



**HAL**  
open science

# Apport de l'imagerie multimodale à l'étude de l'angiogenèse et du métabolisme des tumeurs liées aux mutations SDHB

Charlotte Lussey

► **To cite this version:**

Charlotte Lussey. Apport de l'imagerie multimodale à l'étude de l'angiogenèse et du métabolisme des tumeurs liées aux mutations SDHB. Imagerie médicale. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB151 . tel-01721829

**HAL Id: tel-01721829**

**<https://theses.hal.science/tel-01721829>**

Submitted on 2 Mar 2018

**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 PARIS DESCARTES

---

**THÈSE de DOCTORAT**

**pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

**Ecole Doctorale : Médicament, Toxicologie, Chimie et Imagerie**

**Discipline : Imagerie Médicale**

présentée et soutenue publiquement

par **CHARLOTTE LUSSEY**

le 25 Novembre 2015

**APPORT de L'IMAGERIE MULTIMODALE A L'ETUDE DE  
L'ANGIOGENESE ET DU METABOLISME DES TUMEURS LIEES AUX  
MUTATIONS *SDHB***

Composition du Jury :

Pr Pierre-Francois Plouin	Président
Pr Bertrand Tavitian	Directeur de thèse
Dr Judith Favier	membre invité
Pr Daniel Fagret	Rapporteur
Pr Hervé Lefèbvre	Rapporteur
Dr Jean Lumbroso	membre invité



*En premier lieu je tiens à remercier très sincèrement les membres du jury :*

*Le Professeur Pierre-François Plouin, qui m'a tout appris sur les paragangliomes et me fait l'honneur de présider ce jury.*

*Les Professeurs Daniel Fagret et Hervé Lefèbvre d'avoir accepté la lourde charge d'être rapporteurs de cette thèse.*

*Le docteur Jean Lumbroso qui, en plus d'avoir passé une année complète à me transmettre son savoir avec le calme et la délicatesse qui le caractérisent, a accepté avec enthousiasme de juger ce travail.*

*Merci au Pr Anne-Paule Gimenez-Roqueplo de m'avoir chaleureusement accueillie au sein de son équipe et largement conseillée tout au long de ces années.*

*J'ai eu la grande chance d'avoir 2 directeurs de thèse, le Dr Judith Favier et le Pr Bertrand Tavitian. Je les remercie du fond du cœur d'avoir uni leurs forces dans une parfaite entente pour faire en sorte que ce travail collaboratif aboutisse. Merci Bertrand pour ta bienveillance, de m'avoir fait confiance malgré les apparences et d'avoir dit à tout le PARCC que j'étais ta thésarde préférée, même si tu n'en as qu'une ... Merci particulièrement à toi Judith de m'avoir initiée et donné le goût de la recherche, de m'avoir appris à ne jamais baisser les bras, merci pour ta grande humanité et ton optimisme indétrônable.*

*Faire une thèse c'est avant tout prendre du temps et je tiens à remercier très sincèrement le Pr Schlumberger et son équipe (Dr Jean Lumbroso, Dr Sophie Leboulleux, Dr Désiré Déandreis, Dr Elisabeth Poiseau, Dr Eric Baudin) qui ont été les premiers à m'en donner en me laissant une journée par semaine pour venir au laboratoire.*

*Merci à l'ensemble de l'équipe 13 (Luis, Aurélie, Alexandre, Estelle, Maëva et Mélanie) pour leur aide précieuse à la fois au quotidien mais également de s'être mobilisés à chaque fois qu'il a fallu se dépêcher et se dépasser. Un merci supplémentaire à Alexandre pour ses compliments du matin.*

*Un grand merci également à toute l'équipe 2 (Daniel, Gwennhael, Thomas, Joevin, Laetitia, Medhi, Damien, Anikitos) pour leur accueil, leur convivialité, leur soutien et leur expertise avec une dédicace spéciale à Alexandre Bellucci mon compagnon de fortune.*

*Je remercie affectueusement l'ensemble du service de radiologie de l'HEGP sans qui rien n'aurait été possible : Benjamin, Sébastien, Marion QPP, Régine, Christelle et Fabienne mais aussi bien sur les Pr Philippe Halimi et Olivier Clément pour leur soutien et le Dr Laure Fournier avec qui c'est un réel plaisir de travailler.*

*Merci à Franck Zinzindohoué pour sa collaboration très enthousiaste et son sens inné de la formule !*



*J'aimerais remercier également mes amies, celles qui avec Judith ont ensoleillé cette thèse : Laurence Amar, Nelly Burnichon, Cécile Badoual, Constance Thibaut et Julie Faugeroux. Quitter cet endroit devient vraiment inenvisageable...*

*Mes remerciements vont également aux personnes de la plateforme administrative qui ont toujours tout fait pour me faciliter la tâche : Bruno-le-hacker, DJ Philippe et bien sur Catherine Tritscher, notre mère à tous, sans qui nous ne sommes rien !*

*J'aimerais remercier mes parents, mon frère Louis-Adrien et ma sœur Pauline de m'avoir toujours soutenue durant ces longues années d'études sans avoir forcément cherché à comprendre mon parcours ni mes raisons. Merci à Stanislas et Charles de m'avoir accompagné sans (trop) râler ces quelques Dimanches ou jours fériés où je m'étais mal organisée. Merci à Stanislas d'avoir « toujours su que c'était moi qui gagnerai ». Merci à Pierre-Louis d'avoir toujours réussi à dissiper les nuages.*

*Enfin merci aux patients qui ont accepté de donner de leur temps et de leur énergie pour nous aider à avancer.*

*Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité INSERM U970,  
au Centre de recherche cardiovasculaire PARCC HEGP dirigé par le Dr Alain Tedgui,  
au sein des équipes 2 « Imagerie de l'angiogenèse » du Pr Olivier Clément  
et 13 «Phéochromocytomes et Paragangliomes » du Pr Anne-Paule Gimenez-Roqueplo*



***« Mieux vaut être optimiste et se tromper  
que pessimiste et avoir raison »***

***Jack Penn***



## RESUME

Les phéochromocytomes et les paragangliomes (PCC/PGL) sont des tumeurs neuroendocrines rares qui se développent aux dépens de la médullosurrénale et des paraganglions sympathiques et parasymphatiques. Près de 40% des patients ont une prédisposition génétique, et, à ce jour 13 gènes de prédisposition ont été identifiés. Les mutations du gène *SDHB* sont un facteur de risque de malignité et de mauvais pronostic qui conduisent à une perte de fonction de la succinate déshydrogénase (SDH), enzyme du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il en résulte une accumulation intracellulaire de succinate responsable du phénomène dit de « pseudohypoxie » qui stimule la production de VEGF et donc l'angiogenèse, ainsi que l'expression du transporteur membranaire du glucose GLUT-1. Le surrisque de malignité liée à *SDHB* et l'absence de traitement curatif des formes métastatiques de PCC/PGL nécessitent l'élaboration d'un modèle murin permettant de mettre en place des essais précliniques.

L'obtention d'un modèle murin prédisposé au PCC/PGL par mutation du gène *Sdhb* s'étant révélée infructueuse, notre équipe a finalement généré des cellules chromaffines *Sdhb*<sup>-/-</sup> immortalisées (imCC *Sdhb*<sup>-/-</sup>) dont l'implantation dans le coussinet adipeux sous-cutané (Fat-pad) de souris nudes NMRI a permis l'établissement du premier modèle de tumeurs porteuses d'une inactivation complète du gène *Sdhb*. La caractérisation phénotypique du modèle a été réalisée par imagerie multimodalité *in vivo*, comparativement à un groupe contrôle de souris ayant reçu des imCC non mutées (WT). L'angiogenèse tumorale évaluée par imagerie optique retrouve une expression des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  plus marquée dans le groupe *Sdhb*<sup>-/-</sup> avec une rétention du traceur prolongée 12 h après injection. L'IRM dynamique de contraste (IRM-DCE) montre un réhaussement tumoral global nettement plus important dans le modèle *Sdhb*<sup>-/-</sup>, que le post-traitement par le logiciel PhysioD3D permet d'attribuer à une augmentation du volume capillaire intratumoral. Sur le plan métabolique, la consommation globale de glucose mesurée par TEP au <sup>18</sup>FDG est également plus marquée dans les tumeurs *Sdhb*<sup>-/-</sup>. Enfin, la spectroscopie par résonance magnétique (<sup>1</sup>H-MRS) a mis en évidence une accumulation de succinate dans les tumeurs *Sdhb*<sup>-/-</sup>, non retrouvée dans les tumeurs WT. Ce résultat a été confirmé par spectrométrie de masse et cette technique innovante de détection du succinate *in vivo* a été transférée avec succès en clinique pour l'exploration des patients porteurs de PCC/PGL.

En conclusion, l'imagerie *in vivo* a permis de distinguer le phénotype des tumeurs *Sdhb*<sup>-/-</sup> de celui des WT, avec une néoangiogenèse, une microcirculation et un métabolisme glucidique augmentés. Ces résultats permettent de proposer des études précliniques de réponse précoce aux traitements. La détection de l'accumulation de succinate par <sup>1</sup>H-MRS ouvre la possibilité d'un diagnostic « métabolique » préopératoire pour détecter les patients de mauvais pronostic.

## ABSTRACT

Pheochromocytomas and paragangliomas (PCC/PGL) are rare neuroendocrine tumours that arise from chromaffin cells of the adrenal medulla, and from sympathetic and parasympathetic paraganglia respectively. Around 15% of PCC are metastatic and. *SDHB* mutations are associated with malignancy and poor prognosis. SDH deficiency leads to succinate accumulation that induces a cellular pseudohypoxic phenotype, promoting in particular VEGF and GLUT-1 expression and increasing angiogenesis and glucose metabolism. The high malignancy hazard associated with *SDHB* mutations and the absence of curative treatment of metastatic forms of the disease requires the development a mouse model for preclinical trials launching.

The quest for a predisposed mouse model of *Sdhb*-deficient tumors being unsuccessful, *Sdhb*<sup>-/-</sup> and wild-type (WT) immortalized mouse chromaffin cells (imCC) previously generated in the laboratory were propagated in the fat pad of NMRI nude mice, thereby providing the first model of *Sdhb*- deficient tumors. These mice were compared to a control group receiving WT imCC and their characterization was performed *in vivo* by multimodality imaging. Optical imaging assessing tumor angiogenesis with Angiostamp®, an RGD fluorescent peptide, found an increased expression of  $\alpha\beta3$  integrins in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> group 12 h after tracer injection. Dynamic contrast enhanced MRI (DCE-MRI) showed an overall tumor enhancement significantly higher in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> model secondary to an increase in tumor blood flow (F) and in intratumoral capillary volume fraction (Vb) (compartmental analysis using PhysioD3D software). Metabolic imaging assessed by <sup>18</sup>FDG-PET confirmed the expected high glucose consumption by *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors. Finally, magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H-MRS) detected succinate accumulation in *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors and not in WT tumors. This result was confirmed by mass spectrometry and this innovative procedure for *in vivo* detection of succinate was translated into patients suffering from PCC/PGL. A succinate peak was specifically observed in *SDHx*-related PCC/PGL patients.

In conclusion, these results show strong differences between *Sdhb*<sup>-/-</sup> and WT allografts and suggest that preclinical therapeutic studies could be implemented in this unique model of *Sdhb*-deficient tumor. Our noninvasive, highly sensitive and specific method allowing *in vivo* detection of succinate, the major biomarker of *SDHx*-mutated tumors was translated into clinical imaging.

RESUME .....	9
ABSTRACT.....	10
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS .....	15
Liste des Tableaux.....	17
Liste des Figures.....	19
INTRODUCTION .....	23
A. Phéochromocytomes et paragangliomes.....	23
I. Définitions .....	23
II. Physiologie.....	23
1. Origine embryonnaire .....	23
2. Localisation .....	24
3. Sécrétion.....	25
III. Symptomatologie et diagnostic (hors imagerie) .....	27
1. Signes cliniques .....	27
2. Indications du dépistage .....	28
3. Diagnostic biologique .....	29
a) Tests statiques.....	29
b) Tests dynamiques.....	30
4. Diagnostic histologique et scores de malignité .....	30
5. Complications.....	33
IV. Génétique des PCC et PGL .....	34
1. Formes syndromiques.....	35
a) La néoplasie endocrinienne multiple de type 2 .....	35
b) La neurofibromatose de type 1 (NF1) .....	37
c) La maladie de Von Hippel Lindau (VHL).....	39
2. Formes familiales non syndromiques .....	40
a) Les gènes SDHx .....	40
Découverte des gènes <i>SDHx</i> .....	40
Corrélations génotype/phénotype .....	41
Implication des gènes <i>SDHx</i> dans d'autres types de cancers .....	42
b) Les PCC familiaux.....	44
Le gène <i>TMEM127</i> .....	44
Le gène <i>MAX</i> .....	44
3. Les autres gènes du cycle de Krebs.....	44
a) Les gènes IDH.....	45
c) Le gène FH .....	46
d) Le gène MDH2 .....	47
4. Predisposition ou génétique somatique ? Le cas du gène <i>HIF2A</i> .....	48
5. Génétique somatique .....	48
V. Prise en charge thérapeutique .....	50
1. Traitement médicamenteux symptomatique.....	50
2. Traitement chirurgical .....	50
3. Traitement par radiothérapie .....	51
4. Prise en charge post-opératoire.....	51
VI. Tumorigenèse des PCC/PGL.....	52
1. Le cluster 1 et la voie de la « pseudo-hypoxie » .....	52
a) Tissu spécificité de la réponse hypoxique .....	52
b) Conséquences fonctionnelles des mutations <i>VHL</i> , <i>SDHx</i> , <i>HIF-2A</i> et <i>FH</i> ..	53
c) Implication de la pseudo-hypoxie dans la tumorigenèse des PCC/PGL.	55
Apoptose et prolifération.....	55



Angiogenèse.....	56
Métabolisme énergétique .....	56
Processus d'invasion et de métastase .....	59
2. Le cluster 2A : prolifération et survie cellulaire.....	60
VII. Cas des PCC/PGL malins .....	62
1. Diagnostic .....	62
2. Prise en charge.....	63
a) Radiothérapie interne vectorisée par <sup>131</sup> I-MIBG .....	64
b) Chimiothérapie .....	64
c) Thérapies ciblées antiangiogéniques.....	65
Rationnel.....	65
Thérapies en cours dans les PCC/PGL.....	66
B. Imagerie des PCC/PGL.....	69
I. Imagerie existante dans la prise en charge des PCC/PGL.....	69
1. Imagerie conventionnelle .....	69
2. Imagerie fonctionnelle scintigraphique.....	70
a) Principe.....	70
b) Traceurs existants .....	73
Traceurs TEMP .....	73
✓ Scintigraphie à la <sup>123</sup> I-MIBG.....	73
✓ Scintigraphie des récepteurs de la somatostatine à <sup>111</sup> In-pentétréotide (SRS).....	73
Traceurs TEP .....	74
✓ TEP au <sup>18</sup> Fluorodéoxyglucose ( <sup>18</sup> F-FDG).....	74
✓ TEP à la <sup>18</sup> Fluoro-DOPA ( <sup>18</sup> F-DOPA).....	75
c) Nouveaux traceurs potentiels.....	76
✓ Analogues de la somatostatine marqués au Gallium 68 .....	76
✓ Traceurs de l'angiogenèse.....	78
3. Indications dans la détection des PCC/PGL .....	79
II. Pistes d'imageries innovantes .....	81
1. IRM dynamique de contraste (IRM-DCE).....	81
a) Principe.....	81
d) Apport en pratique clinique .....	83
2. Spectroscopie-IRM ( <sup>1</sup> H-SRM).....	84
a) Principe.....	84
e) Utilisation en cancérologie.....	87
<b>OBJECTIFS ET PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE .....</b>	<b>89</b>
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>93</b>
A. La transgénèse murine .....	93
B. Les modèles prédisposés au PCC/PGL.....	95
I. Contexte et objectifs du travail .....	95
II. Article 1 .....	96
III. Discussion .....	97
<b>CHAPITRE 2 .....</b>	<b>101</b>
A. Contexte et travaux antérieurs .....	101
I. Modèles cellulaires de PCC/PGL .....	101
IV. Les cellules chromaffines <i>Sdhb</i> <sup>-/-</sup> .....	102
V. Les modèles d'allo- et de xénogreffes.....	104
B. Travaux personnels.....	105
I. Mise au point du modèle d'allogreffe sous-cutanée <i>Sdhb</i> <sup>-/-</sup> .....	105

VI. Article 2 : phénotypage par imagerie multimodalité .....	106
1. Mise en perspective du travail dans une problématique translationnelle ...	106
2. Article 2.....	108
VII. Article 3 : détection <i>in vivo</i> du succinate et aspects translationnels.....	109
1. Contexte et objectifs du travail .....	109
2. Article 3.....	111
VIII. Discussion .....	113
1. La souris allogreffée : un bon modèle d'étude des PGL <i>SDHB</i> ?.....	113
2. Vers une imagerie fonctionnelle non-irradiante ? .....	114
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	119
A. Faut-il abandonner l'idée d'un modèle murin prédisposé aux tumeurs <i>Sdhb</i> ? ..	119
B. Evaluation de la réponse au traitement .....	120
I. Thérapies antiangiogéniques .....	120
II. Autres pistes innovantes .....	123
<b>CONCLUSION</b> .....	127
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	130
<b>ANNEXES</b> .....	159
A. Article 4 : la voie de la pyruvate carboxylase est incontournable dans les cellules présentant un déficit en succinate déshydrogénase .....	159
B. Article 5 : Le dépistage des sujets asymptomatiques porteurs de mutation <i>SDHx</i> doit comprendre une <sup>18</sup> FDG-TEP qui ne doit pas être systématiquement renouvelée à un an.....	161
C. Article 6 : Une vision génomique des PCC/PGL.....	163
D. Article 7 : Altérations génomiques des PCC/PGL mises en évidence par une approche d'analyse « multi-omics ».....	165
E. Article 8 : l'architecture vasculaire facteur de risque de malignité des PCC/PGL	167
F. Article 9: intérêt de l'immunohistochimie <i>SDHD</i> pour la validation des mutations <i>SDHx</i> dans les PCC/PGL .....	169



## LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

A: Adrénaline  
 ADN: Acide désoxyribonucléique  
 AIF: Arterial Input Function  
 AUC : Area Under the Curve  
 ARN : acide ribonucléique  
 CA: contrast agent (agent de contraste en imagerie)  
 CMT: carcinoma médullaire thyroïdien  
 EANM : European Association of Nuclear Medicine  
 EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition (Transition Mesenchymo-Epitheliale)  
 ENSAT: European Network for the study of Adrenal Tumors  
 F : flux capillaire ou « blood flow » en anglais  
 FDG: fluoro-désoxyglucose  
 FH: fumarate hydratase  
 FIRSTMAPP: First Randomized Study in Malignant Progressive Pheochromocytomas  
 FP7: Seventh Framework Programme  
 GAPP : Grading system for Adrenal Pheochromocytoma and Paraganglioma  
 GIST : GastroIntestinal Stromal Tumors (tumeurs stromales gastro-intestinales)  
 GLUT : glucose transporters  
<sup>1</sup>H-SRM : spectroscopie protonique  
 HIF: Hypoxia Inductible Factor (facteur inductible par l'hypoxie)  
 HTA: hypertension artérielle  
 IDH: isocitrate déshydrogénase  
 IHC: Immunohistochimie  
 ImCC : immortalized mouse chromaffin cells  
 In: Indium  
 IRM: imagerie par résonance magnétique  
 IRM\_DCE : IRM dynamique de contraste  
 KO: Knock out (inactivation)  
 L-Dopa : L-dihydroxyphényléthylamine  
 LOH: Loss of heterozygosity (perte d'hétérozygotie)  
 MIBG : méta-iodobenzylguanidine  
 NA: Noradrénaline  
 NET : Norepinephrine Transporteur (transporteur de la NA)  
 MAPK : Mitogen-activated protein kinases  
 MAX : Myc-associated factor X  
 MDH : malate déshydrogénase  
 MIBG : métoiodobenzylguanidine  
 MN : Métanéphrines  
 NMN : normétanéphrines  
 MNs : métanéphrines et normétanéphrines  
 MPC: mouse pheochromocytoma cells  
 mTOR : mammalian target of rapamycin, (cible de la rapamycine chez les mammifères)  
 MTT : mouse tumor tissue-derived  
 NEM 2 : Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2  
 NF1: Neurofibromatose de type 1  
 PARCC : Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire

PASS : pheochromocytoma of the adrenal gland scaled Score  
PCC /PGL : phéochromocytome/ paragangliome  
PHD: prolyl-hydroxylases  
PNMT : phényléthanolamine N-méthyl transférase  
PSA : Prostate Specific Antigen (antigène spécifique prostatique)  
RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours  
RCC : Renal Cell Carcinoma  
SDH: succinate déshydrogénase  
SDHAF2 : succinate dehydrogenase complex assembly factor 2  
SRS : scintigraphie des récepteurs de la somatostatine  
SUCCES : SUCCInate estimatiuon by Spectroscopy  
SUV : Standard Uptake Value  
T : tesla  
TDM : tomodensitométrie  
TEMP : tomographie par émission monophotonique  
TEP : tomographie par émission de positons  
TH: tyrosine hydroxylase  
TMEM127: transmembrane protein 127  
Vb : volume sanguin relatif intratumoral  
VEGF: vascular endothelial growth factor  
VHL : Von Hippel-Lindau  
VMAT : vesicular monoamine transporter (Transporteur vésiculaire des monoamines)  
VOI : volume of interest (volume d'intérêt)  
WT : wild-type (souche sauvage)

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1** : Molécules pouvant augmenter les dosages de métanéphrines

**Tableau 2** : comparaison des items des scores de PASS et de GAPP

**Tableau 3** : Les douze gènes de prédisposition au PCC/PGL

**Tableau 4** : Corrélations génotype/phénotype des principaux gènes impliqués dans les PCC/PGL

**Tableau 5**: Corrélations entre les principales mutations du gène *RET* et le risque de CMT, PCC

**Tableau 6** : Régulation différentielle des gènes cibles par HIF1a et HIF2a

**Tableau 7** : Valeur diagnostique de la TEP aux analogues de la somatostatine marqués au <sup>68</sup>Ga pour les PCC/PGL

**Tableau 8** : les modèles cellulaires développés dans le phéochromocytome



## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Principaux types cellulaires dérivant des cellules de la crête neurale
- Figure 2** : Principales localisations anatomiques des paraganglions parasympathiques et sympathiques
- Figure 3**: Biosynthèse des catécholamines dans les cellules chromaffines
- Figure 4** : Architecture vasculaire des PCC/PGL après immunomarquage CD34
- Figure 5** : Critères diagnostiques et principales atteintes extra-surréaliennes de la NF1
- Figure 6** : La succinate déshydrogénase
- Figure 7** : principaux gènes du cycle de Krebs impliqués dans le développement de PCC/PGL
- Figure 8** : La navette malate-aspartate
- Figure 9** : Contributions estimées des mutations constitutionnelles et somatiques des gènes de prédisposition aux PCC/PGL
- Figure 10** : Conséquences fonctionnelles des mutations *SDH*, *FH*, *VHL* et *HIF2A*
- Figure 11** : Mécanisme de promotion de la glycolyse anaérobie par HIF1 $\alpha$ .
- Figure 12** : Gènes cibles et grandes voies de signalisation intracellulaires impliqués dans la tumorigenèse HIF-dépendante
- Figure 13** : Voies de tumorigenèse activées par mutations des gènes du cluster 2A
- Figure 14** : Survie globale des patients avec PCC/PGL malins après survenue de la première métastase en fonction du statut *SDHB*
- Figure 15** : le switch angiogénique
- Figure 16** : Les 4 mécanismes principaux d'échappement aux antiangiogéniques
- Figure 17**: Imagerie conventionnelle des PCC/PGL
- Figure 18**: Les 2 types de rayonnements gamma utilisés en imagerie nucléaire
- Figure 19** : Images scintigraphiques <sup>123</sup>I-MIBG et <sup>111</sup>In-pentétréotide
- Figure 20** : Supériorité du <sup>18</sup>F-FDG aux autres radiotraceurs chez un patient *SDHB* métastatique
- Figure 21** : Représentation schématique de la captation et de la rétention des traceurs TEP d'intérêts dans les PCC/PGL
- Figure 22** : Comparaison de l'efficacité des traceurs TEP chez un patient *SDHB* métastatique
- Figure 23** : Algorithme proposé par l'EANM concernant le choix de l'examen de médecine nucléaire à réaliser devant un PCC/PGL
- Figure 24** : Modélisation du signal de rehaussement au niveau de l'aorte et du tissu tumoral
- Figure 25** : Exemple de carte paramétrique de K<sup>trans</sup> d'une métastase hépatique de cancer colo-rectal d'un patient traité par bevacizumab
- Figure 26** : Schématisation des différences entre les séquences d'IRM morphologique et les séquences de <sup>1</sup>H-SRM



**Figure 27** : Variation des intensités des signaux du succinate et des lipides obtenus par  $^1\text{H}$ -SRM sur l'IRM 4.7 Tesla dédiée au petit animal du centre de recherche cardiovasculaire de l'HEGP

**Figure 28** : Carte paramétrique en  $^1\text{H}$ -SRM de l'activité tumorale d'un gliome de haut grade

**Figure 29** : La première souris transgénique (droite) porteuse d'un transgène de rat codant pour l'hormone de croissance

**Figure 30** : Obtention de clones purs de cellules chromaffines *Sdhb*<sup>-/-</sup> (ImCC)

**Figure 31** : Caractérisation des imCC *Sdhb*<sup>-/-</sup>

**Figure 32** : Elaboration du modèle d'allogreffe de cellules *Sdhb*<sup>-/-</sup> par propagation d'une tumeur sous-cutanée du flanc dans le « fat-pad » de souris nude (nu/nu)

**Figure 33** : Détection des mutations *IDH1* dans les glioblastomes

**Figure 34** : Plan thérapeutique de l'administration de sunitinib aux souris *Sdhb*<sup>-/-</sup>

**Figure 35** : Evaluation par IRM-DCE du traitement par 60mg/kg/j de sunitinib chez une série de 8 souris avec tumeur *Sdhb*<sup>-/-</sup>

**Figure 36** : Evolution des « hallmarks » du cancer

**PHEOCHROMOCYTOMES ET  
PARAGANGLIOMES**

-

PRESENTATION GENERALE

-

IMAGERIE



## INTRODUCTION

### A. Phéochromocytomes et paragangliomes

#### I. Définitions

Les **paragangliomes (PGL)** sont des tumeurs neuroendocrines développées aux dépens des ganglions sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome.

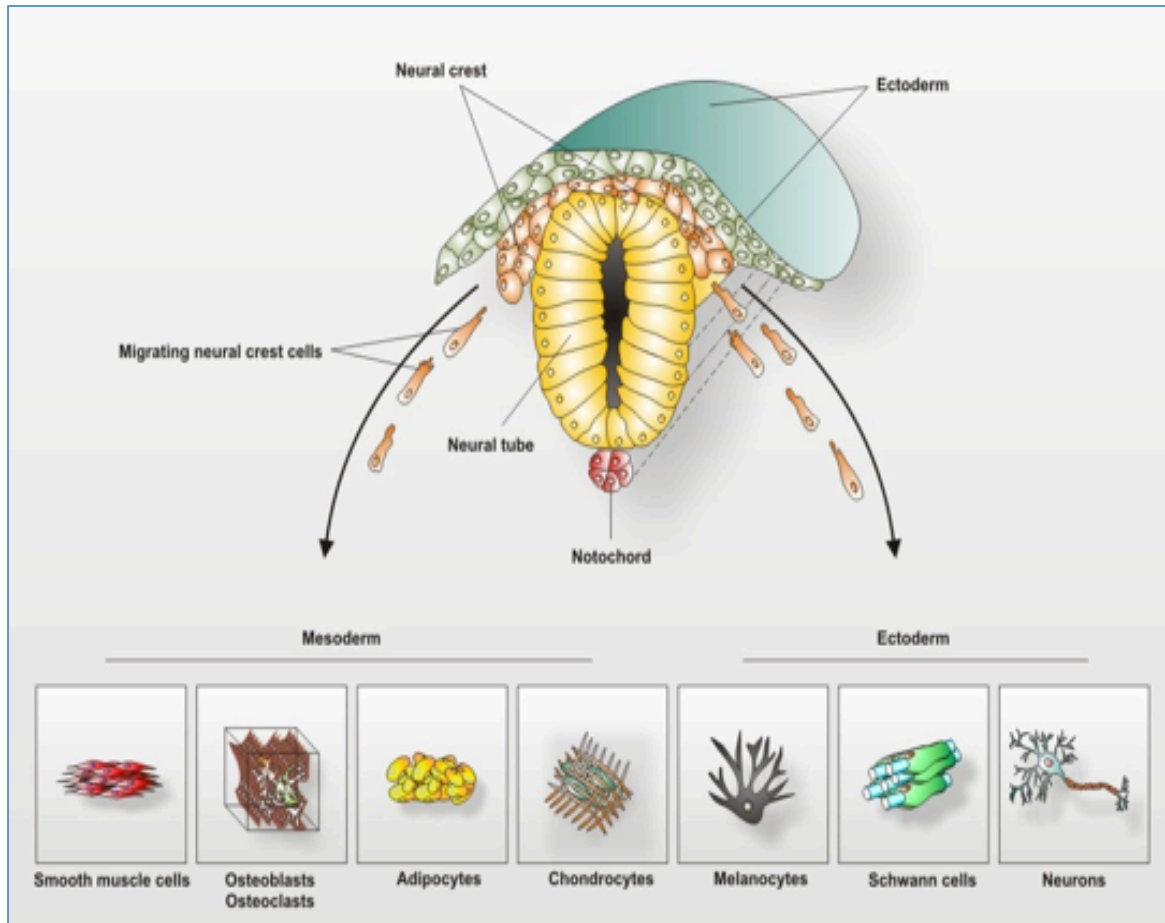
Un **phéochromocytome (PCC)** est un paragangliome particulier qui se développe au niveau de la glande médullosurrénale [1].

Les PCC/PGL sont des tumeurs rares classées parmi les maladies orphelines (OMIM 171300). Leur incidence est estimée entre 2 et 8 cas par million d'habitants et par an et leur taux de prévalence entre 1/300 000 et 1/1 000 000 dans la population générale [2-4], d'environ 0,2% chez les patients ayant une hypertension artérielle (HTA) [5] et de 4% chez les patients ayant une masse surrénale de découverte fortuite.

#### II. Physiologie

##### 1. Origine embryonnaire

Les PGL ont pour origine les cellules de la crête neurale. Ces cellules, présentes uniquement au stade embryonnaire naissent au bord interne de la plaque neurale, au niveau de sa limite avec l'ectoderme non neurologique, avant de se retrouver en position dorsale après la fermeture du tube neural. Commence alors leur phase de migration, où, grâce à un processus appelé EMT (Transition Epithélio-Mésenchymateuse), elles vont être capables de coloniser tout l'embryon et, de par leur caractère multipotent [6], vont donner naissance à de nombreux types cellulaires et tissus (Figure 1). Ainsi elles sont à l'origine, entre autres, des os, cartilages et muscles de la face, des cellules pigmentaires de la peau (mélanocytes) et de la totalité du système nerveux périphérique (système sympathique, parasympathique et sensoriel) [7]. Par ailleurs, elles sont à l'origine de plusieurs cellules du système endocrinien, appelées pour cette raison « cellules neuroendocrines » : les cellules C de la thyroïde, les cellules chromaffines de la médullosurrénale et des paraganglions sympathiques et les cellules non-chromaffines (ou glomiques) des paraganglions parasympathiques [8].



**Figure 1 : Principaux types cellulaires dérivant des cellules de la crête neurale.**

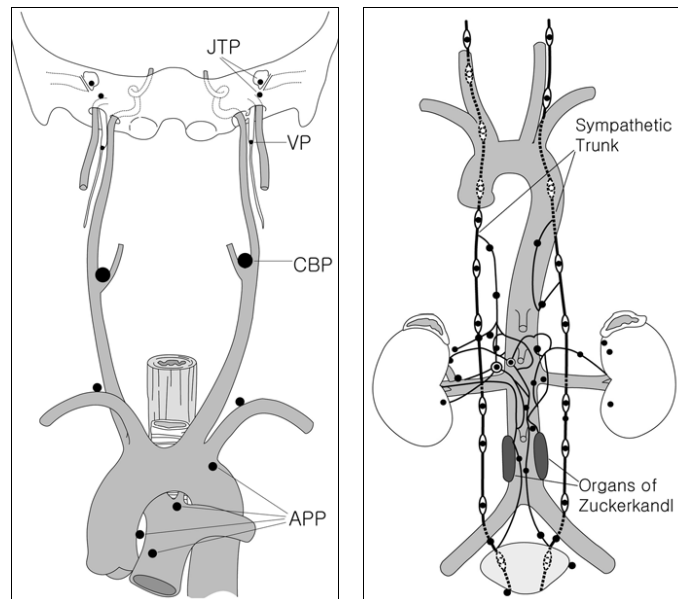
D'après <http://web.biologie.uni-bielefeld.de/cellbiology/>

## 2. Localisation

De par leur origine embryologique, les PGL peuvent s'étendre de la base du crâne jusqu'au dôme vésical (Figure 2). Leurs principales localisations anatomiques sont la tête, le cou, la médullosurrénale et les ganglions sympathiques thoraco-abdominaux-pelviens [5].

On distingue classiquement :

- les PGL parasympathiques, provenant du tissu parasympathique. Ils se développent le plus souvent dans la région cervicale (glomus carotidien, glomus tympanique,...) et sont généralement non sécrétants.
- Les PGL sympathiques quant à eux, se développent aux dépens du tissu sympathique et se situent le plus souvent dans la région abdomino-pelvienne (médullosurrénale, chaînes ganglionnaires para-aortiques et organe de Zuckerkandl, ganglions pré- et paravertébraux, vessie,.....) ou thoracique et notamment para-cardiaque.



**Figure 2 : Principales localisations anatomiques des paranglions parasympathiques (partie droite) et sympathiques (partie gauche).** D'après Lee KY, 2006 [9]. APP = aorticopulmonary paraganglia (PGL aortico-pulmonaire), CBP = carotid body paraganglion (PGL carotidien), JTP = jugulotympanic paraganglia (PGL jugulotympaniques), VP = vagal paraganglia (PGL vagues)

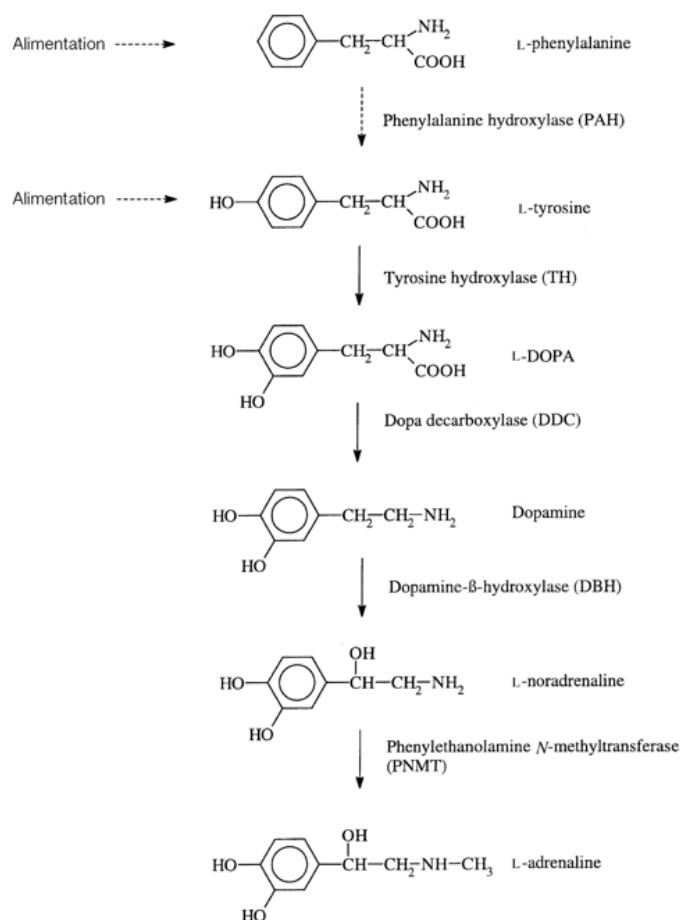
### 3. Sécrétion

Principalement lorsqu'ils dérivent du système nerveux sympathique, les PCC/PGL peuvent sécréter des neuro-hormones appelées catécholamines (Dopamine, Noradrénaline, Adrénaline). On parle alors de PGL fonctionnel.

La noradrénaline (NA) est le neuromédiateur principal du système nerveux sympathique, l'adrénaline (A) est sécrétée dans la circulation par la médullosurrénale et la dopamine est un neurotransmetteur majeur du système nerveux central, également libéré au niveau périphérique par les terminaisons nerveuses sympathiques.

La biosynthèse des catécholamines a lieu dans les cellules chromaffines à partir de la L-Tyrosine (Figure 3) apportée soit directement par l'alimentation, soit à partir du métabolisme hépatique de la phénylalanine. Celle-ci est transformée en L-dihydroxyphényléthylamine (L-Dopa) par la tyrosine hydroxylase (TH) dans le cytoplasme des cellules. Cette première étape est limitante, les catécholamines inhibant leur propre synthèse par compétition [10]. Puis la L-Dopa est transformée en dopamine par la dopa décarboxylase. La biosynthèse peut soit s'arrêter là dans le cas des neurones dopaminergiques, soit se poursuivre par la transformation en noradrénaline par la dopamine- $\beta$ -hydroxylase. Enfin la dernière étape est la synthèse d'adrénaline à partir de

la noradrénaline par la PNMT (phényléthanolamine N-méthyl transférase) dans la médullosurrénale et les neurones adrénergiques du système nerveux central [10, 11].



**Figure 3: Biosynthèse des catécholamines dans les cellules chromaffines**

Après leur synthèse, les catécholamines sont soit stockées dans les granules de sécrétion (catécholamines granulaires constituant le pool de réserve, 80% du stock), soit libres dans le cytoplasme (pool libre cytoplasmique, 20%). Dans les granules de sécrétion, les catécholamines sont associées à plusieurs autres protéines dont la substance P, le neuropeptide Y, la somatostatine et la chromogranine A [12]. Le transfert des monoamines dans les vésicules de sécrétion est assuré par les transporteurs VMAT (VMAT-1 dans les cellules neuroendocrines et VMAT-2 dans les terminaisons nerveuses) [13].

La sécrétion des catécholamines est déclenchée par la stimulation des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine au niveau de la médullosurrénale, ou par l'activation des canaux sodiques voltage-dépendant dans les neurones sympathiques périphériques [14]. Après cette stimulation neuronale, une partie des catécholamines libérées est

recaptée par la terminaison présynaptique afin de reconstituer le pool de réserve [15]. Cette recapture neuronale présynaptique se fait grâce à des transporteurs d'affinité plus ou moins importante en fonction du type de catécholamine. Le transporteur NET assure la recapture de la noradrénaline [13]. Les catécholamines échappant à la recapture présynaptique diffusent dans la circulation puis subissent une dégradation chimique au niveau des neurones, de la médullosurrénale ou des organes périphériques tels que le foie ou le rein. Cette dégradation s'effectue grâce à 2 enzymes principales : la MAO (monoamine oxydase), principalement neuronale, et la COMT (catéchol-O-méthyl transférase) surtout présente dans les tissus non neuronaux [15]. Cette dernière transforme la NA et l'A en dérivés méthoxylés, respectivement la normétanéphrine (NMN) et la métanéphrine (MN), seuls dérivés détectables dans le sang et les urines des patients atteints de PCC/PGL et utiles au diagnostic. La dopamine est dégradée en 3-méthoxytyramine par la COMT puis, par la MAO et l'aldéhyde déshydrogénase, en acide homovanillique excrété dans les urines [16].

### **III. Symptomatologie et diagnostic (hors imagerie)**

#### **1. Signes cliniques**

Les patients porteurs de PCC/PGL présentent une symptomatologie qui peut être aspécifique, fluctuante, voire inexistante. Elle peut être liée à l'hypersécrétion de catécholamines et/ou au syndrome tumoral.

Le délai moyen entre l'apparition des symptômes et le diagnostic est de 3 ans [17]. Une hypertension artérielle existe dans plus de 80% des cas. Elle est permanente dans 50 % des cas ou paroxystique dans 35% des cas. Une hypotension persistante ou apparaissant à l'orthostatisme est également possible [5]. L'hypertension artérielle provient de l'augmentation des résistances vasculaires périphériques et de la fréquence cardiaque et d'une déplétion activant le système rénine-angiotensine-aldostérone. L'hypotension orthostatique provient quant à elle d'une anomalie de la régulation vasculaire sympathique.

