doherty GM, Gauger PG. Interpretation of intraoperative parathyroid hormone monitoring in patients with baseline parathyroid hormone levels of <100 pg/mL. *Surgery* 2006;140:883-90.
27. Siperstein A, Berber E, Barbosa GF, Tsinberg M, Greene AB, Mitchell J, et al. Predicting the success of limited exploration for primary hyperparathyroidism using ultrasound, sestamibi, and intraoperative parathyroid hormone: Analysis of 1,158 cases. *Ann Surg* 2008;248:420-8.
28. Weber CJ, Ritchie JC. Retrospective analysis of sequential changes in serum intact parathyroid hormone levels during conventional parathyroid exploration. *Surgery* 1999;126: 1139-43.
29. Kreis R, Ross BD, Farrow NA, Ackerman Z. Metabolic disorders of the brain in chronic hepatic encephalopathy detected with H-1 NMR spectroscopy. *Radiology* 1992;182: 19-27.
30. Berridge MJ, Downes CP, Harley MR. Neural and developmental actions of lithium: A unifying hypothesis. *Cell* 1989; 59:411-9.
31. Lezaic L, Rep S, Sever MJ, Kocjan T, Hocevar M, Fettich J. 18F-Fluorocholine PET/CT for localization of hyperfunctioning parathyroid tissue in primary hyperparathyroidism: A pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014;41:2083-9.
32. Hindie E, Zanotti-Fregonara P, Tabarin A, Rubello D, Morelec I, Wagner T, et al. The role of radionuclide imaging in the surgical management of primary hyperparathyroidism. *J Nucl Med* 2015;56:737-44.
33. Michaud L, Burgess A, Huchet V, Lefèvre M, Tassard M, Ohnona J, et al. Is 18F-fluorocholine-positron emission tomography/computerized tomography a new imaging tool for detecting hyperfunctioning parathyroid glands in primary or secondary hyperparathyroidism? *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:4531-6.
34. Kluijfhout WP, Vorselaars WM, Vriens MR, Borel Rinke IH, Valk GD, de Keizer B. Enabling minimal invasive parathyroidectomy for patients with primary hyperparathyroidism using Tc-99m-sestamibi SPECT-CT, ultrasound and first results of 18F-fluorocholine PET-CT. *Eur J Radiol* 2015;84: 1745-51.
35. Paul A, Villepelet A, Lefèvre M, Périé S. Oncocytic parathyroid adenoma. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2015;132:301-3.
36. Michaud L, Balogova S, Burgess A, Ohnona J, Huchet V, Kerrou K, et al. A pilot comparison of 18F-fluorocholine PET/CT, ultrasonography and 123I/99mTc-sestaMIBI dual-phase dual-isotope scintigraphy in the preoperative localization of hyperfunctioning parathyroid glands in primary or secondary hyperparathyroidism: Influence of thyroid anomalies. *Medicine* 2015;94:e1701.

Commentary on: High-resolution magic angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolomics of hyperfunctioning parathyroid glands



Geoffrey B. Thompson, MD, Rochester, MN

From the Mayo Clinic, Rochester, MN

THIS SIGNIFICANT STUDY BY BATTINI ET AL¹ of the University of Strasbourg, Strasbourg, France, examines a novel way of distinguishing single-gland primary hyperparathyroidism from multigland hyperplasia, which is present in up to 15–20% of primary hyperparathyroidism cases. We know that an operation is the only definitive curative treatment for primary hyperparathyroidism. In experienced hands, the success of operative intervention can be as great as 98% in patients with nonfamilial, nonmalignant cases of hyperparathyroidism. However, even in experienced hands, the differentiation between single-gland disease and multigland hyperplasia continues to pose a challenge in terms of diagnosis and the extent of tissue removal. Many years ago, the biggest challenge was the definitive diagnosis of primary hyperparathyroidism. Assays that looked only at fragments of parathyroid hormone were available, and these were associated with significant shortcomings. In those days, the diagnosis of primary hyperparathyroidism was based on multiple serum calcium measurements and the exclusion of all other causes of hypercalcemia. With the development of an intact immunochemiluminiscent assay, the diagnosis of primary hyperparathyroidism in the presence of hypercalcemia and

an inappropriate or elevated level of parathyroid hormone has become accurate and simplified. With the definitive diagnosis readily available, challenges remained for optimal localization of abnormal parathyroid glands. Preoperative localization of abnormal glands became more accurate with refinements in neck ultrasound and the development of sestamibi parathyroid nuclear medicine scans. However, multigland hyperplasia continues to be the bane of existence for even the most experienced parathyroid surgeon. Then along came the development of a rapid intraoperative parathyroid hormone assay, which in most cases could confirm successful removal of adequate amounts of parathyroid tissue to render the patient cured. This led to what we refer to today as focused or minimally invasive parathyroidectomy. However, the use of the intraoperative parathyroid hormone assay still fails to differentiate single-gland and multigland diseases in a number of instances. More recently, others have returned to 4-gland exploration. However, even in this situation, visualization by experienced surgeons and microscopic analysis by endocrine pathologists continue to avoid perfection.

The group out of Strasbourg, France has examined tissue metabolomic profiles in patients with single-gland primary hyperparathyroidism and multigland primary hyperparathyroidism and in those with secondary and tertiary renal-related hyperparathyroidism. The method used was ^1H high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy that has the ability to assess metabolomic profiles rapidly among these various pathologic entities. The analysis, which was performed on 46 glands snap-frozen in liquid nitrogen for retrospective analysis, showed a clear

10.1016/j.surg.2016.03.002

Accepted for publication March 22, 2016.

Reprint requests: Geoffrey B. Thompson, MD, Mayo Clinic, 200 First Street SW, Rochester, MN 55902. E-mail: thompson.geoffrey@mayo.edu.

Surgery 2016;160:395-6.

0039-6060/\$ - see front matter

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2016.03.013>

distinction between primary hyperparathyroidism and renal hyperparathyroidism and, even more importantly, was able to distinguish differences in single-gland disease from multigland hyperplasia in primary hyperparathyroidism. The authors showed this technology is reliable and fast and could be used as an intraoperative tool in the future. Very clear-cut differences were noted in the metabolomics among the various subtypes of hyperparathyroidism. This technology, at least as seen in a limited number of patients, seems to demonstrate a process that may help us to better decide intraoperatively whether a patient needs standard 4-gland cervical exploration or minimal access parathyroidectomy. The authors have demonstrated this can be done rather quickly, starting with removal of the most suspicious gland in question. Specifically, single-gland disease was predicted and was associated with significantly higher levels of phosphorylcholine, choline, glycerophosphocholine, fumarate, succinate, lactate, glucose, glutamine, and ascorbate compared with multigland disease.

The authors realize and state the limitations of the study, such as the small sample numbers, and encourage others to validate the findings. The article is extremely well written and detailed, and it is clearly something new and potentially important to the management of patients with hyperparathyroidism and multigland hyperplasia. Metabolomics or global metabolite profiling has been used for investigating metabolite changes associated with some pathologic conditions, including colorectal, breast, liver, and pancreatic cancers.²⁻⁵ Metabolomics represents the latest in the “omics” cascade behind genomics, transcriptomics,

and proteomics, generating great interest in the medical community. The technologies used in the assessment of metabolomics include nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas or liquid chromatography. This technology is readily available in most laboratories and research institutes. With the need for accurate biomarkers to help surgeons distinguish single-gland disease and multigland disease, the current study offers a potential adjunct to the accurate identification and appropriate treatment for multigland hyperplasia. The authors point out that the potential use of this methodology as an intraoperative tool will require specific additional studies that will open an exciting avenue for future investigation.

REFERENCES

1. Battini S, Imperiale A, Taieb D, Elbayed K, Cicek EA, Sebag F, et al. High-resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolomics of hyperfunctioning parathyroid glands. *Surgery* 2016;160:384-94.
2. Ritchie SA, Ahiahonu PW, Jayasinghe D, Heath D, Liu J, Lu Y, et al. Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: Implications for early screening and detection. *BMC Med* 2010;8:13.
3. Denkert C, Buche E, Hilvo M, Salek R, Oresic M, Griffin J, et al. Metabolomics of human breast cancer: New approaches for tumor typing and biomarker discovery. *Genome Med* 2012;4:37.
4. Duarte IF, Stanley EG, Holmes E, Lindon JC, Gil AM, Tang H, et al. Metabolic assessment of human liver transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using high-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy. *Anal Chem* 2005;77:5570-8.
5. Ritchie SA, Akita I, Takemasa I, Eguchi H, Pastural E, Nagano H, et al. Metabolic system alterations in pancreatic cancer patient serum: Potential for early detection. *BMC Cancer* 2013;13:413.

Annexe 2

Tumor metabolomics profiling predicts clinical outcome of patients suffering from pancreatic adenocarcinoma

Battini S¹, Faitot F^{1,2,3}, Imperiale A^{1,3,4}, Cicek A.E^{5,6}, Heimburger C^{1,3,4}, Averous G⁷, Bachellier P², Namer IJ^{1,3,4}

¹ICube, UMR 7357 University of Strasbourg/CNRS, France, ²Department of Visceral Surgery and Transplantation, Hautepierre Hospital, University Hospitals of Strasbourg, France, ³FMTS, Faculty of Medicine, Strasbourg, France, ⁴Department of Biophysics and Nuclear Medicine, Hautepierre Hospital, University Hospitals of Strasbourg, France, ⁵Computational Biology Department, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, ⁶Computer Engineering Department, Bilkent University, Ankara, Turkey, ⁷Department of Pathology, Hautepierre Hospital, University Hospitals of Strasbourg, France.

Manuscript word count: 3558

Abstract word count: 249

Corresponding author

Pr Izzie-Jacques NAMER, MD PhD

Department of Biophysics and Nuclear Medicine

University Hospital of Strasbourg, Hautepierre Hospital

1, Avenue Molière

67098 Strasbourg Cedex, France

Email: Izzie.Jacques.NAMER@chru-strasbourg.fr

Tel: +33388128650

Manuscript category: Research article

Keywords: metabolomics, HRMAS, NMR, biomarker, pancreatic adenocarcinoma, long-term survival

Competing Interests: The authors declare that there are no competing interests.

Manuscript category: Full paper

ABSTRACT

Background Pancreatic adenocarcinomas (PA) have very poor prognoses even when surgery is possible. Currently, there are no tissular biomarkers to predict long-term survival in patients with PA. The aims of this study were to (1) describe the metabolome of pancreatic parenchyma (PP) and PA (2) determine the impact of neoadjuvant chemotherapy on PP and PA (3) find tissue metabolic biomarkers associated with long-term survivors, using metabolomics analysis.

Methods ^1H -high resolution magic-angle-spinning (HRMAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy using intact tissues was applied to analyze metabolites in PP tissue's samples ($n = 17$) and in intact tumor samples ($n = 106$), obtained from 106 patients undergoing surgical resection for PA.

Results An OPLS-DA analysis showed a clear distinction between PP and PA. A higher concentration of myo-inositol and glycerol was shown in PP. On the contrary, a higher level of glucose, ascorbate, ethanolamine, lactate and taurine was revealed in PA. Among those metabolites, one of them was particularly obvious in the distinction between long-term and short-term survivors. A high ethanolamine level was associated with worse survival. The impact of neoadjuvant chemotherapy was higher on PA than on PP.