Les patients porteurs de PCC font également des malaises qui correspondent à des décharges catécholaminergiques et se manifestent par des céphalées (60 à 90 % des cas), des sueurs (55 à 75 %), des palpitations (50 à 70 %). Ces trois symptômes (auxquels il faut ajouter une pâleur typique après le malaise) forment la triade de Plouin-Ménard, qui a une spécificité de 90% pour le diagnostic de PCC [18], mais ils ne



se manifestent pas nécessairement simultanément même lorsqu'ils sont tous présents. D'autres symptômes peuvent également être retrouvés : anxiété, instabilité émotionnelle, amaigrissement, syndrome polyuro-polydipsique chez l'enfant.

Par ailleurs, 10 à 15% des PCC/PGL fonctionnels sont diagnostiqués dans un contexte de complication aiguë, la plus fréquente étant la cardiopathie adrénérgique [19].

Le syndrome tumoral est prépondérant dans les formes cervicales majoritairement non sécrétantes. Ce sont souvent la palpation d'une tumeur, parfois pulsatile, des acouphènes ou une hypo-acousie qui permettent la découverte du PGL.

## 2. Indications du dépistage

Le PCC/PGL est une pathologie rare, le plus souvent curable, et qui expose les patients à des complications cardiovasculaires graves. Un dépistage précoce reposant sur des indications solides est donc essentiel.

On peut considérer, d'après les données de la littérature [20] que la recherche d'un PCC/PGL se justifie :

- chez les patients porteurs d'une HTA associée à des troubles vasomoteurs paroxystiques ;
- chez les patients ayant une labilité tensionnelle importante objective (mise en évidence par une mesure ambulatoire de la pression artérielle), notamment lors d'une intervention chirurgicale ;
- chez les patients ayant une HTA résistante, définie comme une pression artérielle (PA) systolique supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou une PA diastolique supérieure ou égale à 90 mmHg malgré une trithérapie à doses efficaces contenant au moins un diurétique ;
- chez les patients porteurs d'un incidentalome surrénalien ;
- chez les patients atteints d'une maladie génétique prédisposant aux PCC/PGL comme la maladie de Von Hippel Lindau (VHL), la néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM2), la neurofibromatose de type 1 (NF1), la PGL héréditaire, le syndrome paragangliome-polycythémie, le PCC familial ou le syndrome de Reed (cf paragraphe IV génétique des PCC/PGL) ;
- chez les patients de moins de 50 ans, diabétiques, hypertendus, ayant un indice de masse corporelle inférieur à 25 [21].

### 3. Diagnostic biologique

#### a) *Tests statiques*

Le diagnostic de PCC/PGL fonctionnel repose sur l'augmentation des concentrations de métanéphrines (MN) et de normétanéphrines (NMN). De nombreuses études ont montré que les dosages des MN et NMN libres plasmatiques (donc non sulfoconjuguées) et de MN et NMN fractionnées urinaires (sulfoconjuguées) sont bien supérieurs aux autres dosages notamment aux dosages de catécholamines [22]. Actuellement, ces dosages sont le plus souvent réalisés par des techniques de chromatographie liquide à haute pression ou de spectrométrie de masse ce qui permet une très bonne reproductibilité, ainsi qu'une sensibilité et une spécificité dépassant les 95% [23].

Pour le dosage des MN et NMN urinaires, le recueil d'urine ne doit pas nécessairement être effectué dans un bocal contenant de l'acide chlorhydrique (HCl 6N, 1 ml pour 100 ml) qui assure la conservation à 4 °C. En effet, il a été montré que contrairement à l'adrénaline et à la noradrénaline qui sont dégradées au bout de quelques jours lorsque le recueil n'est pas fait sur acide chlorhydrique, la MN et la NMN restent stables pendant 8 jours [24]. Afin de s'assurer d'un recueil urinaire complet, les dosages de MN et NMN urinaires doivent être rapportés à l'excrétion urinaire de la créatinine sur 24 heures. En revanche, il n'est pas nécessaire de répéter ces dosages sur plusieurs jours.

Concernant les dosages de MN et NMN libres plasmatiques, il est classiquement recommandé d'effectuer ce dosage après 30 minutes de repos en position allongée [20], la position assise augmentant les faux positifs [25].

Le diagnostic est hautement probable au-dessus de trois fois la normale et suspect lorsque la concentration est inférieure à trois fois la normale. Le profil sécrétoire des tumeurs (MN versus NMN) peut orienter vers une origine génétique et avoir une valeur pronostique. En effet, une sécrétion préférentielle voire exclusive de NMN est constatée dans les PCC/PGL avec mutations sur les gènes *SDHx*, *VHL* et *FH* alors qu'en cas de mutation sur les gènes *RET*, *NF1*, *TMEM127* et *MAX* le profil sécrétoire est plus classiquement de type adrénérgique. La 3-méthoxytyramine, dérivée méthoxylée de la Dopamine, a une valeur pronostique dans les formes malignes [26]. De plus certains PGL de la tête et du cou produiraient exclusivement de la dopamine : une étude portant sur

136 patients atteints de PGL, rapporte une élévation de 3-methoxytyramine plasmatique isolée dans 13 % des cas [27].

Enfin, certains médicaments peuvent induire des faux positifs dans le dosage soit en raison d'une augmentation de la synthèse des catécholamines ou en raison d'une interférence avec les méthodes de dosage (Tableau 1).

La chromogranine A (CgA) étant moins sensible et moins spécifique que les dosages de MNs, elle n'est généralement pas utilisée pour le diagnostic de PCC. Elle peut être utile pour le suivi des patients opérés d'un PGL.

#### b) Tests dynamiques

Les tests dynamiques, tels que le test de suppression à la clonidine et le test de provocation au glucagon, n'ont plus de réelle indication au vu des performances actuelles des dosages de MNs.

Classe Médicamenteuse	Molécule	MN plasmatique	NMN plasmatique	MN urinaire	NMN urinaire
Interférence avec les dosages par Chromatographie liquide avec détection par fluorométrie ou électrochimie.					
Antalgique	Paracetamol	↑↑	↔	↑↑	↔
Beta-bloquant	Labetalol, Sotalol	↔	↔	↑↑	↑↑
Antihypertenseur central	Alpha methyl dopa	↑↑	↔	↑↑	↔
Anti-inflammatoire intestinal	Sulphasalazine	↑↑	↔	↑↑	↔
Augmentation des Métanéphrines indépendamment des techniques de dosage					
Antidépresseurs tricycliques	Imipramine, clomipramine, amitriptyline	↑↑	↔	↑↑	↔
Inhibiteurs de la monoamine oxydase	Fluoxetine, Fluvoxamine, Paroxetine, Sertraline	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
cocaïne		↑↑	↑	↑↑	↑
Sympathomimétiques	Vasocostricteurs nasaux, pseudoéphédrine	↑	↑	↑	↑
Anti-parkinsonien dopaminergique	Levodopa	↑	↑	↑↑	↑

**Tableau 1 : Molécules pouvant augmenter les dosages de métanéphrines**

#### 4. Diagnostic histologique et scores de malignité

Historiquement, le terme de cellules « chromaffines » vient de la couleur brune caractéristique que prennent les cellules contenant des catécholamines après coloration

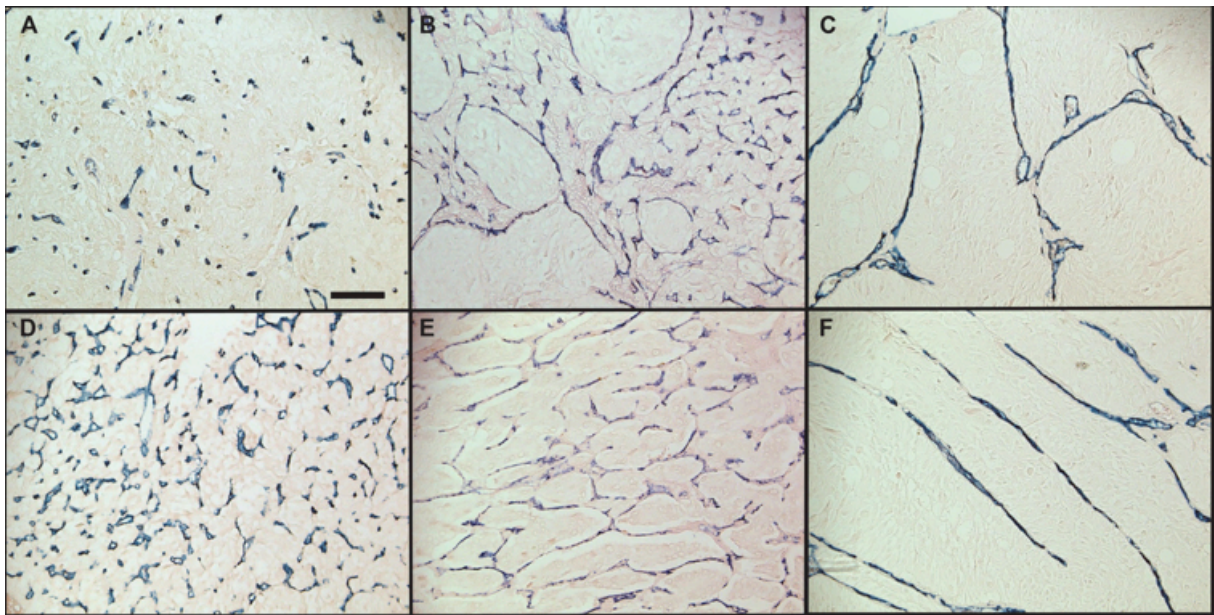
au bichromate de potassium. Ces techniques de coloration sont désormais abandonnées au profit de techniques plus récentes d'immunohistochimie (IHC). Le diagnostic repose maintenant sur la mise en évidence, par IHC, d'une positivité pour les marqueurs généraux des tumeurs neuroendocrines suivants : chromogranine A et synaptophysine associée à un réseau caractéristique de cellules sus-tentaculaires visibles avec un marquage de la protéine S100. Un marquage positif pour la neuron-specific enolase peut aussi être recherché. Un diagnostic spécifique des PCC/PGL peut être réalisé grâce à l'immunopositivité pour les enzymes impliquées dans la synthèse des catécholamines comme la TH [28].

Il n'existe pas de critère histologique fiable permettant le diagnostic de malignité pour ces tumeurs. En 2002, *Thompson et coll* ont établi le score de PASS (Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score), basé sur l'évaluation de 12 critères morphologiques (Tableau 2), afin d'évaluer la malignité des PCC [29]. Un score total  $\geq 4$  indique un risque élevé de malignité. Toutefois, la performance diagnostique de ce score s'avère mauvaise avec une importante variabilité inter- et intra-observateurs ne permettant pas un diagnostic de malignité fiable [30]. L'index de prolifération Ki-67, largement utilisé pour évaluer la malignité des tumeurs neuro-endocrines, serait fortement évocateur de malignité des PCC/PGL lorsqu'il est supérieur à 2,5% mais avec une faible sensibilité [31]. Enfin, plus récemment, un nouveau score baptisé GAPP (Grading system for Adrenal Phaeochromocytoma and Paraganglioma) et basé sur des critères proches du score de PASS (Tableau 2) été proposé par une équipe Japonaise [32]. Cette approche aboutit à un classement des tumeurs en 3 groupes : « bien différenciées » (score 0-2), « moyennement différenciées » (score 3-6) et « peu différenciées » (score 7-10), assez bien corrélés avec le statut métastatique. Néanmoins, en l'absence de cohorte de validation pour le moment, la valeur diagnostique de ce test reste à évaluer.

Principaux scores histologiques utilisés pour prédire la malignité des PCC/PGL			
Score de PASS		GAPP Score	
Items	Pt	Items	Pt
Anomalies cellulaires • Nids larges et irréguliers • Cellules spumeuses	2 2	Anomalies cellulaires • Nids larges et irréguliers • pseudorosette	1 1
Cellularité élevée	2	Cellularité • Modérée • élevée	1 2
Nécrose	2	Nécrose	1
Invasion • Capsulaire • vasculaire	1 1	Invasion • Capsulaire • vasculaire	1 1
Mitoses • >3/10 grands champs • Atypiques	2 2	Index Ki67 (%) • 1-3 • >3	1 2
Monotonie cellulaire	2	Sécrétion noradrénergique	1
Extension tissu adipeux	2		
Pléomorphisme nucléaire	1		
Hyperchromasie du noyau	1		
Score maximum	20	Score Maximum	10

**Tableau 2 : comparaison des items des scores de PASS et de GAPP**

La densité vasculaire a été évaluée dans plusieurs séries de PCC bénins et malins, sans aboutir à des conclusions réellement reproductibles. En revanche, les observations faites par *Favier et coll.* concernant l'architecture vasculaire après immunomarquage CD34 des PCC semblent plus pertinentes [33]. En effet, il a été observé que les PCC bénins présentent une structure microvasculaire homogène et organisée alors que les tumeurs malignes présentent *a contrario* une architecture vasculaire très particulière, irrégulière et anarchique, faite de réseaux, d'arcs et de parallèles, ce qui rend les méthodes de quantification classiques peu reproductibles et peu représentatives (Figure 4). Ces observations suggèrent qu'une évaluation qualitative de la vascularisation tumorale constitue un critère beaucoup plus pertinent pour le pronostic de malignité des PCC/PGL. Néanmoins, une large étude de validation portant sur 184 tumeurs avec 6 observateurs indépendants a montré que même si ce score était assez reproductible, il donnait seulement 60% de sensibilité et 73% de spécificité et ne pouvait à lui seul déterminer la malignité [34].



**Figure 4 : Architecture vasculaire des PCC/PGL après immunomarquage CD34.** D'après Oudijk 2015 [34]. L'architecture vasculaire est homogène et régulière dans les PCC/PGL bénins (A, D), alors que dans les tumeurs malignes les vaisseaux sont irréguliers (B) et forment des arcs (C), des réseaux (E), et des parallèles (F). (échelle 100  $\mu$ m).

Du fait de cette absence d'un critère anatomopathologique fiable, la classification de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) définit depuis 2004 que la malignité des PCC/PGL ne peut être affirmée qu'après l'émergence de la première métastase à distance d'un site paraganglionnaire (ganglions, os, foie, poumons, etc) [35].

### 5. Complications

Les complications sont dominées par le risque lié à la sécrétion de catécholamines par les PCC et PGL fonctionnels. En effet, une libération massive de catécholamines par la tumeur peut déclencher des épisodes critiques spontanés ou induits par un traumatisme, un stress chirurgical ou obstétrical ou par certains médicaments : les antagonistes du récepteur D2 de la dopamine (métoclopramide, chlorpromazine), les bêtabloquants, les inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline, de la sérotonine et de la monoamine oxydase, certains peptides (ACTH, glucagon) et les stéroïdes à forte dose [20]. Ces crises catécholaminergiques comportent souvent une poussée hypertensive sévère et peuvent aller parfois jusqu'à un état de choc. La cardiomyopathie adrénérgique entraîne une sidération brutale du myocarde avec insuffisance cardiaque globale et/ou choc cardiogénique [19, 36]. L'imagerie peut montrer une akinésie avec

dilatation ventriculaire (aspect de Takotsubo), les coronaires étant généralement normales. La crise adrénérgique peut également se manifester par un accident vasculaire cérébral, une ischémie mésentérique, une pancréatite aigüe, une défaillance poly-viscérale ou une acidose lactique.

#### IV. Génétique des PCC et PGL

Les PCC et PGL peuvent avoir une origine génétique dans plus de 40% des cas, que la présentation de la maladie soit familiale ou apparemment sporadique. Les études génétiques menées au cours des 20 dernières années ont permis d'identifier 13 gènes de prédisposition aux PCC/PGL (*RET*, *NF1*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *SDHA*, *TMEM127*, *MAX*, *HIF2A*, *FH*, et *MDH2*) (Tableau 3).

Gène	Localisation	Année	Fréquence
<i>RET</i>	10q11.2	1993	5-7%
<i>NF1</i>	17q11.2	1990	4-6%
<i>VHL</i>	3p25.3	1993	10-12%
<i>SDHx</i>			8-10%
✓ <i>SDHB</i>	1p36.1-p35	2001	
✓ <i>SDHC</i>	1q23.3	2000	
✓ <i>SDHD</i>	11q23	2000	
✓ <i>SDHA</i>	5p15	2010	
<i>SDHAF2</i>	11q12.2	2009	< 1%
<i>TMEM127</i>	2q11.2	2010	2%
<i>MAX</i>	14q23	2011	1-2%
<i>FH</i>	1q42.1	2013	1%
<i>HIF2A</i>	2p21-p16	2013	< 1%
<i>MDH2</i>	7q11.23	2015	< 1%

**Tableau 3 : Les treize gènes de prédisposition au PCC/PGL.** (Localisation chromosomique, année d'identification et fréquence dans la population de patients)

Ces découvertes ont conduit à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de tumorigenèse des PCC/PGL. En effet, il a été possible grâce à des études transcriptomiques non supervisées de classer les PCC/PGL en 2 groupes principaux (Clusters). Dans ces études, le statut génétique des tumeurs était associé à une signature moléculaire particulière, telle que la pseudohypoxie (Cluster 1 A et B) ou l'activation des voies des MAPK ou de mTOR (Cluster 2) (cf Chapitre VI). Ces connaissances ont eu un



impact majeur sur le conseil génétique des patients et de leurs familles, et permettront à l'avenir une prise en charge médicale, clinique et thérapeutique personnalisée des patients atteints [37]. Par ailleurs, les analyses génomiques récentes ont permis de mettre en évidence des mutations somatiques sur différents gènes (*RET*, *NF1*, *VHL*, *MAX*, *HIF2A*, *HRAS*, *ATRX*...) [37-42] dans environ 30% des cas.

### 1. Formes syndromiques

#### a) La néoplasie endocrinienne multiple de type 2

La néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM2) est un syndrome héréditaire associant de multiples tumeurs endocrines dont la prévalence est estimée à 1/20 000 [43].

Il s'agit d'une maladie autosomique dominante à pénétrance complète donc la cause est attribuée depuis 1993 à une mutation activatrice du proto-oncogène *RET* [44].

Il existe 2 formes phénotypiques de NEM2 ayant comme point commun la présence constante d'un carcinome médullaire thyroïdien (CMT) de survenue plus ou moins précoce et qui est responsable du pronostic global de la maladie:

- La NEM 2A ou syndrome de Sipple (OMIM 171400), forme la plus fréquente (60% des cas), associant au CMT la présence d'un PCC dans 20 à 50% des cas et une hyperparathyroïdie primaire (HPT1) dans 5 à 20% des cas.
- La NEM 2B ou syndrome de Gorlin (OMIM 162300), plus rare (5% des NEM2) mais plus sévère avec un CMT pouvant survenir très précocement dans la première année de vie. Il s'y associe un PCC dans près d'un cas sur deux, une dysmorphie Marfanoïde et une ganglioneuromatose digestive et sous-muqueuse (lèvres, langue, paupières). En revanche, l'HPT1 est absente dans cette variante phénotypique [45].

Quelques particularités de ce syndrome concernant les PCC/PGL sont importantes à souligner. En effet, ce syndrome prédispose uniquement au PCC, jamais aux PGL. Les PCC de la NEM2 sont généralement bénins et bilatéraux (Tableau 4). Ils peuvent être la première manifestation de la maladie (25% des cas), synchrones (35% des cas) ou métachrones (40% des cas) au carcinome médullaire thyroïdien. La proportion de mutations *RET* dans les PCC apparemment non syndromiques est plus faible (environ 5 %) que dans les autres syndromes.



Gène	Localisation	PGL multiples	PCC bilatéraux	Jeune âge	Malignité
<i>RET</i>	PH	-	++	++	-
<i>NF1</i>	PH	±	+	-	+
<i>VHL</i>	PCC>PGL-TAP>PGL-ORL	±	+	++	+
<i>SDHB</i>	PGL-TAP>PGL-ORL=PCC	++	+	+	+++
<i>SDHC</i>	PGL-ORL>PGL-TAP=PCC	+	-	±	±
<i>SDHD</i>	PGL-ORL>PGL-TAP>PCC	+++	+	+	+
<i>SDHA</i>	PGL-ORL=PGL-TAP	±	-	±	±
<i>SDHAF2</i>	PGL-ORL	+++	-	±	±
<i>TMEM127</i>	PCC	-	+	-	-
<i>MAX</i>	PCC >> PGL-TAP	+	++	++	+
<i>FH</i>	PGL-TAP > PCC	++	+	+	++
<i>MDH2</i>	PGL-TAP	++	-	±	++

PGL-ORL: paragangliome de la tête et du cou; PGL-TAP: Paragangliome thoraco-abdominopelvien  
MDH2: un seul cas décrit pour le moment dans la littérature

**Tableau 4 : Corrélations génotype/phénotype des principaux gènes impliqués dans les PCC/PGL**

Par ailleurs, il existe une très bonne corrélation génotype-phénotype avec une grande implication pratique en terme de conseil génétique et de traitement [46]. En effet, la NEM de type 2B, la plus sévère en terme de pronostic lié au CMT, est quasiment toujours (97%) associée à une mutation sur l'exon 6 (codon 918), alors que les mutations de la NEM 2A sont plutôt retrouvées dans les exons 10 et 11 (Tableau 5) [47].

<i>RET mutation</i>	<i>Exon</i>	<i>MTC risk level</i>	<i>Incidence of PHEO</i>
G533C	8	MOD	+
C609F/G/R/S/Y	10	MOD	+ / +++
C611F/G/S/Y/W	10	MOD	+ / +++
C618F/R/S	10	MOD	+ / +++
C620F/R/S	10	MOD	+ / +++
C630R/Y	11	MOD	+ / +++
D631Y	11	MOD	+++
C634F/G/R/S/W/Y	11	H	+++
K666E	11	MOD	+
E768D	13	MOD	-
L790F	13	MOD	+
V804L	14	MOD	+
V804M	14	MOD	+
A883F	15	H	+++
S891A	15	MOD	+
R912P	16	MOD	-
M918T	16	HST	+++





**Tableau 5: Corrélations entre les principales mutations du gène *RET* et le risque de CMT, PCC (PHEO).** Adapté d'après Wells et al, 2015 [47]. MOD: Moderate (risque modéré); H : High (risque élevé) ; HST : Highest (risque le plus élevé).

b) La neurofibromatose de type 1 (NF1)

La NF1 ou maladie de Von Recklinghausen (OMIM 162200) est l'une des maladies génétiques parmi les plus fréquentes et touche de 1/4000 à 1/3000 individus, avec une incidence estimée à 1/2500 naissances [48]. Il s'agit d'une affection autosomique dominante et sa pénétrance est quasi complète à l'âge de 20 ans [49]. La NF1 est caractérisée par une très grande variabilité de son expression clinique, que l'on retrouve également au sein d'une même famille [50]. Néanmoins, le diagnostic de la maladie est essentiellement clinique et, dans la majorité des cas, un examen attentif effectué par un médecin connaissant bien la maladie permet de poser le diagnostic. La conférence de consensus du National Institute of Health (USA) a défini, en 1988, sept critères cardinaux pour le diagnostic de NF1 (NIH, 1988). Celui-ci est posé si deux de ces signes sont réunis chez un même individu (Figure 5). Chez l'adulte, le diagnostic est en général facile à poser, mais, chez l'enfant, les tâches café-au-lait peuvent demeurer longtemps le seul signe, et en absence d'antécédents familiaux de NF1, le diagnostic demeure parfois en suspens [51].

Critères cardinaux du diagnostic de NF1	
	➤ Un apparenté du premier degré atteint (parent, fratrie ou enfant)
	➤ Au moins 6 taches café-au-lait de plus de 0,5cm avant ou de plus de 1,5cm après la puberté
	➤ Des lentigines axillaires ou inguinales
	➤ Au moins 2 neurofibromes cutanés quel que soit le type ou au moins un neurofibrome plexiforme
	➤ Un gliome du nerf optique
	➤ Au moins 2 nodules de Lisch
	➤ Une lésion osseuse caractéristique (pseudoarthrose ou dysplasie du phénoïde ou amincissement du cortex des os longs).

Nodules de Lisch		Lentigines		Neurofibromes cutanés Tache café au lait (↖)		Neurofibromes plexiformes (↗)	
------------------	---	------------	---	---	--	-------------------------------	---

**Figure 5 : Critères diagnostiques et principales atteintes extra-surréaliennes de la NF1**

La NF1 prédispose au développement de PCC parfois bilatéraux et malins. Ils seraient présents dans moins de 3% des cas de NF1 à l'âge adulte et exceptionnellement dans l'enfance. Cependant, en raison de la fréquence élevée de la NF1 dans la population, celle-ci serait à l'origine de la survenue d'environ 5% des PCC.

Le gène *NF1*, responsable de la maladie, est localisé sur le bras long du chromosome 17 (17q11.2). Il a été identifié en 1990 [52]. Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur de grande taille (350kb-60 exons). Ce gène est l'un de ceux présentant le plus fort taux de mutations spontanées [53], entraînant une fréquence de néomutations particulièrement élevée (30 à 50%). Ainsi, près de la moitié des patients NF1 ne présentent pas d'histoire familiale de la maladie.

Etant donné la grande taille du gène et le grand nombre de pseudogènes décrits, l'analyse moléculaire du gène *NF1* a été longtemps difficile et le diagnostic de la NF1 reposait essentiellement sur les données cliniques. Le diagnostic moléculaire était le plus souvent réservé aux indications particulières (désir de grossesse et souhait d'un diagnostic prénatal, diagnostic clinique incertain, suspicion clinique chez l'enfant, formes atypiques de la maladie notamment celles évoquant un mosaïcisme) [54]. Ce dernier est désormais facilité par les nouvelles techniques de séquençage (NGS, Next generation sequencing) [55].

Les sujets NF1 doivent faire l'objet tout au long de leur vie d'une surveillance multidisciplinaire, principalement clinique. Il est important de rechercher un PCC devant une symptomatologie évocatrice, mais leur faible fréquence ne justifie pas de bilan systématique. En revanche, devant tout PCC, le diagnostic de NF1 doit être discuté par l'analyse des antécédents familiaux et l'examen clinique soigneux du patient.

c) La maladie de Von Hippel Lindau (VHL)

La maladie de VHL se révèle en général chez l'adulte jeune, entre 18 et 30 ans, mais peut aussi survenir dès l'enfance. En effet, les mutations *VHL* sont détectées chez plus de 40 % des patients pédiatriques porteurs d'un PCC/PGL [56].

Les principales manifestations cliniques sont les hémangioblastomes du système nerveux central (atteignant le cervelet, le tronc cérébral et/ou la moelle épinière) et de la rétine. L'atteinte rénale, volontiers bilatérale et multifocale, se manifeste chez 30 à 70% des sujets par un carcinome du rein à cellules claires (RCC), constituant la principale cause de décès des patients, et/ou par des kystes rénaux. L'atteinte pancréatique regroupe des kystes (30 à 70% des cas) et des tumeurs endocrines (12% des cas), souvent multiples, non fonctionnelles mais présentant un potentiel malin non négligeable [57]. D'autres tumeurs peuvent également survenir, telles des tumeurs du sac endolymphatique et des cystadénomes de l'épididyme chez l'homme ou du ligament large chez la femme.

Le PCC touche 10 à 24% des sujets VHL. Il est parfois bilatéral et malin. Il peut aussi s'agir de PGL extra-surrénaux, rarement localisés dans la région cervicale.

Historiquement, l'étude de grandes familles atteintes a défini deux types de maladie de VHL d'après la fréquence des différentes manifestations cliniques [58]. On distingue ainsi

- Le VHL type 1, dans lequel les patients ne sont pas atteints de PCC/PGL ;
- Le VHL type 2, lui-même subdivisé en 3 sous-types [59, 60], dans lequel les PCC/PGL sont fréquents.
  - ✓ VHL type 2A, dans les familles où l'atteinte rénale et pancréatique est peu présente ;
  - ✓ VHL type 2B, où l'atteinte rénale et pancréatique est fréquente ;
  - ✓ VHL type 2C, non syndromique, caractérisé par la présence exclusive de PCC/PGL.

Le gène *VHL* est un gène suppresseur de tumeur, localisé en 3p25-26, identifié en 1993 [61]. Il est constitué de 3 exons susceptibles de porter des mutations ou d'être emportés au sein de grandes délétions. Une histoire familiale existe dans près de 80% des cas et les mutations *de novo* expliquent environ 20% des cas.

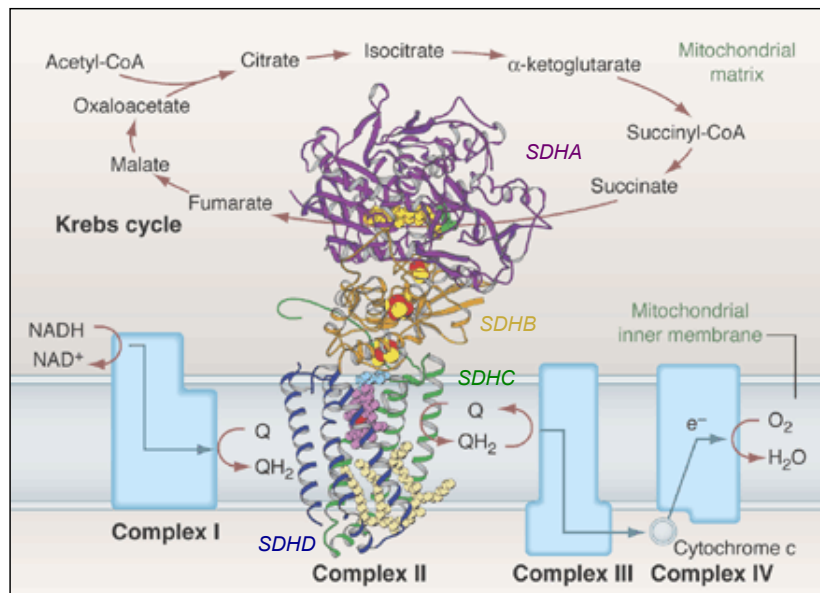
## 2. Formes familiales non syndromiques

### a) Les gènes *SDHx*

Le terme PCC/PGL héréditaire s'applique aux formes secondaires aux mutations constitutionnelles des gènes *SDHx*. La symptomatologie est une association de PCC et/ou de PGL, chez un même patient et/ou au sein d'une même famille. Les localisations peuvent être diverses (PGL de la tête et du cou, PGL thoraco-abdomino-pelvien (TAP), PCC). Dans ces formes familiales, les tumeurs sont de survenue plus précoce, volontiers bilatérales ou multifocales, récidivantes et/ou malignes [4].

### Découverte des gènes *SDHx*

Dans les années 90, des études de liaison génétique menées sur de grandes familles atteintes ont permis d'identifier puis de confirmer l'implication de 3 différents loci (PGL1, 2 et 3) dans la maladie [62-65, 56, 66]. Ce n'est qu'en 2000 que la succinate déshydrogénase (SDH) a été impliquée dans le PCC/PGL héréditaire avec la découverte des premières mutations sur le gène *SDHD* (situé sur le locus PGL1, en 11q23) [67]. L'identification de mutations de *SDHC* (PGL3, situé en 1q21) [68] et *SDHB* (situé sur le locus baptisé, *a posteriori*, PGL4, en 1p36) [69] a rapidement suivi (2000 et 2001). Ces gènes codent pour 3 des 4 sous-unités de la succinate déshydrogénase, ou complexe II mitochondrial. Cette enzyme se situe au carrefour de 2 voies du métabolisme énergétique : le cycle de Krebs où elle est responsable de l'oxydation du succinate en fumarate et la chaîne respiratoire où elle assure la réduction de l'ubiquinone (coenzyme Q). Les sous-unités SDHA et B forment le centre catalytique de l'enzyme, tandis que les sous-unités SDHC et D sont des protéines d'ancrage du complexe dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 6).



**Figure 6 : La succinate déshydrogénase. D'après Hedersted 2003. [70]**

Le locus PGL2, situé en 11q13, a été attribué bien plus tard à une mutation du gène *SDHAF2*, protéine de flavination de la protéine SDHA, nécessaire à l'assemblage du complexe II mitochondrial [71].

L'absence de lien entre les mutations du gène *SDHA* et le développement de PCC/PGL a longtemps fait l'objet d'interrogations, alors que des mutations homozygotes du gène *SDHA* associées au syndrome de Leigh (OMIM 256000), une maladie récessive rare neurodégénérative progressive, avaient été décrites [72]. Ce n'est qu'en 2010 que l'implication du gène *SDHA* dans le développement de PGL sera établi, suite à l'identification par mon équipe d'accueil de la première mutation de ce gène chez une patiente atteinte d'un PGL abdominal [73].

Le diagnostic génétique des gènes *SDHx* peut être guidé par l'immunohistochimie (IHC) des protéines SDHB, SDHA et SDHD dans le tissu tumoral après son exérèse chirurgicale. Ainsi, il a été démontré qu'un immunomarquage négatif pour la protéine SDHB mais positif pour la protéine SDHD est associé à la perte de l'activité du complexe SDH et donc à la présence d'une mutation dans l'un des gènes *SDHx* [74, 75]. Au contraire, une perte d'expression de SDHA ne s'observe que dans les tumeurs porteuses d'une mutation spécifiquement sur ce gène [76].

#### Corrélations génotype/phénotype

Les mutations sur les gènes *SDHx* prédisposent à des formes multiples associant des PCC et des PGL pouvant se développer de la base du crâne jusqu'au dôme vésical, avec

quelques particularités en fonction des sous-unités (Tableau 4). Les PCC/PGL *SDHD*-dépendants sont généralement multiples, souvent localisés dans la tête et le cou, et rarement malins. Par ailleurs, le gène *SDHD* (ainsi que le gène *SDHAF2*) est soumis à empreinte génomique maternelle, impliquant une possible transmission de la maladie uniquement par la branche paternelle [77]. La pathologie associée à des mutations *SDHB* se présente, quant à elle, le plus souvent sous la forme d'une tumeur unique thoraco-abdomino-pelvienne. Cependant, le dépistage systématique par imagerie mené lors de l'étude PGL.EVA a révélé que plus de la moitié des sujets *SDHB* présentaient aussi des PGL cervicaux [78]. Il a été établi que l'identification d'une mutation *SDHB* est un facteur de risque de malignité [79] et de mauvais pronostic [80]. Les mutations de *SDHC* sont, pour des raisons inconnues, plus rarement décrites, mais la pénétrance de la maladie est importante chez les porteurs d'une mutation *SDHC*, qui peuvent développer l'ensemble des manifestations de la maladie [81]. Enfin, les mutations des gènes *SDHA* et *SDHAF2* apparaissent bien plus rares. De très rares mutations de *SDHAF2* ont été décrites, notamment une mutation faux-sens dans deux familles présentant une symptomatologie multifocale exclusivement au niveau de la tête et du cou et un âge précoce d'apparition de la maladie [82-84]. Bien que la participation du gène *SDHAF2* à la génétique des PCC/PGL semble relativement mineure, le génotypage de ce gène doit être considéré chez un patient atteint de PGL multiples de la tête et du cou, pour lequel un dépistage des gènes *SDHD*, *SDHB* et *SDHC* s'est avéré négatif, mais dont la tumeur présente un immunomarquage *SDHB* négatif et ce, d'autant plus en cas d'histoire familiale dans la branche paternelle. De la même façon, le gène *SDHA* semble impliqué dans moins de 2% des cas de PCC/PGL et son génotypage ne doit par conséquent être envisagé que dans des cas très précis, guidés par l'immunohistochimie (immunomarquages *SDHB* et *SDHA* négatifs) [76].

#### Implication des gènes *SDHx* dans d'autres types de cancers

Depuis la mise en évidence de leur rôle dans le développement des PCC/PGL, les gènes *SDHx* ont été impliqués dans d'autres types de tumeurs avec un lien de causalité plus ou moins bien démontré.

Les deux principales tumeurs dont la tumorigenèse peut-être reliée au déficit SDH sont les GIST (tumeurs stromales gastro-intestinales) et les cancers rénaux à cellules claires (RCC).



La grande majorité des GIST présente des mutations somatiques activatrices sur les gènes *KIT* ou *PDGFRA* [85]. Des mutations sur les gènes *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* ont tout d'abord été décrits dans des cas de « dyade de Carney-Stratakis », syndrome héréditaire de transmission autosomique dominante (OMIM 606864) qui associe GIST multifocaux et PGL multiples [86-88]. Plus récemment, des mutations *SDHx* ont été retrouvées dans des cas de GIST isolés [89], avec notamment une large participation des mutations somatiques *SDHA* (jusqu'à 10% des GIST non-mutés sur *c-KIT* ou *PDGFRA*) et d'épimutations de *SDHC* [90-93].

La première description de RCC secondaires à une mutation *SDHB* est attribuable à Neumann et coll. en 2004, qui ont rapporté les cas de 2 patients issus d'une même famille, parmi une cohorte d'une cinquantaine de patients avec mutation *SDHB* [94]. La causalité de cette mutation avait été confirmée par l'association à une LOH au locus *SDHB* dans la tumeur. Par la suite, plusieurs cas cliniques de RCC ont été rapportés [95, 96] jusqu'à l'étude en 2010 d'une large cohorte de patients *SDHB* estimant la prévalence des tumeurs rénales à 3,7% (11/295), mais sans véritable preuve de l'implication du déficit SDH dans la tumorigenèse de ces lésions (absence d'analyse de l'ADN tumoral et d'IHC) [97]. Par ailleurs, même si la mutation *SDHB* semble dominer le spectre des tumeurs rénales, quelques rares cas ont été décrits chez des patients porteurs de mutations *SDHC* et *SDHD* et atteints de PCC/PGL [97-99].

Enfin, de nombreux cas isolés d'association de mutations *SDHx* avec des tumeurs fréquentes et variées (adénomes pituitaires, cancer thyroïdiens différenciés, neuroblastome, ...) ont été rapportés sans réelle preuve définitive d'un lien de causalité direct [97, 94, 100-105]. Un seul cas clinique d'adénome hypophysaire produisant un excès d'hormone de croissance (Growth Hormone, GH) a été associé à une mutation nouvellement décrite sur le gène *SDHD* avec perte LOH et absence d'expression de *SDHD* par western blot dans la tumeur [103]. En revanche, dans l'étude la plus récente réalisée par l'équipe du NIH, décrivant un nouveau syndrome associant adénomes hypophysaires, PCC et PGL chez 3 patients avec mutation *SDHx* et adénomes pituitaires familiaux [104], aucune étude fonctionnelle n'était disponible. Les auteurs faisaient reposer la causalité des mutations *SDHx* dans ce nouveau syndrome sur l'observation d'hyperplasie hypophysaire dans un modèle de souris *Sdhb*<sup>+/-</sup>, qui ne développe ni PCC ni réel adénome pituitaire.



## b) Les PCC familiaux

Le gène *TMEM127*

Le gène *TMEM127*, situé sur le chromosome 2q11, a été identifié comme un gène de susceptibilité au PCC en 2010 [106]. Il code pour une protéine transmembranaire de 238 acides aminés dont les premières données obtenues *in vitro* suggèrent une implication dans le trafic protéique intracellulaire et/ou dans le recyclage des protéines de l'endocytose. *TMEM127* semble également jouer un rôle dans l'inhibition de la signalisation mTOR [106]. Les études génétiques indiquent que les patients porteurs de mutations *TMEM127* représenteraient une faible proportion des patients atteints de PCC (environ 2% des cas sans autre mutation identifiée), mais tout comme pour les mutations de *RET* et *NF1*, *TMEM127* ne prédisposeraient pas au développement de PGL. Les premières associations génotype/phénotype montrent un âge moyen à la présentation (42 ans) similaire à celui des cas sporadiques et plus élevé que chez la plupart des porteurs d'une mutation dans un gène de susceptibilité [107, 108].