Conclusions This study shows that HRMAS NMR spectroscopy using intact tissue provides some important and solid information in the characterization of pancreatic adenocarcinoma. Metabolomics profiling can also predict long-term survival: the assessment of ethanolamine concentration can be clinically relevant as a single metabolic biomarker. This information can be obtained in 20 min, during surgery, in order to distinguish long-term from short-term survival.

Nonstandard Abbreviations:

CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill

HRMAS: high resolution magic angle spinning

NMR: nuclear magnetic resonance

CDP: cephalic duodeno-pancreatectomy

PCA: principal component analysis

OPLS-DA: orthogonal partial least square-discriminant analysis

PA: pancreatic ductal adenocarcinoma

PP: pancreatic parenchyma

INTRODUCTION

Pancreatic adenocarcinomas (PA) are extremely aggressive cancers and have one of the poorest prognoses among all cancers (1). With an estimated 48960 new cases in 2015 in the United States of America (USA), pancreatic cancer is the twelfth most common cancer, representing 3.0% of all the new cancers diagnosed in the USA (2). The majority of pancreatic cancers are pancreatic ductal adenocarcinomas and are localized in the head of the pancreas (3,4).

Surgery is the only potentially curative treatment for PA. Pancreatic surgery is associated with significant morbidity and mortality. Indeed the mortality rate, even in highly specialized centers, ranges from 2-5% and morbidity can be as high as 70%, especially in left pancreatic resection (5,6). The extension of lymphadenectomy, with its high morbidity and low evidence-based data, is actually a matter for debate (7,8). In recent years, a significant shift towards targeted surgical interventions has been proposed, relying on accurate characterization of PA, thanks to preoperative imaging leading to an evaluation of its resectability (9).

However, CT and MRI imaging studies have not proved able to accurately predict long-term survival in patients. The main prognostic factors for survival after cephalic duodeno-pancreatectomy (CDP) are histological parameters, namely R0 margins, nodal status and differentiation (10,11). Although technical breakthroughs have been achieved in the field of pancreatic surgery, it has nevertheless been shown that the rate of R0 resection is rarely over 20% and that it consistently impacts survival (12,13). Nodal extension depends on the extension of lymphadenectomy as shown by the impact of invaded node to total examined node ratio (14). However the benefit of extended lymphadenectomy in pancreatic adenocarcinoma has not been demonstrated. Therefore, there is a lack of accurate prognostic factors and currently no tissue biomarkers have been identified to predict long-term survival in patients with pancreatic cancer.

Gross examination and intraoperative extemporaneous microscopic examination are reliable for diagnosis, but cannot predict overall survival.

In recent years, metabolomics, or global metabolite profiling, has been used to investigate the metabolite changes associated with pancreatic cancers (15-20). Metabolomics is the latest stage of the multi-omics approaches. After genomics, transcriptomics and proteomics, metabolomics has been generating increasing interest in scientific and medical communities in the past few years, particularly in oncology (21) and more precisely in pancreatic cancers. Currently, well-recognized tools for metabolomics are: nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and gas (GC-MS) or liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). ^1H high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy technology is particularly suitable for the analysis of small samples of intact tissue. This avoids the need for chemical extraction procedures or for handling the samples, both of which are required by MS and liquid-state NMR. HRMAS NMR spectroscopy enables identification and quantification of several metabolites from spectra with excellent resolution and signal to noise ratio.

Beyond serum marker (15,18) better characterization of pancreatic tissue would be of particular interest in PA. Consequently, there is a need for accurate tissue biomarkers that could help surgeons distinguish between long-term and short-term survivors. The aims of this study were thus to (1) define the metabolome of pancreatic parenchyma (PP, healthy tissue) and PA (2) determine the impact of neoadjuvant chemotherapy on healthy tissue (PP) and PA (3) find metabolic biomarkers associated with long-term survival in patients suffering from PA by using metabolomics analysis.

METHODS

Patient population

This study included 123 samples obtained from 106 patients retrospectively selected after they had undergone PA resection, from May 2000 to March 2011, in the Department of Visceral Surgery and Transplantation (University Hospitals of Strasbourg, Hautepierre Hospital, Strasbourg, France). These patients fulfilled the following criteria: (1) histological diagnosis of PA, (2) all follow-up patients (3) only patients with tumor-related deaths (4) homogeneous adjuvant treatment using the same chemotherapy for all patients (and no radiotherapy) (5) samples of pancreatic tissue collected just after resection and then snap-frozen in liquid nitrogen before storage.

Among the 106 samples obtained from patients with PA:

- 44 samples from patients who did not receive any neoadjuvant chemotherapy
- 62 samples from patients who did

Among the 17 samples obtained from pancreatic parenchyma (healthy tissue):

- 9 samples from patients who did not receive any neoadjuvant chemotherapy
- 8 samples from patients who did

Finally two groups with extremely different prognosis (PA samples) were compared:

- Long-term survivors (survival > 3 years), 8 samples, no neoadjuvant chemotherapy
- Short-term survivors (survival < 1 year), 9 samples, no neoadjuvant chemotherapy

For this investigation, the tissue samples were obtained from the tumor bio-bank of Strasbourg University Hospitals. A written informed consent was given by all the included patients.

Tissue sample preparation for HRMAS NMR spectroscopy

All tissue specimens were collected during surgery just after tumor removal and were snap-frozen in liquid nitrogen until the -80 °C temperature-storage. Then, the sample preparation was

performed at the temperature of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The amount of tissue used for the HRMAS analysis ranged from 15 mg to 20 mg. Each tissue sample was placed in a 30 μL disposable insert. Next, 8 μl of deuterium oxide with 0.75 weight percent 2,2,3,3-D₄-3-(trimethylsilyl) propionic acid, were added in every biopsy's insert in order to get a chemical shift reference for the NMR spectrometer. Finally, inserts were kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the HRMAS analysis was performed. The insert was placed in a 4-mm ZrO₂ rotor just before the HRMAS analysis.

HRMAS NMR data acquisition

All HRMAS NMR spectra were achieved on a Bruker Avance III 500 spectrometer (installed at Hautepierre Hospital, Strasbourg) operating at a proton frequency of 500.13 MHz and equipped with a 4 mm triple resonance gradient HRMAS probe (¹H, ¹³C and ³¹P). The temperature was maintained at 277.15 K throughout the acquisition time in order to reduce the effects of tissue degradation during the spectra acquisition. A one-dimensional (1D) proton spectrum using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill pulse sequence was acquired with an inter-pulse delay of 285 μs and an acquisition time of 10 min for each tissue sample (Bruker GmbH, Germany). The number of loops was set to 328 giving the CPMG pulse train a total length of 93 ms. The chemical shift was calibrated to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 ppm. In order to confirm resonance assignments in a few representative samples, two-dimensional (2D) heteronuclear experiments (¹H – ¹³C) were also recorded immediately after ending the 1D spectra acquisition. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature (*Table 1*) (22).

HRMAS NMR data processing and statistical analyses

HRMAS NMR data processing, as well as metabolites' quantification have all been previously detailed (23). Briefly, the region between 7.50 and 0.70 ppm of each 1D HRMAS NMR spectra

was automatically bucketed into integral regions of 0.01 ppm, using AMIX 3.9.14 software (Bruker GmbH, Germany). Once the data set had been obtained, it was then exported and analyzed into SIMCA P (version 13.0.3, Umetrics AB, Umeå, Sweden). An orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) was performed to analyze the data. The following OPLS-DA model was considered: PP vs. PA (both without neoadjuvant chemotherapy). Two measurements of model quality were reported for OPLS-DA: R^2Y and. $R^2 > 0.7$ and $Q^2 \geq 0.5$ can be considered as a good predictor.

When the population is small, instead of applying OPLS-DA analysis, network analyses using the “algorithm to determine expected metabolite level alterations”, using mutual information (ADEMA), are justified (25). This is why ADEMA has been applied to metabolite quantification values. ADEMA evaluates the changes in groups of metabolites, between the case and the control instead of analyzing metabolites one by one. ADEMA algorithm includes the metabolic network topology and uses mutual information to find out if those metabolites are biomarkers when considered together, and can predict the expected change in direction per metabolite, when metabolic network topology is considered. The network was constructed using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (26,27) and Selway’s work (28).

Some groups of metabolites were compared related to involved metabolic pathways as follows:

- Choline, Phosphorylcholine, Glycerophosphocholine, Ethanolamine
- Glycerol, Glucose
- Glucose, Lactate
- Aspartate, Threonine
- Glucose, Glycine
- Aspartate, Taurine
- Aspartate, Succinate
- Glucose, Ascorbate, Glycine, Glutamate

- Glutamate, Glutamine
- Glutamate, Glutamine, Glycine
- Glutamate, Glycine, Creatine
- Tyrosine, Phenylalanine

Metabolites' quantification was performed using an external reference standard of lactate (3 μ moles), scanned under the same analytical conditions as tissue samples. Spectra were normalized according to sample weight. Peaks of interest were automatically defined by an in-house program using MATLAB 7.0 (Mathworks, Natick, United States). Peak integration was then compared to the one obtained with the lactate reference and was corrected according to the number of protons. Only well-defined peaks with no overlapping in the 1D CPMG spectra were selected for quantification (*Table 2*, *Table 3*, and *Table 4*). Quantification results were expressed as nmol/mg of tissue.

Continuous variables are expressed as mean \pm standard deviation (SD). The Mann-Whitney U test was performed to compare the metabolites' concentrations of (1) PP without neoadjuvant chemotherapy from PP with (2) PA without neoadjuvant chemotherapy from PA with (3) long-term from short-term survival in patients suffering from PA (*Table 2*, *Table 3*, and *Table 4*). The Mann Whitney U tests were performed with R software (24).

The receiver operating characteristic (ROC) curves and the Kaplan-Meier curves were used to perform a survival analysis and therefore to evaluate the clinical utility of metabolite quantification in the long-term survival characterization (R software (24)).

RESULTS

All the spectra obtained from the 123 analyzed specimens were of high quality without any obvious evidence of tissue necrosis. A total of 31 metabolites were identified within the range of 7.50 – 0.70 ppm from the spectra, obtained from all pancreatic tissue samples (*Table 1*). Among the 31 identified metabolites, only 18 metabolites were quantified. Indeed, only well-defined peaks with no overlapping in the 1D CPMG spectra were selected for quantification. The representative 1D HRMAS NMR CPMG spectra of PP (healthy tissue) and PA samples are shown in *Fig. 1A* and *Fig. 2A*.

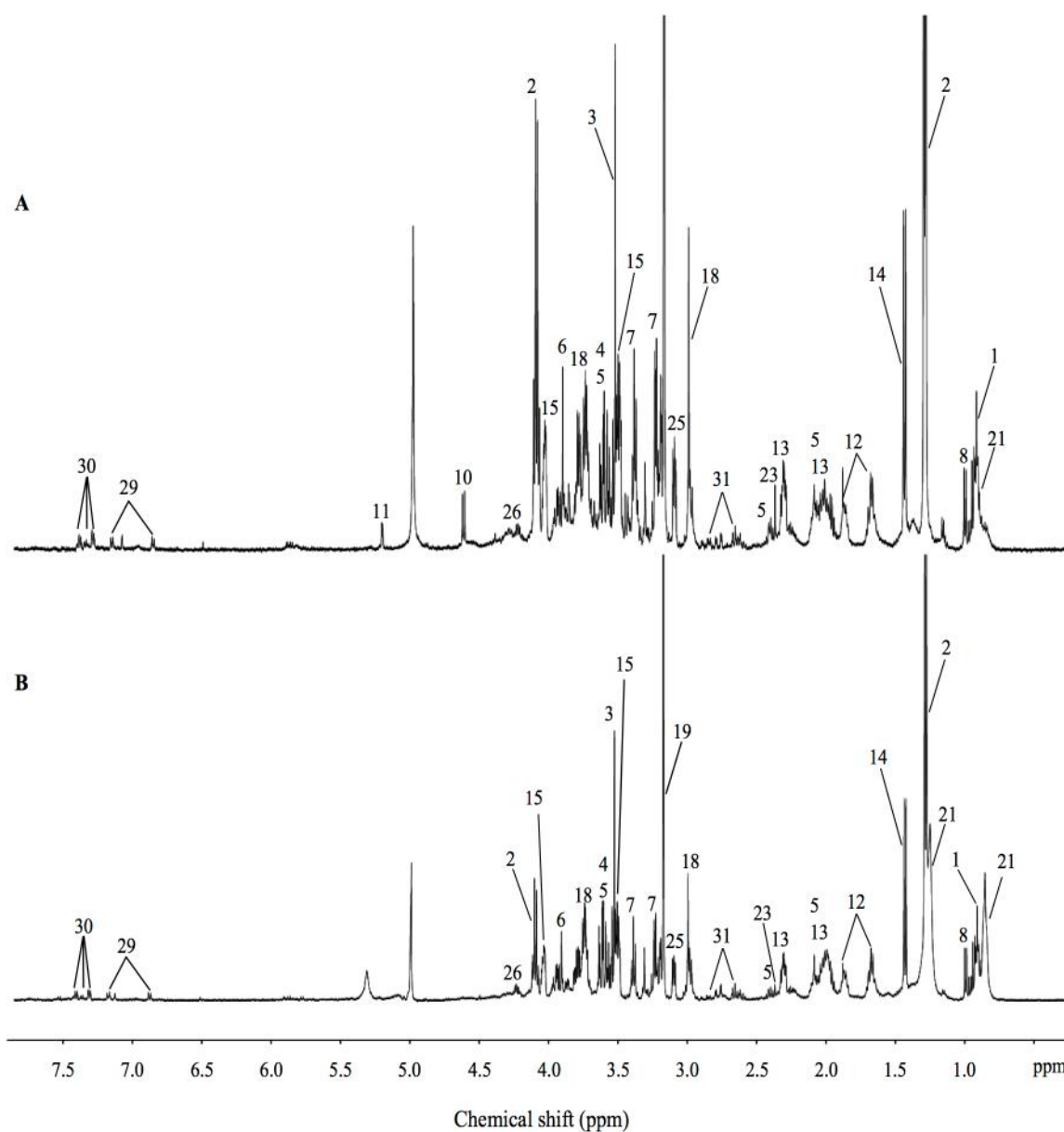


Figure 1 HRMAS NMR spectra of pancreatic healthy tissue (PP). (A) PP without neoadjuvant chemotherapy ($n = 9$), (B) PP with neoadjuvant chemotherapy ($n = 8$). The spectra metabolic contents are directly comparable because of the intensity of each spectrum was normalized in respect to the weight of the analyzed sample. For display purposes, the amplitude of the choline peak at 3.23 ppm, the glycine peak at 3.56 ppm and the lactate peak at 1.33 ppm, was graphically shortened. Metabolites' assignments are given in **Table 1**.

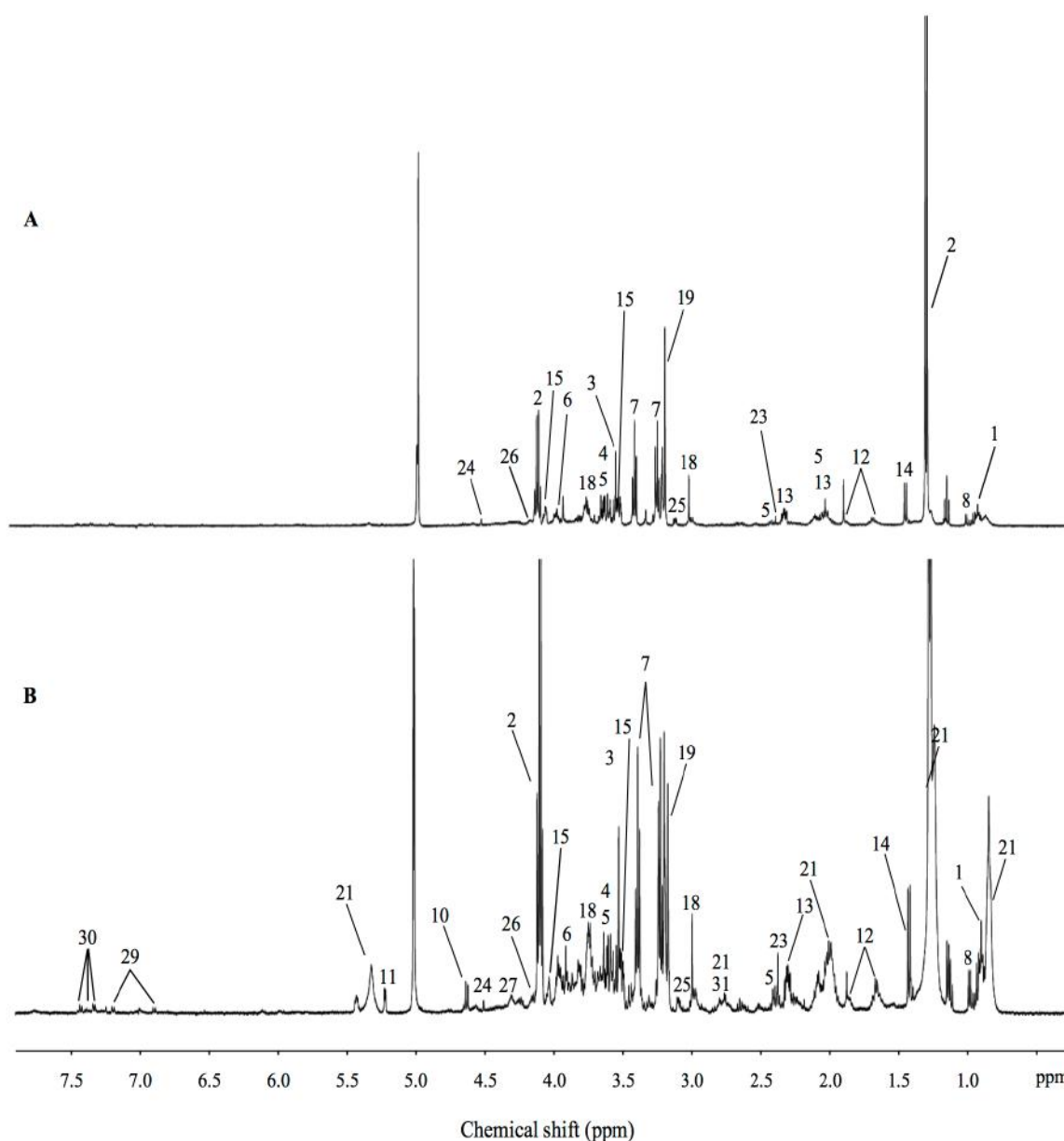


Figure 2 HRMAS NMR spectra of pancreatic adenocarcinoma (PA). (A) PA without neoadjuvant chemotherapy ($n = 44$), (B) PA with neoadjuvant chemotherapy ($n = 62$). The spectra metabolic contents are directly comparable because of the intensity of each spectrum was normalized in respect to the weight of the analyzed sample. For display purposes, the amplitude of the lactate peak at 1.33 ppm was graphically shortened. Metabolites' assignments are given in **Table 1**.

Metabolomic profiles of PP and PA were clearly separated by a bi-component OPLS-DA ($R^2Y = 0.82$; $Q^2 = 0.69$) (Fig. 3).

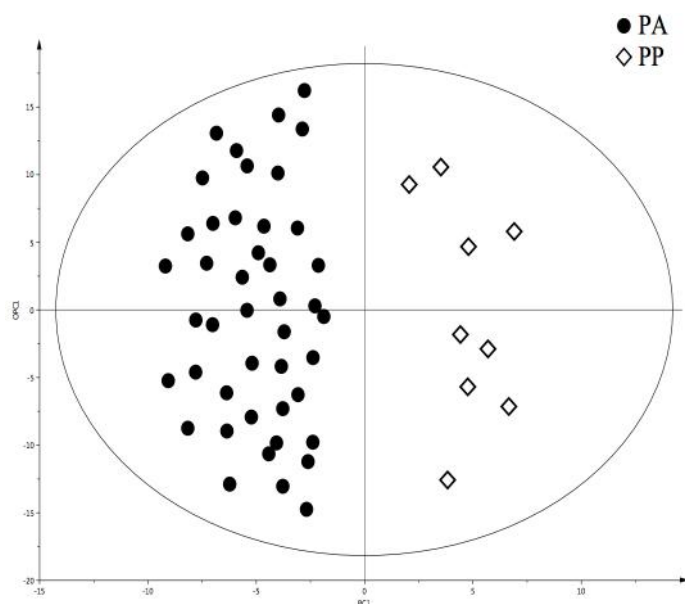


Figure 3 OPLS-DA comparing pancreatic adenocarcinoma (PA) with pancreatic healthy tissue (PP). A two-class model including 53 samples without neoadjuvant chemotherapy: 9 samples of PP and 44 of PA. A clear distinction between the different classes of tissues is shown in this model ($R^2Y = 0.79$; $Q^2 = 0.62$).

A higher concentration of myo-inositol and glycerol was shown in PP tissue samples. On the contrary, a higher level of glucose, ascorbate, ethanolamine, lactate and taurine was revealed in PA tissue samples.

Impact of neoadjuvant chemotherapy on PP and PA

Seventeen samples from PP (healthy tissue) were included in this model: 8 samples received a neoadjuvant chemotherapy, while the 9 others did not (*Fig. 1*). No discriminant metabolites were found using the Mann-Whitney U test. The network analysis showed that a decreased level of succinate, aspartate, taurine, phosphorylcholine, glucose, tyrosine, lactate and glutamine was predicted in PP samples from patients with neoadjuvant chemotherapy. Moreover, a higher level of threonine and glycine was predicted in PP tissue samples from patients with neoadjuvant chemotherapy. Finally, the other metabolites were predicted to be equivalent between the two groups (*Fig. 4*).