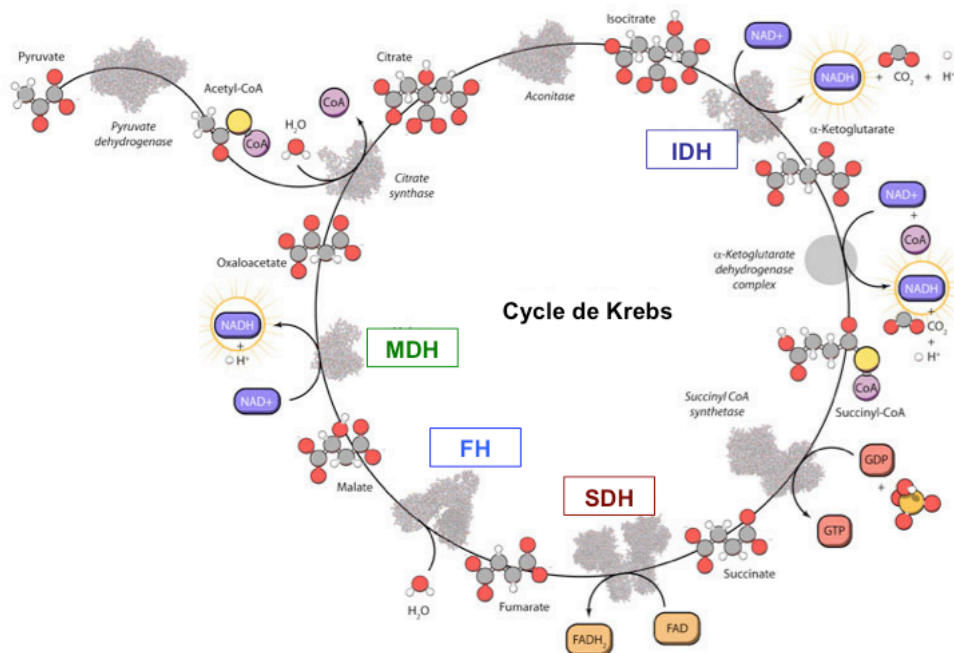
Le gène *MAX*

*MAX* (*Myc-associated factor X*) a été identifié comme prédisposant au PCC/PGL en 2011 [109]. *MAX* est un membre clé de la famille des facteurs de transcription *MYC/MAX/MXD1* (*MAX dimerization protein-1*) qui régule la croissance cellulaire, la prolifération et la biologie des cellules souches. *MAX* se comporte comme un antagoniste de la transformation cellulaire dépendante de *MYC* [110]. De façon intéressante, il avait été montré précédemment que les cellules issues de PCC de la lignée de rat PC12 portent une mutation homozygote inactivatrice de *Max*. Une large étude multicentrique a par la suite été réalisée sur plus de 1500 patients et a montré l'implication de *MAX* dans environ 1% des cas. *MAX* semble prédisposer aux PCC, souvent multiples et bilatéraux, parfois malins, chez des patients relativement jeunes (médiane de survenue 34 ans) [111]. Tous les patients porteurs présentaient un PCC avec, dans un certain nombre de cas (15,8%), des PGL Thoraco-abdominopelviens (TAP) additionnels.

3. Les autres gènes du cycle de Krebs

Les deux derniers gènes identifiés dans la prédisposition aux PCC/PGL sont des gènes impliqués dans le cycle de Krebs. En effet, après avoir ouvert une nouvelle voie dans la compréhension de la tumorigenèse, la découverte des gènes *SDHx* a été rapidement

suivie par l'identification de mutations dans le gène *FH* (codant pour la fumarate hydratase ou fumarase), responsables d'une prédisposition aux léiomyomes cutanés et utérins et au cancer du rein [112], dont mon équipe d'accueil a récemment démontré l'implication dans les PCC/PGL. En 2008, des mutations somatiques ont été décrites sur les gènes *IDH1* et *IDH2* (codant respectivement pour les formes cytoplasmique et mitochondriale de l'isocitrate déshydrogénase) dans les gliomes de grades II-III et les glioblastomes multiformes (GBM) [113]. En 2015, une quatrième enzyme du cycle de Krebs, la malate déshydrogénase, a rejoint le rang des gènes de prédisposition aux PCC/PGL avec l'identification des mutations du gène *MDH-2* [114, 115] (Figure 7).



**Figure 7 : principaux gènes du cycle de Krebs impliqués dans le développement de PCC/PGL**

#### a) Les gènes *IDH*

Les gènes *IDH1* et *IDH2* codant pour l'isocitrate déshydrogénase qui catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α-cétoglutarate (αKG), ont été identifiés dans une majorité de glioblastomes multiformes, mais aussi dans d'autres types de tumeurs gliales, de leucémies myéloïdes aiguës et de cancers de la thyroïde [116-118] (Figure 7). Les mutations rapportées sont des mutations ponctuelles touchant quasi exclusivement le résidu Arg132 de *IDH1* ou son homologue Arg172 de *IDH2*, correspondant au site de liaison de l'enzyme avec son substrat l'isocitrate. Ces

mutations entraînent une incapacité de l'enzyme à produire de l' $\alpha$ -cétoglutarate et s'accompagnent d'un gain de fonction de la protéine IDH mutante qui, devenue très affine pour le NADPH, acquiert alors la capacité de transformer l' $\alpha$ -cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2HG), entraînant ainsi une augmentation importante du stress oxydatif cellulaire [119].

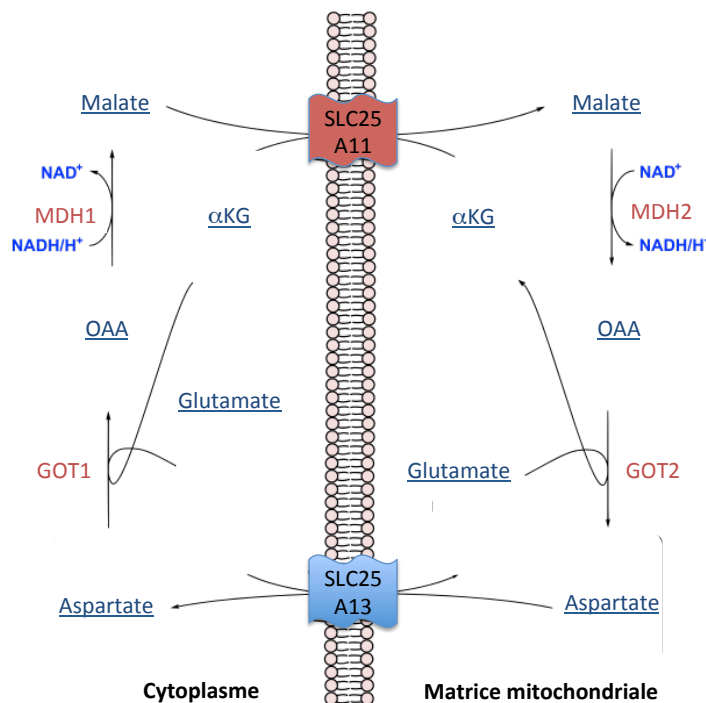
Néanmoins, les gènes *IDHx* ne semblent pas impliqués dans la tumorigenèse spécifique des PCC/PGL, une seule mutation somatique d'*IDH1* ayant été retrouvée sur une collection de 365 tumeurs [120].

### c) Le gène *FH*

Le gène *FH*, situé en 1q42.3-q43, code pour la fumarate hydratase ou fumarase, enzyme située juste en aval de la SDH dans le cycle de Krebs (Figure 7) et responsable de l'hydratation du fumarate en malate. Les mutations sur le gène *FH* prédisposent chez l'homme au syndrome des léiomyomes cutanés et utérins multiples (MCUL, multiple cutaneous and uterin leiomyomata, OMIM 150800) [112, 121]. Cette pathologie de transmission autosomique dominante associe des tumeurs bénignes des tissus mous se développant aux dépens des muscles lisses (léiomyomes), principalement au niveau de la peau et de l'utérus. Certains patients ont également un risque de kystes rénaux, de carcinomes rénaux papillaires de type 2 (HLRCC, hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer) [122], et de léiomyosarcomes [123, 112, 121]. Depuis 2013, grâce aux travaux de mon équipe d'accueil, ce gène est également impliqué dans des cas exceptionnels de PCC/PGL [114]. Ce lien entre mutation sur le gène *FH* et PGL a pu être mis en évidence après séquençage de l'exome d'un patient dont le phénotype moléculaire tumoral était très proche de celui des tumeurs SDHx, retrouvant une mutation constitutionnelle hétérozygote associée à une mutation somatique au niveau de l'ADN tumoral. Par la suite, deux études de cohortes ont été publiées en 2014 : la première a été réalisée en collaboration entre mon équipe d'accueil et une équipe espagnole sur près de 600 patients porteurs de PCC/PGL sans mutation identifiée [124] et la seconde, britannique, portait sur 71 patients [125]. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une faible prévalence de ces mutations (1%) mais surtout un phénotype « *SDHB-like* » avec un risque de malignité augmenté [124].

d) Le gène *MDH2*

La malate déshydrogénase ou MDH, intervient en aval de la fumarate hydratase dans le cycle de Krebs. Elle catalyse l'oxydoréduction du L-malate en oxaloacetate (OAA) (Figure 8). Tout comme IDH, cette enzyme possède 2 isoformes codées par 2 gènes distincts, l'une cytosolique (MDH1) et l'autre mitochondriale (MDH2). La forme cytosolique MDH1 intervient dans la navette malate-aspartate, mécanisme de transport de molécules à travers la membrane mitochondriale interne permettant de transférer le NADH, H<sup>+</sup> issu de la glycolyse produit dans le cytosol vers la matrice mitochondriale en régénérant le NAD<sup>+</sup> du cytosol (Figure 8).



**Figure 8 : La navette malate-aspartate**

Pour le moment, seule est décrite la mutation princeps découverte par l'équipe de *Robledo et al.* à Madrid grâce à une stratégie de séquençage d'exome d'un patient de 55 ans porteur de PGL multiples avec histoire familiale [115]. Ce patient était porteur d'une mutation à l'état hétérozygote de *MDH2* au niveau germinal avec perte d'hétérozygotie dans ses 2 tumeurs analysées. La mutation perte de fonction *MDH2* est bien accompagnée d'une baisse de l'expression protéique et de l'activité enzymatique de MDH2 mais, de façon étonnante, aucune accumulation de malate n'a pu être observée. En revanche les auteurs retrouvent une accumulation de fumarate (augmentation du

rapport fumarate/succinate) et une hyperméthylation de l'ADN avec un profil d'expression génique de type « Cluster 1A » (cf Chapitre VI) comme les tumeurs *SDHx* [115]. Des travaux en cours suggèrent une prévalence assez faible de ces mutations *MDH2*.

#### 4. Prédisposition ou génétique somatique ? Le cas du gène *HIF2A*

La première description d'une mutation activatrice de *HIF2A* a été décrite en 2012 chez 2 patients sans lien de parenté souffrant depuis l'enfance de polyglobulie associée à la présence de multiples PGL de survenue précoce [126]. Néanmoins, en l'absence de mutation retrouvée dans les tissus sains, il a été conclu que ces 2 patients étaient porteurs d'une mutation somatique en mosaïque de *HIF2A* de survenue post-zygotique et non germinale [126]. Par la suite, d'autres équipes ont confirmé la présence de mutations somatiques mosaïques de *HIF2A* chez des patients, le plus souvent jeunes, avec PCC/PGL multiples parfois associés à des somatostatinoïdes [127, 128] et même un cas de mosaïque germinale (détecté par séquençage en profondeur) avec risque de transmission à la descendance [129]. Néanmoins, un cas de mutation germinale de *HIF2A* a été retrouvé chez un patient atteint de polyglobulie, PGL multiples et chez sa mère asymptomatique âgée de 83 ans [130]. Ce dernier reste cependant isolé pour le moment, les études à plus grandes échelles publiées par la suite ayant confirmé l'implication de mutations activatrices de *HIF2A*, mais uniquement au niveau somatique avec ou sans mosaïque [131, 132].

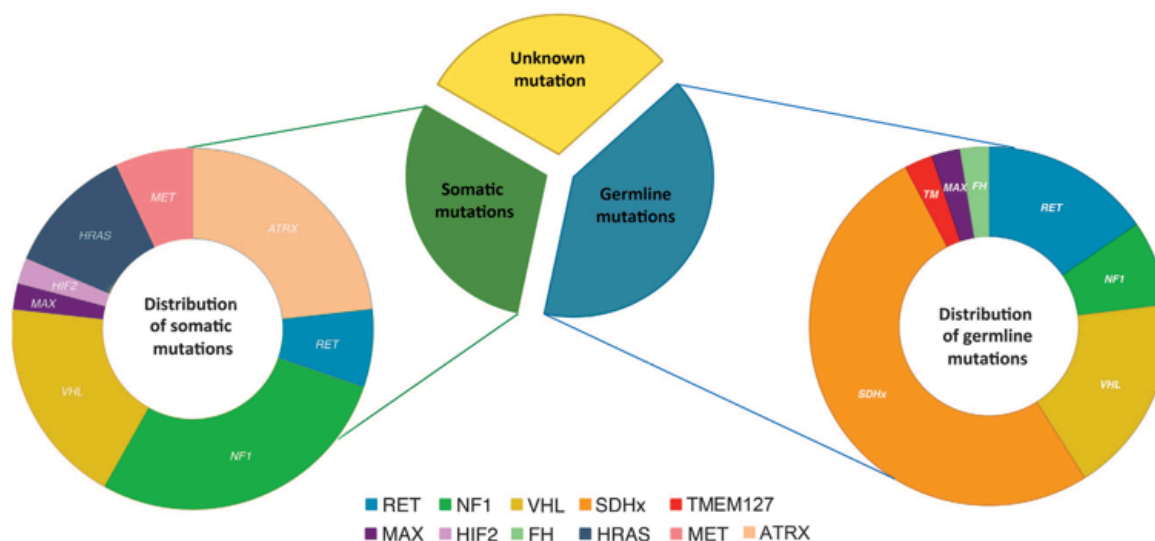
#### 5. Génétique somatique

En parallèle des 40% de formes avec mutation génétique constitutionnelle, des mutations somatiques sont retrouvées dans au moins 30% des PCC/PGL, menant aujourd'hui à l'identification de la cause génétique du développement tumoral dans 70% des cas (Figure 9).

De façon intéressante, les gènes impliqués dans des mutations somatiques sont pour la plupart les mêmes que les gènes de prédisposition classiques, à l'exception des gènes *SDHx*, uniquement mutés au niveau de l'ADN germinale. Par ailleurs, ces mutations sont, sauf très rares exceptions, mutuellement exclusives, renforçant encore le rôle de ces gènes dans la tumorigenèse des PCC/PGL.

Ce sont initialement les études transcriptomiques [42, 133-135], parfois suivies de séquençage d'exomes qui ont permis d'identifier des mutations somatiques sur les gènes

*VHL* dans les tumeurs sporadiques appartenant au cluster 1B, alors que le cluster 2A contenaient des tumeurs avec mutations somatiques sur *RET*, *NF1* et au niveau de « hotspot » du gène *HRAS* [41, 42, 38, 136, 39]. Encore une fois, aucune mutation somatique isolée n'a été décrite comme responsable de la tumorigenèse des PCC/PGL se classant dans le cluster 1A avec les *SDHx*.



**Figure 9 : Contributions estimées des mutations constitutionnelles et somatiques des gènes de prédisposition aux PCC/PGL. D'après Castro-Vega 2015 [137]**

Les mutations initialement décrites par Crona et coll [39] sur le gène *H-RAS* sont des mutations activatrices responsables d'une activation de la voie de prolifération et survie cellulaire des MAPK et PI3K/AKT/mTOR. Par la suite, une étude à plus grande échelle a permis d'estimer la prévalence de ces mutations à 5% des cas [138].

Enfin, 2 grandes études récentes ont étudié spécifiquement les altérations somatiques présentes dans les PCC/PGL, dont une étude provenant de notre équipe et ayant fait l'objet de l'article 7 présenté en annexe de ce manuscrit [136, 139]. La première constatation est la faible proportion de mutations dans ces tumeurs (0,3 mutations par Mb), de l'ordre de celle retrouvée dans les cancers pédiatriques, notamment ceux dérivant des cellules de la crête neurale (neuroblastomes, médulloblastomes, épendymomes) [137]. Un second élément particulièrement important est que la plupart des altérations sont trouvées au niveau des classiques transitions C>T, suggérant l'absence d'implication de carcinogènes environnementaux. Enfin, ces deux études ont permis de mettre en évidence des mutations sur des gènes souvent impliqués dans d'autres types de cancers et jusque là non encore impliqués dans la tumorigenèse des

PCC/PGL, comme *TP53*, *CDKN2A*, *CDH1*, *MLL2*, *ATRX*, *FHIT*, et *MET* ainsi que *MSH3*, *MLL3*, *STAG2*, *PALB2* et *STAT3* (pour revue voir article 6 des annexes) [137]. Le rôle important des mutations *ATRX* dans la génomique des PCC/PGL a été confirmé, avec une implication au niveau somatique dans plus de 12% des cas et même parfois en association avec une mutation germinale *SDHx* [140].

## V. Prise en charge thérapeutique

### 1. Traitement médicamenteux symptomatique

Le traitement de référence des PCC/PGL sécrétants est la chirurgie. Le problème est celui de l'extrême variabilité tensionnelle per opératoire, liée aux décharges catécholaminergiques secondaires à la mobilisation tumorale par le chirurgien.

La prémédication des patients a diminué le taux de mortalité péri-opératoire à moins de 3% [141]. Elle doit être débutée 7 à 15 jours avant l'intervention chirurgicale. Elle repose sur une expansion volémique (par du sérum physiologique) afin de limiter les risques de choc hypovolémique post opératoire, et sur le blocage des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques [20]. La phénoxybenzamine est l'alpha bloquant le plus utilisé mais il n'est pas commercialisé en France. Il est donc usuel d'utiliser la prazosine. Ce traitement doit être introduit à faible posologie, en augmentant progressivement les doses à cause du risque d'hypotension sévère. Les  $\alpha$ -bloquants étant inotrope positif, il est habituel de leur adjoindre des bêtabloquants, qui ne seront introduit que dans un second temps, lorsque la fréquence cardiaque commence à s'élever. Les dihydropyridines sont également utilisées dans certains centres. Il n'existe pas à ce jour d'études randomisées qui permettent d'établir un consensus.

### 2. Traitement chirurgical

L'intervention consiste en une surrénalectomie totale unilatérale, généralement sous cœlioscopie pour les PCC et en une tumorectomie pour les PGL. Le risque opératoire réside dans les fluctuations tensionnelles, mais aussi dans les fluctuations du rythme cardiaque et le risque hémorragique, car ces lésions sont souvent très vascularisées, notamment quand elles s'intègrent dans un contexte de PGL héréditaire lié à *VHL* ou *SDHx*. Pour les tumeurs de la tête et du cou, il existe un risque supplémentaire locorégional étant donné la présence de vaisseaux et de nerfs à proximité, voire même parfois intriqués dans la tumeur, alors que le risque lié à la sécrétion est quasiment nul.



Les recommandations actuelles préconisent une laparotomie pour les lésions de grande taille (plus de 6 cm), pour les PCC/PGL invasifs et pour les PGL de la tête et du cou [20]. Dans les formes familiales, la tumorectomie peut être proposée dans les PCC de petite taille pour éviter l'insuffisance surrénale chirurgicale secondaire à la surrénalectomie bilatérale. La chirurgie épargnant le cortex surrénal permet de sursoir au traitement substitutif en hydrocortisone et fludrocortisone dans 90% mais augmente le risque de récurrence sur la partie de la surrénale restante [142, 143].

### 3. Traitement par radiothérapie

Non indiqué pour les PCC/PGL sécrétants, la radiothérapie externe est une option intéressante dans la prise en charge des PGL de la tête et du cou, notamment dans les formes de la base du crâne ayant une morbidité chirurgicale importante [144]. Des études récentes ont montré qu'elle permet une stabilisation à 10 ans de la taille de la tumeur dans 96% des cas [145]. Le traitement radiochirurgical par Gamma-knife a également montré une très bonne efficacité mais est indiqué pour les PGL de petite taille [146]. La radiothérapie doit donc être discutée avant de décider d'une intervention chirurgicale dans les formes de la tête et du cou.

### 4. Prise en charge post-opératoire

En post-opératoire, les patients sont souvent pris en charge en réanimation chirurgicale pendant 24 à 48 heures pour prévenir le risque d'hypotension et d'hypoglycémie. L'hypotension est liée à la réduction brutale du taux de catécholamines circulantes avec persistance du blocage des récepteurs  $\alpha$ . Lorsque le remplissage et l'hydratation sont inefficaces, il est parfois nécessaire d'ajouter un traitement par adrénaline.

Le suivi à distance de l'intervention n'est pas encore bien codifié en l'absence de grande étude prospective sur ce sujet. Une revue systématique de la littérature, à laquelle je participe en collaboration avec le service d'hypertension artérielle de l'HEGP, est en cours et des recommandations vont être publiées début 2016 sous l'égide de la Société Européenne d'Endocrinologie (ESE, European Society of Endocrinology). A l'heure actuelle, à distance de l'intervention (environ 3 mois), le dosage des métanéphrines et l'imagerie sont effectués afin de vérifier qu'il n'existe pas de tumeur sécrétante résiduelle.

Après la résection d'un PCC/PGL, la plupart des patients sont normo-tendus avec une sécrétion physiologique de catécholamines. Les exceptions sont les cas de résection



incomplète, d'omission d'une deuxième tumeur, d'inoculation du péritoine par une rupture capsulaire au cours de la chirurgie, ou la présence d'une métastase [147, 148]. Le cas particulier des PCC/PGL malins est traité à la fin de ce chapitre.

## VI. Tumorigenèse des PCC/PGL

De nombreuses études de cohortes réalisées sur des collections tumorales indépendantes à travers le monde ont permis la réalisation de grandes études génomiques [133-135, 42, 149].

Comme évoqué précédemment, les profils transcriptionnels dévoilés grâce à ces études ont permis de classer de façon non-supervisée les PCC/PGL en 2 sous-groupes principaux: le Cluster 1 caractérisé par une augmentation de l'angiogenèse et une activation constitutive des voies de l'hypoxie appelée "pseudo-hypoxie", et le Cluster 2 activant de façon prédominante la voie de signalisation kinase-dépendante.

Le Cluster 1 regroupe toutes les tumeurs avec mutations *SDHx*, *VHL*, *FH* et *HIF2A* [114, 124]. Le Cluster 2 comprend les tumeurs secondaires aux mutations sur les gènes *RET*, *NF1*, *TMEM127* et *MAX*, ainsi que la plupart des tumeurs sporadiques.

### 1. Le cluster 1 et la voie de la « pseudo-hypoxie »

Les gènes surexprimés dans ce cluster participent notamment à la voie de signalisation de l'hypoxie qui stimule, entre autres, l'angiogenèse, la prolifération et la glycolyse [149].

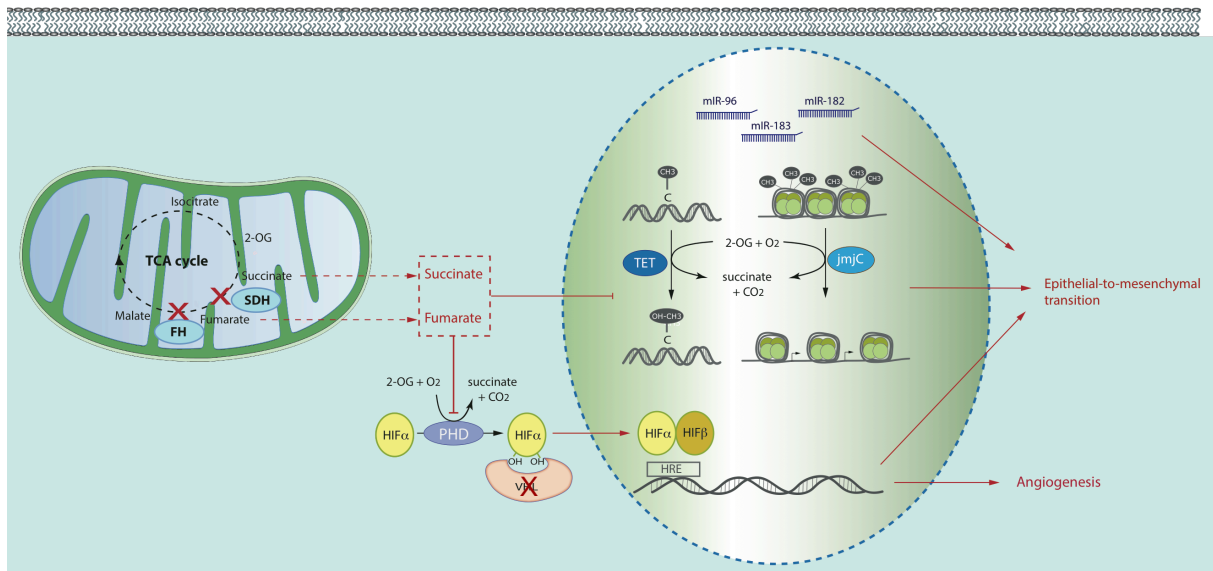
#### a) Tissu spécificité de la réponse hypoxique

Il existe un lien physiopathologique important entre l'hypoxie et les PCC/PGL. En effet, chez les mammifères certaines cellules réceptrices spécialisées sont capables de détecter les variations de pression partielle en oxygène ( $pO_2$ ), permettant à l'organisme de s'adapter à la vie dans des conditions de  $pO_2$  basse (hypoxie). Ces cellules sont localisées au niveau des chémorécepteurs comprenant : les glomus carotidiens, les corps neuroépithéliaux pulmonaires, les cellules chromaffines de la médullosurrénale fœtale et les cellules musculaires lisses vasculaires. Les premiers liens directs entre PCC/PGL et hypoxie ont pu être établis dans les populations vivant en altitude avec notamment l'observation au début des années 70 d'une forte incidence de PGL du glomus carotidien chez des sujets vivant dans la Cordillère des Andes au Pérou [150].

b) Conséquences fonctionnelles des mutations *VHL*, *SDHx*, *HIF-2A* et *FH*

Le mécanisme moléculaire responsable de la réponse cellulaire à l'hypoxie a commencé à être mis en évidence à la fin des années 90 puis démontré en 2001 simultanément par les équipes de Peter Ratcliffe et de William Kaelin [60, 151]. Ainsi, la réponse hypoxique est médiée par l'activation des facteurs de transcription spécifiquement induits par l'hypoxie HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  (Hypoxia Inductible Factors). En conditions de normoxie, les protéines HIF $\alpha$  sont polyubiquitinés par la protéine pVHL qui code pour une ubiquitine ligase E3, ce qui conduit à leur dégradation rapide par le protéasome. Cette reconnaissance par pVHL n'est possible que si les HIF $\alpha$  sont hydroxylés sur 2 prolines par des enzymes de la famille des dioxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate (2-OG), les prolyl-hydroxylases (PHD). Cette réaction d'hydroxylation utilise l'O<sub>2</sub> comme substrat et est donc inhibée en conditions d'hypoxie. Les HIF $\alpha$  sont alors stabilisés et transloqués au noyau où ils peuvent induire l'expression de centaines de gènes cibles impliqués dans l'adaptation cellulaire et tissulaire à l'hypoxie.

Dans les tumeurs du Cluster 1, un phénomène dit de "pseudo-hypoxie" est secondaire à la capacité des cellules mutées sur les gènes *SDHx*, *HIF2A*, *FH* et *VHL* à stabiliser les HIF $\alpha$ , même en conditions normoxiques (Figure 10). Ainsi, les mutations perte de fonction sur le gène *VHL* entraînent une stabilisation anormale des HIF $\alpha$  en conditions normoxiques. De même, dans les tumeurs liées à une mutation sur l'un des gènes *SDHx*, il a été démontré que l'inactivation de la succinate déshydrogénase conduit à l'accumulation de succinate qui agit comme un inhibiteur compétitif du 2-OG et inhibe l'hydroxylation des HIF par les PHD [152, 153]. Ainsi, même en présence d'oxygène, les protéines HIF $\alpha$  non hydroxylées ne peuvent être reconnues par la protéine pVHL, ne sont plus dégradées dans le protéasome et activent l'angiogenèse, le métabolisme glucidique et la prolifération (Figure 10). L'accumulation de succinate a également été impliquée, grâce à des travaux de mon équipe d'accueil, dans l'inhibition d'enzymes déméthylant l'ADN (TET déméthylases) et les histones (JmJC), l'ensemble aboutissant à un phénotype hyperméthylateur de l'ADN dans ces tumeurs avec pour conséquences d'importantes diminutions d'expression de certains gènes [114]. C'est ce phénomène d'hyperméthylation qui est responsable, comme évoqué plus haut, du phénotype noradrénergique des PCC/PGL *SDHx* et *VHL*-dépendant par inhibition de l'enzyme PNMT responsable de la transformation de la NA en A.



**Figure 10 : Conséquences fonctionnelles des mutations *SDH*, *FH*, *VHL* et *HIF2A*.**

Adapté d'après Morin 2014 [154]

Dans les tumeurs du rein secondaires à un déficit en FH, l'accumulation de fumarate conduit également à une stabilisation des HIF $\alpha$  et à une pseudo-hypoxie [155]. En effet, tout comme le succinate, le fumarate agit comme un oncométabolite en inhibant les PHD par compétition avec le 2-OG [155]. Néanmoins, cette pseudo-hypoxie n'expliquerait pas à elle seule la tumorigenèse FH-dépendante dans les cellules rénales. En effet, pour une raison non encore complètement élucidée, l'inactivation de HIF1 $\alpha$  dans le modèle murin inactivé pour le gène *FH* ne réverse pas le phénotype mais, à l'inverse, l'aggrave [156]. Les conséquences fonctionnelles des mutations *FH* dans les PGL n'ont pas pu être aussi bien étudiées. En effet, moins de 10 patients atteints de PGL ont été identifiés comme porteurs de telles mutations [124, 125]. Néanmoins, parmi eux, un patient a eu une analyse transcriptomique de sa tumeur, le classant avec les *SDHx* dans le cluster 1A [42] caractérisé par l'activation des voies de la pseudo-hypoxie et par un phénotype d'hyperméthylation de l'ADN et des histones [114].

Enfin, les mutations décrites sur *HIF-2A* sont des mutations activatrices. Elles surviennent sur, ou à proximité des exons codant pour les résidus des prolines hydroxylées par les PHD (Pro531, Ala530) et donc impliquées dans la stabilisation de HIF2 $\alpha$  ou dans la liaison de HIF2 $\alpha$  avec l'ADN (Ser71) [41, 127, 132, 128, 126].

### c) Implication de la pseudo-hypoxie dans la tumorigenèse des PCC/PGL

Les conséquences fonctionnelles de la pseudo-hypoxie sont nombreuses et susceptibles de participer à la tumorigenèse à plusieurs niveaux. Les HIF $\alpha$  sont des facteurs de transcription capables d'induire une grande variété de gènes cibles (Figure 11) impliqués dans les voies de régulation cellulaires diverses comme l'angiogenèse, la prolifération tumorale, le métabolisme énergétique, la survie et la migration cellulaires.

#### Apoptose et prolifération

Les deux mécanismes principaux de la croissance tumorale sont la stimulation de la prolifération cellulaire et l'échappement aux voies de régulation de la mort cellulaire programmée ou apoptose.

L'implication de l'hypoxie dans la régulation de ces fonctions est complexe, les HIF $\alpha$  ayant été associés à la fois à des effets pro- ou anti- prolifératif et apoptotiques. Les discordances observées concernant le lien entre ces processus et l'hypoxie sont très probablement liées à des régulations très fines reposant sur des variations étroites des niveaux d'oxygène mais aussi sur la spécificité tissulaire de la sensibilité à l'hypoxie [157-160]. Par ailleurs, ces différences relèvent également du sous-type de HIF $\alpha$  impliqué (Tableau 5). HIF1 $\alpha$ , par exemple, augmente l'expression de *BNIP3* [161], un membre de la famille Bcl-2 et module la stabilisation de p53, ces 2 phénomènes conduisant à la mort cellulaire par apoptose. A l'inverse, *BNIP3* est inhibé par HIF2 $\alpha$  dans les cellules de cancer du rein à cellules claires (RCC) [162].

De la même façon, HIF2 $\alpha$  stimule l'expression de la cycline D1, la principale cycline de la régulation du cycle cellulaire, en charge de la transition la phase G1 en S [162], alors que HIF1 $\alpha$  n'a pas d'action sur cette cycline mais régule l'expression de la cycline G2 dont l'action est anti-proliférative. Dans les PCC/PGL, *BNIP3* est sous-exprimé dans les tumeurs avec mutation sur le gène *SDHB* et *HIF2A*, suggérant un rôle de cette voie de signalisation dans le caractère particulièrement sévère de ces tumeurs [163].

HIF-2 $\alpha$ > HIF-1 $\alpha$	VEGF, VEGFR-2, Tie-2 LOX, LOXL2 Cyclin D1 COX4-I2
HIF-1 $\alpha$ > HIF-2 $\alpha$	BNIP3 HK-2, GPI, PFK, ALDO A, ALDO C, TPI, GAPDH, PGK-1, PGM-1, ENO-1, LDHA PDK-1

**Tableau 6 : Régulation différentielle des gènes cibles par HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ . D'après Favier et Gimenez-Roqueplo, 2010 [164]**

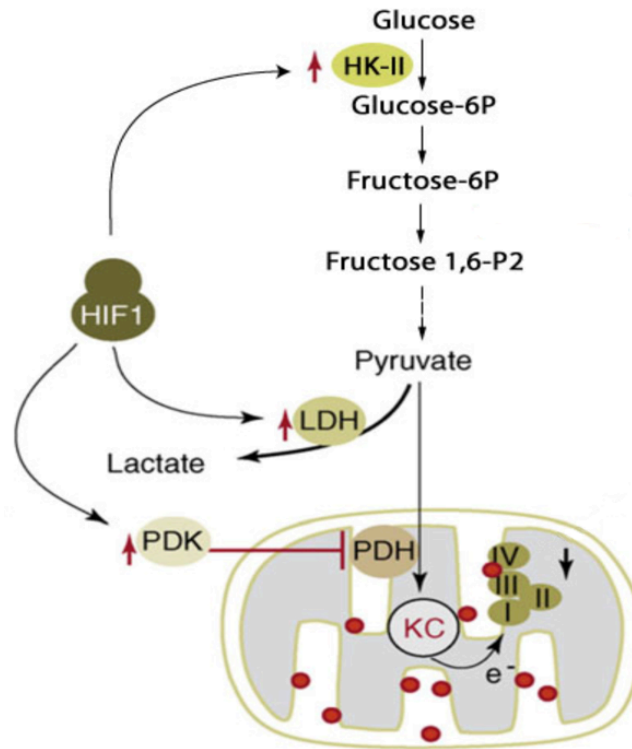
### Angiogenèse

L'un des premiers liens identifiés entre l'activation des HIF $\alpha$  et le développement tumoral est l'induction de l'angiogenèse [158]. En effet, les HIF $\alpha$  modulent l'expression de plusieurs facteurs pro-angiogéniques capables d'induire le développement de néovaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Parmi ces cibles, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et ses récepteurs ainsi que le couple angiopoiétine-2/Tie2 semblent jouer un rôle important dans l'initiation de ce phénomène de néovascularisation. De façon intéressante, les études menées *in vitro* sont en faveur d'une régulation HIF $\alpha$ -dépendante plutôt que liée à HIF1 $\alpha$  [165-168]. Le système de l'angiopoiétine repose sur la liaison antagoniste de 2 ligands sur le récepteur Tie2 : l'angiopoiétine-1 (Ang-1) a un effet agoniste alors que l'angiopoiétine-2 (Ang-2) se comporte dans la majorité des cas comme un antagoniste naturel [169]. Ang-1 induit le recrutement des péricytes et la maturation des vaisseaux néoformés. Sa liaison au récepteur est donc responsable de l'intégrité et de la stabilité du réseau vasculaire. En revanche, Ang-2, induit en conditions d'hypoxie, bloque la signalisation Tie2-dépendante, avec pour conséquences le détachement des cellules endothéliales de la paroi vasculaire et une déstabilisation de l'intégrité vasculaire. En l'absence de stimulus pro-angiogénique, ce phénomène aboutit à une régression vasculaire. En revanche, en présence de VEGF, comme dans un contexte d'hypoxie ou de pseudo-hypoxie, l'activation du récepteur VEGFR-2 permet alors la migration, la prolifération et la survie de ces cellules endothéliales [170].

Les PCC/PGL sont classiquement décrits comme des tumeurs hypervascularisées notamment chez les patients présentent des mutations sur les gènes *SDHx* et *VHL* [149]. Un niveau d'expression élevé de VEGF et de ses récepteurs a été décrit dans le sérum des patients [171] et dans leur tumeurs [172, 33, 173] et cette expression est significative augmentée dans les PCC/PGL métastatiques avec mutation *SDHx* ou *VHL* [174-176, 163, 177].

cellulaire d'ATP bascule d'un mécanisme de phosphorylation oxydative mitochondriale à une glycolyse cytoplasmique. La glycolyse étant moins rentable que la phosphorylation oxydative (génération de 4 ATP versus 36 par molécule de glucose), ce « switch métabolique » implique une adaptation de la cellule par augmentation de la captation de glucose et activation des enzymes de la glycolyse. Ce processus survient en conditions hypoxiques sous l'effet de HIF1 $\alpha$  qui induit l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT3, et des enzymes de la glycolyse comme l'hexokinase 2 (HK2) et la lactate déshydrogénase A [179]. L'isoforme HIF2 $\alpha$  est quant à elle capable d'induire l'expression du transporteur GLUT1, mais ne serait apparemment pas réellement impliquée dans la régulation des enzymes de la glycolyse [180].

Au début des années 1930, Otto Warburg répétant les expériences de Pasteur avec des tissus cancéreux observe que, même en présence d'oxygène, leur métabolisme est de type hypoxique avec utilisation préférentielle de la glycolyse anaérobie. Il émet alors l'hypothèse très avant-gardiste que le cancer serait secondaire à un défaut de la phosphorylation oxydative, ne laissant aux cellules que le choix de la glycolyse anaérobie même en conditions normoxiques [181]. L'augmentation de la captation de glucose qui découle de cet « effet Warburg » est un phénomène général très largement utilisé en clinique dans l'imagerie fonctionnelle du cancer par tomographie par émission de positons au 2-désoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose (<sup>18</sup>FDG-TEP). Ce n'est que bien des années après que ce phénomène a été mis en relation avec la stabilisation des HIF $\alpha$  [182]. Outre son rôle dans la stimulation de la glycolyse, HIF1 $\alpha$  pourrait également inhiber la phosphorylation oxydative mitochondriale. En effet, HIF1 $\alpha$  stimule la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK-1), enzyme inhibitrice de la pyruvate déshydrogénase (PDH) [183, 184]. Cette activation de PDK-1 a pour conséquence une réduction de l'entrée de pyruvate dans la mitochondrie et donc une diminution du flux via le cycle de Krebs, l'ensemble aboutissant à la réduction de l'apport de NADH and FADH<sub>2</sub> pour la chaîne respiratoire. Encore une fois, ce phénomène est principalement HIF-1a dépendant [185] (Figure 11).



**Figure 11 : Mécanisme de promotion de la glycolyse anaérobie par HIF1 $\alpha$ .**

Le rôle de HIF2 $\alpha$  dans l'induction de la glycolyse anaérobie semble plutôt être lié à un effet direct sur la chaîne respiratoire mitochondriale [185]. En effet, *Fukuda et al* [186] ont montré que dans des conditions d'hypoxie, HIF2 $\alpha$  régulerait l'activité du complexe mitochondrial IV (COX) en favorisant l'expression de la sous-unité COX4-2 au détriment de COX4-1. Cette préférence pour COX4-2 a pour conséquence une diminution de l'activité globale de la COX [186].

Ces données suggèrent donc une implication à la fois de HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  dans l'effet Warburg et ces constatations ont été confirmées dans les tumeurs associées à la pseudo-hypoxie. Dans les cancers du rein à cellules claires sporadiques, dont plus de 80% sont porteurs de mutations somatiques sur *VHL*, on retrouve également une surexpression de nombreux gènes codants pour des enzymes de la glycolyse alors que les enzymes mitochondriales sont sous-exprimées [187], conséquence directe de l'altération de la protéine pVHL [188, 189]. Dans les PCC/PGL, plusieurs études sont également en faveur de l'implication des HIF $\alpha$  dans l'effet Warburg. *Dahia et coll* ont constaté une diminution de l'expression de la protéine SDHB (par régulation post-transcriptionnelle) dans les tumeurs *VHL*- et *SDH*-dépendantes [133]. Chez une cohorte de 68 PCC/PGL héréditaires,



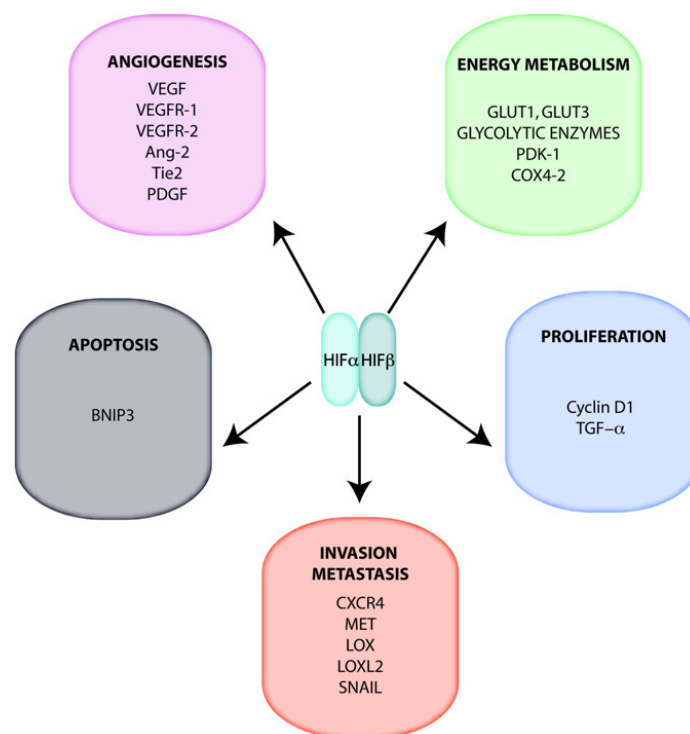
mon équipe d'accueil a pu confirmer ces résultats par une approche de type micro-array et les élargir à l'ensemble des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriales, dont à la fois l'expression protéique et l'activité enzymatique étaient diminuées chez les patients porteurs de mutation sur les gènes *SDHx* et *VHL* par rapport aux patients *RET* et *NF1* [149]. Dans cette même étude, concernant la stimulation de la glycolyse anaérobie, si l'augmentation de l'expression des transporteurs du glucose (GLUT-1 et GLUT-3) a pu être retrouvée dans les 2 types de tumeurs *VHL*- et *SDH*-dépendantes, la surexpression des enzymes glycolytiques était en revanche restreinte aux seules tumeurs *VHL*. Enfin, l'ensemble des résultats soutient un rôle central de HIF2 $\alpha$  dans la tumorigenèse spécifique des PCC/PGL. Le « switch » COX4-1/COX4-2 est retrouvé de façon très spécifique dans les PCC/PGL avec mutation *SDH* et *VHL* alors que l'expression de PDK-1 n'est en aucun cas modifiée. Enfin, les tumeurs *SDH* et *VHL* surexpriment fortement HIF2 $\alpha$  et non HIF1 $\alpha$  [149].