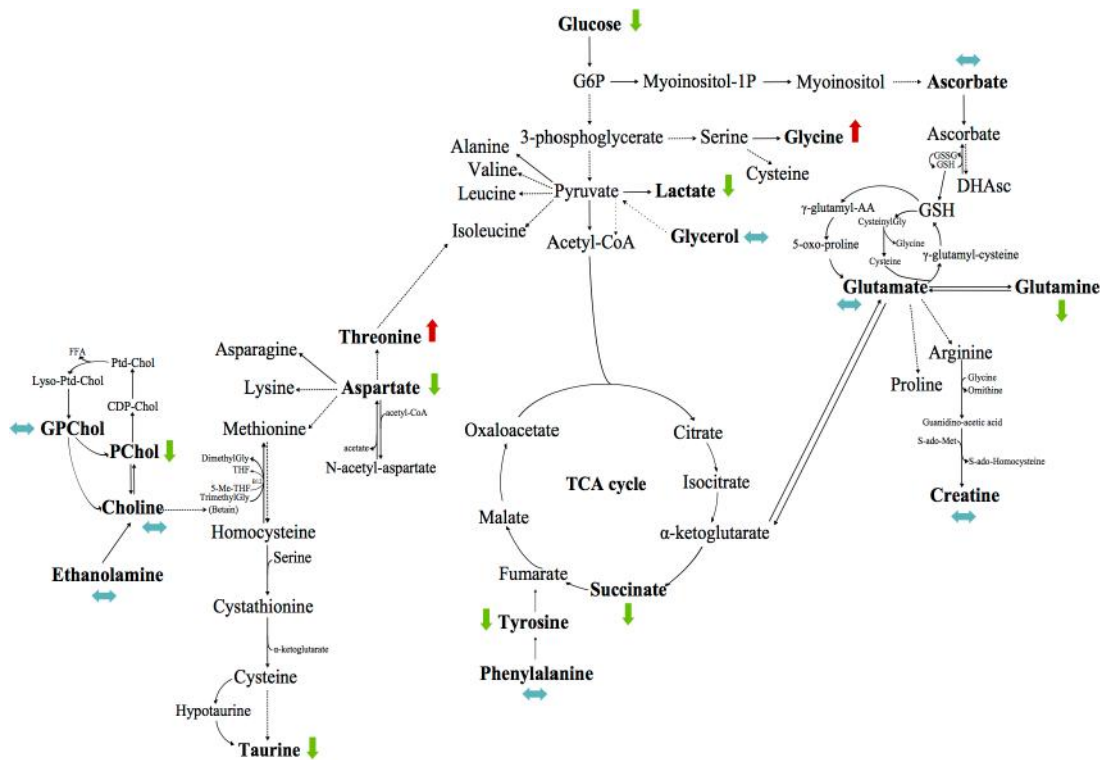


Figure 4 Impact of neoadjuvant chemotherapy on healthy tissue (PP). PP with neoadjuvant chemotherapy-related samples ($n = 8$) were compared to PP with no neoadjuvant chemotherapy ($n = 9$). Metabolic network analysis according to ADEMA results. The red, green and blue arrows respectively indicate the metabolites that are predicted to increase, decrease or remain stable, in the population who received neoadjuvant chemotherapy.

Among the 106 samples of PA, 62 received neoadjuvant chemotherapy, while the 44 others did not (Fig. 2). Some discriminant metabolites were highlighted using the Mann-Whitney U test. Aspartate ($p = 0.0017$) was statistically significant between PA samples from patients who received neoadjuvant chemotherapy and those who did not (Table 3). As shown in Fig. 5, the network analysis revealed a decreased level of lactate, which was predicted in PA samples from patients with neoadjuvant chemotherapy. Moreover, a higher level of ethanolamine, tyrosine, phenylalanine, aspartate, glucose, glycerol, succinate, glycine, glutamate, glutamine and creatine was predicted in PA tissue samples from patients with neoadjuvant chemotherapy. Finally, the other metabolites were predicted to be equivalent between the two groups.

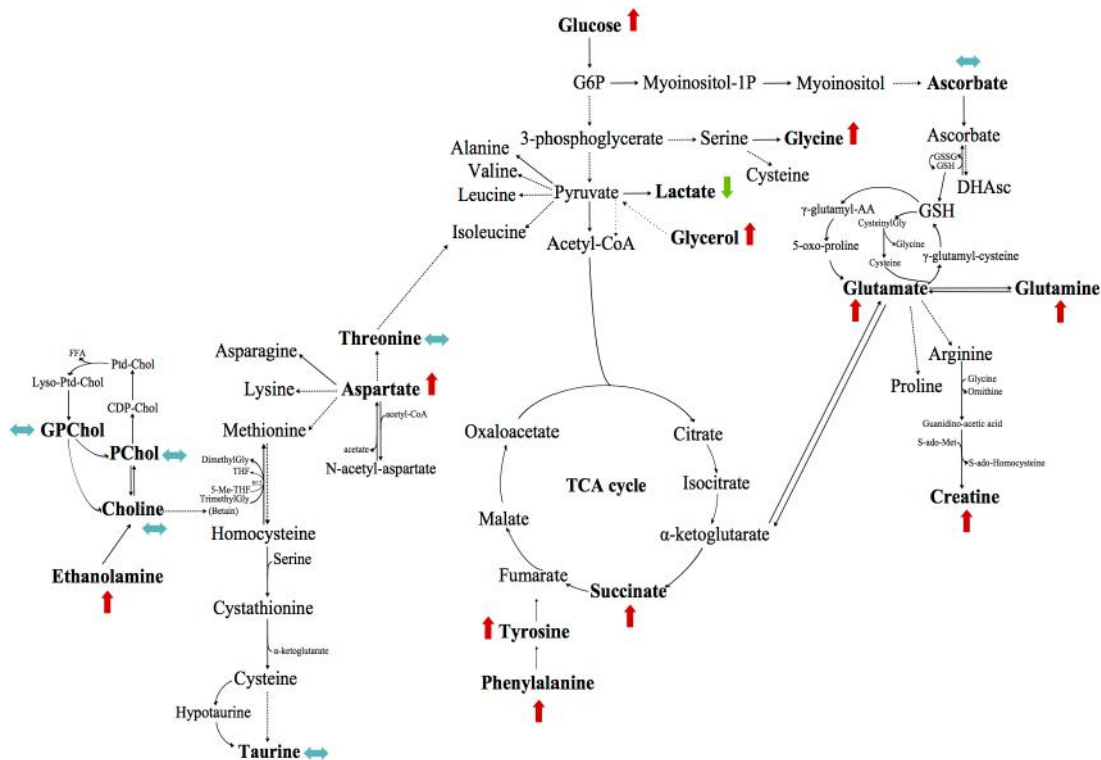


Figure 5 Impact of neoadjuvant chemotherapy on pancreatic adenocarcinoma (PA). PA with neoadjuvant chemotherapy-related samples ($n = 62$) were compared to PA without neoadjuvant chemotherapy ($n = 44$). Metabolic network analysis according to ADEMA results. The red, green and blue arrows respectively indicate the metabolites that are predicted to increase, decrease or remain stable, in PA with neoadjuvant chemotherapy-related samples.

For some of these analyses, the Mann-Whitney U test did not yield any significant differences, whereas ADEMA reports some changes for those metabolites. So, ADEMA appears more effective as it compares different groups of metabolites, uses mutual information and does not require a large population of samples.

Long-term vs. short term survival in patients with PA

Patients' characteristics are described in *Table 5*. The representative 1D HRMAS NMR CPMG spectra of long-term and short-term survivors are shown respectively in *Fig. 6A* and *Fig. 6B*.

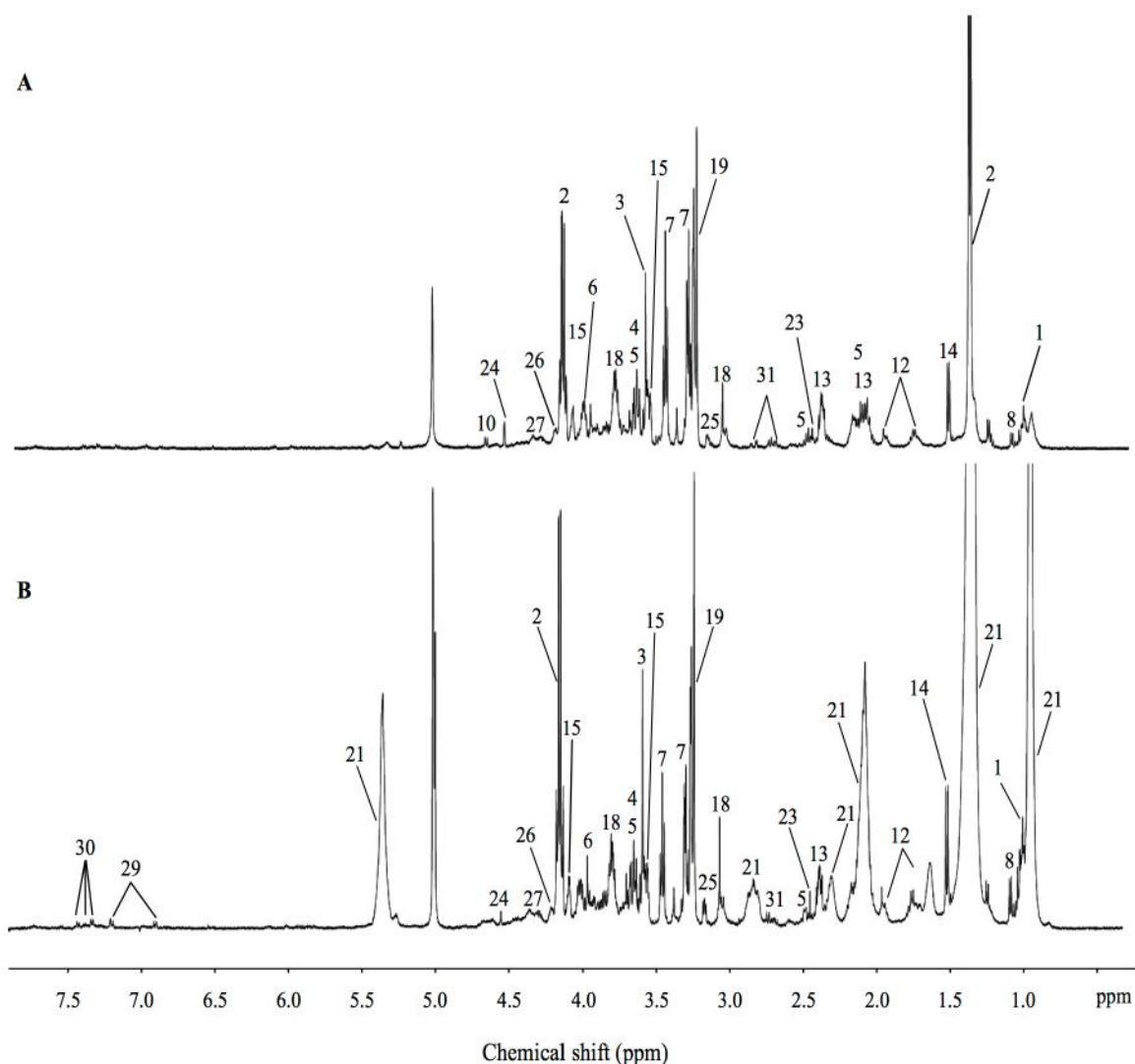


Figure 6 HRMAS NMR spectra of long-term and short-term survivors. (A) PA with long-term survival ($n = 8$); (B) PA with short-term survival ($n = 9$).