#### Processus d'invasion et de métastase

La dérégulation des HIF $\alpha$ , notamment de HIF2 $\alpha$ , est associée depuis longtemps à la tumorigenèse accrue et au mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers chez l'homme [190]. Ce rôle peut être attribué à l'induction d'une vascularisation anarchique et très perméable secondairement à l'hypoxie. Néanmoins, les HIF $\alpha$  sont également capables d'induire directement des gènes impliqués dans la dispersion métastatique. L'invasion tumorale est un mécanisme complexe impliquant, pour la cellule cancéreuse, une augmentation de sa capacité à migrer, à s'implanter au niveau d'organes situés à distance, à dégrader et à remodeler la matrice extracellulaire. HIF2 $\alpha$  favorise le processus de métastase en stimulant l'expression de plusieurs gènes-clés, comme *CHD1* (codant pour l'E-cadherine), *LOX*, *LOXL-2*, *Snail* et *TWIST-1* [191-194]. Tous ces facteurs sont impliqués dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT [195-197, 194]. L'EMT est un processus survenant de façon physiologique chez l'embryon lors de la mise en place du feuillet mésodermique au stade de la gastrulation, qui nécessite le changement de forme, l'invagination et la migration des cellules, initialement de type épithéliales et devenant mésenchymateuses. Par analogie, la capacité des cellules à changer de phénotype et à migrer, qui peut également se produire dans les tissus adultes en conditions physiologiques (régénération tissulaire, cicatrisation,...) ou pathologiques (fibrose tissulaire, progression tumorale) [198] est aussi appelée EMT.



La E-cadhérine est spécifique de la cellule épithéliale et est responsable de l'adhésion intercellulaire. LOX et LOXL2 sont deux protéines régulant positivement l'expression de SNAIL, facteur de transcription capable de réprimer la E-cadhérine. En 2009, 2 études ont mis en relation l'expression de SNAIL1 et TWIST1 (étudiées par IHC) avec la malignité des PCC/PGL [199, 200]. De façon intéressante, mon équipe d'accueil a démontré en 2012, par une approche transcriptomique, que l'activation des voies de l'EMT était une caractéristique propre aux tumeurs *SDHB* malignes [201]. L'ensemble de ces données est donc en faveur d'un rôle très important de cette activation de l'EMT (partiellement dépendante de HIF2 $\alpha$ ) dans la malignité des PCC/PGL liée à *SDHB*.



**Figure 12 : Gènes cibles et grandes voies de signalisation intracellulaires impliqués dans la tumorigenèse HIF-dépendante.** D'après Favier et Gimenez-Roqueplo, 2010 [164]

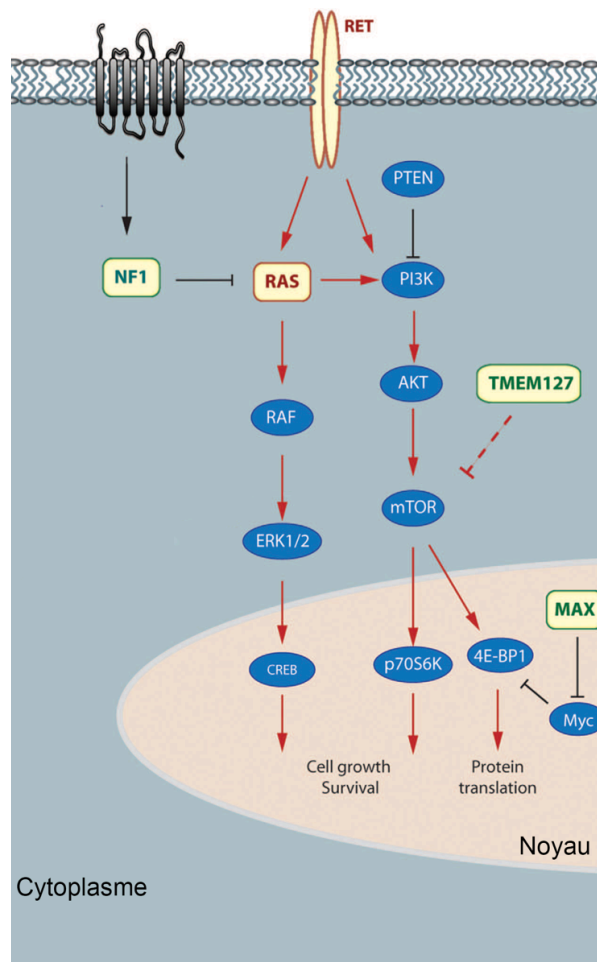
## 2. Le cluster 2A : prolifération et survie cellulaire

Le Cluster C2A comprend les tumeurs secondaires aux mutations des gènes *RET*, *NF1*, *MAX* et *TMEM127*, ainsi que la plupart des tumeurs sporadiques. Dans ces tumeurs, on observe une régulation des gènes de la prolifération et de la survie cellulaire via l'activation des voies de signalisation RAS/RAF/MAPK (mitogen-activated protein

kinase) et PI3K/AKT/mTOR (Figure 13). Cette cascade d'événements entraîne une dérégulation de la croissance et/ou de la différenciation cellulaire ayant pour conséquence une prolifération cellulaire incontrôlée.

Le gène *RET* code pour un récepteur à activité tyrosine kinase activé soit par dimérisation après liaison à son ligand, soit directement par phosphorylation de son domaine tyrosine kinase. Les mutations *RET* retrouvées dans la NEM 2 entraînent une auto-activation constitutive du récepteur (par autophosphorylation) responsable de l'activité pro-oncogénique [202, 203]. En effet, cette auto-activation aboutit d'une part à la stimulation directe de la voie de signalisation intracellulaire RAS/RAF qui induit la phosphorylation oxydative des MAPK (mitogen-activated protein kinase) elles-mêmes responsables de l'activation de ERK1 et ERK2 (extracellular signal-regulated kinases), voie principale de la prolifération cellulaire. D'autre part, RET activé stimule également la voie PI3K (phosphatidyinositol-3-kinase)/AKT (protéine kinase B), principal promoteur intracellulaire de la survie [204, 205].

Le gène *NF1* code pour une protéine cytoplasmique, la neurofibromine, appartenant à la famille des protéines GAP (GTPase-activating protein), ayant pour fonction de réguler négativement la voie RAS. Les mutations de *NF1*, responsables d'une perte de fonction du gène, aboutissent donc au maintien de RAS sous sa forme active et, via RAF, à l'activation de la voie des MAP-kinases (MAPK).



**Figure 13 : Voies de tumorigenèse activées par mutations des gènes du cluster 2A.**  
Adapté de Castro-Vega, 2015 [137]

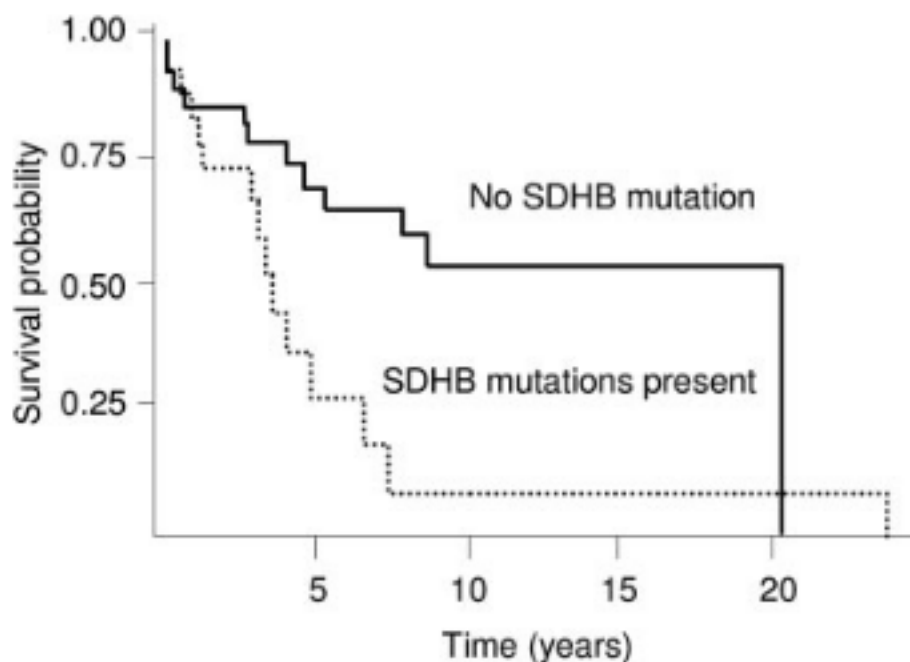
## VII. Cas des PCC/PGL malins

### 1. Diagnostic

Dans la série de 192 patients atteints de PCC/PGL suivis à l'HEGP, 15% des patients avaient une forme maligne [17]. Comme il n'existe pas de critères histologiques de malignité, celle-ci est définie par l'apparition d'une métastase, le plus souvent localisée au niveau des ganglions lymphatiques, de l'os, du foie et du poumon, ce qui permet de distinguer les métastases des nouvelles tumeurs qui sont fréquentes dans les maladies familiales. Selon cette définition, 5% environ des PCC/PGL sont malins dès le diagnostic, et 10% des tumeurs considérées comme bénignes à la première intervention développent ultérieurement des récurrences métastatiques [147]. Le test le plus sensible pour le suivi de ces patients est le dosage des MNs, dont la concentration est corrélée au volume tumoral.

Actuellement, seuls 3 facteurs de risque de malignité des PCC/PGL sont généralement admis : une taille tumorale initiale supérieure à 5 cm [206], le site de la tumeur primitive (la localisation extra-surrénalienne thoraco-abdomino-pelvienne est associée à la malignité dans 40 à 70% des cas) [206-208] et la présence d'une mutation constitutionnelle sur le gène *SDHB* [20]. En effet, la présence d'une mutation sur le gène *SDHB* est retrouvée chez environ 36% de ces patients et près de 50% des patients porteurs d'une mutation sur le gène *SDHB* risquent de développer une forme maligne de la pathologie PCC/PGL [20, 80, 79].

Le pronostic est assez réservé avec une survie globale à 5 ans inférieure à 50% [209, 210]. Les patients avec mutation sur le gène *SDHB* sont les plus sévèrement atteints (Figure 14) avec une survie médiane de 42 mois versus 244 mois en l'absence de mutation *SDHB* [80].



**Figure 14 : Survie globale des patients avec PCC/PGL malins après survenue de la première métastase en fonction du statut *SDHB*. D'après Amar et coll 2007 [80]**

## 2. Prise en charge

Le traitement est d'abord symptomatique, avec contrôle de l'HTA et des signes catécholaminergiques (constipation, palpitations, sueurs, malaises...).

Il n'existe pas de consensus sur le traitement visant à réduire le volume tumoral. Les différentes thérapies utilisées sont la thérapie par  $^{131}\text{I}$ -MIBG, la chimiothérapie

(vincristine, cyclophosphamide, dacarbazine), plus récemment le temozolomide seul [211] et l'embolisation. Les traitements par antiangiogéniques sont en cours d'évaluation. Le traitement de référence est bien entendu la résection chirurgicale quand elle est possible.

*a) Radiothérapie interne vectorisée par  $^{131}\text{I}$ -MIBG*

La métoiodobenzylguanidine (MIBG) est un analogue de la NA utilisée pour l'imagerie dont le principe est détaillé dans la seconde partie de cette introduction. Lorsque cet analogue est marqué à l'iode 131, il émet par désintégration un rayonnement  $\beta$  permettant une irradiation locale du tissu sur lequel il s'est fixé. Depuis la première expérience de *Sisson et coll* décrite en 1984 [212], plusieurs équipes ont utilisé avec des résultats variables la  $^{131}\text{I}$ -MIBG thérapie pour le traitement des PCC/PGL malins fixant la  $^{123}\text{I}$ -MIBG. Avec maintenant 30 ans de recul et les résultats d'une méta-analyse récente [213], il apparaît que ce traitement est avant tout palliatif (3% de réponse tumorale complète et 27% de réponse partielle) et surtout intéressant pour son effet anti-sécrétoire avec 40% de réponse hormonale partielle, avec possiblement un effet prédominant des fortes doses chez les patients avec mutation *SDHB* [214].

*b) Chimiothérapie*

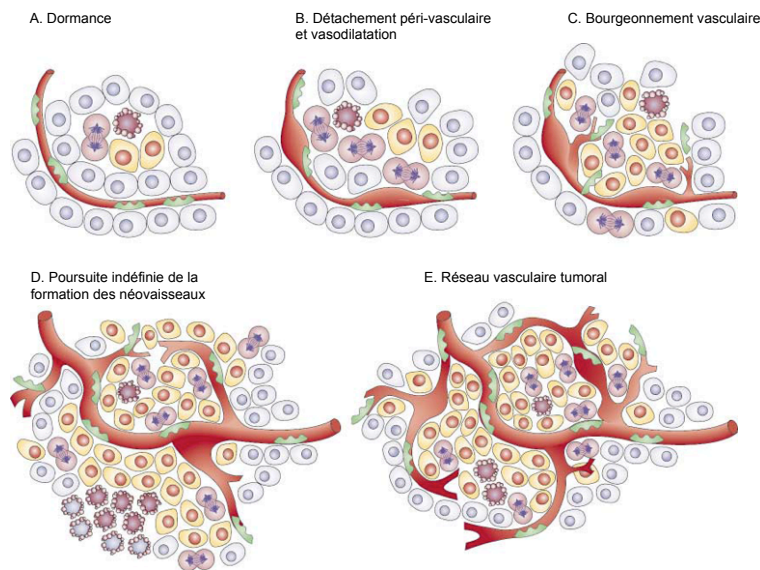
La chimiothérapie de référence dans les PCC/PGL est la combinaison CVD (cyclophosphamide, vincristine, dacarbazine). Etant donné la rareté de cette pathologie, il n'existe pas de grande étude prospective évaluant ce traitement mais il apparaît que moins de la moitié des patients répondraient au traitement, sans réel bénéfice en terme de survie globale [215, 216] et au prix de lourds effets indésirables. Ce traitement est donc réservé aux patients ayant une maladie rapidement progressive [217].

Le temozolomide (équivalent oral de la dacarbazine) a été proposé récemment comme alternative moins toxique et aussi efficace que la trithérapie [211]. Ce traitement montre par ailleurs une efficacité particulière chez les patients avec mutation *SDHB* qui serait en lien avec une diminution de l'expression de l'enzyme MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) par un phénomène d'hyperméthylation du promoteur de ce gène chez les patients porteurs de cette mutation.

c) *Thérapies ciblées antiangiogéniques*Rationnel

Le rôle de l'angiogénèse dans la croissance tumorale a été proposé dès les années 1970, dans un article princeps de Judah Folkman [218]. Selon Folkman, lors d'une phase initiale pouvant être plus ou moins longue, la tumeur est avasculaire avec une taille restant inférieure à  $2\text{mm}^3$ , et donc cliniquement indétectable. A ce stade, la tumeur est dite « dormante » dans une phase d'équilibre entre prolifération et apoptose. Puis, suite à une modification de cette balance, le « switch angiogénique » va se déclencher et permettre une croissance tumorale exponentielle via l'induction d'une néo-angiogénèse assurant à la tumeur l'accès à la vascularisation de l'hôte [219, 220].

L'angiogénèse tumorale est stimulée par des facteurs pro-angiogéniques dont les principaux appartiennent à la famille VEGF, via notamment sa fixation sur son récepteur VEGFR-2, ce qui en fait une cible de choix pour les thérapies antiangiogéniques. Par ailleurs, comme évoqué plus haut, ces voies de l'angiogénèse sont particulièrement activées dans les tumeurs ayant un profil pseudo-hypoxique avec mutations sur les gènes *SDHx* et *VHL*, notamment lorsqu'elles sont métastatiques [174-176, 163, 177].



**Figure 15 : le switch angiogénique.** D'après Bergers et coll 2003 [219]. La majorité des tumeurs ont d'abord la forme de nodules avasculaires (dormance, A.) jusqu'à atteindre un stade d'équilibre entre prolifération et apoptose. L'initiation de l'angiogénèse, ou « switch angiogénique » permet ensuite la croissance exponentielle de la tumeur. Cette phase débute par une vasodilatation et le détachement des cellules endothéliales (B.), suivie du bourgeonnement de néovaisseaux (C.), de la formation de néovaisseaux et du recrutement des péricytes (D). Ce phénomène n'étant pas régulé, il se poursuit indéfiniment aboutissant à une vasculature tumorale anarchique et très anormale (E.)

### Thérapies en cours dans les PCC/PGL

La molécule principalement testée dans les PCC/PGL est le sunitinib (SUTENT®). Le sunitinib est un inhibiteur oral de récepteur tyrosine kinase (RTK) à activité antiangiogénique et antitumorale. Il cible des RTK multiples : VEGFR-1,-2 et -3 mais aussi PDGFR, c-Kit (stem-cell factor receptor), Flt-3 (Fms-like tyrosine kinase 3), RET et CSF-1R (Colony Stimulating Factor Receptor type 1).

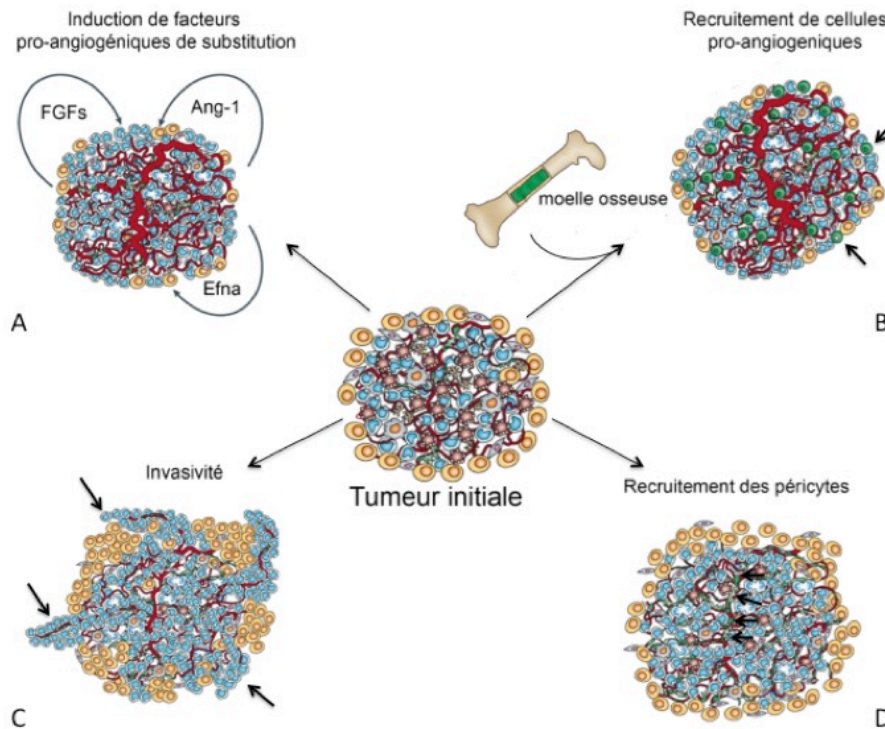
Les six premiers cas de PCC/PGL traités par sunitinib ont été décrits presque simultanément en 2009 par 4 équipes différentes [221-224], avec des réponses objectives partielles, prolongées parfois jusqu'à 40 semaines, notamment chez des patients avec mutation *SDHB*. Ensuite, *Ayala-Ramirez et coll* ont publié la première étude rétrospective sur 17 patients progressifs depuis au moins 6 mois, résistants aux thérapies conventionnelles comme la chimiothérapie ou la <sup>131</sup>I-MIBG, dont 8 avec mutation *SDHB* et un patient *VHL* [225]. Sur cette série, 14 patients ont été traités suffisamment longtemps pour être évalués, avec une réponse partielle (PR) chez 3 patients et une stabilisation (SD) de la maladie chez 5 autres. De façon intéressante, parmi les 8 patients avec bénéfice clinique, 6 étaient génétiquement prédisposés avec activation de la voie de la pseudo-hypoxie : 5 des 6 patients porteurs d'une mutation *SDHB* évaluables (1 PR et 4 SD) et le patient porteur d'une mutation sur *VHL* (SD) [225]. Des études prospectives sont actuellement en cours, dont la première étude randomisée internationale en double aveugle évaluant le sunitinib versus placebo : FIRSTMAPPP, First Randomized Study in Malignant Progressive Pheochromocytomas ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) - NCT01371201). Cet essai clinique de phase II a pour objectif d'évaluer l'efficacité du Sunitinib sur la survie sans progression de patients atteints de PCC/PGL métastatiques progressifs. C'est une étude multicentrique européenne promue par l'Institut Gustave Roussy sous l'égide de l'« European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENS@T) », avec plusieurs centres ouverts en Europe dont le recrutement envisagé est de 80 patients. Une autre étude multicentrique de phase II (3 centres canadiens et un centre aux Pays-Bas) en collaboration avec l'industrie pharmaceutique (Pfizer) étudie l'efficacité du sunitinib dans les PCC/PGL malins, mais sans randomisation ni bras placebo ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) - NCT00843037).

Néanmoins, il est important de noter que la plupart des patients rapportés ayant un bénéfice sous sunitinib finissent tôt ou tard par échapper au traitement, ce qui est également décrit dans d'autres types de cancers comme le RCC [226]. Contrairement à ce qui est communément observé avec les chimiothérapies classiques où les mécanismes de résistance reposent le plus souvent sur des modifications géniques de la cible médicamenteuse ou sur des altérations des mécanismes de captation ou relargage de la drogue par les cellules [227, 228], le phénomène d'échappement aux antiangiogéniques serait largement indirect. En effet l'hypothèse principale fait reposer ce phénomène sur 4 mécanismes d'adaptation principaux [229] (Figure 16) :

- l'activation de voies de signalisation alternatives pro-angiogéniques au sein de la tumeur ;
- le recrutement de cellules pro-angiogéniques au niveau de la moelle osseuse ;
- l'augmentation des péricytes au niveau des néovaisseaux tumoraux afin d'assurer l'intégrité du réseau même en l'absence du signal de survie VEGF-dépendant ;
- l'activation et la promotion de l'invasion et de la métastase afin d'avoir accès à la vascularisation tissulaire saine sans nécessiter de façon obligatoire la formation de néovaisseaux

Pour lutter contre ce phénomène de résistance acquise, 2 stratégies complémentaires pourraient être envisageables. La première serait d'adapter très précocement la stratégie thérapeutique aux phénomènes d'échappement, la seconde de ne pas utiliser ces thérapies seules mais de façon combinée, soit d'emblée, soit de manière séquentielle : dans les deux cas il est indispensable de développer des outils d'imagerie permettant de suivre de façon précise la réponse au traitement afin de détecter l'échappement thérapeutique et/ou de définir le moment propice à l'introduction d'une thérapie complémentaire : c'est dans cette optique qu'a été réalisée une partie de ce travail de thèse (chapitre 2).





**Figure 16 : Les 4 mécanismes principaux d'échappement aux antiangiogéniques.**

*Adapté d'après Bergers 2008 [229].* A : activation de facteurs pro-angiogéniques alternatifs par la tumeur dont le Fibroblast Growth Factor (FGF), l'angiopoïetine 1 (Ang-1) et les ephrines A (Efna). B : Infiltration de la tumeur par des cellules pro-angiogéniques recrutées à partir de la moelle osseuse. C : Promotion de l'invasivité et du potentiel métastastatique pour coloniser le réseau vasculaire des tissus sains. D : Recrutement des péricytes maintenant l'intégrité du réseau vasculaire.

En dehors de ces 4 mécanismes précédemment décrits, un mécanisme de résistance au sunitinib dans les tumeurs neuroendocrines pouvant expliquer l'échappement et la croissance tumorale secondaire serait l'activation par un phénomène de compensation de la voie mTOR [230]. La rapamycine et l'everolimus sont 2 molécules inhibant spécifiquement cette voie de signalisation [231]. Si les premiers résultats sur des cas cliniques isolés avec l'everolimus étaient plutôt décevants [232], les résultats d'une étude plus récente de phase II suggèrent une efficacité modeste permettant une stabilisation de la maladie chez 5 patients atteints de PCC/PGL préalablement progressifs, sur 7 patients inclus [233]. Le plus intéressant au niveau anti-tumoral pourrait être la combinaison d'un anti-VEGF et d'un inhibiteur de la voie mTOR [234]. Cependant, même si les effets de ces 2 molécules peuvent en principe se potentialiser, c'est surtout l'addition des effets indésirables qui sont pour le moment un frein à ces associations [235].

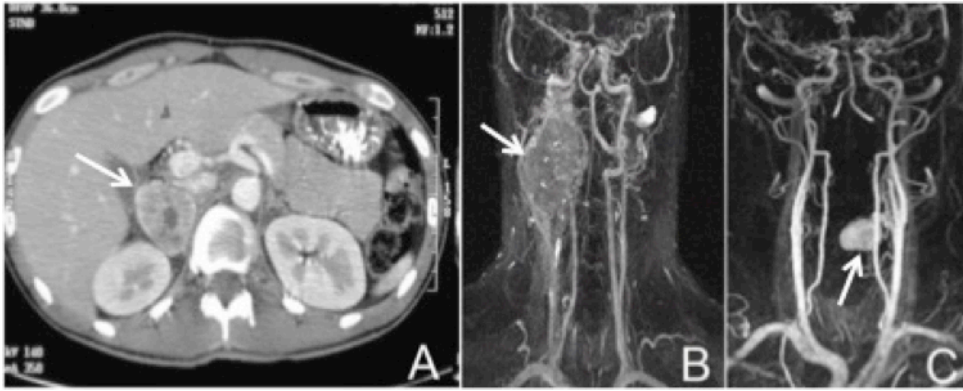
## B. Imagerie des PCC/PGL

### I. Imagerie existante dans la prise en charge des PCC/PGL

Les formes génétiques prédisposent donc à des lésions multiples et parfois malignes de PCC/PGL. La chirurgie est à l'heure actuelle le seul traitement curatif mais reste une procédure délicate avec, selon la localisation du PCC/PGL, des risques de complications nerveuses et vasculaires non négligeables, dont la fréquence augmente avec la taille tumorale. Ces patients nécessitent donc un bilan d'imagerie exhaustif avec pour buts : une localisation précise de la tumeur à l'origine de l'hypersécrétion ou du PGL non sécrétant, la recherche d'autres localisations dans le cas d'un syndrome de prédisposition, le bilan d'extension initial à la recherche de localisations secondaires métastatiques, l'éventuel suivi sous traitement d'un PCC/PGL malin ou le dépistage des sujets prédisposés non encore atteints (sujets apparentés).

#### 1. Imagerie conventionnelle

La tomodensitométrie (TDM) avec injection de produit de contraste est l'examen de première intention pour localiser des PCC/PGL thoraco-abdomino-pelviens (TAP). Les techniques actuelles permettent d'identifier des lésions infra-centimétriques, alors que la taille médiane d'un PCC/PGL au diagnostic est de 50 mm [17]. Ces lésions sont généralement hétérogènes, nécrotiques, solides ou kystiques avec une densité spontanée supérieure à 10 Unités Hounsfield et un rehaussement important après injection de produit de contraste (Figure 17). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) retrouve un aspect classique hyperintense en T2 mais qui n'est pas suffisamment spécifique pour permettre seul le diagnostic [236]. Dans le cas particulier des PGL de la tête et du cou, s'intégrant souvent dans un syndrome de prédisposition lié aux gènes *SDHx*, l'angio-IRM avec reconstruction 3D à la phase artérielle est l'examen de choix [78, 237]. L'imagerie conventionnelle (TDM et IRM) a en effet une excellente sensibilité (respectivement 98% et 100%) mais une spécificité moindre (respectivement 70 et 67%) [238, 239]. Il est donc la plupart du temps nécessaire de compléter ces examens par une imagerie fonctionnelle métabolique.



**Figure 17 : Imagerie conventionnelle des PCC/PGL.** Scanner avec injection d'un PCC droit (A), angio-IRM avec reconstruction 3 D à la phase artérielle d'un PGL cervical droit (B) et d'un PGL laryngé (C).

## 2. Imagerie fonctionnelle scintigraphique

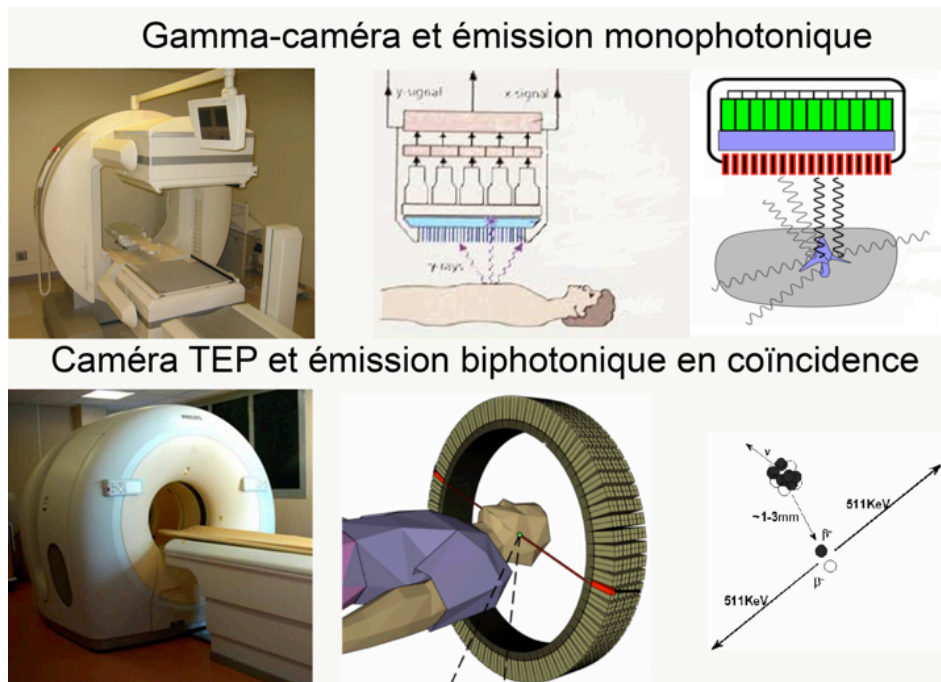
### a) Principe

L'imagerie fonctionnelle a l'avantage d'informer sur l'aspect physio-pathologique des tumeurs. Le principe de l'imagerie scintigraphique repose sur la détection d'une émission de photons gamma ( $\gamma$ ) émis par un isotope radioactif préalablement injecté (ou administré par voie orale) au patient. Par opposition à l'imagerie radiographique conventionnelle (à laquelle appartient la TDM), qui est une imagerie dite de « transmission » (obtenue par l'interaction d'un faisceau externe de rayons X avec le corps du patient), la scintigraphie est une imagerie « d'émission » : le signal détecté est un rayonnement  $\gamma$  émis de l'intérieur du corps du patient par le traceur radioactif appelé radiopharmaceutique qui lui a été administré.

Le rayonnement  $\gamma$  peut-être de 2 types (Figure 18):

- Monophotonique : un seul photon est émis et l'émission est recueillie par une gamma-caméra. On parle alors de tomographie d'émission monophotonique (TEMP) ou SPECT (de l'anglais single photon emission computerized tomographie). Il s'agit des scintigraphies classiques les plus anciennes.
- Biphotonique en coïncidence : dans ce cas le radiopharmaceutique utilisé est un émetteur de positon. Le positon, après un court parcours dans le milieu (de l'ordre de 0,3 à 0,4 mm pour un isotope comme le fluor 18) s'annihile en rencontrant son antiparticule, l'électron, ce qui a pour conséquence l'émission de 2 photons  $\gamma$  de 511 keV émis à 180° l'un de l'autre. La détection des photons  $\gamma$

d'annihilation se fait grâce à une couronne de détecteurs couplés en coïncidence dans un tomographe à émission de positon (TEP).



**Figure 18 : Les 2 types de rayonnements gamma utilisés en imagerie nucléaire.**

En imagerie TEP, la détection de 2 photons coïncidents rend possible le traitement tomographique des données sans collimation mécanique. En effet, l'électronique des capteurs situés en couronne autour du patient ne retient que les photons émis simultanément, ce qui permet d'identifier la ligne sur laquelle se situe l'émission, appelée « ligne de réponse ». Le couplage du tomographe TEP à un tomographe à rayons X (tomodensitomètre ou TDM) permet de déterminer les caractéristiques d'atténuation du rayonnement des tissus traversés. Le couple TEP-TDM (ou PET-CT en anglais) permet à la fois d'obtenir des images corrigées de l'atténuation (améliorant ainsi considérablement la qualité des images et permettant la quantification du signal) et de superposer l'image fonctionnelle TEP à l'image anatomique TDM, autorisant la localisation précise de la lésion. Après reconstruction en 2 ou 3 dimensions par le système informatique, l'image obtenue a une résolution comprise entre 3 et 6 mm en imagerie clinique. Le couplage des images scintigraphiques à la TDM est maintenant également largement disponible pour les gamma-caméras (TEMP-TDM ou SPECT-CT en anglais).

Un avantage important de la TEP-TDM est de permettre la quantification de la présence du traceur au niveau de régions d'intérêt (ROI) définies sur les images par l'utilisateur. La concentration du radiopharmaceutique peut-être mesurée en kBq/ml (quantification absolue) ou être normalisée en fonction de l'activité injectée et du volume de distribution (ou poids) du le patient (quantification relative par la SUV pour Standard Uptake Value) selon la formule suivante :

$$\text{SUV} = \frac{\text{concentration activité kBq/ml}}{\text{activité injectée (KBq)/ Poids (kg)}}$$

L'indice le plus utilisé en clinique, car le plus reproductible, est la SUVmax qui correspond à l'intensité du pixel le plus fixant au sein de la ROI. En effet, l'utilisation de la SUVmax permet de réduire l'effet de volume partiel (EVP) existant dans les tumeurs de petite taille. Cet EVP est une conséquence directe de la faible résolution spatiale dans les images TEP reconstruites résultant en un étalement du signal. Ce phénomène est alors responsable d'une sous-estimation de l'intensité maximale du signal pour toute lésion dont la taille est inférieure à 3 fois la résolution spatiale [240] avec l'introduction de biais parfois très importants [241]. L'approche classique consistant à mesurer la SUVmax a l'avantage, en l'absence de bruit, d'être la moins influencée par l'EVP. Malheureusement les images sont toujours bruitées. La solution alternative afin de limiter les erreurs de mesures liées au bruit, serait de mesurer la valeur moyenne dans la tumeur ou SUVmean [242]. La difficulté principale est alors de délimiter la région tumorale d'intérêt ou « volume métabolique ». Ce volume peut être défini comme incluant tous les pixels dont la valeur est supérieure à un certain pourcentage de la SUVmax (typiquement supérieur à une valeur située entre 50 et 75% de la SUVmax). Enfin, la captation globale de glucose par la tumeur peut-être estimée par le produit de la SUVmean et du volume métabolique. La mesure de la SUV est très utilisée en clinique d'autant plus qu'elle permet de s'affranchir des variations de poids des patients. Elle s'avère moins indispensable en préclinique, les modèles de rongeurs ayant le plus souvent des poids très similaires.

## b) Traceurs existants

### Traceurs TEMP

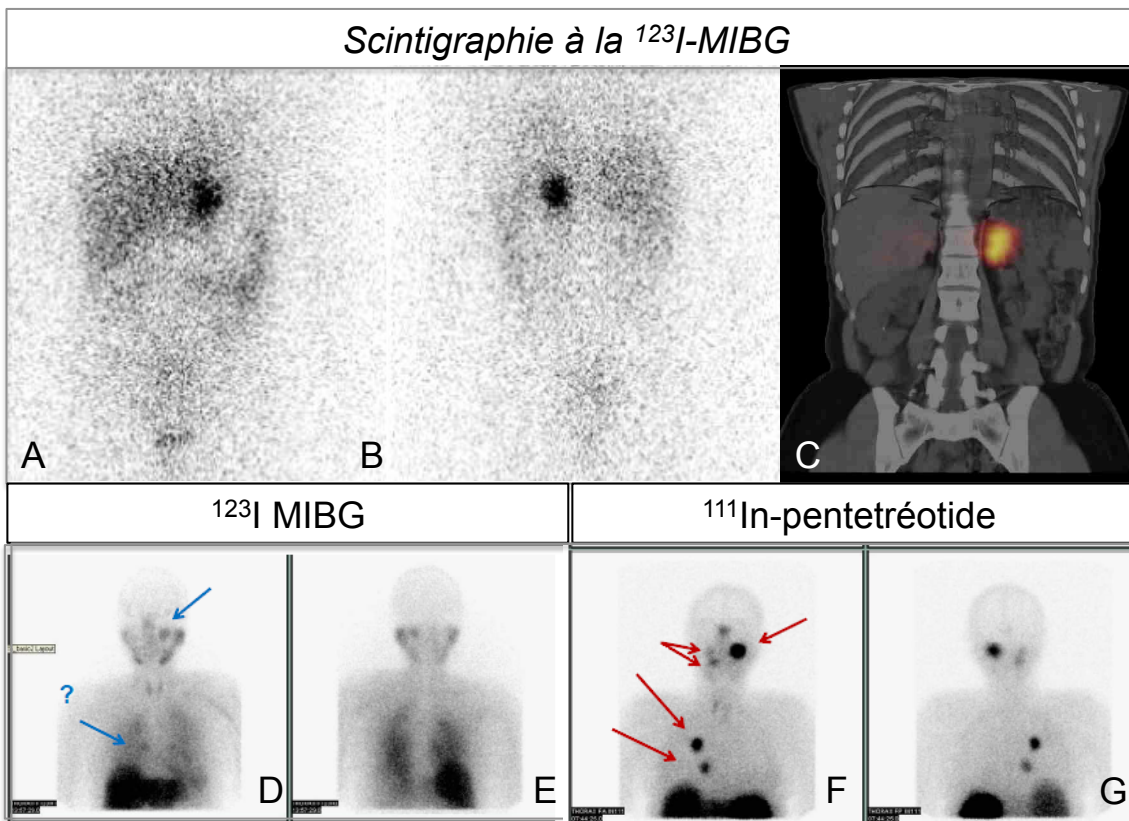
#### ✓ *Scintigraphie à la $^{123}\text{I}$ -MIBG*

La métoiodobenzylguanidine marquée à l'iode 123 ( $^{123}\text{I}$ -MIBG) est un analogue de la noradrénaline qui utilise le même transporteur membranaire NET (NorEpinephrine Transporter). Elle s'accumule dans les tissus chromaffines après stockage dans les vésicules de sécrétion par le transporteur VMAT. Certains médicaments peuvent interférer avec l'absorption de MIBG par la tumeur, principalement le labétolol et certains neuroleptiques. Cette scintigraphie corps entier ne détecte en général que les PCC et PGL sympathiques fonctionnels.

#### ✓ *Scintigraphie des récepteurs de la somatostatine à $^{111}\text{In}$ -pentétréotide (SRS)*

Le pentétréotide se fixe sur les récepteurs de la somatostatine (notamment les sst 2 et sst 5) situés sur la membrane cellulaire. Il a donc une affinité pour toutes les tumeurs endocrines. Cette scintigraphie du corps entier est surtout performante pour les PGL parasympathique sus-diaphragmatiques et sa sensibilité est faible pour les PCC [78].





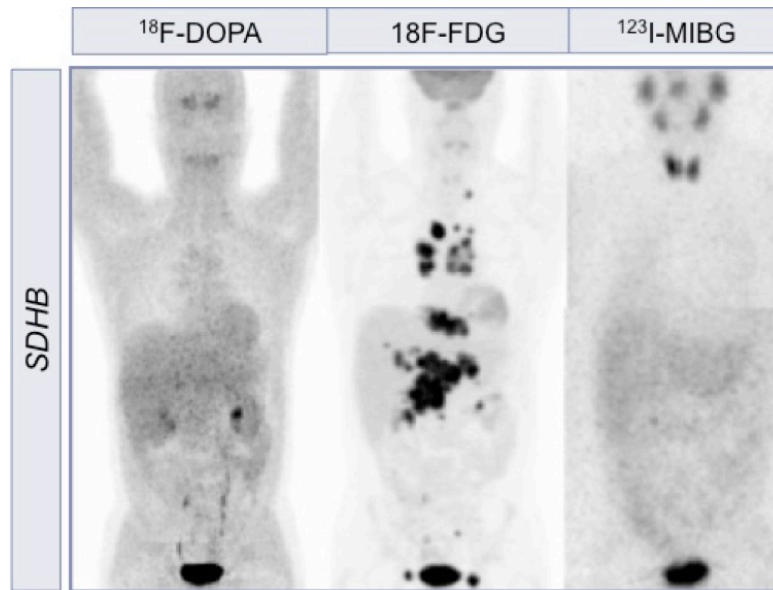
**Figure 19: Images scintigraphiques  $^{123}\text{I}$ -MIBG et  $^{111}\text{In}$ -pentétréotide.** Visualisation d'un PCC gauche en  $^{123}\text{I}$ -MIBG, vue planaire antérieure (A), postérieure (B) et image de fusion TEMP-TDM (C). PGL multiples parasymphatiques métastatiques visualisés en  $^{111}\text{In}$ -pentétréotide (vue antérieure F et postérieure G) mais pas en  $^{123}\text{I}$ -MIBG (vue antérieure D et postérieure E).

#### Traceurs TEP

##### ✓ TEP au $^{18}\text{F}$ Fluorodéoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG)

Le 2-désoxy-2- $^{18}\text{F}$ fluoro-D-glucose, abrégé en FDG, est un analogue du glucose sur lequel est fixé un isotope du fluor émetteur de positon, le fluor 18 ou  $^{18}\text{F}$ , dont la demi-vie physique est de 110minutes. Le  $^{18}\text{F}$ -FDG est le traceur le plus utilisé en oncologie et le plus facilement accessible. Il crée un contraste entre les tumeurs et les tissus avoisinants en raison de l'augmentation de la captation tissulaire du glucose dans les tumeurs par rapport aux tissus sains. Cette fixation est particulièrement marquée dans les tumeurs malignes et à forte prolifération. Les PCC/PGL fixent très fréquemment le  $^{18}\text{F}$ -FDG (ce qui les différencie des autres tumeurs endocrines), notamment les tumeurs avec mutation *SDHx*, l'avidité étant la plus forte pour les PCC/PGL malins avec mutation sur le gène *SDHB* [243, 244]. La fixation du FDG est la conséquence de l'augmentation de la consommation de glucose liée à l'accélération du métabolisme énergétique dans les cellules cancéreuses correspondant à l'effet Warburg sus-décrit [245]. Le mécanisme de

tumorigenèse particulier lié à une « pseudo-hypoxie » des tumeurs *SDHx* en fait l'examen de choix chez ces patients. En effet, les PCC/PGL avec mutation sur les gènes *SDH* et *VHL* surexpriment HIF-2 et les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3 [243, 149, 134, 133], laissant supposer que la très forte avidité pour le  $^{18}\text{F}$ -FDG des PCC/PGL avec mutation *SDH* et notamment des PGL métastatiques avec mutation *SDHB* [244] soit en lien avec le phénomène de "pseudo-hypoxie".



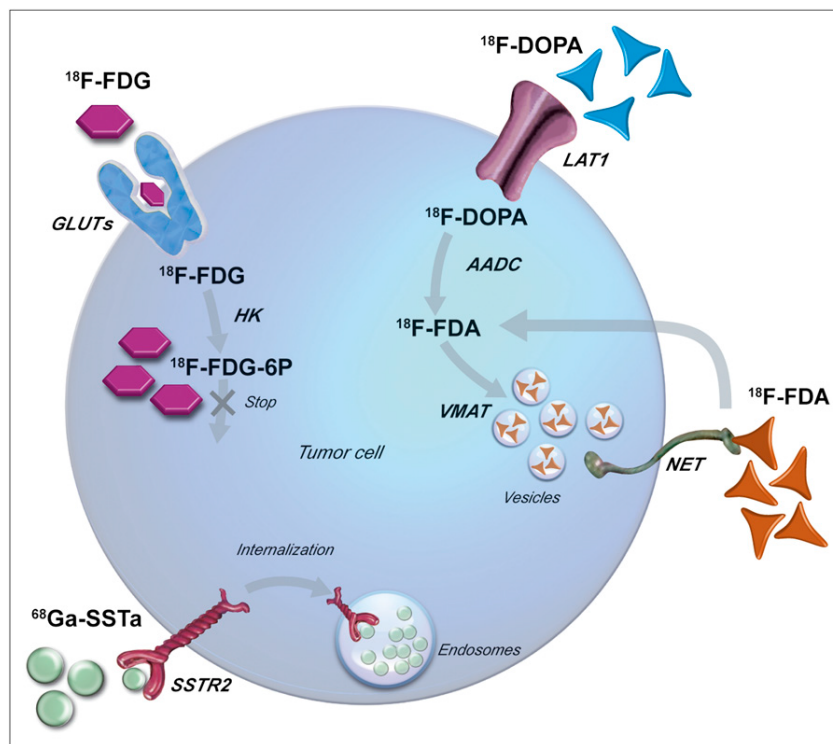
**Figure 20 : Supériorité du  $^{18}\text{F}$ -FDG aux autres radiotraceurs chez un patient *SDHB* métastatique.** Adapté de Timmers et coll, 2009 [246]

✓ TEP à la  $^{18}\text{F}$ Fluoro-DOPA ( $^{18}\text{F}$ -DOPA)

La  $^{18}\text{F}$ -DOPA est un acide aminé aromatique capté au niveau cellulaire par le transporteur LAT1. Les PCC/PGL, comme la plupart des tumeurs dérivées des cellules de la crête neurale, ont la capacité de capter avec une haute affinité la  $^{18}\text{F}$ -DOPA mais également de la décarboxyler en  $^{18}\text{F}$ -FDA (Fluoro-Dopamine) grâce à une enzyme impliquée dans la synthèse des catécholamines et dont elle est l'étape limitante : la L-aromatic amino acid decarboxylase (AADC). Après cette décarboxylation, la  $^{18}\text{F}$ -FDA est alors stockée dans les vésicules de sécrétion, permettant l'imagerie TEP [247]. La  $^{18}\text{F}$ -DOPA est assez spécifique et a montré d'excellents résultats notamment pour les PGL de la tête et du cou, fréquents chez les patients porteurs de mutations *SDHD* [248-250]. Cette qualité s'explique par l'absence de fixation du traceur dans les ganglions inflammatoires et au niveau des glandes salivaires, supprimant tout bruit de fond dans cette région, ainsi que par la faible captation cérébrale. *A contrario*, la sensibilité de la  $^{18}\text{F}$ -DOPA est inférieure à celle du  $^{18}\text{F}$ -FDG chez les patients porteurs d'une mutation *SDHB*



[247]. Par ailleurs, malgré son Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 2006, la  $^{18}\text{F}$ -DOPA est beaucoup moins accessible que le  $^{18}\text{F}$ FDG en raison de difficultés de production aboutissant à un coût, en France, 3 à 5 fois plus élevé que ce dernier.



**Figure 21 : Représentation schématique de la captation et de la rétention des traceurs TEP d'intérêts dans les PCC/PGL.** D'après Taieb 2012 [247]. Trois traceurs TEP sont utilisables pour l'imagerie des PCC/PGL : le  $^{18}\text{F}$ Fluorodéoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG), la  $^{18}\text{F}$ Fluoro-DOPA ( $^{18}\text{F}$ -DOPA) et les analogues de la somatostatine marqués au  $^{68}\text{Ga}$  ( $^{68}\text{Ga}$ -SSTa). La  $^{18}\text{F}$ Fluorodopamine ( $^{18}\text{F}$ FDA) n'est pas disponible en Europe.

### c) Nouveaux traceurs potentiels

#### ✓ Analogues de la somatostatine marqués au Gallium 68

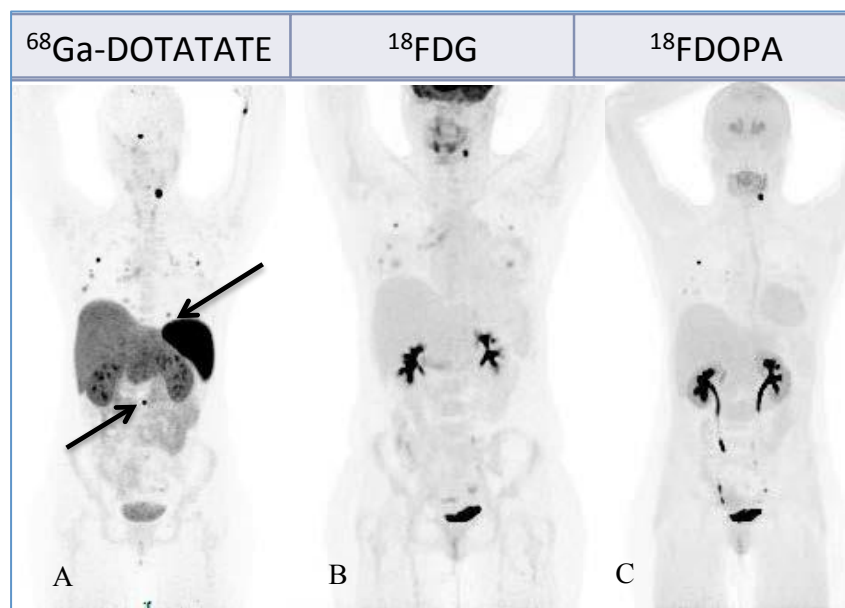
Ces dernières années, de nouveaux traceurs analogues de la somatostatine couplés à la DOTA et marqués au Gallium 68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), ont été développés comme alternative à la SRS. Actuellement, 3 peptides couplés à la DOTA sont disponibles, tous ayant une excellente affinité pour le récepteur sst2 : DOTATOC (Tyr3-octreotide), DOTATATE (Tyr3-octreotate), et DOTANOC (Nal3-octreotide). A l'heure actuelle, même si le  $^{68}\text{Ga}$ -DOTANOC semble avoir la plus haute affinité pour les récepteurs sst2, 3 et 5, il n'est pas prouvé qu'il y ait réellement une supériorité clinique de l'un de ces 3 traceurs. Les premières études montrent une très bonne sensibilité de ces analogues de la

somatostatine marqués, probablement bien au-delà des résultats de la SRS, même s'il n'y a pas d'étude comparative directe [251-256] (tableau 6).

Etudes	N patients	N lésions	Génétique	Traceur	Taux détection
Naswa, 2012*#	35	44	ND	DOTANOC	100%
Naswa, 2012#	5	12	ND	DOTANOC	100%
Naji, 2011#	11	30	5 SDHB	DOTATATE	96%
Sharma, 2013#	26	78	ND	DOTANOC	100%
Maurice, 2012#	15	167	7 SDHB, 2 SDHD, 1 RET	DOTATATE	87%
Kroiss, 2013	20	45	ND	DOTATOC	100%
Kroiss, 2015	10	27	ND	DOTATOC	100%
Janssen, 2015*	17	289	SDHB M1	DOTATATE	98,6%

**Tableau 5 : Valeur diagnostique de la TEP aux analogues de la somatostatine marqués au  $^{68}\text{Ga}$  pour les PCC/PGL. (\* études prospectives, # comparaison à la  $^{123}\text{I}$ -MIBG)**

Ces radiopharmaceutiques semblent à la fois très sensibles pour les PGL de la tête et du cou mais également pour les PGL métastatiques *SDHB*, avec également une très bonne spécificité [251] ce qui pourrait en faire l'examen de choix des PCC/PGL dans les prochaines années.



**Figure 22 : Comparaison de l'efficacité des traceurs TEP chez un patient *SDHB* métastatique. Adapté de Janssen et coll 2015 [251]**

✓ *Traceurs de l'angiogenèse*

Comme rapporté précédemment, les PCC/PGL, notamment ceux avec des mutations *SDHx* et *VHL*, présentent une activation des voies de la néoangiogenèse HIF-2 $\alpha$  et VEGF dépendantes. Plusieurs études précliniques ont montré qu'il était possible d'imager cette néoangiogenèse en ciblant notamment les intégrines.

Les intégrines sont des glycoprotéines membranaires hétérodimériques formées de 2 sous unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ), exprimées à la surface des cellules avec pour rôles principaux l'adhésion et la migration cellulaire. En particulier, les intégrines  $\alpha_v \beta_3$  sont exprimées à la surface des cellules cancéreuses et des cellules endothéliales des néovaisseaux mais pas sur celle des cellules endothéliales quiescentes. Dans le cadre du processus d'adhésion et de migration, ces intégrines lient spécifiquement plusieurs protéines de la matrice extracellulaire (comme le collagène et la fibronectine) au niveau d'un motif récurrent constitué de 3 acides aminés arginine-glycine-acide aspartique, abrégé selon la nomenclature internationale par les lettres RGD [257]. C'est pourquoi différents peptides contenant la séquence RGD ont été développés et couplés à des radiotraceurs afin de cibler ces intégrines par imagerie.

Le traceur TEP fluoré ciblant les intégrines le plus étudié en clinique est le  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD. Le processus de glycosylation avec du galactose permet de rendre ce peptide moins lipophile, avec une élimination majoritaire rénale [258] alors que les pentapeptides générés initialement étaient lipophiles et donc majoritairement concentrés dans le foie, ce qui rendait difficile l'interprétation des images à ce niveau [259]. Les premières études cliniques retrouvent une bonne corrélation entre la fixation  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD-TEP et l'expression des intégrines  $\alpha_v \beta_3$  en IHC [260-262], alors que l'information apportée n'est pas superposable à la fixation obtenue en  $^{18}\text{F}$ FDG, confirmant bien la différence des mécanismes imagés [263]. Il a été également possible de marquer les peptides RGD au  $^{68}\text{Ga}$  après conjugaison au chélateur DOTA ou NOGADA avec certains résultats précliniques prometteurs [264, 265].

L'intérêt de l'imagerie ciblée de l'angiogenèse réside avant tout dans le suivi des thérapies ciblées anti-angiogéniques. En effet, ce type de traitement entraîne avant tout une stabilisation tumorale et une nécrose difficilement évaluable par les classiques critères RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) basés sur la mesure de la taille tumorale [266]. Il est donc indispensable de développer des méthodes d'imagerie adaptées à ces nouvelles thérapies et l'imagerie de l'angiogenèse est dans ce

contexte une excellente candidate. Néanmoins, il n'existe encore que très peu de données dans la littérature et les premières études précliniques donnent malheureusement des résultats controversés [267, 268].

### 3. Indications dans la détection des PCC/PGL

Des recommandations récentes pour la prise en charge des PCC/PGL ont été rédigées sous l'égide de la société américaine d'Endocrinologie (Endocrine Society) [20].

L'examen de première intention pour la localisation de la tumeur initiale reste la TDM-TAP. L'IRM doit être réservée aux indications suivantes :

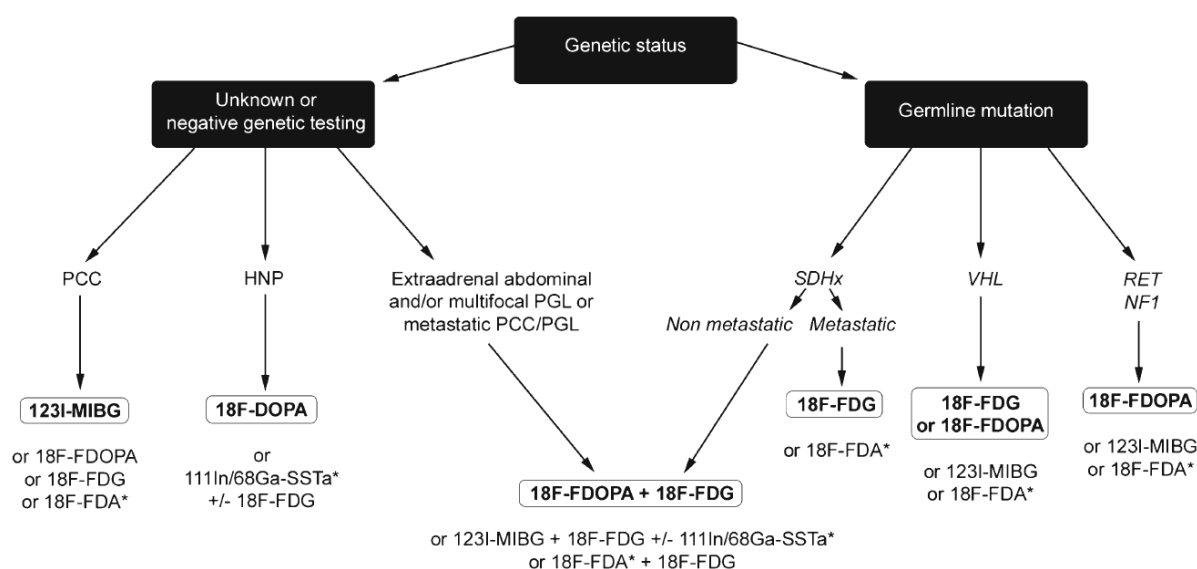
- patients métastatiques ;
- détection des PGL de la tête et du cou ;
- impossibilité d'utiliser la TDM : clips chirurgicaux entraînant des artéfacts, allergie aux produits de contraste iodés, éviction des radiations ionisantes (jeune enfant, femme enceinte, patient prédisposés génétiquement, patients ayant déjà été fortement exposés aux radiations).

En ce qui concerne la médecine nucléaire, la classique scintigraphie  $^{123}\text{I}$ -MIBG n'a désormais d'indication que chez les patients métastatiques dont le bilan d'extension a déjà été fait et pour lesquels une radiothérapie interne vectorisée par  $^{131}\text{I}$ -MIBG est envisagée. La SRS n'apparaît pas indiquée dans ces recommandations. En effet, ces scintigraphies classiques TEMP ( $^{123}\text{I}$ -MIBG, SRS), encore beaucoup utilisées à l'heure actuelle, sont assez spécifiques et ont de plus vu leur sensibilité améliorée par l'acquisition scannographique simultanée. Néanmoins, ces imageries ont des inconvénients pratiques (longueur des acquisitions, artéfacts digestifs, blocage thyroïdien, arrêt de certains médicaments interférents, ...) et surtout deux défauts majeurs : leur faible résolution et l'absence de quantification fiable possible du métabolisme tumoral. Par ailleurs, l'étude récente prospective PGL.EVA [78] réalisée sur plus de 200 patients porteurs de mutations *SDHx*, dont une centaine d'apparentés présymptomatiques, a retrouvé une sensibilité relativement faible de ces scintigraphies (42.7% pour la  $^{123}\text{I}$ -MIBG et 69.5% pour la SRS), expliquant probablement leur disparition des recommandations récentes au profit des traceurs TEP.

Les auteurs suggèrent également la réalisation systématique d'une  $^{18}\text{F}$ -FDG-TEP chez les patients atteints d'un PCC/PGL métastatique.

La société européenne de médecine nucléaire (European Association of Nuclear Medicine, EANM) a également publié des recommandations en 2012 concernant

spécifiquement l'imagerie métabolique des PCC/PGL [269]. Le groupe de travail a mis en avant les traceurs TEP en accordant une place importante de la génétique pour le choix du radiopharmaceutique. Selon ces recommandations, le  $^{18}\text{F}$ -FDG est à privilégier pour les patients avec mutations *VHL* et *SDHB* (métastatiques ou pas), alors que l'on préférera la  $^{18}\text{F}$ -DOPA pour les PGL de la tête et du cou, notamment dans un contexte de mutation *SDHD* ainsi que pour les PCC avec mutation *RET* ou *NF1* (Figure 23).



**Figure 23 : Algorithme proposé par l'EANM concernant le choix de l'examen de médecine nucléaire à réaliser devant un PCC/PGL. D'après Taieb, 2012 [269]**

Ces recommandations font néanmoins l'impasse sur 2 catégories de patients qui posent problème au quotidien en pratique clinique. La première concerne les patients métastatiques sous thérapies ciblées. Ces patients sont mal évalués par l'imagerie conventionnelle pour les raisons évoquées précédemment. L'évaluation de la réponse au traitement par  $^{18}\text{F}$ -FDG-TEP semble être la plus appropriée par analogie aux pratiques en cours dans d'autres types de cancers et d'après les premières études rétrospectives [270, 225], notamment parce que dans les PCC/PGL, les métastases peuvent être exclusivement osseuses, sans extension aux tissus mous et donc non mesurables par RECIST1.1. Bien que les premiers résultats soient encourageants [225], il n'y a pour le moment pas encore suffisamment de données dans la littérature : la réponse pourrait être apportée par les résultats de l'essai FIRSTMAPPP. La seconde catégorie est celle des

sujets apparentés *SDHx*, c'est-à-dire les sujets chez qui une mutation *SDHx* a été découverte dans le cadre du dépistage familial mais qui n'ont jamais développé de tumeur. L'Endocrine Society préconise de ne pas multiplier les examens irradiants et de préférer l'IRM au scanner chez les patients prédisposés, suite aux bons résultats de l'angiogramme tête et cou de l'étude PGL-EVA [78, 20], mais, de la même façon que l'EANM, n'individualise pas spécifiquement ces sujets non malades [269].

Dans le cadre d'une étude monocentrique rétrospective chez 30 patients réalisée grâce à une collaboration avec le service de médecine nucléaire de l'Institut Gustave Roussy, nous avons montré une très bonne sensibilité et spécificité de la  $^{18}\text{F}$ -FDG-TEP dans cette indication précise (Article 5 des annexes) qui reste à confirmer sur une plus large cohorte.

## II. Pistes d'imageries innovantes

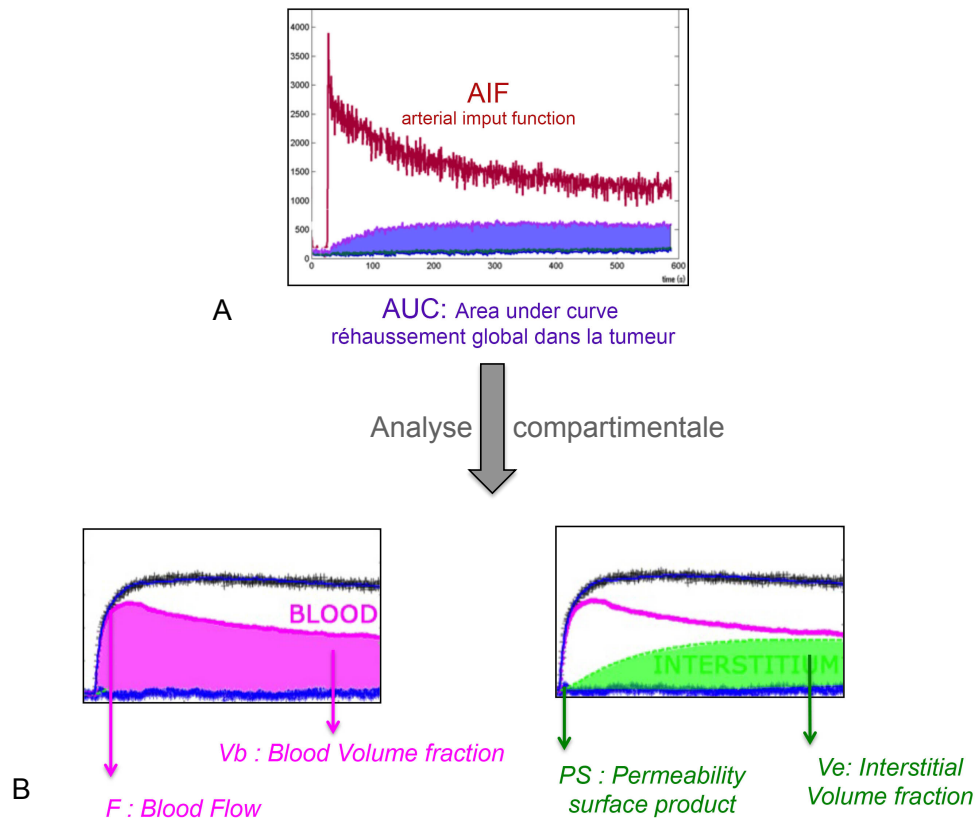
### 1. IRM dynamique de contraste (IRM-DCE)

#### a) Principe

Le réseau microcirculatoire est composé de capillaires assurant, entre autres, l'apport de substrats énergétiques et d'oxygène nécessaire au bon fonctionnement des tissus. L'objectif de l'imagerie de la microcirculation est d'étudier le flux sanguin au sein du réseau capillaire et les échanges entre ce réseau et l'espace extravasculaire avoisinant (également appelé tissu interstitiel). La microcirculation est souvent modifiée à un stade plus précoce que les changements tumoraux morphologiques, comme la taille par exemple [271], et son imagerie peut être utilisée comme un biomarqueur de réponse précoce au traitement [272].

Plusieurs techniques d'imagerie en coupes ont été développées pour l'étude de la microcirculation, la plus largement utilisée étant l'analyse de la cinétique du rehaussement tissulaire après injection en bolus d'un agent de contraste (CA), principe même de l'IRM dynamique de contraste ("Dynamic Contrast-Enhanced imaging" (DCE-IRM) en anglais). Cette technique repose sur les deux principes que sont le passage du CA au sein du réseau microcirculatoire, suivie de son accumulation dans l'interstitium tissulaire après passage à travers la membrane capillaire. Elle permet ainsi d'apprécier les paramètres fonctionnels vasculaires (flux et volume sanguin capillaires) et la qualité des échanges entre les vaisseaux et les tissus (perméabilité capillaire). C'est une

méthode non irradiante qui présente une bonne résolution temporelle et est utilisable en routine clinique. L'IRM-DCE permet la caractérisation de la microcirculation tumorale, soit qualitativement, soit quantitativement en analysant par modélisation compartimentale les variations temporelles du signal tissulaire en fonction de la cinétique d'entrée artérielle de l'agent de contraste, appelée "Arterial Input Function" (AIF) [273]. Les modèles mathématiques utilisés corrèlent le rehaussement global dans la tumeur (ou le tissu) à cette AIF. L'analyse globale initiale consiste à quantifier la microcirculation dans la tumeur par mesure de l'AUC (Area Under the Curve) qui correspond à l'aire sous la courbe de rehaussement mesurée dans le tissu. Certains auteurs recommandent de mesurer plutôt le  $K^{\text{trans}}$ , mesure composite de la perméabilité, de la surface capillaire et du flux sanguin, dont la résultante est proche de la mesure d'AUC, mais qui serait moins influencée par le volume interstitiel extracapillaire [274]. De façon schématique, lors de son premier passage dans la circulation (typiquement 45-60 secondes après injection), le CA se retrouve de façon prédominante en intravasculaire, autorisant l'étude de la perfusion (flux capillaire F ou « blood flow » en anglais, noté F), le volume sanguin relatif (Vb) et le temps de transit intravasculaire. Ensuite, au cours des 2-10 minutes suivantes, le passage progressif du CA dans l'espace extravasculaire permet de mesurer la perméabilité capillaire (PS) et la fraction volumique interstitielle (Ve)[275].

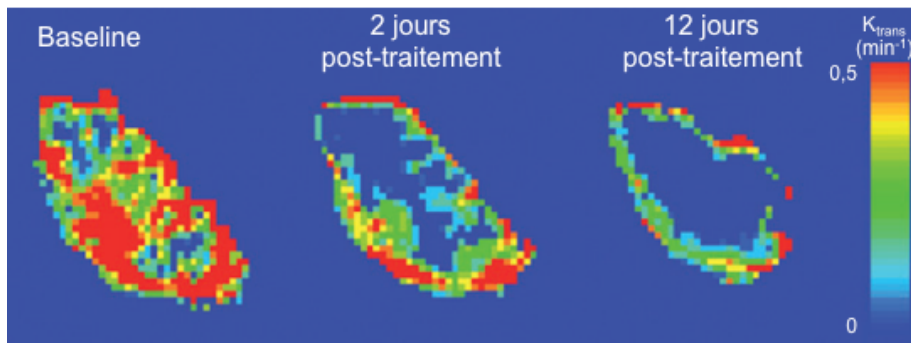


**Figure 24 : Modélisation du signal de rehaussement au niveau de l'aorte et du tissu (A). Obtention des paramètres après analyse compartimentale par un modèle à 2 compartiments/4 paramètres (B).**

#### d) Apport en pratique clinique

Cette technique est bien entendue dépendante des paramètres d'acquisition, du type d'agent de contraste utilisé, de son mode d'injection ainsi que du type de modélisation mathématique, ce qui peut diminuer sa reproductibilité [276]. Malgré tout, la DCE-IRM a montré en pratique clinique sa capacité à caractériser la vascularisation tumorale et à étudier la réponse vasculaire post-thérapeutique à certaines thérapies, dont les antiangiogéniques [276]. En particulier, depuis sa première utilisation en 2002 dans une étude de phase I [277], l'IRM-DCE a largement démontré sa capacité à évaluer les effets pharmacodynamiques précoces des thérapies ciblant le VEGF [278]. On observe généralement une réduction précoce de l'AUC et du  $K^{\text{trans}}$  (Figure 25) dans plusieurs types de cancers solides (cancer du sein, colorectal, glioblastome multiple, hépatocarcinome, ...), que ce soit avec les anti-VEGF comme le bevacizumab ou les inhibiteurs de tyrosine kinase (Sunitinib, Vandetanib, Pazopanib, ...) [278].





**Figure 25 : Exemple de carte paramétrique de  $K^{\text{trans}}$  d'une métastase hépatique de cancer colorectal d'un patient traité par bevacizumab.** On observe une nette réduction du  $K^{\text{trans}}$  au niveau central dès le 2<sup>e</sup> jour après le début du traitement qui se confirme au 12<sup>e</sup> jour. D'après O'Connor et coll, 2012 [278].

Concernant la capacité de l'IRM-DCE (ou de la TDM-DCE) à prédire la réponse au traitement et la survie sans progression, les études sont plus controversées. Les résultats dépendent du type de tumeur et de l'agent antiangiogénique utilisé [276]. Dans le cancer du rein à cellules claires (RCC), il apparaît que les tumeurs apparaissant les plus vascularisées avant traitement sont celles qui ont le plus fort taux de réponse [279-282], mais il n'y a pas toujours de lien entre la visualisation d'une réponse vasculaire et la survie globale des patients [280]. De la même façon, dans d'autres types de cancers solides comme l'hépatocarcinome, les paramètres d'imagerie permettent de prédire la réponse au traitement mais pas la survie globale ou la survie sans progression [283-285]. Enfin, à l'inverse, les résultats des études réalisées dans les gliomes de haut grade montrent plutôt des résultats contraires avec une augmentation de la survie chez les patients dont la tumeur est peu vascularisée [286, 287], ceci pouvant s'expliquer par un meilleur pronostic global des tumeurs peu vascularisées indépendamment du traitement utilisé [288, 289].

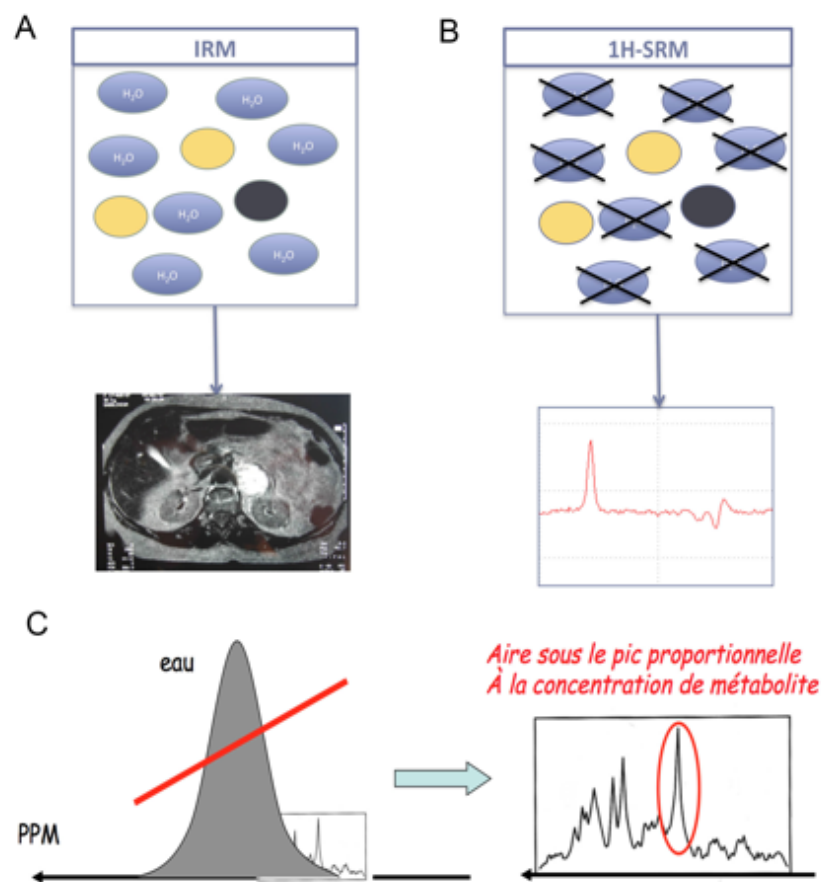
Cette technique est donc adaptée pour l'analyse *in vivo* de la microcirculation et de la réponse aux thérapeutiques antiangiogéniques. Son utilité dans les PCC/PGL reste à évaluer.

## 2. Spectroscopie-IRM ( $^1\text{H-SRM}$ )

### a) Principe

La spectroscopie protonique ( $^1\text{H-SRM}$ ) est une technique permettant l'analyse des composants d'un tissu basée sur l'étude de la vitesse de précession des noyaux

d'hydrogène (proton) constitutifs d'une molécule. D'autres techniques de SRM, moins développées en routine clinique, sont basées sur l'étude d'autres atomes comme le carbone ou le phosphore. Dans ce type de séquences, une impulsion de radiofréquence (RF) est utilisée pour exciter de façon sélective les noyaux d'hydrogène. La principale différence avec une séquence d'IRM morphologique est l'exclusion première des molécules d'eau. En effet, toute la difficulté du recueil du signal repose sur l'abondance des molécules d'eau et de graisse au sein d'un tissu vivant, comparativement aux autres molécules d'intérêt qui sont dans un rapport de l'ordre de 1 à 100 000, ce qui oblige à supprimer le signal de l'eau pour leur détection et leur caractérisation.



**Figure 26: Schématisation des différences entre les séquences d'IRM morphologique dont le signal dépend principalement des protons de l'eau et des lipides (A) et les séquences de  $^1\text{H}$ -SRM explorant les éléments constituant le tissu après saturation des protons de l'eau (B) représenté sous forme de spectre. La mesure de l'aire sous le pic permet une quantification du métabolite étudié dans le tissu (C)**

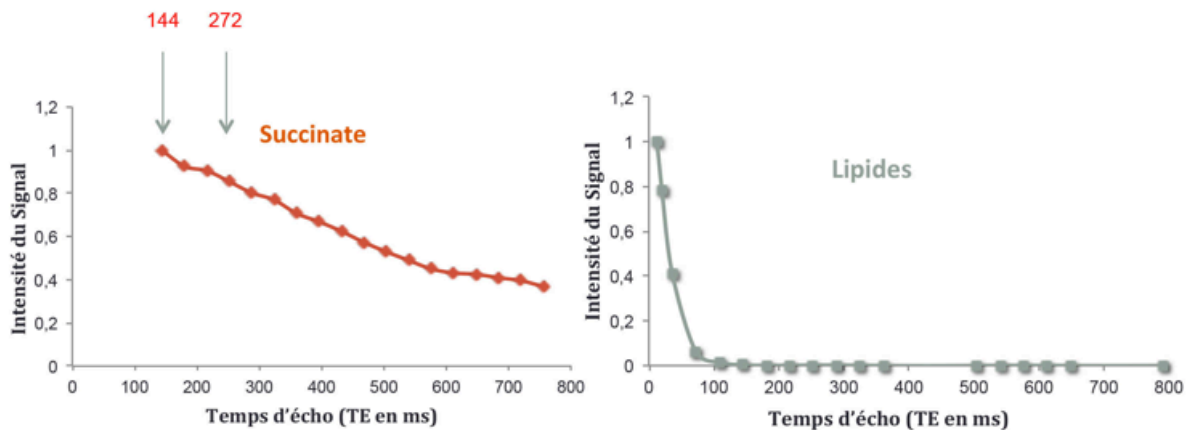
La SRM repose sur deux principes physiques différents et complémentaires :

- Le premier correspond à la vitesse de précession des noyaux d'hydrogène. Cette vitesse dépend de l'environnement moléculaire, c'est-à-dire des constituants atomiques de la molécule ainsi que du champ magnétique initial exercé pour mettre en phase les protons ( $B_0$ ). Par convention, afin de permettre une mesure reproductible de ces vitesses de précession, chaque vitesse est comparée à la vitesse de précession des noyaux d'hydrogène au sein d'une molécule de référence (0 ppm), le tétraméthylsilane, et exprimée en partie par million (ppm). Ce différentiel, appelé déplacement chimique, est unique pour chaque noyau d'hydrogène d'une région moléculaire : le déplacement chimique des protons de l'eau est de 4,7 ppm.

- Le second repose sur le phénomène de couplage scalaire correspondant à l'interaction entre noyaux d'hydrogène de différentes régions moléculaires et induisant de petites variations de la vitesse de précession, visualisées sur la représentation spectrale par la présence éventuelle de dédoublement ou de triplement des pics.

L'analyse combinée du déplacement chimique et du couplage scalaire permet non seulement la détection mais aussi la caractérisation de l'architecture moléculaire, base de la SRM. Le succinate ( $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ) présente par exemple un pic unique caractéristique à 2,44 ppm correspondant aux protons de son groupe méthylène  $\text{CH}_2$ .

Une limite concernant l'utilisation et la sensibilité de cette technique pour la détection du succinate est la contamination par le signal des protons de la graisse. En effet, le signal de la graisse est caractérisé par une succession de pics entre 0,6 et 3 ppm (principalement aux alentours de 0,9 ppm), limitant la détection des métabolites de plus faibles concentrations dont le déplacement chimique est compris dans cet intervalle, ce qui est le cas du succinate. Outre la sélection d'un volume d'intérêt (VOI) excluant autant que possible les tissus graisseux péri-lésionnels, une solution repose sur l'utilisation des séquences de spectroscopie à temps d'écho (TE) long [290], diminuant certes la sensibilité de détection due à la décroissance exponentielle du signal, mais permettant de minimiser la contamination compte-tenu du différentiel de relaxation transversale ( $T_2$ ) existant entre les protons et les autres métabolites d'intérêt tel le succinate. En effet, l'augmentation du TE induit une chute drastique du signal des protons de molécule à  $T_2$  court (cas des lipides,  $T_2$  d'environ 30-40ms), beaucoup plus faible voire parfois négligeable pour les protons des molécules à  $T_2$  long [290], améliorant de manière spectaculaire la détection du succinate ( $T_2 > 500\text{ms}$ ) (Figure 27).



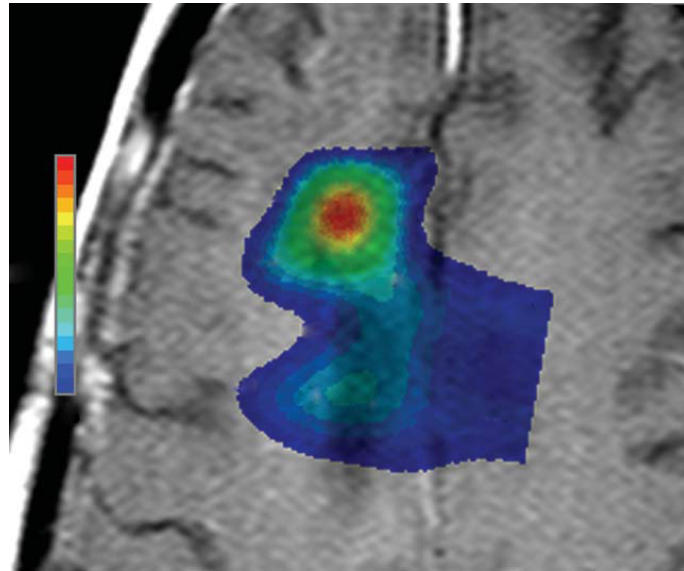
**Figure 27 : Variation des intensités des signaux du succinate et des lipides obtenus par  $^1\text{H}$ -SRM sur l'IRM 4.7 Tesla dédiée au petit animal du centre de recherche cardiovasculaire de l'HEGP.** Les lipides présentent une décroissance exponentielle du signal recueilli en fonction du TE, avec un T2 évalué entre 30 et 40 ms, alors que la décroissance du succinate est beaucoup plus lente (T2 > 500ms).