The spectra metabolic contents are directly comparable because of the intensity of each spectrum was normalized in respect to the weight of the analyzed sample. For display purposes, the amplitude of, the choline peak at 3.23 ppm, the fatty acids peak at 1.30 ppm and the lactate peak at 1.33 ppm, was graphically shortened. Metabolites' assignments are given in **Table 1**.

Seventeen samples were studied: 8 long-term survivors and 9 short-term survivors (both without any neoadjuvant chemotherapy). Some discriminant metabolites were highlighted using the Mann-Whitney U test. Choline ($p = 0.0150$), ethanolamine ($p = 0.0078$), lactate ($p = 0.0360$), and phenylalanine ($p = 0.0055$), were statistically significant between long-term and short-term survival in patients with PA

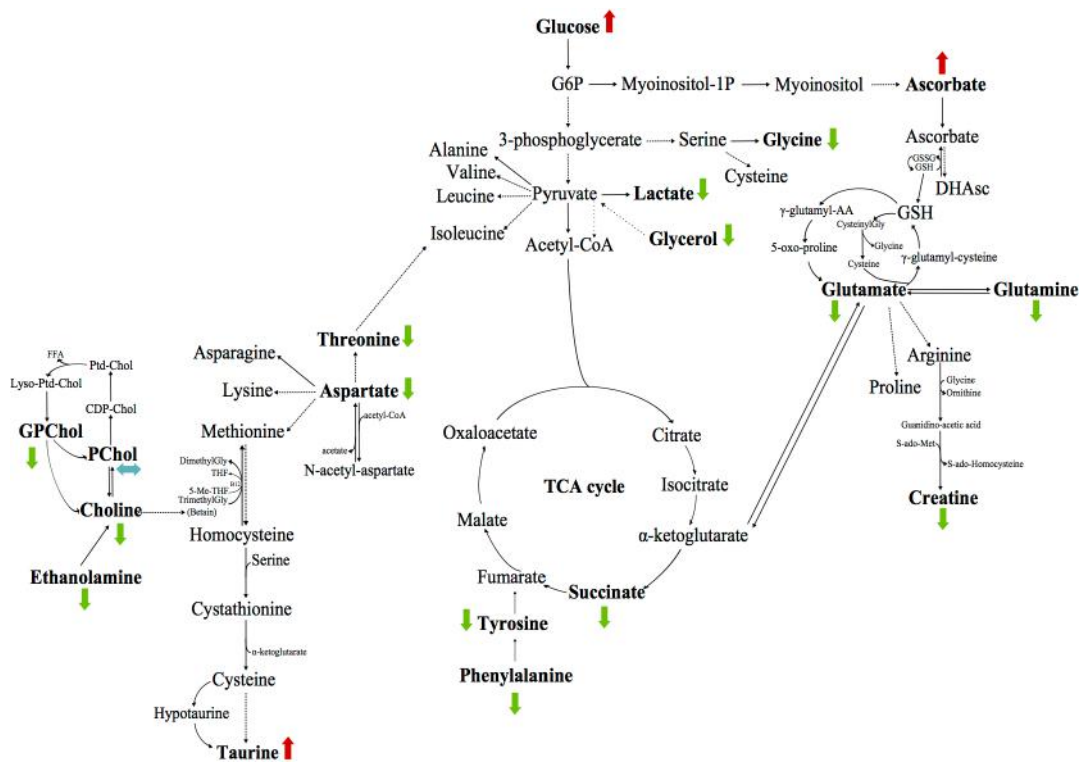


Figure 7 Metabolic network analysis enables pancreatic adenocarcinoma (PA) prognostication. Long-term survival-related samples ($n = 8$) were compared to short-term survival patients ($n = 9$) according to ADEMA results. No neoadjuvant chemotherapy was used. The red, green and blue arrows respectively indicate the metabolites that are predicted to increase, decrease or remain stable, in long-term survivors.

The network analysis showed a higher level of glucose, ascorbate and taurine, which was predicted in long-term survivors. Moreover, a decreased level of choline, ethanolamine, glycerophosphocholine, phenylalanine, tyrosine, aspartate, threonine, succinate, glycerol, lactate, glycine, glutamate, glutamine and creatine was predicted in long-term survivors. Finally, phosphorylcholine was predicted to be equivalent between the two groups (Fig. 7).

Survival analysis

When long/short term survival patients were compared, only the use of ethanolamine as a single screening test showed a higher accuracy in distinguishing long-term from short-term survivors. As shown in Fig. 8, samples with a decreased level of ethanolamine had a high probability of

being assigned to long-term survivors. All the patients showing a low level of ethanolamine were long-term survival patients. The Area Under Curve (AUC) was 0.861 +/- 0.101.

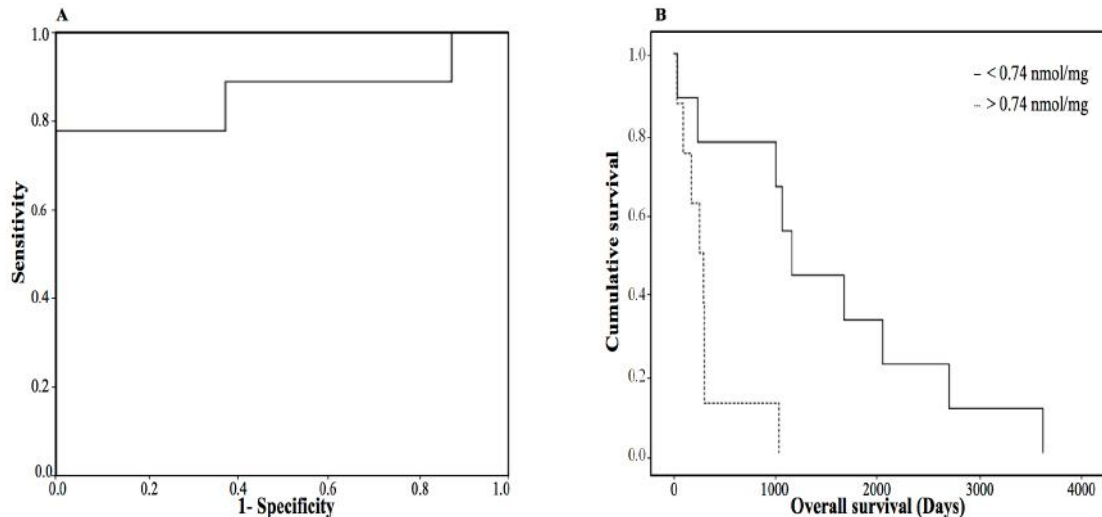


Figure 8 Ethanolamine concentration as a single metabolic biomarker predicting the overall survival in patients with PA. (A) ROC and (B) Kaplan Meier curves obtained from the analysis of ethanolamine concentrations for the diagnosis of long-term survival in patients with PA. The Area Under Curve (AUC) was 0.861 +/- 0.101, the threshold value was 0.740 nmol.mg⁻¹, sensitivity and specificity were respectively equal to 77.80 % and 75.00 %. The Kaplan-Meier curve shows differences between long-term and short-term survival patients. The P value was 0.005 and was for the log-rank test.

The optimal ethanolamine threshold was 0.740 nmol.mg⁻¹ when distinguishing long-term from short-term survivors. With this threshold point, sensitivity and specificity were respectively 77.80% and 75.00% (Fig. 8A). The predictive positive value was 47.00% and the negative predictive value was 52.90 %. Kaplan-Meier analysis showed that the overall survival probabilities were significantly higher in patients with low tumors-ethanolamine values compared to those with high tumors-ethanolamine concentrations (Fig. 8B).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study that has evaluated the metabolome of PP's intact tissues and PA's intact tissues.

Preoperative assessment of resectability of PA is not yet an adequate way of predicting survival. However given morbi-mortality of CDP, better evaluation of the balance between risks and benefits is a complex quest. Indeed, serum markers such as carcinoembryonic antigen (CEA) or carbohydrate antigen (CA 19.9) are poorly correlated to long term results and should not be used for contraindicating the only potentially curative treatment of this often fatal disease. Up to now only histological parameters have enabled surgeons to retrospectively evaluate the potential benefit of CDP, but these parameters are available only after surgery. Moreover none of these parameters is really specific for predicting the necessity of pancreatic resection. In order to evaluate the benefit of pancreatic resection, long-surviving patients were compared to short-term survivors. Of note, among the long-term survivors, 2 of them showed an infra-millimetric margin and 3 had histological invasion of the portal vein (*Table 5*). Thus the use of currently described predictive factors should not lead to contraindicating resection in patients that can otherwise tolerate surgery. The use of a more specific marker tightly linked to the pathophysiology of pancreatic cancer would be of particular interest.

HRMAS NMR provides new insights into the relationships between metabolic pathways and pancreatic cancers. This method allows for the identification of cell membranes and phospholipid metabolism, cellular energy production via neoglucogenesis, tricarboxylic acid (TCA) cycle and oxidative stress. The majority of PA have KRAS mutation (90% with activating mutations in this oncogene) (29-31).

Our results about PP's metabolome show a higher level of lactate, glucose, phosphorylcholine, taurine, aspartate, lactate, glutamine and succinate in patients who received some neoadjuvant chemotherapy. Mutations in TCA cycle enzymes are known to promote cancer development and growth. For example, mutations in succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase

(FH) and isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1, IDH2) can be cited (32,33). Moreover, these mutations have been associated with distinct cancer subsets and different patient prognoses (34,35). Mutations in TCA cycle enzymes have also been associated with measurable changes in the levels of metabolites. Nevertheless, these mutations have not been a major feature of PA. Reprogrammed cellular metabolism has increasingly become an obvious field of research for PA. Research has also focused on the alterations that involve the TCA cycle and mutant KRAS-induced tumor cell dependencies for glucose, glutamine, and extracellular protein.

Our results about PA's metabolome show a higher level of lactate in patients who did not receive any neoadjuvant chemotherapy. Elevated expression of lactate dehydrogenase A (LDHA) is highlighted in breast and colorectal cancers (36,37). This has been recently identified in pancreatic cancers (38). Some studies have already shown the different steps where LDHA is involved (tumor initiation, maintenance and progression) (39,40). Given the elevated glycolysis in PA, leading to increased lactate production, the ability to utilize lactate could provide an additional advantage to PA cells (1). Indeed, the inhibition of glycolysis through suppressing LDHA expression by RNA interference decreased the growth of PA cells (41). A decreased level of glucose has also been shown in PA without neoadjuvant chemotherapy. As described in the work of Koong et al. (42) and Guillaumont et al. (43), areas within PA tumors are hypoxic which has implications on the cellular metabolism. Hypoxia promotes tumor growth by particularly stimulating glycolysis.