#### e) Utilisation en cancérologie

A l'heure actuelle, c'est dans le domaine des tumeurs cérébrales, dominées par les gliomes, que la  $^1\text{H}$ -SRM a été la plus étudiée [291, 292]. Dans ce type de tumeurs, le grade histologique est primordial alors que la chirurgie est rarement indiquée. La  $^1\text{H}$ -SRM peut être utilisée pour :

- guider la biopsie chirurgicale et les traitements focaux [291, 293]. Par rapport au tissu cérébral sain, le spectre tumoral est en effet caractérisé par une diminution du marqueur de différenciation neuronale N-acetyl-aspartate (NAA) et de la créatinine associée à une augmentation du taux de choline, indicateur de prolifération. Classiquement, on utilise le rapport choline/créatinine pour différencier la tumeur du tissu sain périphérique ; il est également possible de réaliser des cartes paramétriques afin de guider le geste chirurgical dans la zone la plus active (Figure 28);
- l'évaluation *in vivo* du grade histologique des tumeurs cérébrales primitives et/ou le diagnostic différentiel entre tumeur primitive et secondaire. Dans cette indication, la  $^1\text{H}$ -SRM a une très bonne efficacité en comparaison avec l'histologie (plus de 90% d'exactitude) [294-296] ;

- l'identification des récurrences et le diagnostic différentiel avec des lésions résiduelles de radionécrose post-radiothérapie (les lésions actives ayant un taux intra-tumoral de choline plus élevé) [297, 298];



**Figure 28 : Carte paramétrique en  $^1\text{H}$ -SRM de l'activité tumorale d'un gliome de haut grade.** L'échelle colorimétrique représente le ratio choline/créatinine (rouge=rapport maximal et bleu=rapport minimal) et permet de guider la biopsie chirurgicale dans la zone la plus active. D'après Kwock, 2006. [299]

La  $^1\text{H}$ -SRM est également de plus en plus utilisée pour aider au diagnostic du cancer de la prostate [300] et du cancer du sein [301, 302], et commence même à être utilisée comme marqueur de réponse à certains traitements [303], toujours sur le principe de l'accumulation de choline dans les tumeurs malignes par rapport aux tissus sains.

Très récemment, la  $^1\text{H}$ -SRM s'est vue attribuer une nouvelle indication dans le glioblastome. Ces tumeurs présentent fréquemment une mutation génétique somatique sur les gènes *IDH1* et *IDH2* avec des conséquences métaboliques (accumulation du 2-hydroxyglutarate) qui sont, de façon très intéressante, mesurables *in vivo* par spectroscopie [304, 305]. Après le domaine de l'histologie, l'imagerie fonctionnelle pourrait donc s'immiscer dans la génétique, ce qui nous a conduit à tester cette méthode sur les PCC/PGL *SDHx*-dépendants. Ces considérations font l'objet d'une partie du Chapitre 2 de cette thèse.

## OBJECTIFS ET PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

Dans le cadre d'un programme européen FP7 (Seventh Framework Programme) ENS@T-Cancer concernant les cancers rares de la surrenale, mon équipe d'accueil avait pour objectif le développement et l'étude de modèles de PCC/PGL *Sdhb*-dépendants, afin de permettre à la fois d'initier des études précliniques mais aussi d'élucider les mécanismes fondamentaux impliqués pour les molécules déjà en cours d'études chez les patients.

Dans ce contexte les objectifs de mon travail de thèse étaient :

- l'élaboration et le phénotypage d'un modèle murin de tumeurs *Sdhb*-dépendant ;
- la mise au point de techniques d'imagerie innovantes spécifiques de ces tumeurs et permettant l'étude de la réponse précoce au traitement
- l'étude de la réponse au traitement par antiangiogéniques, plus précisément de la réponse au sunitinib, molécule choisie dans le cadre de l'essai FIRSTMAPPP.

L'ensemble de mon travail a donc porté sur l'élaboration et le phénotypage par imagerie de modèles murins de PCC/PGL *Sdhb*-dépendants.

Dans une première partie, j'ai achevé l'étude de plusieurs modèles murins d'inactivation constitutive et conditionnelles du gène *Sdhb*, projet initié il y a plusieurs années par Judith Favier et dont l'objectif était de générer une souris prédisposée au PCC/PGL *SDHB*-dépendant. Malgré les nombreuses stratégies mises en place au sein du laboratoire, ce modèle s'est avéré infructueux. Ces résultats ont été rapportés dans le cadre d'un article de revue publié dans le journal *Molecular and Cellular Endocrinology*, que je signe en première auteure.

Par la suite, grâce à la disponibilité au laboratoire d'une lignée cellulaire murine de cellules chromaffines *Sdhb*<sup>-/-</sup>, le premier modèle de tumeurs *Sdhb*-dépendantes a pu être mis au point, sous la forme d'allogreffes sous-cutanées dans le coussinet graisseux (fat-pad). J'ai donc pu m'attacher à la caractérisation de ce modèle, notamment sur le plan métabolique et vasculaire *in vitro*, mais aussi *in vivo*, par imagerie multimodale, grâce à la plateforme d'imagerie du petit animal du PARCC dirigée par mon co-directeur de thèse Bertrand Tavitian. Ces travaux m'ont permis de valider la pertinence de ce modèle, qui reproduit la particularité des tumeurs humaines *SDH*-dépendantes,

notamment l'accumulation de succinate, un métabolisme du glucose important et une vascularisation accrue. Nous avons pu mettre au point une technique tout à fait innovante de détection du succinate (et donc indirectement de la présence d'une mutation sur l'un des gènes *SDHx*) *in vivo* par  $^1\text{H}$ -SRM et transféré cette technique appelée SUCCES (SUCCinate Estimation by Spectroscopy) en clinique, ce qui a donné lieu à un article en révision dans la revue *Clinical Cancer Research* dont je suis la première auteure.

Le comportement très particulier de ces tumeurs caractérisables *in vivo* par imagerie multimodalité (IRM-DCE, imagerie optique de l'angiogenèse et  $^{18}\text{F}$ FDG-TEP), la pertinence à la fois de ce modèle et des techniques d'imagerie mises en place pour sa caractérisation font l'objet d'un dernier article actuellement en préparation.

Enfin, l'étude de la réponse au sunitinib est en cours avec des premiers résultats encourageants.

## CHAPITRE 1

-

LA QUETE D'UN MODELE PREDISPOSE  
DE TUMEURS *Sdhb*<sup>-/-</sup>





## CHAPITRE 1

Plusieurs modèles murins génétiquement modifiés ont été générés afin d'étudier la tumorigenèse du phéochromocytome. L'intérêt de ces modèles est de suivre l'histoire naturelle de ces tumeurs et dans un second temps, d'évaluer de potentielles thérapies innovantes lors d'études pré-cliniques.

### A. La transgénèse murine

Les modèles expérimentaux ont été construits chez la souris afin de mimer les caractéristiques génétiques et biochimiques de la pathologie humaine. Ils ont été établis en introduisant des modifications génétiques germinales (surexpression d'un oncogène ou inactivation (KO) d'un gène suppresseur de tumeur) associées à des modifications d'expression de gènes dans des tissus bien précis grâce à l'utilisation de promoteurs inductibles dont l'expression est dépendante du tissu (expression conditionnelle tissu-spécifique). Ces modèles permettent d'étudier l'évolution tumorale spontanée chez un animal immuno-compétent et sont complémentaires des xénogreffes, où un fragment d'une tumeur humaine est introduit chez des souris immunodéprimées,

Les souris porteuses de mutations germinales sont obtenues par des techniques de transfert de gène, par transgénèse ou recombinaison homologue, qui consistent en l'introduction d'un matériel génétique (sous forme d'ADN ou d'ARN), qui sera transmis à la descendance.

Chez la souris, on distingue deux grands types de transgénèse permettant d'introduire de l'ADN exogène:

- la transgénèse additive classique, qui consiste en l'insertion aléatoire d'un transgène par micro-injection pro-nucléaire d'ADN cloné dans des œufs fertilisés;
- la recombinaison homologue ou transgénèse ciblée, qui consiste à modifier la séquence d'un gène endogène dans des cellules ES par recombinaison homologue.

La transgénèse additive classique par micro-injection pro-nucléaire a pour but d'exprimer un gène non exprimé chez l'animal cible. Certaines copies du transgène vont ainsi pouvoir s'insérer spontanément et au hasard dans le génome du pronucléus. Cette intégration chromosomique du transgène n'est stable que dans 10 à 40 % des souris obtenues [306].

La première souris transgénique a été développée en 1982 [307, 308]. Il s'agissait d'une souris dans laquelle avait été introduit par transgénèse classique le gène codant pour l'hormone de croissance d'une souche de rat. La vraie nouveauté à l'époque était d'arriver à faire exprimer ce gène provenant d'une autre espèce, rendant ainsi les souris transgéniques nettement plus grosses que leur fratrie n'exprimant pas le gène (Figure 29). En effet, la première expérience de transgénèse couronnée de succès avait eu lieu deux ans plus tôt, cependant, bien qu'intégré dans le génome des souris, ce premier transgène n'était pas fonctionnel [309].



**Figure 29 : La première souris transgénique (droite) porteuse d'un transgène de rat codant pour l'hormone de croissance. [307]**

Afin de pallier à l'insertion aléatoire des transgènes et également d'induire de nouvelles modifications génétiques (délétion, mutation ponctuelle), a été développée une technique de ciblage génique, ou mutagenèse dirigée, rendue possible grâce au processus de recombinaison homologue qui a lieu lors des crossing-over (enjambements) de la méiose entre l'ADN exogène transfecté dans les cellules eucaryotes et l'ADN génomique. L'ADN exogène s'intègre dans le génome en entraînant soit l'invalidation d'un gène endogène (knock-out, KO), soit l'expression de ce gène exogène ou d'un gène endogène ayant subi préalablement une mutation ponctuelle par mutagenèse dirigée (knock-in, KI). Ces modifications génétiques (KO ou KI) sont réalisées initialement dans des cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES)

qui sont ensuite injectées dans le blastocèle d'embryons au stade blastocyste prélevés sur une femelle donneuse avant d'être réinjectés dans une femelle receveuse. Les souriceaux dérivant des blastocystes modifiés seront alors mosaïques, l'espoir étant que les cellules modifiées aient colonisé la lignée germinale. A partir de croisements de ces souriceaux et de leurs descendances on obtiendra les souris transgéniques pour le gène considéré. Cette stratégie, plus précise et permettant un meilleur contrôle de la transgénèse, est néanmoins plus longue à mettre en place et les premières souris n'ont été obtenues qu'à la toute fin des années 80 [310, 311]. Par ailleurs, le caractère ubiquitaire et constitutif des anomalies génétiques induites peut présenter des inconvénients. Si le gène d'intérêt est requis pour le développement, son KO provoquera une mortalité *in utero* ou au cours des premiers jours de vie. Pour pallier à cela, des systèmes dans lesquels l'inactivation peut se produire à la demande ou ne toucher qu'un seul organe ont été mis au point: c'est le modèle de KO conditionnel. La stratégie la plus utilisée fait appel au système Cre/loxP. Il est basé sur la capacité de l'enzyme Cre-recombinase (Cre) du bactériophage P1 à catalyser la recombinaison spécifique entre deux sites loxP et ainsi entraîner l'excision des séquences situées entre ces deux sites [312]. Les souris porteuses de cet allèle dit "floxed" sont croisées avec des souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle de promoteurs tissu-spécifiques ou inductibles dans le temps [313].

Le début des années 90 a vu la création d'une succession de modèles de prédisposition au cancer. Les gènes suppresseurs de tumeur majeurs comme *p53*, *Rb* (Rétinoblastome), ainsi que de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ont été invalidés et leur implication dans la tumorigenèse a commencé à être étudiée [314-317].

C'est également à ce moment là que les premiers modèles murins prédisposés de PCC ont vu le jour, avec le KI de *c-mos* mimant la NEM2 en 1992 [318] et 2 ans plus tard le KO de *Nf1* [319].

## B. Les modèles prédisposés au PCC/PGL

### I. Contexte et objectifs du travail

Les modèles murins de phéochromocytomes incluent des lignées porteuses de mutations sur les gènes suppresseurs de tumeurs *Nf1*, *Rb*, *Vhl*, *Sdhc*, *Pten* et *Ink4a* [319-327] ainsi que sur les proto-oncogène *c-mos*, *Ret*, *ErbB2* et *B-Raf* [318, 328-330]. De façon intéressante, les souris présentant des altérations sur les voies de tumorigenèse

du Cluster 2 (activant les voies MAPK et PI3K) développent des PCC avec des incidences variables selon les gènes impliqués et, il a même été observé récemment pour la première fois, des PGL (B-Raf<sup>V600E</sup>). En revanche, aucun modèle murin ciblant les gènes du Cluster 1 ne développe de PCC ni de PGL.

Il n'existe donc pas pour le moment de modèle animal de PCC/PGL comportant une activation de la voie « pseudo-hypoxique ». Par ailleurs, les mécanismes moléculaires responsables de l'invasivité particulière des tumeurs *SDHB*-dépendantes restent à élucider.

Plusieurs approches ont été développées par mon équipe d'accueil pour générer un modèle animal de PCC/PGL héréditaire lié à *SDHB*. La quête de ce modèle murin prédisposé a duré 10 ans avec la mise en place de nombreuses stratégies de transgénèses dirigées constitutionnelles, conditionnelles et même la combinaison de plusieurs KO (double KO et double KO conditionnels). Plusieurs étudiants y ont consacré leurs travaux : le phénotypage des souris KO constitutionnel *Sdhb*<sup>+/-</sup> et conditionnel sous le contrôle du promoteur Tyrosine Hydroxylase (TH) (TH-Cre/*Sdhb*<sup>lox</sup>) a constitué mon projet de master 2 au sein du laboratoire, puis le relais a été pris par le Dr Alexandre Buffet pour les souris KO conditionnelles sous le contrôle du promoteur PSA (Prostate Specific Antigene , PSA-Cre/*Sdhb*<sup>lox</sup>) et les souris double KO *Sdhb*<sup>+/-</sup> / *Pten*<sup>+/-</sup>, enfin le phénotypage des dernières lignées et de la lignées double KO conditionnel PSA-Cre/*Sdhb*<sup>lox</sup>/*Pten*<sup>lox</sup> a été achevé au cours de ma première année de thèse avec l'aide du Dr Constance Thibaut (Master 2).

Ces travaux, accompagnés d'une revue de la littérature sur les modèles existant de PCC, ont fait l'objet de l'article 1 de cette thèse.

## II. Article 1

**Lepoutre-Lussey C, Thibault C, Buffet A, et al.**

“From *Nf1* to *Sdhb* knock-out: successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma.”

Mol Cell Endocrinol. 2015 Jun 27.



## From *Nf1* to *Sdhb* knockout: successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma

Charlotte Lepoutre-Lussey<sup>1,2</sup>, Constance Thibault<sup>1,2</sup>, Alexandre Buffet<sup>1,2</sup>, Aurélie Morin<sup>1,2</sup>, Cécile Badoual<sup>1,2,3</sup>, Paule Bénit<sup>4,5</sup>, Pierre Rustin<sup>4,5</sup>, Chris Ottolenghi<sup>2,6,7</sup>, Maxime Janin<sup>2,6,7</sup>, Luis-Jaime Castro-Vega<sup>1,2</sup>, Jan Trapman<sup>8</sup>, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo<sup>1,2,9</sup> and Judith Favier<sup>1,2</sup>

1- INSERM, UMR970, Paris-Cardiovascular Research Center, F-75015 Paris, France

2- Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France

3- Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'anatomopathologie, F-75015 Paris, France

4- INSERM, UMR1141, Hôpital Robert Debré, F-75019 Paris, France

5- Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot, Paris, France.

6- Metabolic Biochemistry, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

7- INSERM, Unit 1124, Paris, France

8- Department of Pathology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, The Netherlands

9- Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, F-75015 Paris, France

Corresponding author: Dr. Judith Favier, [judith.favier@inserm.fr](mailto:judith.favier@inserm.fr)

### Abstract

Pheochromocytomas and paragangliomas (PPGL) are rare neuroendocrine tumors characterized by a high frequency of hereditary forms. Based on transcriptome classification, PPGL can be classified in two different clusters. Cluster 1 tumors are caused by mutations in *SDHx*, *VHL* and *FH* genes and are characterized by a pseudohypoxic signature. Cluster 2 PPGL carry mutations in *RET*, *NF1*, *MAX* or *TMEM127* genes and display an activation of the MAPK and mTOR signaling pathways. Many genetically engineered and allografted mouse models have been generated these past 30 years to investigate the mechanisms of PPGL tumorigenesis and test new therapeutic strategies. Among them, only Cluster 2-related models have been successful while no Cluster 1-related knockout mouse was so far reported to develop a PPGL. In this review, we present an overview of existing, successful or not, PPGL models, and a description of our own experience on the quest of *Sdhb* knockout mouse models of PPGL.

### III. Discussion

Chez l'homme, les mutations du gène *SDHB* prédisposent au développement de PCC et de PGL avec une pénétrance relativement élevée (environ 65% à 40 ans) [81]. Dans notre modèle murin hétérozygote et dans le KO conditionnel, nous n'avons pas observé d'augmentation du développement tumoral et notamment aucun PCC ni PGL. Cette divergence entre l'homme et la souris du lien génotype/phénotype n'est pas la première observée dans ce domaine, en particulier pour les KO concernant les gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, les souris KO pour le gène *SDHD* ne développent pas non plus de PGL alors que la pénétrance de la maladie chez l'homme est encore plus forte (84% à 40 ans) [81, 324]. Les souris hétérozygotes pour le gène *VHL* développent des tumeurs vasculaires mais ne sont pas non plus un modèle de PCC [322]. A l'opposé, l'inactivation du gène *Pten* est associée à une incidence élevée de PCC chez la souris, fréquemment malins, pourtant la perte chez l'homme de ce gène suppresseur de tumeur est responsable entre autre du syndrome de Cowden qui prédispose à de nombreux cancers mais n'a jamais été décrite comme étant responsable d'un PCC [331, 332] et n'est pas non plus retrouvée au niveau somatique [136]. Le seul modèle murin ayant une grande homologie phénotypique avec l'homme est le KO du gène *NF1*, responsable de 1% des PCC chez l'homme [333] et pouvant être à l'origine de PCC chez la souris avec une incidence de 18% sur un fond génétique mixte (croisement 129/sv et C57BL/6) [319]. Il est intéressant de noter que ce même KO ne prédisposait pas aux PCC sur un fond génétique non mixte (C57BL/6) [334]. En effet, le fond génétique est très probablement un élément important à prendre en compte. De nombreuses études (pour revue voir [335]) montrent que l'expression des mutations sur des gènes nucléaires impliqués dans les fonctions mitochondriales est très largement modulée par le fond génétique de la souris, avec un meilleur rendement lorsque le fond génétique est mixte, ce qui était le cas dans nos modèles.

De plus, contrairement au rat qui développe plus fréquemment des PCC spontanés, ces tumeurs sont beaucoup plus rares chez la souris (comme chez l'homme) avec une fréquence estimée à moins de 3% dans la plupart des études [336], ce qui pourrait en partie expliquer les difficultés rencontrées dans les modèles murins. Cependant, les PCC développés chez le rat sont assez différents de ceux de l'homme, et un modèle chez la souris semble réellement le plus approprié dans le cas du PCC [336].

Le second événement génétique somatique spontané, nécessaire pour conduire au développement tumoral, serait donc trop rare chez la souris et c'est pour cette raison qu'une approche d'inactivation conditionnelle a été envisagée d'emblée par mon équipe d'accueil. Ces souris présentent une inactivation hétérozygote ubiquitaire du gène *Sdhb* et une inactivation homozygote, uniquement dans les tissus exprimant la TH (notamment la médullosurrénale et les paraganglions) ou le PSA (médullosurrénale). Elles devraient refléter la pathologie humaine puisque les patients atteints de phéochromocytomes SDH-dépendants sont porteurs d'une mutation germinale à l'état hétérozygote et présentent une perte d'hétérozygotie somatique au niveau du tissu tumoral. Le fait que ces souris n'aient pas développé de PCC/PGL nous conduit à discuter du choix du promoteur et du niveau d'expression de la Cre recombinase dans les tissus cibles. L'expression de la Cre étudiée par IHC (ainsi qu'après croisement avec une souris Rosa-LacZ, *données non présentées*) est très faible voire absente dans la surrénale, et bien qu'elle soit plus conséquente dans le glomus carotidien, reste très probablement insuffisante pour conduire à l'émergence d'un clone cellulaire tumoral *Sdhb*<sup>-/-</sup>. En revanche, le promoteur PSA (Prostate Specific Antigen) est un promoteur fort qui conduit à une expression non spécifique importante dans la médullosurrénale et a permis le développement de PCC dans le modèle de KO conditionnel *PSA-Cre/Pten* [326]. Dans notre modèle de double KO conditionnel *Pten/Sdhb*, l'expression de la Cre sous le contrôle du promoteur PSA n'est pas remise en question étant donné la forte prévalence, équivalente au KO *Pten* constitutionnel, des PCC lorsque la mutation *Sdhb* associée est à l'état hétérozygote (souris *PSA-Cre/Sdhb*<sup>+/*lox*</sup>/*Pten*<sup>+/*lox*</sup> et *PSA-Cre/Sdhb*<sup>+/*lox*</sup>/*Pten*<sup>*lox/lox*</sup>). Dans ces conditions, l'hypothèse la plus probable expliquant la plus faible incidence des PCC dans le modèle double KO homozygote est la létalité au niveau cellulaire, et ceci même dans les cellules de la médullosurrénale, du déficit complet en SDH.

Le modèle murin de KO conditionnel décrit ici n'est donc pas un modèle de développement de PCC/PGL. Néanmoins, développer un modèle dépendant du gène *SDHB* reste essentiel en raison de la particularité de l'utilisation de la voie pseudo-hypoxique par ces tumeurs et de la sévérité de la maladie chez l'homme. Afin de disposer d'un modèle utilisable pour les essais précliniques, une stratégie d'allogreffe a été développée et fait l'objet du Chapitre 2.



## CHAPITRE 2

-

PHENOTYPAGE D'UN MODELE MURIN  
D'ALLOGREFFE DE CELLULES CHROMAFFINES  
*Sdhb*<sup>-/-</sup> PAR IMAGERIE MULTIMODALITE



## CHAPITRE 2

### A. Contexte et travaux antérieurs

#### I. Modèles cellulaires de PCC/PGL

En dehors des cellules *Sdhb*<sup>-/-</sup> générées dans le laboratoire, il existe aujourd'hui quatre lignées cellulaires de PCC : une lignée humaine et 3 lignées issues de rongeurs (Tableau 7).

Une seule lignée cellulaire humaine est décrite dans la littérature, hPheo1, obtenue grâce à l'immortalisation par la télomérase hTERT de cellules issues de la mise en culture d'un échantillon de phéochromocytome humain bénin sporadique [337]. Ces cellules ont des caractéristiques neuro-endocrines (expression de CgA, CD56, PNMT) mais ne sécrètent pas de catécholamines.

Les cellules PC12 sont historiquement la première lignée cellulaire générée à partir de la mise en culture d'un PCC de survenue spontanée chez un rat [338]. Ces cellules sont capables de sécréter des catécholamines (norépinéphrine et dopamine) et se différencient de façon réversible en neurones sympathiques sous l'effet du NGF (Nerve Growth Factor). Néanmoins, elles n'expriment pas la PNMT et ne sécrètent donc pas d'adrénaline. Vingt ans après leur découverte, mais bien avant que ce gène ne soit impliqué dans les PCC chez l'homme [109], une mutation *MAX* a été mise en cause dans la tumorigenèse de ces cellules [339]. Néanmoins, à l'époque, le déficit de la protéine *MAX* a été rendu responsable de l'établissement et du maintien de la lignée en culture et n'a pas été considéré comme élément initiateur de la tumorigenèse, n'ayant pas été retrouvé dans le tissu tumoral du PCC de rat [340].

En 2000, la même équipe dirigée par A. Tischler, a établi une seconde lignée cellulaire à partir de PCC développés chez les souris KO pour *Nf1* (cf Article 1, Chapitre 1). Les MPC (pour Mouse Pheochromocytoma Cells) ont un phénotype chromaffine avec une forte expression de TH et se différencient des PC12 par le fait qu'elles expriment la PNMT. En revanche, étonnamment, ces cellules ont une expression résiduelle de neurofibromine, contrairement aux PCC des souris *Nf1*. Les auteurs suggèrent que cette expression résiduelle serait la condition *sine qua non* pour éviter la différenciation de ces cellules en cellules neuronales, ce qui est quasiment inévitable lorsque la voie RAS est activée [341]. Quelques années plus tard, une version plus agressive et invasive de ces cellules, les

MTT (Mouse Tumor Tissue-derived) ont été générées à partir d'une métastase hépatique survenue après injection de MPC dans une veine caudale de souris nude [342]. Après injection à des souris nude, ces MTT induisent le développement très rapide de tumeurs volumineuses avec un très fort potentiel métastatique. Par ailleurs, elles gardent un phénotype chromaffine avec la conservation d'une expression de TH, PNMT et la présence de granules de sécrétion.

#### IV. Les cellules chromaffines *Sdhb*<sup>-/-</sup>

Le premier modèle cellulaire de déficit complet en SDH a été généré par mon équipe d'accueil [114]. Ces cellules ont été obtenues en isolant les cellules chromaffines à partir de la médullosurrénale des souris *Sdhb*<sup>lox/lox</sup>. L'inactivation de *Sdhb* a été réalisée *ex-vivo*, après immortalisation spontanée des cellules, grâce à l'excision de l'exon 2 en utilisant le système de recombinaison Cre/lox. Deux clones purs de ces cellules appelées imCC (pour immortalized mouse Chromaffin Cells) ont ainsi pu être obtenus (Figure 30).

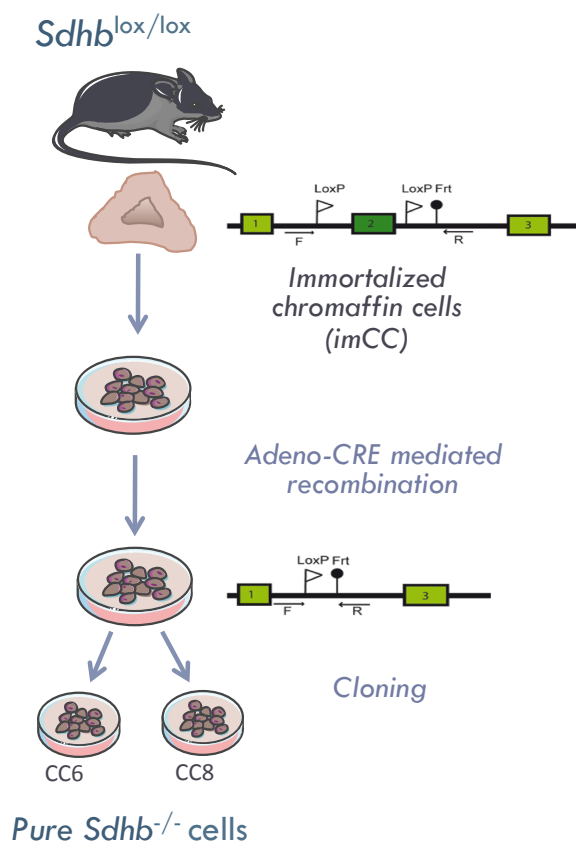
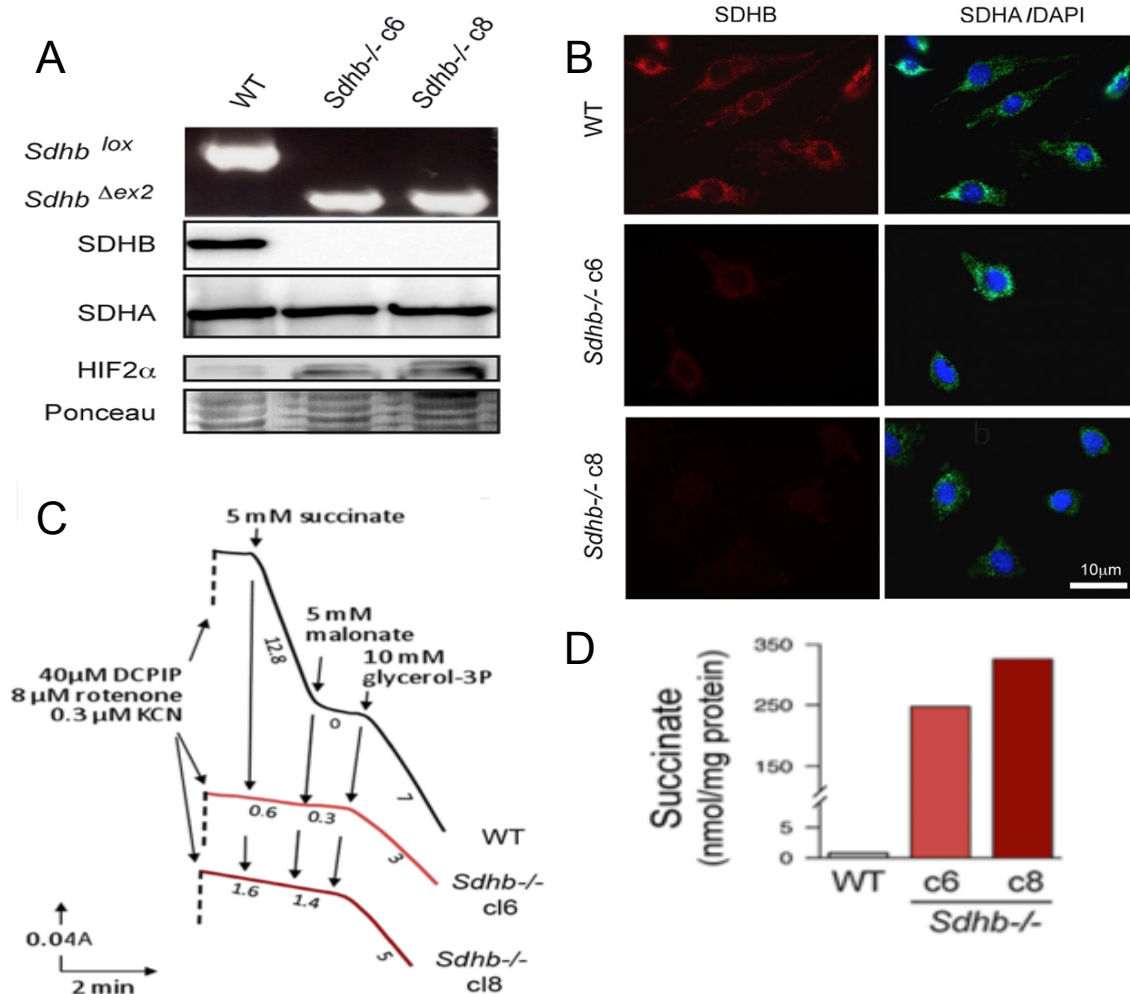


Figure 30 : Obtention de clones purs de cellules chromaffines *Sdhb*<sup>-/-</sup> (imCC).

Ces imCC présentent une inactivation complète du gène *Sdhb* se traduisant par une absence de la protéine, une perte de l'activité enzymatique de la SDH et comme dans les tumeurs humaines une accumulation de succinate (Figure 31).



**Figure 31 : Caractérisation des imCC *Sdhb*<sup>-/-</sup>.** Les 2 clones purs (c8 et c6) obtenus et sélectionnés par PCR n'expriment pas la protéine SDHB, que ce soit en western-blot (A) ou en immunofluorescence (B). L'activité enzymatique de la SDH est perdue (C) et il en résulte une accumulation de succinate dans les cellules (D).

L'analyse du méthylome des imCC a retrouvé, exactement comme dans les tumeurs humaines SDH-dépendantes, une hyperméthylation globale de l'ADN. Sur le plan phénotypique, les cellules *Sdhb*<sup>-/-</sup> prolifèrent moins vite que les cellules *Sdhb*<sup>lox/lox</sup> (appelées Wild-Type, WT) mais ont des capacités migratoires nettement plus importantes, propriété pouvant être modulée par un traitement déméthylant [114].

Nom	Année	Espèce	Mutation génétique	Croissance <i>in vivo</i>	Phénotype sécrétoire	Métastatique <i>in vivo</i>
PC12	1976	rat	<i>Max</i>	oui	oui	non
MPC	2000	souris	<i>Nf1</i>	oui	oui	oui
MTT	2009					
hPheo1	2013	homme	ND	ND	ND	ND
ImCC	2013	souris	<i>Sdhb</i>	oui	non	ND

**Tableau 6 : les modèles cellulaires développés dans le phéochromocytome.**

(ND= non déterminé)

Parallèlement, d'autres modèles cellulaires d'inactivation de *Sdhb* ont été réalisés par des méthodes d'extinction génique par siRNA, mais l'extinction n'est pas complète et surtout transitoire, n'en faisant pas un modèle stable [343]. Certains auteurs ont quant à eux généré des modèles stables de knockdown par technique de shRNA mais aucun modèle n'a été réalisé dans des cellules chromaffines, n'en faisant pas *stricto sensu* des modèles de phéochromocytomes [344, 345].

#### V. Les modèles d'allo- et de xénogreffes

Dans les modèles murins de xénogreffes, des cellules humaines ou animales issues de cancer sont transplantées soit sous la peau (greffe ectopique) soit dans l'organe d'origine de la tumeur (greffe orthotopique) de souris immunodéficientes [346-349]. On parle de xénogreffes lorsque les tumeurs ou cellules injectées proviennent d'une espèce différente de l'hôte. Les allogreffes sont réalisées au sein de la même espèce.

Les souris immunodéficientes les plus utilisées pour ce type de recherche sont les souris nude (nu/nu) athymiques (*Forkhead box protein N1* [*Foxn1nu*]) [350], et les souris SCID, très fortement immunodéprimées, puisque déficientes pour les lignées lymphocytaires B et T [351]. Les souris nude (nu/nu) sont porteuses d'une mutation sur le gène *Foxn1* avec pour conséquence l'absence de thymus et donc un déficit immunitaire lié à un nombre très réduit de cellules T [350].

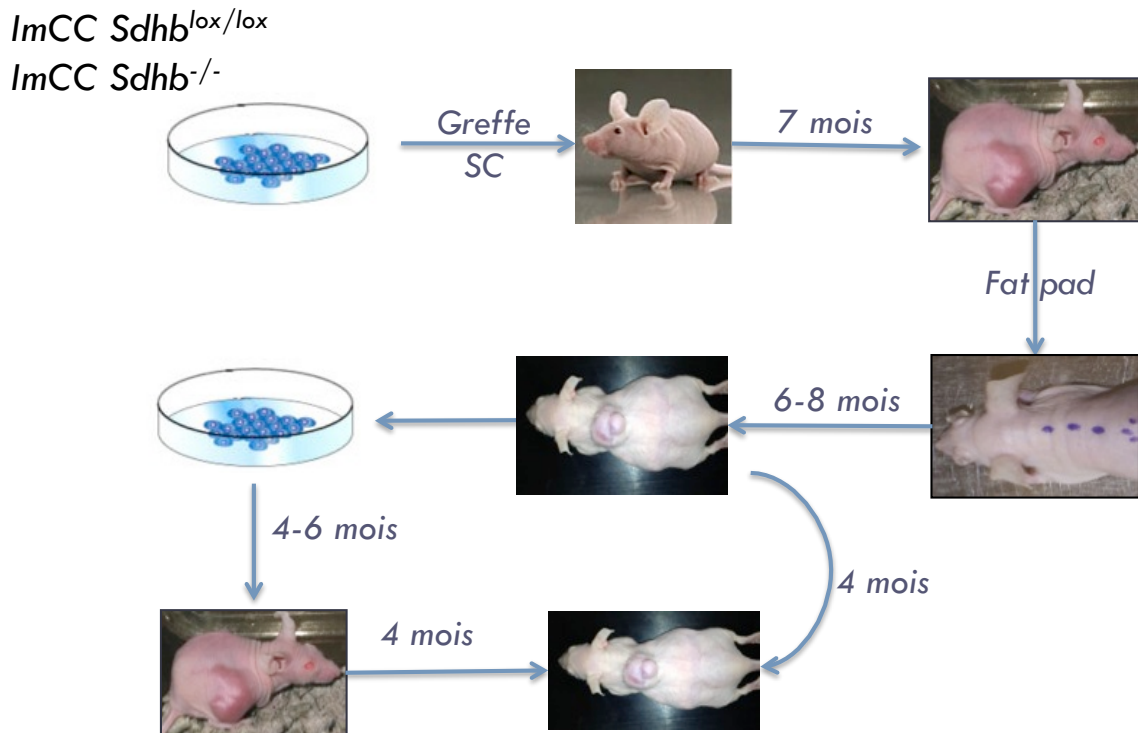
Ces modèles ont l'avantage d'être moins coûteux et plus rapides à établir que les modèles prédisposés. Ils permettent de tester l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses [352] et d'évaluer les méthodes d'imagerie [353].

## B. Travaux personnels

### I. Mise au point du modèle d'allogreffe sous-cutanée *Sdhb*<sup>-/-</sup>

Avec l'aide d'Aurélié Morin, postdoctorante dans le laboratoire, un modèle d'allogreffe sous-cutanée de tumeurs *Sdhb*<sup>-/-</sup> a été généré. Dans un premier temps, les ImCC WT et *Sdhb*<sup>-/-</sup> ont été injectées par voie sous-cutanée au niveau des deux flancs (2,5.10<sup>6</sup> dans 60µl de matrigel en haute concentration) à une série de souris nude NMRI. Les souris ayant reçu des imCC WT ont eu une prise tumorale rapide (1 mois) et complète alors que la prise tumorale des imCC *Sdhb*<sup>-/-</sup> a été considérablement plus lente et avec une pénétrance incomplète. Nous avons repris cette tumeur sous-cutanée et l'avons propagée dans le coussinet adipeux (« fat-pad », tissu graisseux et richement vascularisé situé au niveau sous-cutané entre les omoplates de la souris) d'une nouvelle série de souris nude, ce qui a conduit à une nette accélération et une prise tumorale dans 100% des cas. Des cultures cellulaires secondaires de ces tumeurs ont été réalisées à chaque étape, à la fois pour caractériser ces cellules, possiblement modifiées par le passage *in vivo*, mais également afin de disposer d'un modèle cellulaire permettant une prise tumorale rapide et efficace (Figure 32).

La caractérisation de ces tumeurs *in vitro* puis *in vivo* a fait l'objet des articles 2 et 3.



**Figure 32 : Elaboration du modèle d'allogreffe de cellules *Sdhb*<sup>-/-</sup> par propagation d'une tumeur sous-cutanée du flanc dans le « fat-pad » de souris nude (nu/nu).**

## VI. Article 2 : phénotypage par imagerie multimodalité

### 1. Mise en perspective du travail dans une problématique translationnelle

Comme cela a été évoqué dans l'introduction, la seule approche thérapeutique efficace dans le PCC/PGL est l'ablation chirurgicale de la tumeur. La radiothérapie et certaines chimiothérapies sont parfois utilisées, mais avec des efficacités variables et souvent limitées. La radiothérapie métabolique au <sup>131</sup>I-MIBG peut être proposée aux patients porteurs de métastases fixant le traceur à la scintigraphie, avec une réponse objective dans 30% des cas [209].

Les thérapies moléculaires ciblées sont aujourd'hui considérées comme les stratégies les plus prometteuses pour le traitement des patients présentant une forme progressive maligne de PCC/PGL. Parmi ces approches, les thérapies anti-angiogéniques font l'objet d'un intérêt particulier. Du fait de la surexpression du VEGF dans les tumeurs *SDHB*-dépendantes, il existe un rationnel relativement clair à l'utilisation de stratégies anti-angiogéniques dans le traitement du PCC/PGL malin [354].

Ces traitements comprennent l'inactivation de la voie du VEGF grâce à un anticorps monoclonal anti-VEGF (bevacizumab), ou à de petits inhibiteurs de tyrosine kinase tels



que le sunitinib ou le sorafenib. Ces molécules ont notamment été approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) et l'EMA (European Medicines Agency) pour le traitement des carcinomes du rein à cellules claires et les tumeurs stromales gastrointestinales, tumeurs qui peuvent par ailleurs être porteuses de mutations sur le gène *SDHB* [95, 86].