Our results about PA's metabolome in short-term survivors are in accordance with other studies that found a higher level of choline in several cancers. The role of choline kinase α (Chk- α) in malignant transformation and progression in several cancers has been well described in literature. Increased levels and activity of Chk- α have been observed in human breast (44), colorectal (45), lung (45,46), prostate (45), ovarian cancers (47) and more recently in endometrial (48) and pancreatic cancers (49). Moreover, a decreased amount of succinate was

shown by the network analysis in long-term survivors compared to short-term survivors, suggesting a decreased activity of the TCA cycle. PA from long-term survivors also show decreased levels of threonine, aspartate, glycerol, glutamate and glutamine compared to those from short-term survivors. Glutamine has been particularly studied for its role in cancer metabolism because it appears to be required for the growth of many types of tumors (50). Decreased levels of creatine and lactate were shown in long-term survival patients too. Other studies showed the relationship between a lower level of creatine, lactate, choline and the overall survival (51). Understanding the different metabolic links within pancreatic cancer is a promising approach to identifying novel prognostic markers (long-term survival) and therapeutic programs in patients' care (1).

Short-term survivors showed higher levels of choline, glycerophosphocholine, ethanolamine and fatty acids as depicted in *Fig. 6B* (respectively numbers 19, 25 and 21-22). Fatty acids are a major factor in the growth of tumor cell. Some explorations have begun in order to study the PA metabolism and more precisely the role of individual complex fatty-acids. Indeed, as detailed in the work of Guo et al (52) and Zadra et al (53) fatty acids can be both pro-tumorigenic and anti-tumorigenic, as described in various cancers, making their biology difficult to explain. Reducing the levels of certain fatty acids seems to be important for PA. But, we have to determine first which fatty acids are cytotoxic for tumor cells and which fatty acids provide the tumor with metabolic substrates (1). Focusing on ethanolamine, the survival analysis showed that survival was longer for patients with lower tumoral ethanolamine concentration. The assessment of ethanolamine concentration can be clinically relevant as a single metabolic biomarker for distinguishing long-term survivors from short-term survivors in patients with PA.

The current study demonstrates that metabolomics profiling may provide prognostic information in patients with pancreatic cancer. Whereas research usually focuses on enzymatic

steps within the TCA cycle as its potentially influences the progression of disease as well as on the alterations of the phospholipid metabolism within the choline/ethanolamine membrane.

Only very few patients are needed to build a model that can predict oncological outcome in pancreatic cancer very accurately; this very fact should help promoting our technique. We acknowledge that a comparative-effectiveness study should be performed in real-time in order to evaluate usual serum markers versus HRMAS NMR spectroscopy before drawing any definitive conclusions. This study was retrospective and may involve some bias that could have been unaccounted for.

Metabolomics analysis could be validated as an intra-operative discriminant method for distinguishing healthy tissues from PA tissues. This could deepen our knowledge of PA metabolism and may also lead to the identification of new targets for diagnosis, imaging or future therapeutic options. If these results are confirmed in further studies, it is expected that the role of Intra Operative HRMAS NMR spectroscopy could then be evaluated in the setting of PA. This approach we called “metabolomics-guided surgery” could help surgeons to extend the excision if necessary. Since HRMAS NMR spectroscopy enables rapid characterization of intact tissue, it could also be used as an intraoperative method. HRMAS analysis only takes 20 min. Data analysis is also very quick (< 10 min). Furthermore, the cost is < \$50 per sample.

In conclusion, as we are able to distinguish PP from PA, we could imagine using this technique for analyzing several samples collected from the excision cavity in addition to tissue tumor samples. This last step could help surgeons for the detection of residual tumor cells in the excision cavity and the control of margins. This approach could be used in clinical routine for prediction of long-term survival in patients with PA. Indeed, this information can be obtained in 20 min during surgery. Finally, due to the high morbi-mortality during surgery, we could also imagine using this technique before surgery, with the use of endoscopic or percutaneous biopsy. This could have a positive impact on patients' care.

Abbreviations

CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill

HRMAS: high resolution magic angle spinning

NMR: nuclear magnetic resonance

CDP: cephalic duodeno-pancreatectomy

PCA: principal component analysis

OPLS-DA: orthogonal partial least square-discriminant analysis

PA: pancreatic ductal adenocarcinoma

PP: pancreatic parenchyma

Ethics approval and consent to participate

A written informed consent was obtained from all the included patients. For this investigation, the tissue samples were obtained from the Tumor Bio-bank (Centre de Ressources Biologiques) of the Strasbourg University Hospitals.

Consent for publication

A written informed consent was obtained from all the included patients. For this investigation, the tissue samples were obtained from the Tumor Bio-bank (Centre de Ressources Biologiques) of the Strasbourg University Hospitals.

Availability of data and material

Not applicable

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Funding

Not applicable.

Authors' contributions

SB: writer, tissue's sample preparation; HRMAS-NMR data acquisition, spectra analysis, statistical analysis, **FF**: writer, patient surgical management; **AI**: manuscript review; **AEC**: network analysis; **CH**: statistical analyses; **GA**: histopathological analysis; **PB**: patient surgical management, manuscript review; **IJN**: experimental design, data analysis, manuscript review.

All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The laboratory staff of the Tumor Bio-bank (Centre de Ressources Biologiques) of the Strasbourg University Hospitals are gratefully acknowledged for his technical assistance.

REFERENCES

- 1 Sousa CM, Kimmelman AC. The complex landscape of pancreatic cancer metabolism. *Carcinogenesis*. 2014;35:1441-1450.
- 2 National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Factsheets: Pancreas Cancer. National Cancer Institute Bethesda, MD. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>. [accessed 13 May 2016].
- 3 Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011;378:607-620.
- 4 Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2004; 363:1049-1057.
- 5 McMillan MT, Christein JD, Callery MP, Behrman SW, Drebin JA, Hollis RH et al. Comparing the burden of pancreatic fistulas after pancreatoduodenectomy and distalpancreatectomy. *Surgery*. 2016;159:1013-1022.
- 6 Vollmer CM Jr, Lewis Rs, Hall BL, Allendorf JD, Beane JD, Behrman SW et al. Establishing a quantitative benchmark for morbidity in pancreatoduodenectomy. *Ann Surg*. 2015;261:527-536.
- 7 Jang JY, Kang MJ, Heo JS, Choi SH, Choi DW, Park SJ et al. A prospective randomized controlled study comparing outcomes of standard resection and extended resection, including dissection of the nerve plexus and various lymph nodes, in patients with pancreatic head cancer. *Ann Surg*. 2014;259:656-664.
- 8 Pedrazzoli S, DiCarlo V, Dionigi R, Mosca F, Pederzoli P, Pasquali C et al. Standard versus extended lymphadenectomy associated with pancreatoduodenectomy in the surgical treatment of adenocarcinoma of the head of the pancreas: a multicenter, prospective, randomized study. Lymphadenectomy Study Group. *Ann Surg*. 1998;228:508-517.
- 9 Andersson R, Vagianos CE, Williamson RCN. Preoperative staging and evaluation of resectability in pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB(Oxford)*. 2004;6:5-12.
- 10 Wang F, Gill AJ, Neale M, Puttaswamy V, Ganadha S, Pavlakis N et al. Adverse tumor biology associated with mesenterico-portal vein resection influences survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21:1937-1947.

- 11 Schnelldorfer T, Ware AL, Sarr MG, Smyrk TC, Zhang L, Qin R et al. Long-term survival after pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: is cure possible? *Ann Surg.* 2008;247:456-462.
- 12 Yekebas EF, Bogoevski D, Cataldegirmen G, Kunze C, Marx A, Vashist YK et al. En bloc vascular resection for locally advanced pancreatic malignancies infiltrating major blood vessels: perioperative outcome and long-term survival in 136 patients. *Ann Surg.* 2008;247:300-309.
- 13 Delperro JR, Bachellier P, Regenet N, Le Treut YP, Paye F, Carrere N et al. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: a French multicentre prospective evaluation of resection margin in 150 evaluable specimens. *HPB (Oxford).* 2014;16:20-33.
- 14 Vuarnesson H, Lupinacci RM, Semoun O, Svrcek M, Julié C, Balladur P et al. Number of examined lymph nodes and nodal status assessment in pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2013;39:1116-1121.
- 15 Ritchie SA, Akita H, Takemasa I, Eguchi H, Pastural E, Nagano H. Metabolic system alterations in pancreatic cancer patient serum: potential for early detection. *BMC Cancer* 2013;13:416.
- 16 Urayama S. Pancreatic cancer early detection: expanding higher-risk group with clinical and metabolomics parameters. *World J Gastroenterol.* 2015;21:1707-1717.
- 17 Zyromski NJ, Mathur A, Gowda GA, Murphy C, Swartz-Basile D, Wade T et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolomics of the fatty pancreas: implicating fat in pancreatic pathology. *Pancreatology.* 2009;9:410-419.
- 18 LaConti JJ, Laiakis EC, Mays AD, Peran I, Kim SE, Shay JW et al. Distinct serum metabolomics profiles associated with malignant progression in the KrasG12D mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Genomics.* 2015;16:Suppl 1:S1.
- 19 Zhang G, He P, Tan H, Budhu A, Gaedcke J, Ghadimi BM et al. Integration of metabolomics and transcriptomics revealed a fatty acid network exerting growth inhibitory effects in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19:4983-4993.

- 20 He XH, Li WT, Gu YJ, Yang Bf, Deng Hw, Yu Yh et al. Metabonomic studies of pancreatic cancer response to radiotherapy in a mouse xenograft model using magnetic resonance spectroscopy and principal components analysis. *World J Gastroenterol.* 2013;19:4200-4208.
- 21 Marengo E, Robotti E. Biomarkers for pancreatic cancer: recent achievements in proteomics and genomics through classical and multivariate statistical methods. *World J Gastroenterol.* 2014;20:13325-13342.
- 22 Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D801-D807.
- 23 Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh FM, Reix N, Piotto M, Bellocq JP et al. Metabolomic profile of the adrenal gland: from physiology to pathological. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20:705-716.
- 24 R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2016. Retrieved from <http://www.R-project.org>.
- 25 Cicek A.E, Bederman I, Henderson L, Drumm ML, Ozsoyoglu G. ADEMA: an algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information. *PLoS Comput Biol.* 2013;9:e1002859.
- 26 Kanehisa M and Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:27-30.
- 27 Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D199-205.
- 28 Selway ZZ. *Metabolism at A Glance.* 3rd ed. Malden (MI): Blackwell Publishing; 2014.
- 29 Almoquera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* 1988;53:549-554.
- 30 Uemura T, Hibi K, Kaneko T, Takeda S, Inoue S, Okochi O et al. Detection of K-ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients. *J Gastroenterol.* 2004;39:56-60.