Au moment de l'élaboration de mon projet de thèse, le premier essai clinique randomisé international d'une thérapie anti-angiogénique dans le PCC/PGL, FIRSTMAPPP allait démarrer dans ce contexte. Mon équipe d'accueil participe à différents axes de ce programme, notamment pour le développement et l'étude de modèles précliniques de PCC/PGL *SDHB*-dépendants.

Comme évoqué dans l'introduction, la réponse thérapeutique à ces thérapies ciblées est difficilement réalisable par l'imagerie classique et les critères RECIST habituels. En effet, les effets précoces de ces traitements se traduisent par l'apparition d'une nécrose tumorale ayant pour conséquence une stabilité voire une légère augmentation de la taille tumorale à la phase initiale [355]. L'IRM dynamique de perfusion et la <sup>18</sup>FDG-TEP ont en revanche prouvé leur efficacité dans l'évaluation de la réponse thérapeutique aux thérapies ciblées [356, 357].

Nous avons donc cherché à développer un modèle murin de tumeurs *Sdhb*-dépendantes et les outils d'imageries capables de caractériser la particularité de ces tumeurs *in vivo*, afin de mettre en place une véritable plateforme de première ligne pour essais pré-cliniques pouvant être directement transférables aux essais réalisés chez les patients porteurs de PCC/PGL malins. La présence dans l'unité d'une plate-forme comportant une IRM petit animal 4,7 Tesla, équipée d'antennes supraconductrices, d'un imageur photonique pour souris (PhotonImager®) et l'arrivée d'une caméra de tomographie d'émission de positons de haute résolution dédiée au petit animal m'a permis de mettre en place les protocoles d'imagerie nécessaires à ces explorations, en collaboration avec l'équipe du Pr O Clément et sous la direction du Pr B Tavitian.

Ces travaux sont à l'origine des articles 2 et 3

2. Article 2

**Article 2**

**Lussey-Lepoutre C, Morin A , Viel T et al**

**“ In vivo phenotyping by multimodality imaging of an allograft mouse model of *Sdhb*<sup>-/-</sup> chromaffin cells”**

*Article en préparation*

# **In vivo phenotyping by multimodality imaging of an allograft mouse model of *Sdhb*<sup>-/-</sup> chromaffin cells**

Charlotte Lussey-Lepoutre<sup>1</sup>, Aurélie Morin<sup>1</sup>, Thomas Viel<sup>1,2</sup>, Daniel Balvay<sup>1,2</sup>, Gwennhael Autret<sup>1,2</sup>, Estelle Robidel<sup>1</sup>, Maeva Ruel<sup>1</sup>, Alexandre Bellucci<sup>1</sup>, Cécile Badoual<sup>1,3</sup>, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo<sup>1,4</sup>, Bertrand Tavitian<sup>#1,2,5</sup> and Judith Favier<sup>##\*1</sup>

## **Affiliations**

<sup>1</sup>UMR970, Paris Cardiovascular Research Center, INSERM/ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France.

<sup>2</sup>Plateforme d'imagerie du vivant, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France.

<sup>3</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'anatomopathologie, Paris, France.

<sup>4</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, Paris, France

<sup>5</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Radiologie, Paris, France.

# J. Favier and B. Tavitian jointly directed this work.

**Running title:** multimodality imaging of an allograft *Sdhb*<sup>-/-</sup> mouse model

**Key words:** Imaging, paraganglioma, pheochromocytoma, SDHB

**Funding:** This work received funding from the Cancer Research for Personalized Medicine - CARPEM project (Site de Recherche Intégré sur le Cancer - SIRIC), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-JCJC-00701 MODEOMAPP), the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 259735, GIS-Institut des Maladies rares.

**Conflict of interests:** We have no conflict interests to disclose

**\*Corresponding author:** Dr. Judith Favier

PARCC- Centre de recherche cardiovasculaire de l'HEGP

56 rue Leblanc 75015 Paris, France

E-mail: [judith.favier@inserm.fr](mailto:judith.favier@inserm.fr)

Tel: 01 53 98 80 41 - Fax: 01 53 98 79

**Word count** (excluding references):

**Total number of figures and tables:** 4

## **ABSTRACT (233 words)**

### ***Introduction***

Mutations on the *SDHB* gene are associated with malignancy and poor prognosis in patients suffering from paragangliomas. SDH deficiency leads to succinate accumulation that induces a cellular pseudohypoxic phenotype, promoting VEGF expression and angiogenesis. Our objective is to phenotype the microvascularization and the metabolic hallmarks of an *Sdhb* knock-out allograft model by multimodality imaging.

### ***Methods***

*Sdhb*<sup>-/-</sup> and wild-type (WT) immortalized mouse chromaffin cells were propagated in the fat pad of NMRI nude mice. Tumour growth and vascular density (CD31 immunostaining on paraffin-embedded tumours) were evaluated. High-temporal resolution DCE-MRI was performed at 4.7 Tesla. Tumor blood flow and blood volume fraction were calculated by compartmental analysis. Imaging of angiogenesis was assessed with Angiostamp®, an RGD fluorescent  $\alpha_v\beta_3$  integrin. Metabolic imaging was carried out by <sup>18</sup>F-DG-PET.

### ***Results***

WT tumors grew faster and were detected about one week before the development of *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors. The vascular density was significantly higher in *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors. Global enhancement was dramatically higher in *Sdhb*<sup>-/-</sup> compared to WT tumours, with a marked increase in blood flow and blood volume fraction. *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors were more angiogenic and had an increased metabolic volume ratio than in the WT group.

### ***Conclusion***

Our results show strong differences between *Sdhb*<sup>-/-</sup> and WT allografts and suggest that preclinical therapeutic studies could be further implemented in this model of *Sdhb*-deficient tumors. The non-invasive imaging methods presented here would be a useful tool for following therapeutic response in treated mice.

## Introduction

Pheochromocytoma (PCC) and paraganglioma (PGL) are rare neuroendocrine tumors that arise in chromaffin cells of the adrenal medulla and in sympathetic and parasympathetic ganglia, respectively. At least 40% of patients with PPGL carry a germline mutation in one of the 13 PPGL susceptibility genes identified so far [1] and mutations in *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*) genes, leading to the so-called hereditary PPGL syndrome, are the most frequently involved, causative of approximately half of the genetically determined cases. Furthermore, patients with *SDHB* mutations have an increased risk of recurrence, malignant disease and poor prognosis [2].

Surgery remains the only curative treatment, which is not suitable for metastatic disease and lead to a poor overall survival [2]. The lack of novel therapy is in part due to the lack of suitable animal model, in particular, the absence of adequate experimental models of *Sdhb*-deficient tumors [3] and the high complexity in the establishment of cell lines from primary human malignant and/or *SDHB*- deficient PPGL.

Successful development of new therapies in cancers requires optimal imaging techniques allowing early detection, localization of the lesions, and evaluation of response to treatment. In PPGL with *SDHB* gene mutation, accumulation of succinate leads to pseudohypoxia by stabilizing HIF (Hypoxia Inducible Factor) and thus increases VEGF-mediated angiogenesis and glucose metabolism [4]. *SDHB*-dependent PPGL display an increased vascularization [4] and a peculiar avidity for <sup>18</sup>F-FDG especially when metastatic [5-7].

Morphologic criteria are not well adapted to predict early response to treatment because targeted therapies have little effect on tumor size[8, 9]. In contrast, several reports have shown that *in vivo* imaging of tumor perfusion using Dynamic Contrast

Enhanced (DCE) Magnetic Resonance Imaging (MRI) is an indicator of treatment efficacy with anti-angiogenic agents [10-16]. Positron Emission Tomography (PET) with 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose (<sup>18</sup>FDG) also appears as a promising tool to predict early response to treatment in several cancers and in particular in clinical cases of PPGL and melanomas [17, 18]. Finally, several imaging techniques to study angiogenesis have been developed using labeled-RGD peptides to target in particular  $\alpha_v\beta_3$  integrin to study neovessels [19-21].

Recently, an immortalized mouse chromaffin cell line harboring a complete *Sdhb* knockout has been generated [22] and allowed the establishment of an *in vivo* model of allograft [23]. Our aim was to characterize this model *in vivo* using multimodality imaging in order to obtain an optimal preclinical model for new targeted therapy with reliable non-invasive tools predicting early response to treatments.

## **Materials and methods**

### *Cellular and mouse models*

As previously described, we generated an allografted mouse model by subcutaneous injection of immortalized mouse chromaffin cells (imCC) [22] carrying a homozygous knockout of the *Sdhb* gene (*Sdhb*<sup>-/-</sup>, clone 8) or their wild type (WT) counterparts (*Sdhb*<sup>lox/lox</sup>) and secondarily propagated flank tumors in the dorsal fat pad of naive nude mice as described previously [23].

Animal experiments were registered by the French Ethical committee under Number 14-041 and followed the ARRIVE guidelines of the National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research (London, UK).

For MRI, PET and bioluminescence imaging, mice were under anesthetic with isoflurane (2-3% in normal air), and placed head-first in prone position in the scanner under respiration monitoring with a window placed between 30 and 50 cycles per minute.

#### *MRI acquisition protocol and images post-processing*

MRI was performed in a dedicated small-animal 4.7 Tesla MR system (Biospec 47/40 USR Bruker), using a  $^1\text{H}$  quadrature transmit/receive body coil with a 3.5-cm inner diameter. An anatomic two-dimensional (2D) steady state free precession sequence (True FISP) was first acquired in two orthogonal planes to localize and measure tumors and a phase contrast sequence in the sagittal plane to localize the abdominal aorta. DCE-MRI was performed with a 2D-FLASH sequence (TR: 11.4 ms, TE: 1 ms, Average: 1, matrix: 128x103, field of view: 4x3.22 cm, slice thickness: 0.7 mm, resolution: 312  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) in the coronal plane to select two planes of imaging; in a first plane a region of interest (ROI) was positioned over the supra renal aorta to determine the arterial input function (AIF), in a second plane a ROI was positioned over the largest diameter of the tumor. The temporal resolution of the MRI sequence was 1.1 second and the total duration was 9 min 48 sec. A conventional gadolinium chelate contrast agent (gadoterate meglumine, Dotarem®, Guerbet, 500 mmol Gd/l, dilution: 1/15, bolus: 100  $\mu\text{l}$ ) was injected after the first 30 seconds of acquisition through the tail vein in a 24G catheter. To prevent the entry slice artifact, an axial saturation band was placed above the aorta.

DCE-MRI analysis was performed on acquisitions without noise correction using in-house software (PhysioD 3D) developed with Matlab (MathWorks, Natick, United States). Modeling was based on fittings using the Levenberg–Marquard regression

method. Tumors and aorta were manually delimited by a zone of Interest (ZOI) and oversegmented using automatic pixel clustering based on the k-means methods. Clusters presenting noisy signals were manually eliminated. The intensity-to-time average signal inside each ROI was computed and modeled with a one-compartmental model [24, 25] to yield the following vascular parameters: (i) relative Area Under Curve for total acquisition ( $rAUC_{10min}$ ) representing the global tumor enhancement corrected for AIF; (ii) tissue Blood Flow (tBF) in ml/min/100ml of tissue; (iii) tissue Blood Volume (tBV) expressed in percent of vascular to tissue volume.

#### *Positron Emission Tomography with $^{18}F$ FDG ( $^{18}F$ FDG-PET)*

PET images were acquired with a PET/CT (nanoScan PET/CT, Mediso Ltd., Hungary) sequential animal imaging system. Ten MBq of 2-deoxy-2- $^{18}F$ fluoro-D-glucose ( $^{18}F$ FDG) was injected in a volume of 0.15 mL saline into the tail vein under gaseous anesthesia. Animal temperatures and respiration rate were monitored during the entire scan. PET data were collected in three-dimensional acquisition mode during 60 min. PET volumes corresponding to 45-60 min post injection events were reconstructed using a three-dimensional Ordered Subset Expectation Maximization (3D-OSEM) algorithm (Tera-Tomo, Mediso Ltd., Hungary) with a final voxel size of 0.4 mm. For attenuation correction, co-registered CT scans were acquired with the following parameters: 520  $\mu$ As, 50 keV, pitch: 0.5, binning 1:1, FOV: 283mm, matrix: 344x344.

FDG uptake was quantified in 3D volumes-of-interest (VOI) delineated semi-automatically by iso-contours at 25% threshold of maximal value for each tumor on PET/CT fusion slices using the PMOD software package (PMOD Technologies Ltd, Zürich,



Switzerland). Mean and maximal standardized uptake value (SUV) were calculated for each VOI.

### *Fluorescent imaging*

Biodistribution of the AngioStamp™700 tracer (Fluoptics, Grenoble) in allografted mice was studied by fluorescence imaging using the PhotonImager optical system (Biospace Lab, Paris). Mice were injected with 200 µl of AngioStamp™700 (50 µmol/L) in a retro-orbital way under gaseous anesthesia with 2-3% isoflurane in normal air. At 5min, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h and 48h post injection, the fluorescence of the animals, still anesthetized, was measured using the following parameters: excitation filter: 650 nm; emission filter: 700 nm; light intensity: 100%; background correction filter: 575 nm. Fluorescent signal intensities were corrected for background and quantified using M3Vision software (Biospace Lab, Paris).

### *Immunohistochemistry*

Immediately after imaging, tumors were resected and snap frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% paraformaldehyde before paraffin-embedding. Six µm sections of paraffin-embedded tissues were cut and mounted on Superfrost plus glass slides. The sections were deparaffinized and rehydrated and stained alternatively with Hematoxylin-eosin-safran (HES) or immunostained. For CD31 immunostaining, heat-mediated antigen retrieval was performed using citrate buffer, pH6 for 20 min after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. After a blockade of unspecific sites in bovine serum albumin for 30 min, anti-CD31 (DIA 310, Clinisciences; 1:100) antibody was applied for 1h30 at room temperature. The

biotinylated secondary anti-rat antibody (Vector Lab; 1:400) was applied for 45 min and the revelation was assessed after 30 min amplification with ABC/PO (Vectastain ABC kit, PK-6100, Vector Laboratories) using histogreen as a chromogen (Vector Laboratories, EUROBIO/ABCYS). Nuclear Fast Red counterstaining was performed before rehydrating and mounting of slides in Eukitt media (Sigma-Aldrich).

Acquisitions were performed using a Leica DM400B microscope. CB and CLL analyzed slides blindly for HES and CLL for vascular density. Vascular density was measured on sections after CD31. For each sample, total blood vessels were counted in eight randomly with 63x objective.

#### *Statistical analysis*

Comparisons were performed using GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego California USA. Pre-therapeutic parameters derived from DCE-MRI, fluorescence and PET were compared between the WT and *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors using Student's *t* test for continuous variables if the passed d'Agostino and Pearson normality test or using a nonparametric Mann-Whitney test if distribution was not normal. Reported *p* values were two-sided and *p*-values < 0.05 were considered significant.

## **Results**

### ***Allografted model of Sdhb<sup>-/-</sup> imCC mimics SDHB-deficient tumors***

WT tumors become macroscopically visible about one week before *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors and grow faster (220 mm<sup>3</sup> per day versus 102 mm<sup>3</sup> per day respectively) (Fig 1B), in line with the doubling times of cells grown *in vitro* (Fig 1A) [22].

For a same tumor volume, HES staining showed that *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors were homogeneous, while we observed a central necrotic core in WT tumors (Fig 1C).

Like in human *SDHB* PPGL, the vessel density was significantly higher in *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors with a mean vessel count of  $37 \pm 15$  versus  $5 \pm 2$  for the WT tumors (Fig 1D).

### ***Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors are highly and homogeneously vascularized**

#### *Evaluation of tumor microcirculation by DCE-MRI*

A total of 31 mice were studied by DCE-MRI: 15 *Sdhb*<sup>-/-</sup> and 16 with WT tumors as controls. In line with the slower growth rate of *Sdhb*<sup>-/-</sup> cells and tumors, the DCE-MRI was performed at day 19 ( $\pm 5$ ) post grafting for the WT versus day 34 ( $\pm 8$ ) for the *Sdhb*<sup>-/-</sup> group.

Global enhancement in tumors was dramatically higher in *Sdhb*<sup>-/-</sup> than in the WT tumors (Fig 2A). Moreover, after an automatic segmentation based on the evolution of the grey scale level along time, the parameter maps showed a binary distribution in the WT with a poorly enhanced large core, while the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors were homogeneously enhanced (Fig 2B upper part). The corresponding enhancement curves of the 4 automatic segmented zones illustrate importance of the difference between the 2 types of tumors (Fig 2B lower part).

Thanks to a high time resolution sequence, we used mathematical models to extract vascular parameters. Correlating the variation of signal intensity in the tumor (AUC) with enhancement in the artery i.e. the arterial input function (AIF) allowed a quantitative analysis. A compartmental analysis was used to calculate tumor blood flow (F) and blood volume fraction (Vb). A significantly higher enhancement was observed in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> group: AUC  $30.3 \pm 2.0\%$  for the *Sdhb*<sup>-/-</sup> versus  $15.3 \pm 1.8\%$  for the WT ( $p < 0.0001$ ). This high enhancement was consecutive to an increase in the blood flow (F:

106.4 ± 16.5 ml/min/100ml for *Sdhb*<sup>-/-</sup> versus 42.9 ± 5.7 ml/min/100ml for the WT tumors;  $p = 0.0014$ ) and in the blood volume fraction ( $V_b$ : 54.4 ± 3.9 % for the *Sdhb*<sup>-/-</sup> versus 32.8 ± 3.8 % for the WT;  $p = 0.0004$ ) (Fig 2D).

### *Neoangiogenesis*

Imaging of angiogenesis based on the use of Angiostamp®, an RGD fluorescent peptide, was performed in 6 *Sdhb*<sup>-/-</sup> and 11 WT tumors at respectively 36 and 20 days post-grafting.

As expected, the Angiostamp® signal 12 h after injection was significantly higher in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> group (Fig 3A) and this result was confirmed after quantification: 9.8 ± 1.3 photons/second/cm<sup>2</sup>/square radian for the *Sdhb*<sup>-/-</sup> versus 6.8 ± 3.0 photons/second/cm<sup>2</sup>/square radian for the WT ( $p=0.04$ ) (Fig 3B).

Nevertheless, no significant difference was found at the other time points of measurements (data not shown).

### ***Glucose utilization is essential in Sdhb<sup>-/-</sup> tumors***

Results of metabolic imaging with <sup>18</sup>FDG-PET performed on 25 mice (10 *Sdhb*<sup>-/-</sup> and 15 WT) were consistent with vascular imaging showing a homogeneous uptake in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors while WT tumors show a large central core with no <sup>18</sup>FDG uptake (Fig 4A).

After quantification of the signal in the tumor, the maximum uptake value (SUVmax) was quite similar between the two types of tumors, with a mean SUVmax of 7.3 for the *Sdhb*<sup>-/-</sup> versus 7.5 for the WT group ( $p=0.75$ ). However, we observed a significant difference between the metabolic volumes and the mean uptake in the whole tumor volume (Fig 4B) indicative of an increase in total glucose consumption in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors. Actually, the mean volume fraction of tumor with an uptake equivalent or superior to 50% of

SUVmax was 37.6% for the *Sdhb*<sup>-/-</sup> versus 16.4% for the WT (p < 0.0001). The total glucose consumption evaluated by multiplying the SUVmean with the global tumor volume was 9.6 ml for the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors versus 3.7 ml for the WT (p < 0.0001).

## Discussion

Here, we present the imaging phenotyping of the first experimental model of *Sdhb*-deficient tumors. As we previously demonstrated, this model reproduces the molecular characteristics of the human pathology, with a high accumulation of succinate, the oncometabolite responsible for tumorigenesis of *SDHx*-dependent PPGL. In this report, we have extended the characterization of *Sdhb*-deficient tumors by multimodality imaging and showed as expected, a highly vascularized pattern secondary to increase of neoangiogenesis and a particular avidity for  $^{18}\text{F}$ FDG.

The non-invasive imaging methods described here represent a major tool to evaluate therapeutic responses, allowing long-term longitudinal follow-up in the same group of animals over time. Furthermore, another serious benefit of non-invasive specific multimodality imaging is the possibility to track the growth of tumors and eventually the development of metastasis. The subcutaneous graft described here is not a model for metastatic disease. However, the invasiveness of *Sdhb*<sup>-/-</sup> cells *in vitro* [26] allows expecting the possibility of developing such a model, that, when successful, will allow the examination of all steps of the metastatic story.

This model would allow the assessment of the candidate therapeutic targets identified by molecular studies [27], such as demethylating agents [22, 28], temozolomide, which has shown a particular efficiency in *SDHB*-mutated patients [29] or 2-oxoglutarate, a metabolite that is expected to reverse the succinate-mediated tumorigenic effects. Because of its highly vascularized pattern and its robust evaluation by DCE-MRI, this *Sdhb*<sup>-/-</sup> allograft model is a good candidate to evaluate antiangiogenic therapies such as sunitinib, already involved in multicentric clinical trials in PPGL patients. It could also lead to the identification of mechanisms of resistance or secondary exhaust, main failures of those new therapeutics.

We observed a high and homogeneous vascularization in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors *in vitro* and *in vivo* by DCE-MRI. This is in accordance with the activation of the VEGF-dependent angiogenic pathways previously described in these tumors (Favier et al 2012). After a multimodal approach, we can conclude that *Sdhb*<sup>-/-</sup> cells are proangiogenic, leading to a high vascularization of the tumor center, while it appears that the WT tumors do not have this capacity. In the WT tumors, we observe a low vascularization, even in the peripheral zone, and a central necrotic core secondary to a poor vascularization. This leads, in the WT tumors, to a hypoxic response driving anaerobic glycolysis and a high peripheral glucose uptake that explains the similar SUVmax in the two types of tumors. In one hand, glucose consumption is increased in *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors because of pseud-hypoxia and in the other hand the WT tumors have the classical metabolism shift to anaerobic glycolysis described by Otto Warburg because of the lack of efficient central angiogenesis [30, 31].

This study has some limitations. The first one is the difference of proliferation rate between the two types of tumors. Actually, WT imCC are much more proliferative *in vitro* than *Sdhb*<sup>-/-</sup> imCC, which display increased migration and invasiveness [26]. This is secondary to an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process that occurs in cells with *Sdhb*<sup>-/-</sup> [26], and was already described in *SDHB*-dependent human PPGL [32]. This led to a difference in the delay post-graft. A second one could be the model itself. An allograft model is less representative of the human pathology than a predisposed mouse model with a spontaneous tumor development in its natural microenvironment. The necessity of using immunodeficient mice should also influence tumor natural history and response to treatment. However, our team, and probably others worldwide, tried unsuccessfully for years to develop such a predisposed mouse model for cluster 1-dependant tumors and innovative therapies for malignant PPGL are missing (for review

see [3]). This study shows that DCE-MRI allows distinguishing vascular profiles. Inevitably, there are some limitations to this approach; the main may have resulted from the use of small molecular contrast agents. We chose a one-compartment model to measure  $F$  and  $V_b$ , assuming that during the first 60 seconds (first pass), most of the contrast agent is still in the vascular compartment, but this approach prevents the study of the permeability-surface area product (reflecting capillary permeability) and of the interstitial volumes fraction, probably interesting to follow anti-angiogenic treatments. These two parameters are highly dependent on the type of contrast agent used, and it is probably better to use a macromolecular contrast agent to study capillary permeability. However, such agents are not yet validated for small animal use. Future projects could take advantage of collaborations with companies producing such contrast agents.

In conclusion, the *Sdhb*<sup>-/-</sup> allografted mouse model that we developed, as well as the imaging methods are now usable for preclinical studies, to test innovative novel therapies in malignant *SDHB*-related PPGL.



## **Acknowledgements**

We are grateful to Catherine Tritscher for administrative assistance. The work leading to these results has received funding from the GIS-Institut des Maladies rares, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-JCJC-00701 MODEOMAPP), the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 259735. C.L-L. is funded by the Cancer Research for Personalized Medicine - CARPEM project (Site de Recherche Intégré sur le Cancer - SIRIC).

## References

1. Favier J, Amar L, Gimenez-Roqueplo A. Paraganglioma and pheochromocytoma: from genetics to personalized medicine. *Nature reviews Endocrinology*. 2014. doi:10.1038/nrendo.2014.188.
2. Amar L, Baudin E, Burnichon N, Peyrard S, Silvera S, Bertherat J et al. Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(10):3822-8. doi:10.1210/jc.2007-0709.
3. Lepoutre-Lussey C, Thibault C, Buffet A, Morin A, Badoual C, Benit P et al. From Nf1 to Sdhb knockout: Successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015. doi:10.1016/j.mce.2015.06.027.
4. Favier J, Briere JJ, Burnichon N, Riviere J, Vescovo L, Benit P et al. The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PloS one*. 2009;4(9):e7094. doi:10.1371/journal.pone.0007094.
5. Taieb D, Sebag F, Barlier A, Tessonnier L, Palazzo FF, Morange I et al. 18F-FDG avidity of pheochromocytomas and paragangliomas: a new molecular imaging signature? *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2009;50(5):711-7. doi:10.2967/jnumed.108.060731.
6. Timmers HJ, Chen CC, Carrasquillo JA, Whatley M, Ling A, Eisenhofer G et al. Staging and functional characterization of pheochromocytoma and paraganglioma by 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) positron emission tomography. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(9):700-8. doi:10.1093/jnci/djs188.
7. Timmers HJ, Kozupa A, Chen CC, Carrasquillo JA, Ling A, Eisenhofer G et al. Superiority of fluorodeoxyglucose positron emission tomography to other functional imaging techniques in the evaluation of metastatic SDHB-associated pheochromocytoma and paraganglioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(16):2262-9. doi:10.1200/JCO.2006.09.6297.
8. Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(13):1753-9. doi:10.1200/JCO.2006.07.3049.
9. van der Veldt AA, Meijerink MR, van den Eertwegh AJ, Haanen JB, Boven E. Choi response criteria for early prediction of clinical outcome in patients with metastatic renal cell cancer treated with sunitinib. *British journal of cancer*. 2010;102(5):803-9. doi:10.1038/sj.bjc.6605567.
10. Cuenod CA, Balvay D. Perfusion and vascular permeability: basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI. *Diagnostic and interventional imaging*. 2013;94(12):1187-204. doi:10.1016/j.diii.2013.10.010.
11. de Bazelaire C, Siauve N, Fournier L, Frouin F, Robert P, Clement O et al. Comprehensive model for simultaneous MRI determination of perfusion and permeability using a blood-pool agent in rats rhabdomyosarcoma. *Eur Radiol*. 2005;15(12):2497-505. doi:10.1007/s00330-005-2873-z.
12. Ewing JR, Bagher-Ebadian H. Model selection in measures of vascular parameters using dynamic contrast-enhanced MRI: experimental and clinical applications. *NMR in biomedicine*. 2013;26(8):1028-41. doi:10.1002/nbm.2996.
13. Lemasson B, Christen T, Tizon X, Farion R, Fondraz N, Provent P et al. Assessment of multiparametric MRI in a human glioma model to monitor cytotoxic and anti-angiogenic drug effects. *NMR in biomedicine*. 2011;24(5):473-82. doi:10.1002/nbm.1611.
14. Pradel C, Siauve N, Bruneteau G, Clement O, de Bazelaire C, Frouin F et al. Reduced capillary perfusion and permeability in human tumour xenografts treated with the VEGF signalling inhibitor ZD4190: an in vivo assessment using dynamic MR imaging and macromolecular contrast media. *Magnetic resonance imaging*. 2003;21(8):845-51.
15. Fournier LS, Oudard S, Thiam R, Trinquart L, Banu E, Medioni J et al. Metastatic renal carcinoma: evaluation of antiangiogenic therapy with dynamic contrast-enhanced CT. *Radiology*. 2010;256(2):511-8. doi:10.1148/radiol.10091362.
16. O'Connor JP, Jayson GC. Do imaging biomarkers relate to outcome in patients treated with VEGF inhibitors? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(24):6588-98. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1501.
17. Ayala-Ramirez M, Chougnet CN, Habra MA, Palmer JL, Leboulleux S, Cabanillas ME et al. Treatment with sunitinib for patients with progressive metastatic pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(11):4040-50. doi:10.1210/jc.2012-2356.
18. Sachpekidis C, Larribere L, Pan L, Haberkorn U, Dimitrakopoulou-Strauss A, Hassel JC. Predictive value of early 18F-FDG PET/CT studies for treatment response evaluation to ipilimumab in metastatic melanoma: preliminary results of an ongoing study. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2015;42(3):386-96. doi:10.1007/s00259-014-2944-y.
19. Beer AJ, Haubner R, Sarbia M, Goebel M, Luders Schmidt S, Grosu AL et al. Positron emission tomography using [18F]Galacto-RGD identifies the level of integrin alpha(v)beta3 expression in man. *Clinical cancer*

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2006;12(13):3942-9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0266.
20. Beer AJ, Grosu AL, Carlsen J, Kolk A, Sarbia M, Stangier I et al. [18F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging of alphavbeta3 expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(22 Pt 1):6610-6. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0528.
  21. Schnell O, Krebs B, Carlsen J, Miederer I, Goetz C, Goldbrunner RH et al. Imaging of integrin alpha(v)beta(3) expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography. *Neuro-oncology*. 2009;11(6):861-70. doi:10.1215/15228517-2009-024.
  22. Letouze E, Martinelli C, Lorient C, Burnichon N, Abermil N, Ottolenghi C et al. SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer cell*. 2013;23(6):739-52. doi:10.1016/j.ccr.2013.04.018.
  23. Lussey-Lepoutre C, Bellucci A, Morin A, Buffet A, Amar L, Janin M et al. In vivo detection of succinate by magnetic resonance spectroscopy as a hallmark of SDHx mutations in paraganglioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;Acceptée.
  24. Alison M, Quibel T, Balvay D, Autret G, Bourillon C, Chalouhi GE et al. Measurement of placental perfusion by dynamic contrast-enhanced MRI at 4.7 T. *Investigative radiology*. 2013;48(7):535-42. doi:10.1097/RLI.0b013e3182856a25.
  25. Tofts PS, Brix G, Buckley DL, Evelhoch JL, Henderson E, Knopp MV et al. Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 1999;10(3):223-32.
  26. Lorient C, Domingues M, Berger A, Menara M, Ruel M, Morin A et al. Deciphering the molecular basis of invasiveness in Sdhbdeficient cells. *Oncotarget*. 2015;in press.
  27. Castro-Vega LJ, Lepoutre-Lussey C, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective. *Oncogene*. 2015;In press.
  28. Powers JF, Korgaonkar PG, Flidner S, Giubellino A, Pacak K, Sahagian GG et al. Cytocidal activities of topoisomerase I inhibitors and 5-azacytidine against pheochromocytoma/paraganglioma cells in primary human tumor cultures and mouse cell lines. *PloS one*. 2014;9(2):e87807. doi:10.1371/journal.pone.0087807.
  29. Hadoux J, Favier J, Scoazec JY, Leboulleux S, Al Ghuzlan A, Caramella C et al. SDHB mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or paraganglioma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014;135(11):2711-20. doi:10.1002/ijc.28913.
  30. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):269-70.
  31. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006;441(7092):437-43. doi:10.1038/nature04871.
  32. Lorient C, Burnichon N, Gadessaud N, Vescovo L, Amar L, Libe R et al. Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(6):E954-62. doi:10.1210/jc.2011-3437.

## Figure Legends

### Figure 1: *In vitro* characterization of the *Sdhb*<sup>-/-</sup> allograft model

In vitro, the SDHB<sup>-/-</sup> cells proliferation is slower than the WT **(A)**. This is in line with the tumour growth in vivo **(B)**: WT tumours are detected about one week before *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumours and their growth is 2 times faster. On paraffin sections after HES staining **(C)**, *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumours are homogeneous, while WT presented with a large necrotic central core (tumor volume 3,4cm<sup>3</sup> for the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumor versus 3,8cm<sup>3</sup> for the WT). The vessel density **(D)** evaluated on paraffin sections after immunostaining (IHC) with an anti-CD31 antibody, is significantly higher in *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors.

### Figure 2: Dynamic contrast enhanced-MRI

Global enhancement in tumours on dynamic coronal slices after injection of the contrast agent was dramatically higher in *Sdhb*<sup>-/-</sup> than in the *WT* tumours **(A)**. Parameter maps obtained after automatic segmentation show a binary distribution in the *WT*: highly enhanced peripheral zone (brown-red) and poorly enhanced large core (blue), while the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumors were homogeneously enhanced **(B, upper part)**. Corresponding AUC curves of the segmented areas are dramatically higher in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumor **(B, lower part)**. A higher enhancement was observed in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> group (AUC) consecutive to an increase in the Blood Flow (F) and the Blood Volume Fraction (Vb) **(C)**

### Figure 3: In vivo fluorescence (Angiostamp®)

The Angiostamp® signal 12 h after injection is significantly higher in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> group on 2D- images **(A)**, which was confirmed after quantification **(B)**

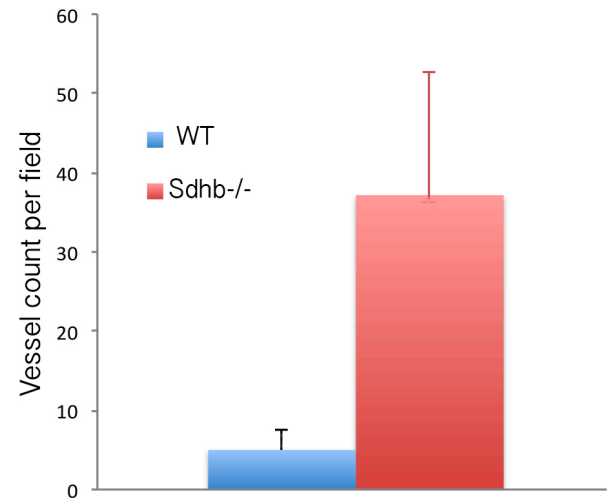
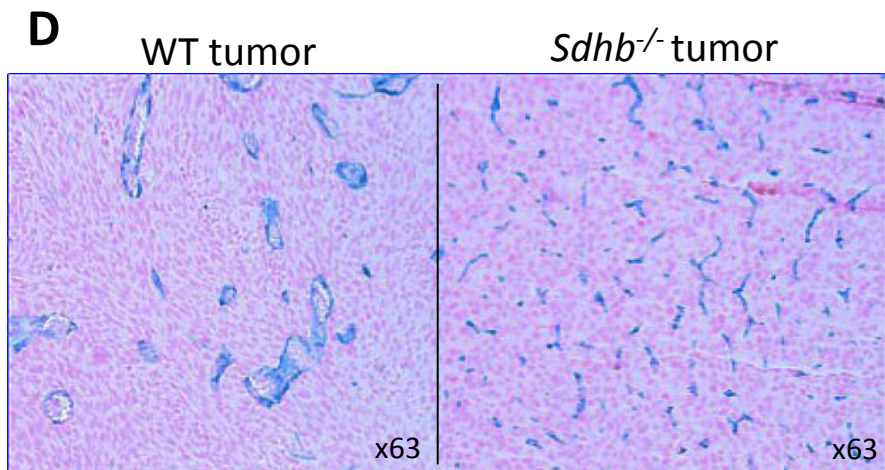
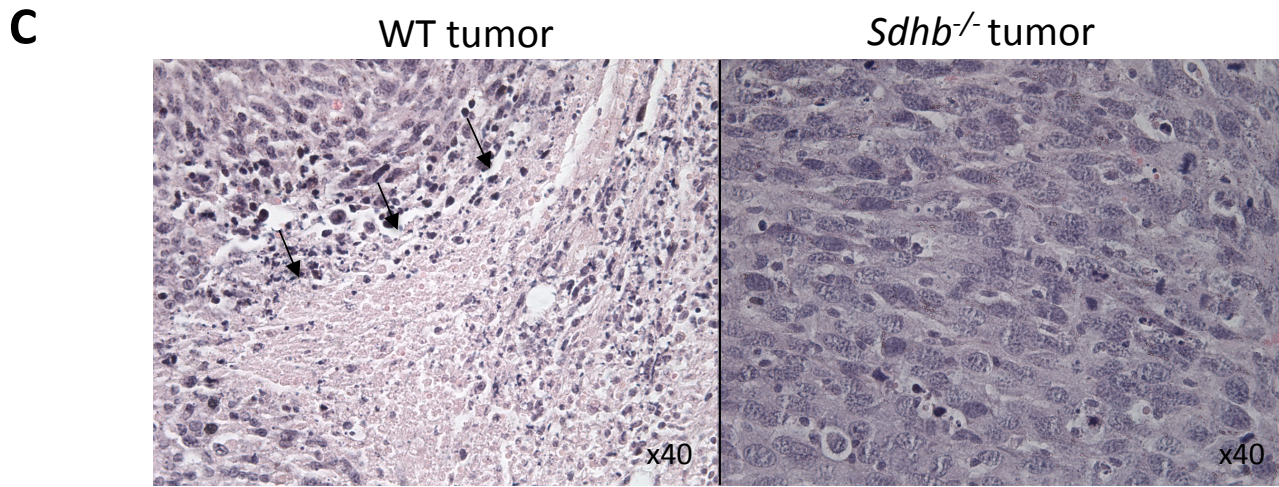
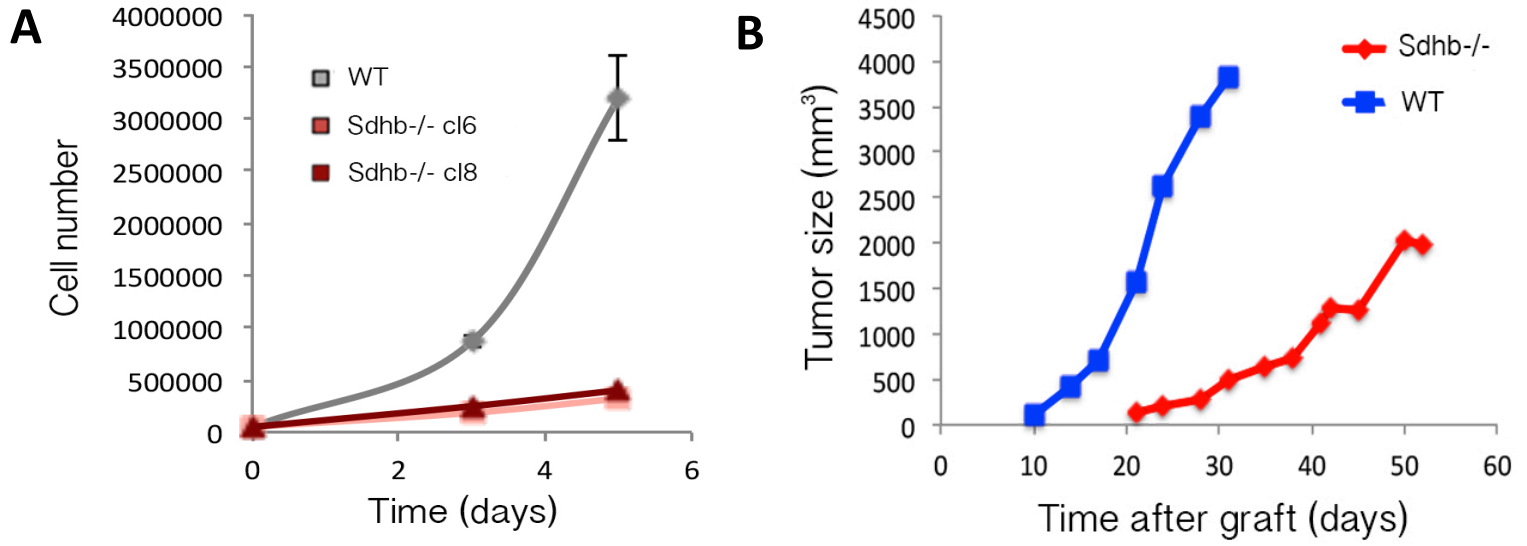
### Figure 4: Glucose metabolism assesement by <sup>18</sup>FDG-PET

Imaging with  $^{18}\text{F}$ FDG-PET on saggital **(A, left part)** and coronal **(A, right part)** slices at 60 minutes post-injection, shows a homogeneous uptake in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> tumours while WT tumours exhibit a large central core with no  $^{18}\text{F}$ FDG uptake (arrows).