- 31 Löhner M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 2005;1:17-23.
- 32 Desideri E, Vegliante R, Cririolo MR. Mitochondrial dysfunctions in cancer: genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity. *Cancer Lett*. 2015;356:217-223.
- 33 Morin A, Letouze E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer*. 2014;135:2237-2248.
- 34 Srinivasan R, Ricketts CJ, Sourbier C, Linehan WM et al. New strategies in renal cell carcinoma: targeting the genetic and metabolic basis of disease. *Clin Cancer Res*. 2015;21:10-17.
- 35 Hai Y, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed A, Yuan W et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360:765-773.
- 36 Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A et al. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10:R84.
- 37 Sanchez-Tena S, Alcarraz-Vizan G, Marin S, Torres JL, Cascante M. Epicatechin gallate impairs colon cancer cell metabolic productivity. *J Agric Food Chem*. 2013;61:4310-4317.
- 38 Lu QY, Zhang L, Yee JK, Go VL, Lee WN. Metabolic consequences of LDHA inhibition by epigallocatechin gallate and oxamate in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Metabolomics*. 2015;11:71-80.
- 39 Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:2037-2042.
- 40 Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer cells*. 2006;9:425-434.

- 41 Zhao D, Zou SW, Liu Y, Zhou X, Mo Y, Wang P et al. Lysine-5 acetylation negatively regulates lactate dehydrogenase A and is decreased in pancreatic cancer. *Cancer cell*. 2006;23:464-476.
- 42 Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM et al. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48:919-922.
- 43 Guillaumont F, Leca J, Olivares O, Lavaut MN, Vidal N, Berthezene P et al. Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:3919-3924.
- 44 Ramirez de Molina A, Gutierrez R, Ramos MA, Silva JM, Bonilla F, Sanchez JJ et al. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene*. 2002;21:4317-4322.
- 45 Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Gutierrez R, Martinez-Pineiro L, Sanchez J, Bonilla F et al. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296:580-583.
- 46 Ramirez de Molina A, Sarmentero-estrada J, Belda-Iniesta C, Taron M, Ramirez de Molina V, Cejas P et al. Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol*. 2007;8:889-897.
- 47 Iorio E, Mezzanzanica D, Alberti P, Spadaro F, Ramoni C, D'Ascenzo S et al. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res*. 2005;65:9369-9376.
- 48 Trousil S, Lee P, Pinato DJ, Ellis JK, Dina R, Aboagye EO et al. Alterations of choline phospholipid metabolism in endometrial cancer are caused by choline kinase alpha overexpression and a hyperactivated deacylation pathway. *Cancer Res*. 2014;74:6867-6877.
- 49 Penet MF, Shah T, Bharti S, Krishnamachary B, Artemov D, Mironchik Y et al. Metabolic imaging of pancreatic ductal adenocarcinoma detects altered choline metabolism. *Clin Cancer Res*. 2015;21:386-395.

- 50 Wise Dr, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2010;35:427-433.
- 51 Yokota H, Guo J, Matoba M, Higashi K, Tonami H, Nagao Y. Lactate, choline, and creatine levels measured by *in vitro* ¹H-MRS as prognostic parameters in patients with non-small-cell lung cancer. *J Magn Reson Imaging.* 2007;25:992-999.
- 52 Guo JY, Karsil-Uzunbas G, Mathew R, Aisner SC, Khamphorst JJ, Strhecker AM et al. Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev.* 2013;27:1447-1461.
- 53 Zadra G, Photopoulos C, Loda M. The fat side of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831:1518-1532.

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1. HRMAS NMR spectra of pancreatic healthy tissue (PP). (A) PP without neoadjuvant chemotherapy (n = 9), (B) PP with neoadjuvant chemotherapy (n = 8).

The spectra metabolic contents are directly comparable because of the intensity of each spectrum was normalized in respect to the weight of the analyzed sample. For display purposes, the amplitude of the choline peak at 3.23 ppm, the glycine peak at 3.56 ppm and the lactate peak at 1.33 ppm, was graphically shortened. Metabolites' assignments are given in **Table1**.

Figure 2. HRMAS NMR spectra of pancreatic adenocarcinoma (PA). (A) PA without neoadjuvant chemotherapy (n = 44), (B) PA with neoadjuvant chemotherapy (n = 62).

The spectra metabolic contents are directly comparable because of the intensity of each spectrum was normalized in respect to the weight of the analyzed sample. For display purposes, the amplitude of the lactate peak at 1.33 ppm was graphically shortened. Metabolites' assignments are given in **Table1**.

Figure 3. OPLS-DA comparing pancreatic adenocarcinoma (PA) with pancreatic healthy tissue (PP). A two-class model including 53 samples without neoadjuvant chemotherapy: 9 samples of PP and 44 of PA. A clear distinction between the different classes of tissues is shown in this model ($R^2Y = 0.79$; $Q^2 = 0.62$).

Figure 4. Impact of neoadjuvant chemotherapy on healthy tissue (PP). PP with neoadjuvant chemotherapy-related samples (n = 8) were compared to PP with no neoadjuvant chemotherapy (n = 9). Metabolic network analysis according to ADEMA results. The red, green and blue arrows respectively indicate the metabolites that are predicted to increase, decrease or remain stable, in the population who received neoadjuvant chemotherapy.

Figure 5. Impact of neoadjuvant chemotherapy on pancreatic adenocarcinoma (PA). PA with neoadjuvant chemotherapy-related samples (n = 62) were compared to PA without neoadjuvant chemotherapy (n = 44). Metabolic network analysis according to ADEMA results. The red, green and blue arrows respectively indicate the metabolites that are predicted to increase, decrease or remain stable, in PA with neoadjuvant chemotherapy-related samples.

Figure 6. HRMAS NMR spectra of long-term and short-term survivors. (A) PA with long-term survival (n = 8); (B) PA with short-term survival (n = 9).

The spectra metabolic contents are directly comparable because of the intensity of each spectrum was normalized in respect to the weight of the analyzed sample. For display purposes, the amplitude of, the choline peak at 3.23 ppm, the fatty acids peak at 1.30 ppm and the lactate peak at 1.33 ppm, was graphically shortened. Metabolites' assignments are given in **Table1**.

Figure 7. Metabolic network analysis enables pancreatic adenocarcinoma (PA) prognostication. Long-term survival-related samples (n = 8) were compared to short-term survival patients (n = 9) according to ADEMA results. No neoadjuvant chemotherapy was used. The red, green and blue arrows respectively indicate the metabolites that are predicted to increase, decrease or remain stable, in long-term survivors.

Figure 8. Ethanolamine concentration as a single metabolic biomarker predicting the overall survival in patients with PA. (A) ROC and (B) Kaplan Meier curves obtained from the analysis of ethanolamine concentrations for the diagnosis of long-term survival in patients with PA. The Area Under Curve (AUC) was 0.861 +/- 0.101, the threshold value was 0.740 nmol.mg⁻¹, sensitivity and specificity were respectively equal to 77.80 % and 75.00 %. The

Kaplan-Meier curve shows differences between long-term and short-term survival patients. The P value was 0.005 and was for the log-rank test.

Table 1. NMR resonance assignments of the metabolites identified in samples of pancreatic intact tissues. Each peak in the 2D spectra represents a correlation $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature (22).

Table 2. Impact of neoadjuvant chemotherapy on healthy tissue (PP). Results of the Mann-Whitney's U test. Metabolite differences between PP without neoadjuvant chemotherapy and PP with neoadjuvant chemotherapy (univariate analysis, nonparametric test).

Table 3. Impact of neoadjuvant chemotherapy on pancreatic adenocarcinoma (PA). Results of the Mann-Whitney's U test. Metabolite differences between PA without neoadjuvant chemotherapy and PA with neoadjuvant chemotherapy (univariate analysis, nonparametric test).

Table 4. Metabolite differences according to survival rate. Results of the Mann-Whitney's U test (univariate analysis, nonparametric test). No neoadjuvant chemotherapy. LongSurv, long-term survivors; ShortSurv, short-term survivors.

Table 5. Patients' characteristics. Seventeen samples from seventeen patients suffering from PA: 8 patients were classified as long-term survival patients (>3 years), while the 9 others had a short-term survival (<1 year). LongSurv, long-term survival patients; ShortSurv, short-term survival patients. T and N describing the TNM. T, tumor; N, lymph nodes; differ, differentiation; W, well-differentiated; P, poorly differentiated; M, moderately differentiated; coll, colloid; vasc invas, vascular invasion.

Table 1. NMR resonance assignments of the metabolites identified in samples of pancreatic intact tissues

Metabolite	Group	¹ H chemical shift (ppm)	¹³ C chemical shift (ppm)
1 Leucine	δCH ₃	0.95	23.43
	δ'CH ₃	0.95	24.75
2 Lactate	CH ₃	1.33	22.69
	CH	4.13	71.22
3 Glycine	CH	3.56	44.05
4 Glycerol	CH ₂ -OH (d 2X)	3.55	65.03
	CH ₂ -OH (u 2X)	3.64	65.07
	CH-OH	3.77	74.69
5 Glutamine	αCH ₂	3.77	57.23
	γCH ₂	3.44	33.52
6 Serine	γCH ₂	3.97	62.90
7 Taurine	CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.27	50.01
	CH ₂ -SO ₃ ⁻	3.43	37.93
8 Valine	γ'CH ₃	1.04	20.44
	αCH-NH ₂	3.60	63.05
9 Arginine	γCH ₂	1.65	25.90
	βCH	1.92	30.13
	δCH ₂	3.22	43.23
10 β-Glucose	C6H(d)	3.89	63.48
	C1H	4.65	98.70
11 α-Glucose	CH ₂	3.83	62.08
	C1H	5.22	94.94
12 Lysine	δCH ₂	1.73	29.17
	βCH ₂	1.90	32.48
	γCH ₂ (d)	1.91	30.25
13 Glutamic acid	βCH ₂	2.08	29.67
	γCH ₂	2.35	35.96
14 Alanine	βCH ₃	1.48	18.87

15	Myo-Inositol	C1H, C3H	3.54	73.81
		C4H, C6H	3.63	75.11
		C2H	4.05	74.79
16	Ornithine	α CH-NH ₂	3.77	57.05
		δ CH ₂ -NH ₂	3.05	41.83
		β -CH ₂	1.93	30.28
		γ -CH ₂	1.74	25.52
17	3-Hydroxybutyric acid	CH ₃	1.20	24.30
18	Creatine	CH ₂	3.93	56.23
19	Choline	N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.23	56.48
20	Fatty acids (a)	(1)CH ₂	1.30	32.16
21	Fatty acids (b)	CH ₂	2.80	28.50
22	Fatty acids (c)	(1)CH ₂	2.26	36.60
23	Succinic acid	(α , β CH ₂)	2.39	34.00
24	Ascorbate	C ₄ H	4.52	80.87
25	Ethanolamine	CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.13	43.90
26	Phosphorylcholine	CH ₂ -O	4.11	63.60
		CH ₃	3.22	56.57
27	Threonine	β CH	4.25	68.50
28	Glycerophosphocholine	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.21	56.56
		β CH ₂	3.72	68.49
		α CH ₂	4.33	62.16
		CH ₂ OH	3.93	73.32
		CH ₂ -HPO ₄ (d)	3.89	69.22
29	Tyrosine	para CH	6.88	118.44
		ortho CH	7.18	133.30
		β CH ₂ (d)	3.02	39.40
30	Phenylalanine	ortho CH	7.31	131.91
		para CH	7.36	132.28
		meta CH	7.42	131.59
31	Aspartic acid	β CH ₂ (d)	2.63	40.20
		β CH ₂ (u)	2.81	40.82

|

Each peak in the 2D spectra represents a correlation $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables available in the literature (22)

Table 2. Impact of neoadjuvant chemotherapy on healthy tissue (PP)

Metabolite	Neoadjuvant- chemotherapy	Mean (nmol/mg)	Std. deviation (nmol/mg)	p-value
Ascorbate	No	0.3488	0.2191	0.6730
	Yes	0.3592	0.1671	
Aspartic acid	No	0.7577	0.3284	0.9626
	Yes	0.6730	0.1776	
Choline	No	1.5580	0.5921	0.7430
	Yes	1.7649	0.7624	
Creatine	No	1.7371	0.9568	0.5414
	Yes	1.7760	0.6579	
Ethanolamine	No	0.9314	0.4502	0.6058
	Yes	1.1115	0.5408	
Glutamate	No	2.9830	0.8698	0.8148
	Yes	2.3800	0.4264	
Glycerol	No	8.1840	7.3988	0.6730
	Yes	8.2990	7.2904	
Glycine	No	6.0920	5.0908	0.5414
	Yes	6.5590	5.7401	
Glycerophosphocholine	No	2.4215	2.6084	0.9626
	Yes	2.2208	2.1689	
Lactate	No	11.0040	2.4733	0.3704
	Yes	9.6770	2.1588	
Phosphorylcholine	No	1.1690	0.6396	0.8148
	Yes	0.9469	0.3644	
Taurine	No	2.9660	1.9594	
	Yes	2.7060	1.3103	

	Yes			0.9626
Threonine	No	1.1202	0.2821	
	Yes	1.1678	0.2801	0.6730
	Yes			
Glutamine	No	0.6855	0.2518	
	Yes	0.5633	0.1466	0.5414
	Yes			
Succinic acid	No	0.3069	0.2121	
	Yes	0.2595	0.1406	0.8884
	Yes			
Glucose	No	1.2247	0.6158	
	Yes	1.0736	0.7355	0.4807
	Yes			
Tyrosine	No	0.0520	0.0442	
	Yes	0.0552	0.0599	0.6058
	Yes			
Phenylalanine	No	0.1449	0.0771	
	Yes	0.1495	0.0880	0.8148
	Yes			

Results of the Mann-Whitney's U test. Metabolite differences between PP without neoadjuvant chemotherapy and PP with neoadjuvant chemotherapy (univariate analysis, nonparametric test)

Table 3. Impact of neoadjuvant chemotherapy on pancreatic adenocarcinoma (PA)

Metabolite	Neoadjuvant chemotherapy	Mean (nmol/mg)	Std. deviation (nmol/mg)	p-value
Ascorbate	No	0.3988	0.2221	0.6648
	Yes	0.4062	0.2227	
Aspartic acid	No	0.6229	0.2255	0.0017
	Yes	0.9658	0.6074	
Choline	No	0.8849	0.3887	0.6600
	Yes	0.9539	0.4702	
Creatine	No	1.3561	0.5057	0.4285
	Yes	1.4464	0.5971	
Ethanolamine	No	0.6148	0.2620	0.1958
	Yes	0.7511	0.4177	
Glutamate	No	2.4650	0.7699	0.0908
	Yes	2.8070	0.9767	
Glycerol	No	2.7550	1.1994	0.1339
	Yes	3.5300	2.6914	
Glycine	No	2.2663	0.8577	0.1265
	Yes	2.9025	1.8798	
Glycerophosphocholine	No	1.0319	0.5029	0.7421
	Yes	1.0810	0.7982	
Lactate	No	16.1370	4.7272	0.7969
	Yes	15.9030	5.3324	
Phosphorylcholine	No	0.9764	0.5008	0.9092
	Yes	0.9518	0.4822	

	Yes			
Taurine	No	4.4630	1.4062	
	Yes	4.3490	1.3425	0.8886
Threonine	No	1.1931	0.4229	
	Yes	1.2957	0.6961	0.6273
Glutamine	No	0.6394	0.2272	
	Yes	0.6870	0.2668	0.5864
Succinic acid	No	0.1762	0.0763	
	Yes	0.1866	0.0739	0.4400
Glucose	No	1.3141	1.1020	
	Yes	2.3227	2.7375	0.0813
Tyrosine	No	0.0730	0.0493	
	Yes	0.1097	0.1479	0.3140
Phenylalanine	No	0.1789	0.0811	
	Yes	0.1097	0.1958	0.1622

Results of the Mann-Whitney's U test. Metabolite differences between PA without neoadjuvant chemotherapy and PA with neoadjuvant chemotherapy (univariate analysis, nonparametric test).

Table 4. Metabolite differences according to survival rate

Metabolite	No Neoadjuvant chemotherapy	Mean (nmol/mg)	Std. deviation (nmol/mg)	p-value
Ascorbate	LongSurv	0.3897	0.2403	0.5414
	ShortSurv	0.3002	0.1524	
Aspartic acid	LongSurv	0.6019	0.2730	0.7430
	ShortSurv	0.6098	0.2343	
Choline	LongSurv	0.6787	0.2231	0.0150
	ShortSurv	1.0443	0.2985	
Creatine	LongSurv	1.0755	0.2421	0.2766
	ShortSurv	1.4130	0.5110	
Ethanolamine	LongSurv	0.4781	0.1790	0.0078
	ShortSurv	0.8231	0.2450	
Glutamate	LongSurv	2.2060	0.7227	0.2766
	ShortSurv	2.5220	0.5562	
Glycerol	LongSurv	2.7580	1.2039	0.6730
	ShortSurv	3.1170	1.4576	
Glycine	LongSurv	1.8810	0.7959	0.2359
	ShortSurv	2.4580	0.9537	
Glycerophosphocholine	LongSurv	0.8421	0.3262	0.7430
	ShortSurv	1.0964	0.6795	
Lactate	LongSurv	12.9750	2.9930	0.0360
	ShortSurv	16.9700	4.1860	
Phosphorylcholine	LongSurv	0.7452	0.3123	0.6730
	ShortSurv	0.8240	0.2944	

Taurine	LongSurv	4.7320	1.5160	
	ShortSurv	4.0020	1.6747	0.4807
Threonine	LongSurv	0.9846	0.3281	
	ShortSurv	1.1849	0.2640	0.3213
Glutamine	LongSurv	0.5133	0.1734	
	ShortSurv	0.6501	0.2559	0.1672
Succinic acid	LongSurv	0.1338	0.0531	
	ShortSurv	0.2030	0.1074	0.0747
Glucose	LongSurv	1.4845	1.3667	
	ShortSurv	1.0641	0.7318	0.4807
Tyrosine	LongSurv	0.0480	0.0243	
	ShortSurv	0.0846	0.0395	0.0592
Phenylalanine	LongSurv	0.1267	0.0369	
	ShortSurv	0.2027	0.0739	0.0055

Results of the Mann-Whitney's U test (univariate analysis, nonparametric test). No neoadjuvant chemotherapy. LongSurv, long-term survivors; ShortSurv, short-term survivors.

Table 5. Patients' characteristics

	Age	Gender	Tumor size	CEA	CA 19-9	T	N	Margin (mm)	Differ	Vasc invas ^o
LongSurv 1	70	F	50	8	52.3	3	1	2	W	No
LongSurv 2	70	M	25	2.1	20256	3	0	1	M-P	No
LongSurv 3	63	M	35	2	200	4	0	3	M	Vein
LongSurv 4	66	F	50	1.1	1007	3	1	0	W-M	Vein
LongSurv 5	59	M	40			4	1	3	W-M	No
LongSurv 6	76	M	40	1.8	43.2	3	1	2	P	Vein
LongSurv 7	67	F	60	3.6	1626	3	1	3	M	No
Long surv 8	69	F	25	1.4	220.4	3	0	3	M	No
ShortSurv 1	47	M	40		112	3	1	2	P	No
ShortSurv 2	65	M	30	144	97.4	3	1	2	P	No
ShortSurv 3	78	F	30	3.6	250	3	1	2	M	No
ShortSurv 4	72	F	35	2	13	3	1	0	M-P	No
ShortSurv 5	82	F	25		178	3	0	0	W	Vein
ShortSurv 6	49	F	30	2.3	451.5	3	1	1	P	Vein
ShortSurv 7	62	M	70	4.5	293.7	4	1	0	W	Vein
ShortSurv 8	60	M	40	4.2	916	3	1	0	Coll	Vein
ShortSurv 9	61	F	30	4.7	246.4	3	1	0	M	Vein

Seventeen samples from seventeen patients suffering from PA: 8 patients were classified as long-term survival patients (>3 years), while the 9 others had a short-term survival (<1 year). LongSurv, long-term survival patients; ShortSurv, short-term survival patients. T and N describing the TNM. T, tumor; N, lymph nodes; differ, differentiation; W, well-differentiated; P, poorly differentiated; M, moderately differentiated; coll, colloid; vasc invas, vascular invasion.

Métabolomique par spectroscopie RMN HRMAS appliquée à l'hyperparathyroïdie et aux tumeurs pancréatiques

Résumé

La spectroscopie RMN Haute Résolution en Rotation à l'Angle Magique (HRMAS) permet la caractérisation métabolomique tissulaire. Nous avons caractérisé par RMN HRMAS le profil métabolomique des glandes parathyroïdiennes hypersécrétantes. Celui de l'hyperparathyroïdie primaire (HPT1) a été comparé à celui des HPT rénales. Au sein des HPT1, la distinction a pu être faite entre pathologie uni- et multi-glandulaire. Le profil métabolomique du tissu pancréatique sain a été comparé à celui du tissu tumoral. Aussi, les patients longs/courts-survivants ont pu être distingués. La relation entre le phénotype métabolique et la survie des patients a été étudiée. Le profil métabolomique des TIPMP a été caractérisé. Les TIPMP non dégénérées et dégénérées ont été comparées. Le risque de dégénérescence a été corrélé au profil métabolomique. Nos résultats montrent que la spectroscopie RMN HRMAS est une technique prometteuse pour l'étude du profil métabolomique des HPT et des pathologies pancréatiques.

Mots clés : Métabolomique, RMN HRMAS, biomarqueurs, glandes parathyroïdes, pancreas, TIPMP, cancer

HRMAS NMR metabolomics profiling of hyperfunctioning parathyroid glands and pancreatic tumors

Abstract

High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) NMR spectroscopy allows metabolomics profiling of intact tissues. Metabolomics profiling of hyperfunctioning parathyroid glands were characterized by using HRMAS NMR spectroscopy. Primary hyperparathyroidism (PHPT) was compared to renal HPT. Among PHPT, we distinguished single gland disease from multiple gland disease. Pancreatic parenchyma and adenocarcinoma were compared. Thus, long-term and short-term survival patients were distinguished. The relationship between the survival of patients and their metabolic phenotype was studied. Metabolomics profiling of IPMN was also examined. IPMN with no degeneration and degenerated IPMN were compared. Finally, the risk of degeneration was correlated with the metabolomics profile. Our results show that HRMAS NMR spectroscopy is a promising technique in view of studying metabolomic profiling of HPT and pancreatic diseases.

Key words : Metabolomics, HRMAS NMR, biomarkers, parathyroid glands, pancreas, IPMN, cancer