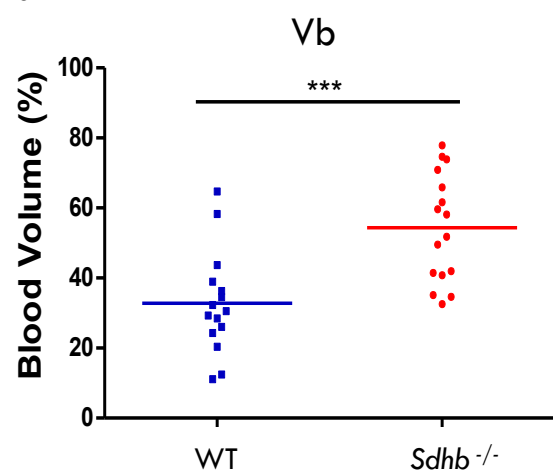
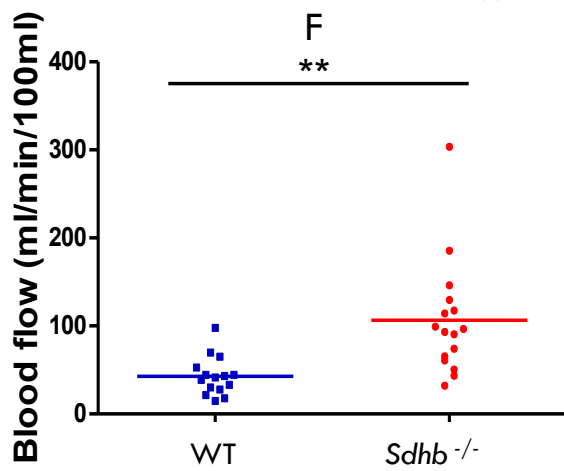
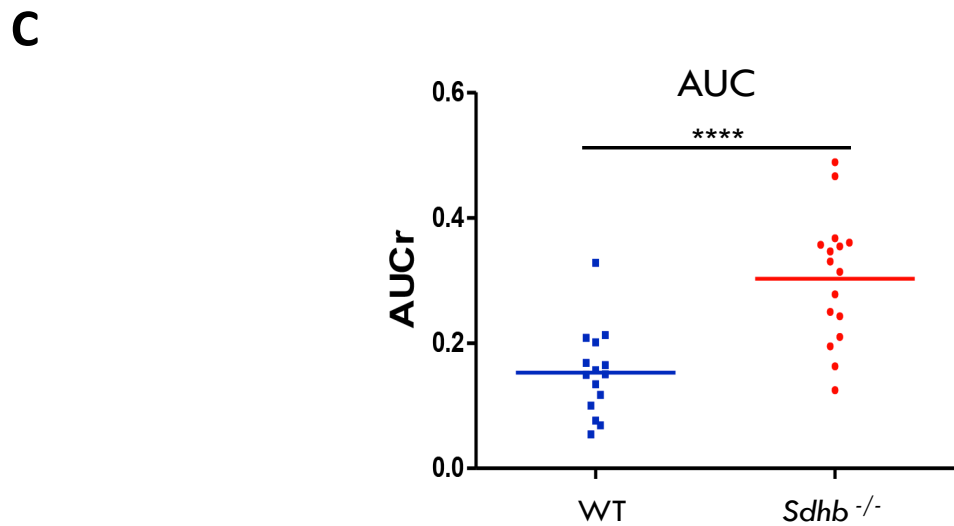
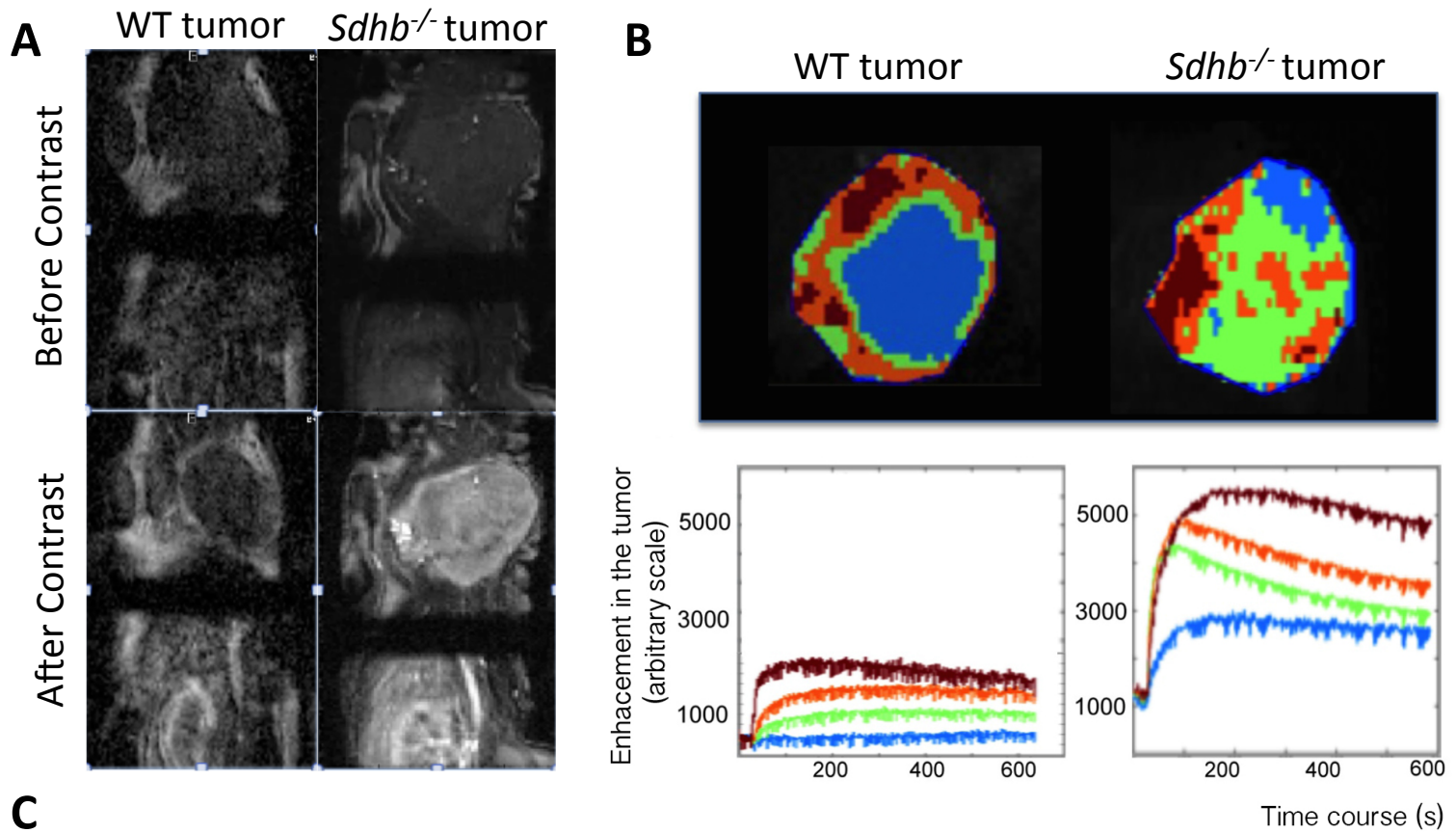
After quantification of the signal in the tumour, no difference was noted for the SUVmax of tumors **(B)** but the metabolic volumes **(C)** and the mean uptake in the whole tumour volume **(D)** were increased in the *Sdhb*<sup>-/-</sup> group.



**Figure 1**

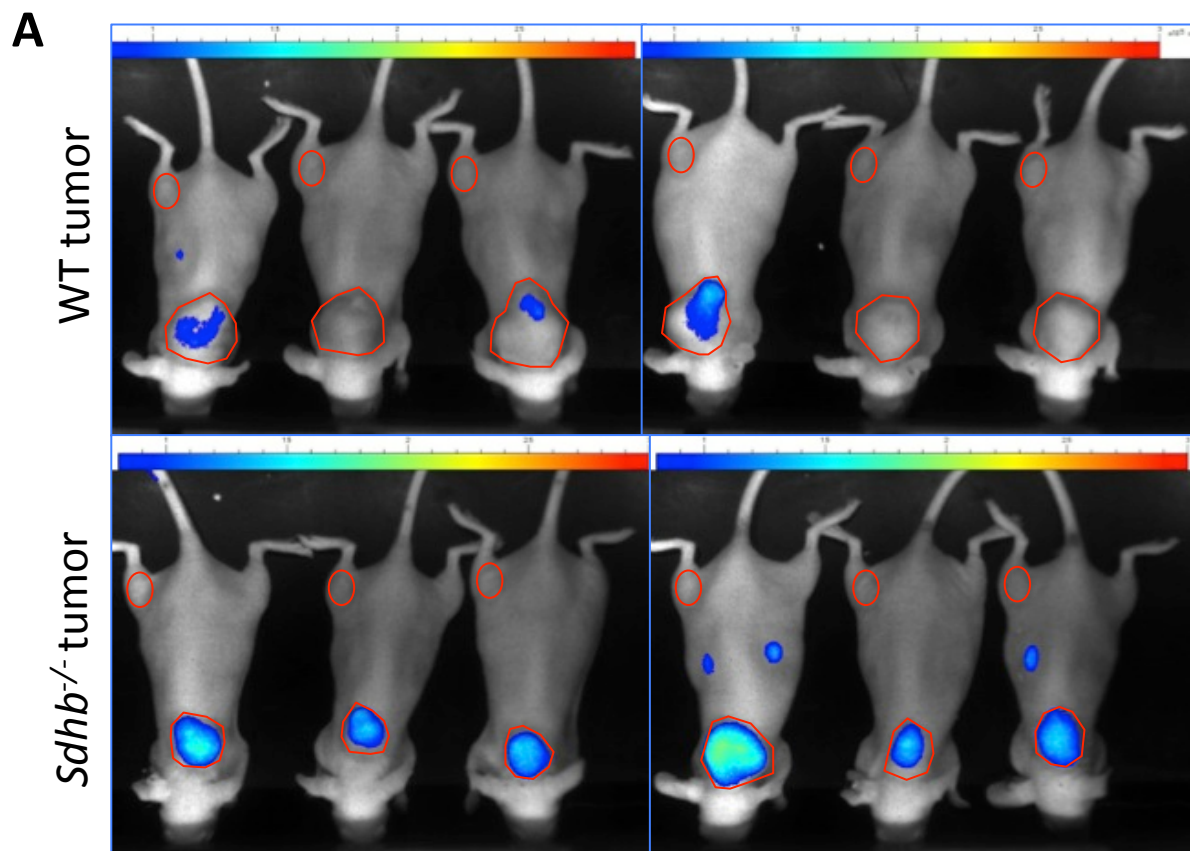


**Figure 2**

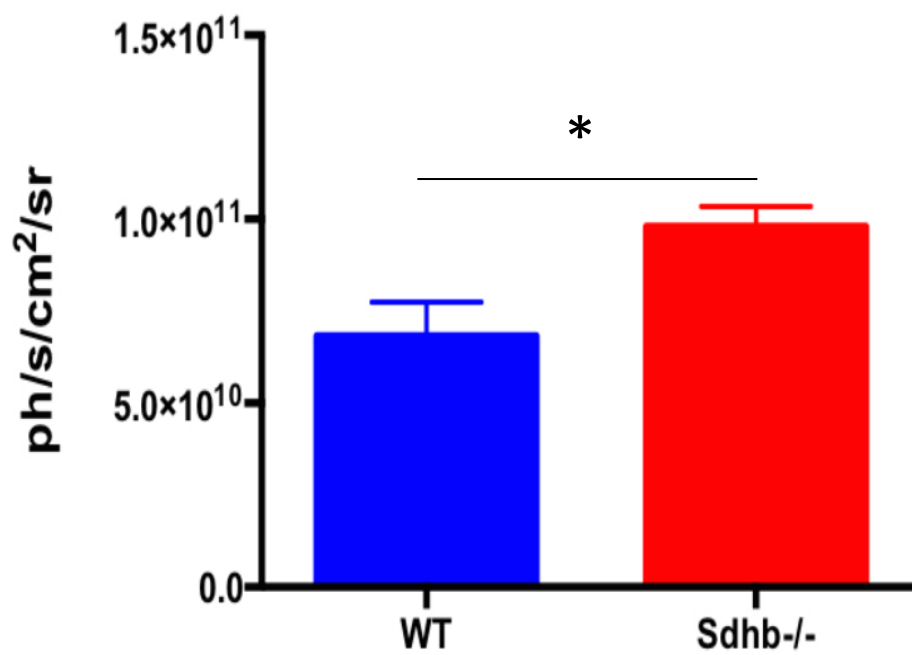




**Figure 3**

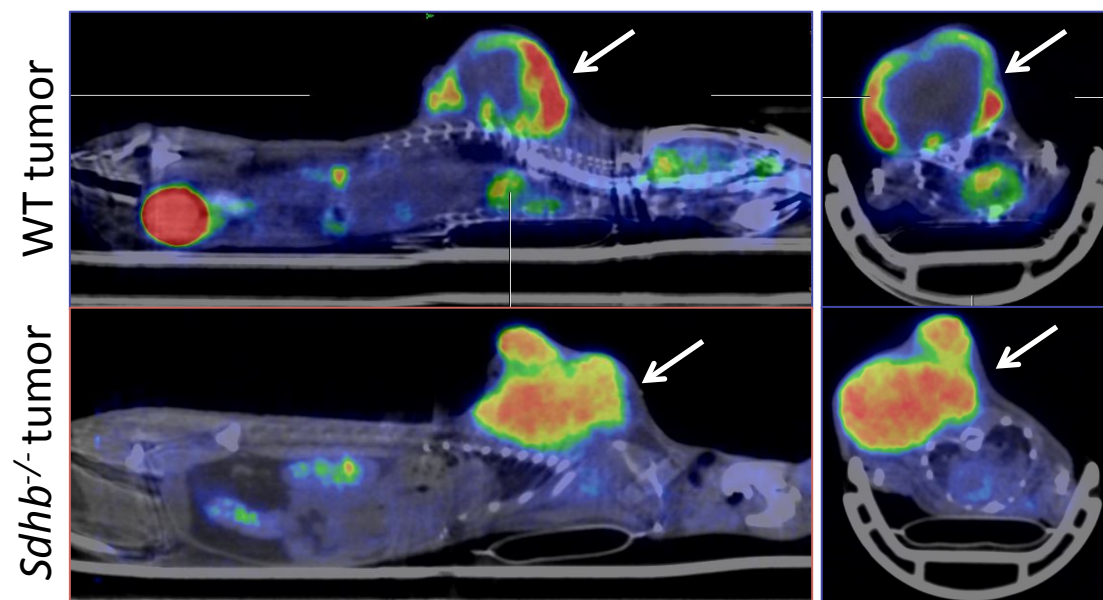


**B**

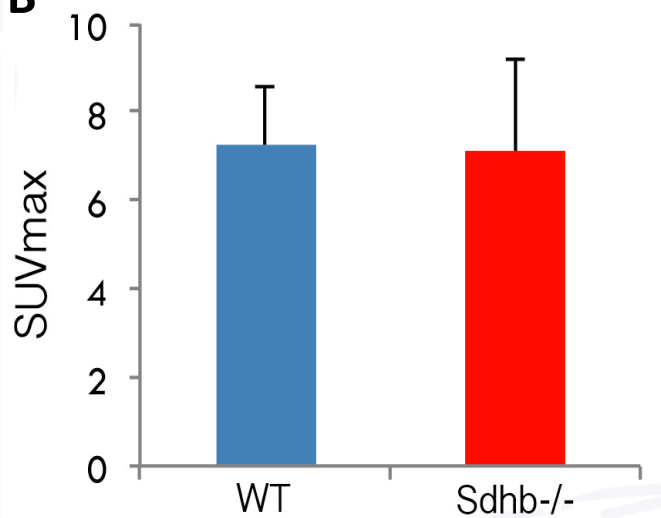


**Figure 4**

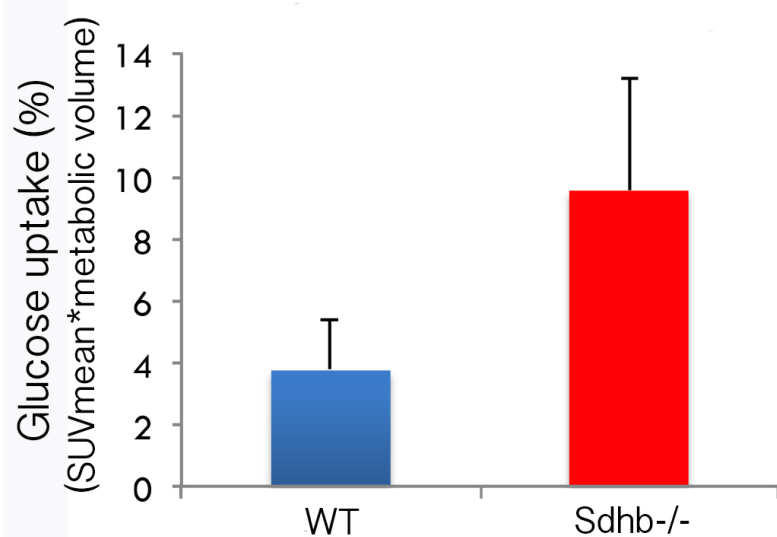
**A**



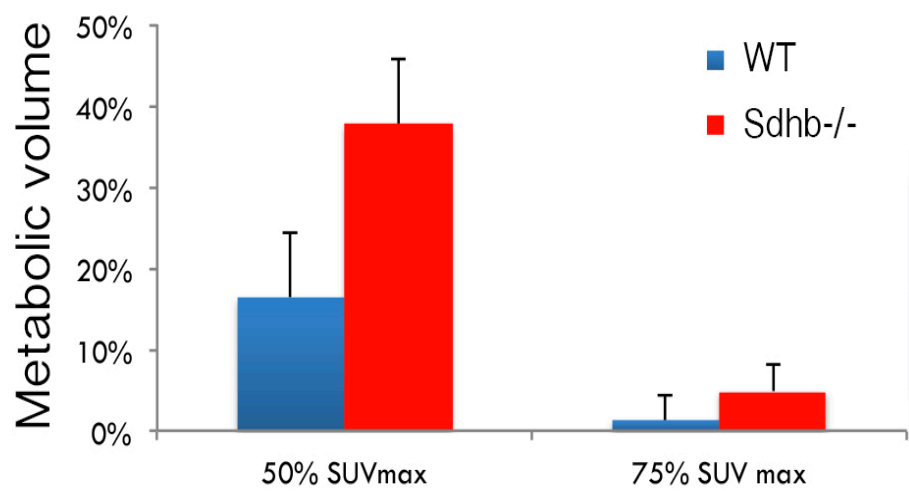
**B**



**C**



**D**



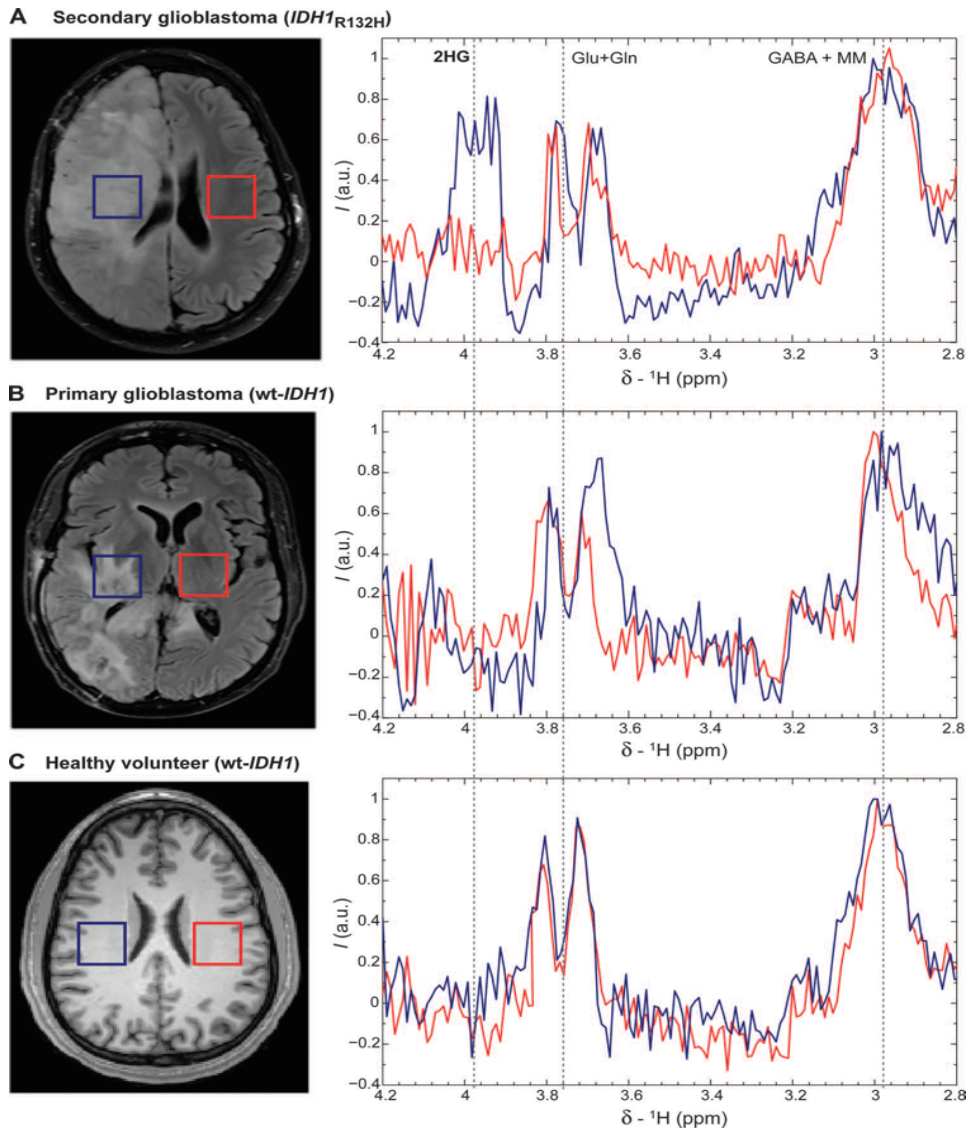
## VII. Article 3 : détection *in vivo* du succinate et aspects translationnels

### 1. Contexte et objectifs du travail

A coté des indications classiques décrites dans l'introduction (diagnostic de malignité, critères d'agressivité histologiques, évaluation de la réponse au traitement), deux équipes ont récemment montré qu'il était possible de déterminer *in vivo* par  $^1\text{H-SRM}$  le statut mutationnel d'une tumeur [304, 305].

Ces travaux portaient sur les gliomes, tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes, désignant toutes les tumeurs dérivant des cellules gliales (astrocytomes, oligodendrogliomes et épendymomes). Ces tumeurs sont classées en 4 grades histopronostiques par la World Health Organization (WHO) [358] le grade I correspondant à des tumeurs bénignes alors que le glioblastome multiforme (GM) constitue le grade IV avec un pronostic catastrophique. Des mutations sur le gène *IDH* (principalement *IDH1*) ont été retrouvées dans plus de 70% des gliomes de grade II et III, mais également dans les GM dit « secondaires », c'est à dire qui proviennent de la dégénérescence de gliomes de grade II ou III, alors que ces mutations ne sont pas retrouvées dans les GM primitifs [118, 113]. De façon très intéressante, la mutation *IDH* confère un meilleur pronostic en terme de survie globale aux patients [118]. Ces mutations sont exclusivement somatiques et le diagnostic génétique nécessite obligatoirement l'analyse d'une pièce de tumeur, le plus souvent obtenue par biopsie cérébrale stéréotaxique.

Comme évoqué dans l'introduction, ces mutations s'accompagnent d'un gain de fonction de la protéine IDH mutante qui acquiert la capacité de transformer l' $\alpha$ -kétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2HG), entraînant alors son accumulation intracellulaire à des concentrations pouvant atteindre plusieurs microgrammes par gramme de tumeur, alors qu'en l'absence de mutation la concentration de ce métabolite est inférieure au seuil de détection [119]. Choi, Andronesis et leurs équipes respectives ont montré les premiers qu'il était possible de détecter *in vivo* par  $^1\text{H-SRM}$  l'accumulation de 2-HG dans les tumeurs (Figure 33), et donc de statuer de façon non invasive sur la présence ou non d'une mutation *IDH* [304, 305].



**Figure 33 : Détection des mutations IDH1 dans les glioblastomes.** Détection d'un pic de 2-HG dans un GM *IDH1*-muté (A) alors que ce pic est absent dans le GM *IDH1*-wt (B) et dans le tissu cérébral sain (C). D'après Andronesis et coll [304]

## 2. Article 3

Par analogie aux tumeurs cérébrales *IDH*, la détection de l'accumulation du succinate *in vivo* comme marqueur de la présence d'une mutation *SDHx* nous a paru intéressante.

En effet, cette détection chez les patients offrirait d'emblée un intérêt clinique potentiel à plusieurs points de vue :

- confirmation du caractère pathologique d'une image douteuse identifiée à l'imagerie;
- confirmation de l'évolution métastatique d'un patient devant une (ou des) images douteuses identifiées à l'imagerie;
- validation de la fonctionnalité d'un variant de signification inconnue, identifié sur un gène *SDHx* chez un patient ayant une tumeur non opérable (analyses génétiques et/ou immunohistochimiques complémentaires impossibles sur la pièce tumorale)

Par ailleurs, les patients *SDHB* ayant un risque de malignité augmenté et un mauvais pronostic, la connaissance pré-opératoire du statut mutationnel peut être d'une grande utilité, alors que ça n'est que rarement le cas en pratique en raison des délais actuels des diagnostics génétiques. En effet, la chirurgie étant le seul traitement curatif, le geste en lui-même et l'exploration per-opératoire pourraient être adaptés en fonction d'un risque de récurrence estimé selon la présence ou non d'une mutation *SDHx*.

Nous avons donc optimisé une séquence de  $^1\text{H}$ -SRM, que nous avons nommé SUCCES pour SUCCinate Estimation by Spectroscopy), afin de détecter l'accumulation de succinate dans les tumeurs de notre modèle murin grâce à l'IRM 4,7T dédiée au petit animal. Puis nous avons reprogrammé cette séquence sur l'IRM clinique 3T et exploré une première série de 9 patients porteurs de PCC/PGL.

Ces travaux ont fait l'objet de l'article 3.

**Article 3**

**Lussey-Lepoutre C\***, Bellucci A\*, Morin A et al

“ *In vivo* detection of succinate by magnetic resonance spectroscopy as a hallmark of *SDHx* mutations in paraganglioma”

Clinical Cancer Research. *Accepté*

## ***In vivo* detection of succinate by magnetic resonance spectroscopy as a hallmark of *SDHx* mutations in paraganglioma**

Charlotte Lussey-Lepoutre<sup>†1,2</sup>, Alexandre Bellucci<sup>†1,2</sup>, Aurélie Morin<sup>1,2</sup>, Alexandre Buffet<sup>1,2</sup>, Laurence Amar<sup>1,2,3</sup>, Maxime Janin<sup>2,4,5</sup>, Chris Ottolenghi<sup>2,4,5</sup>, Franck Zinzindohoué<sup>2,6</sup>, Gwennhael Autret<sup>1,2</sup>, Nelly Burnichon<sup>1,2,7</sup>, Estelle Robidel<sup>1,2</sup>, Benjamin Banting<sup>8</sup>, Sébastien Fontaine<sup>8</sup>, Charles-André Cuenod<sup>1,2,8</sup>, Paule Benit<sup>9,10</sup>, Pierre Rustin<sup>9,10</sup>, Philippe Halimi<sup>2,8</sup>, Laure Fournier<sup>1,2,8</sup>, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo<sup>1,2,7</sup>, Judith Favier<sup>#\*1,2</sup> and Bertrand Tavitian<sup>#1,2,8</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, France.

<sup>2</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France.

<sup>3</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'hypertension artérielle et médecine vasculaire, F-75015 Paris, France.

<sup>4</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Laboratoire de Biochimie Métabolique, Paris, France.

<sup>5</sup>INSERM, U1124, Paris, France.

<sup>6</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Chirurgie Digestive, F-75015 Paris, France.

<sup>7</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, Paris, France

<sup>8</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Radiologie, Paris, France.

<sup>9</sup>INSERM, UMR1141, Hôpital Robert Debré, Paris, France.

<sup>10</sup>Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot, Paris, France.

† C. Lepoutre-Lussey and A. Bellucci contributed equally to this work.

# J. Favier and B. Tavitian jointly directed this work.

**Running title:** *In vivo* detection of succinate in paraganglioma

**Key words:** Succinate, magnetic resonance spectroscopy, imaging, paraganglioma, pheochromocytoma

**Funding:** This work received funding from the Cancer Research for Personalized Medicine - CARPEM project (Site de Recherche Intégré sur le Cancer - SIRIC), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-JCJC-00701 MODEOMAPP), the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 259735, the Institut National du Cancer et la Direction Générale de l'Offre de Soins (INCa-DGOS\_8663) for the COMETE network.

**Conflict of interests:** We have no conflict interests to disclose

**\*Corresponding author:** Dr. Judith Favier

PARCC- Centre de recherche cardiovasculaire de l'HEGP

56 rue Leblanc 75015 Paris, France

E-mail: [judith.favier@inserm.fr](mailto:judith.favier@inserm.fr)

Tel: 01 53 98 80 41 - Fax: 01 53 98 79

**Word count** (excluding references):4155

**Total number of figures and tables:** 5

## **Abstract**

### *Purpose*

Germline mutations in genes encoding mitochondrial succinate dehydrogenase (SDH) are found in patients with paragangliomas, pheochromocytomas, gastrointestinal stromal tumors, and renal cancers. SDH inactivation leads to a massive accumulation of succinate, acting as an oncometabolite and which levels, assessed on surgically resected tissue are a highly specific biomarker of SDHx-mutated tumors. The aim of this study was to address the feasibility of detecting succinate in vivo by magnetic resonance spectroscopy.

### *Experimental design*

A pulse proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) sequence was developed, optimized and applied to image nude mice grafted with *Sdhb*<sup>-/-</sup> or wild-type chromaffin cells. The method was then applied to paraganglioma patients carrying (n=5) or not (n=4) an *SDHx* gene mutation. Following surgery, succinate was measured using gas chromatography-mass spectrometry and SDH protein expression was assessed by immunohistochemistry in resected tumors.

### *Results*

A succinate peak was observed at 2.44 ppm by  $^1\text{H}$ -MRS in all *Sdhb*<sup>-/-</sup>-derived tumors in mice and in all paragangliomas of patients carrying an *SDHx* gene mutation, but neither in wild-type mouse tumors nor in patients exempt of *SDHx* mutation. In one patient,  $^1\text{H}$ -MRS results led to the identification of an unsuspected *SDHA* gene mutation. In another case, it helped defining the pathogenicity of a variant of unknown significance in the *SDHB* gene.



## *Conclusions*

Detection of succinate by  $^1\text{H}$ -MRS is a highly specific and sensitive hallmark of *SDHx* mutations.

This noninvasive approach is a simple and robust method allowing *in vivo* detection of the major biomarker of *SDH*-mutated tumors.

## VIII. Discussion

### 1. La souris allogreffée : un bon modèle d'étude des PGL SDHB ?

Les objectifs de ce travail étaient doubles : générer un modèle murin permettant de mimer la tumorigenèse SDH-dépendante et développer des outils permettant de le caractériser mais aussi de prédire la réponse au traitement. Les tumeurs *Sdhb*<sup>-/-</sup> du modèle murin d'allogreffe présenté dans ce chapitre reproduisent plusieurs caractéristiques des PGL SDH-dépendants :

- elles accumulent le succinate, biomarqueur très spécifique de la présence d'une mutation sur l'un des gènes *SDHx* [152, 153, 359-361] ;
- elles présentent un phénotype hypervasculaire, probablement par activation de la pseudo-hypoxie
- elles ont une activation de la glycolyse les rendant très avides pour le <sup>18</sup>F-FDG

Ce modèle murin, comme tout modèle, a néanmoins des imperfections. Les cellules ImCC se sont différenciées *in vitro* et ne sécrètent donc pas de catécholamines. Cette « dérive » cellulaire n'est pas la première à être observée. Par exemple, les cellules PC12, initialement décrites comme noradrénergiques [338] sécrètent très peu de dopamine dans le modèle sous-cutané de Denorme *et coll* [352].

Nos tumeurs *Sdhb*<sup>-/-</sup> se développent moins vite que les contrôles WT. Cette constatation avait déjà été faite *in vitro*, les ImCC WT ayant une prolifération plus importante que les *Sdhb*<sup>-/-</sup>. Ceci s'explique probablement par le phénotype mésenchymateux de ces cellules, qui suite à la perte de la SDH ont induit un processus d'EMT [362], tout comme ce qui a été constaté dans les PGL humains métastatiques SDHB-dépendant [201]. En effet, les cellules mésenchymateuses et/ou activant l'EMT prolifèrent moins vite que les cellules épithéliales mais sont plus invasives et ont des propriétés migratoires importantes. Ces dernières propriétés devraient promouvoir l'apparition de métastases dans les allogreffes *Sdhb*<sup>-/-</sup>, ce qui ne peut pas être évalué dans notre modèle sous-cutané. En effet, les métastases ne se développent qu'exceptionnellement, voire même jamais, à partir de greffes sous-cutanées. Pour évaluer le potentiel métastatique de ces cellules, il sera nécessaire d'établir d'autres modèles à partir de greffes intraveineuses, intraspléniques ou orthotopiques (comme en intra-capsulaire rénal par exemple) [363]. Ces stratégies font partie du projet d'Aurélien Morin en cours au laboratoire.

D'une façon générale, les modèles de greffes présentent plusieurs désavantages : le développement souvent rapide de la tumeur ne mime pas forcément celui de la pathologie humaine, et la localisation sous-cutanée hétérotopique oriente l'interaction avec le microenvironnement (cellules stromales, réseau vasculaire et lymphatique, cellules immunitaires). En outre, bien que la plupart des thérapies anticancéreuses aient été développées à partir d'études de ce type, le défaut majeur de ces modèles est la nécessité d'utiliser des modèles immunodéficients pour le développement tumoral [364], ce qui influence à la fois l'histoire naturelle du cancer et, possiblement de façon importante la réponse au traitement. En effet, le VEGF-A, surexprimé dans les tumeurs *SDHx* et *VHL* a des propriétés pro-angiogéniques mais également immunomodulatrices favorisant l'échappement des cellules tumorales à la surveillance par le système immunitaire. Il a ainsi été montré que le VEGF-A stimulait la prolifération des lymphocytes T régulateurs (Treg) [365] et favorisait l'épuisement des lymphocytes T CD8+ (LT8) infiltrant la tumeur [366], notamment en induisant l'expression de PD-1 (program cell death-1, molécule de co-stimulation inhibitrice) à leur surface [367]. Cette action immunorégulatrice de VEGF-A était bloquée spécifiquement par le sunitinib, inhibiteur de la voie VEGF /VEGFR2 [365, 367]. L'interprétation de l'efficacité d'une thérapie antiangiogénique ciblant la voie du VEGF dans ce modèle devrait donc prendre en compte cette limitation.

## 2. Vers une imagerie fonctionnelle non-irradiante ?

Les outils d'imagerie développés dans ce travail de thèse, notamment l'IRM-DCE et la <sup>1</sup>H-SRM ont remplis les objectifs de détection du phénotype hypervasculaire des tumeurs *Sdhb*<sup>-/-</sup>, et de la détection de l'accumulation pathogénomique de succinate.

De par sa capacité à étudier de façon précise la microcirculation tumorale, l'IRM-DCE est probablement la technique de choix à proposer pour l'évaluation de la réponse aux antiangiogéniques. De plus, l'accumulation de succinate détectée *in vivo* semblant être corrélée au taux réel de succinate mesuré dans la tumeur *in vitro*, la <sup>1</sup>H-SRM pourrait être le reflet de la masse tumorale et détecter une mort cellulaire débutante, ce qui en ferait également un outil de suivi de réponse au traitement.

Néanmoins, bien que robuste et très prometteur, cet outil déjà transféré chez l'homme a une limitation majeure : sa sensibilité. Toutes les mutations *SDHx* ont été détectées dans notre étude, et même parfois des mutations insoupçonnées, mais au détriment d'une séquence relativement longue, nécessitant une bonne compréhension et collaboration

du patient et avec probablement la limitation à l'étude de tumeurs de taille supra-centimétriques.

La poursuite de ce travail sur une plus large cohorte devra s'astreindre à essayer de réduire la durée de l'examen. Compte tenu de l'optimisation déjà très poussée de la séquence IRM, on peut faire l'hypothèse que cela passera par une amélioration du post-traitement du signal, et/ou par le passage à des caméras de plus haut champ. Une autre question à résoudre concernant cette nouvelle technique est son niveau de spécificité. En effet, si la  $^1\text{H}$ -SRM est parfaitement capable d'identifier les patients porteurs de mutations sur l'un des gènes *SDHx* avec une spécificité parfaite, il n'est pas certain qu'elle soit capable d'identifier quelle sous-unité est atteinte. Bien que les résultats d'études *in vitro* de dosage du succinate n'orientent pas dans cette direction [368, 361], ce point restera à être évalué sur une plus large cohorte de patients.

Enfin, nous avons démontré que la  $^{18}\text{F}$ FDG-TEP était tout à fait utile dans notre modèle avec, comme chez les patients avec PCC/PGL malins *SDHB*, une forte captation ce traceur par nos tumeurs. Ce résultat, bien qu'intéressant, n'est pas complètement inattendu et les résultats prometteurs obtenus dans notre modèle avec le RGD fluorescent (Angiostamp®) nous encouragent à tester de nouveaux traceurs comme le  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD.



**DISCUSSION  
ET  
PERSPECTIVES**



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

### A. Faut-il abandonner l'idée d'un modèle murin prédisposé aux tumeurs *Sdhb* ?

Comme évoqué précédemment, le besoin d'un modèle murin de tumeurs *Sdhb*<sup>-/-</sup>, dans un contexte international extrêmement dynamique sur le plan du développement de nouvelles thérapeutiques, est un enjeu majeur. Pour pallier les échecs des modèles prédisposés, le modèle d'allogreffes est apparu dans un premier temps comme une solution bien adaptée. Il n'en reste pas moins qu'un modèle prédisposé reproduirait mieux la pathologie humaine. Dans ce contexte, et bien que les conclusions du Chapitre 1 indiquent que l'obtention d'un tel modèle est peu probable [369], il reste tentant d'essayer tant que toutes les pistes n'ont pas encore été explorées. Quelques stratégies sont donc encore en cours au laboratoire.

Le premier consiste donc à la mise en hypoxie des souris *PSA-Cre/Sdhb<sup>lox/lox</sup>*. Le rationnel de cette approche est double. D'un côté, il est connu que les patients vivant en altitude sont sujets au développement de PGL. Les souris seront donc exposées à un taux d'O<sub>2</sub> de 13%, correspondant à une altitude de 4000 m, pendant une longue période, probablement plus d'un an. La seconde raison de cette mise en hypoxie est l'instauration d'une pression de sélection positive sur les cellules porteuses d'un déficit en SDH. En effet, les cellules au sein desquelles la délétion de *Sdhb* aura eu lieu par recombinaison sous l'action de la cre-recombinase ont déjà, via l'activation de la voie de pseudo-hypoxie, instauré tous les mécanismes de résistance à l'hypoxie, leur conférant un avantage évident en termes de prolifération et de survie par rapport aux cellules saines.

Le second mécanisme envisagé est l'utilisation d'une CRE inductible par un traitement au tamoxifène, la CRE-ET2. En effet, les gènes *SDHx* sont des gènes suppresseurs de tumeurs qui suivent le modèle à deux coups (« two hits ») de Knudson [370] : présence d'une mutation constitutionnelle associée à la survenue d'un second événement génétique somatique par délétion de la région chromosomique comprenant l'allèle normal (LOH). Dans le cas de l'utilisation de cette CRE inductible, la délétion du gène pourrait être induite au cours de la vie adulte, ce qui reproduit davantage le mécanisme moléculaire se produisant chez les patients. La délétion se ferait de façon aléatoire dans différents tissus. Elle pourrait donc, en principe, conduire au développement de



PCC/PGL mais également de cancers du rein, ou de GIST, auxquels peuvent également être prédisposés les porteurs de mutations dans les gènes *SDHx*. Dans ce même ordre d'idées, nous envisageons l'irradiation de souris *PSA-Cre/Sdhb<sup>lox/lox</sup>*, ce second évènement pouvant être également favorisé par les dommages causés à l'ADN par les radiations ionisantes [371]. Par ailleurs, dans le modèle de souris *NF1*, l'incidence des PCC a été considérablement augmentée (multipliée par 7) par une irradiation de 4 Gray des souriceaux âgés de 10 jours [340, 372].

Enfin, l'équipe d'Arthur Tischler, qui a déjà généré les modèles cellulaires PC12 et MPC, a récemment mis en place une stratégie qui repose sur la propension plus importante des rats à développer des PCC par rapport aux souris. Ils établissent actuellement un modèle de rat porteur d'un KO du gène *Sdhb* réalisé par une approche CRISPR/Cas9, qui pourrait donner des résultats positifs [373].

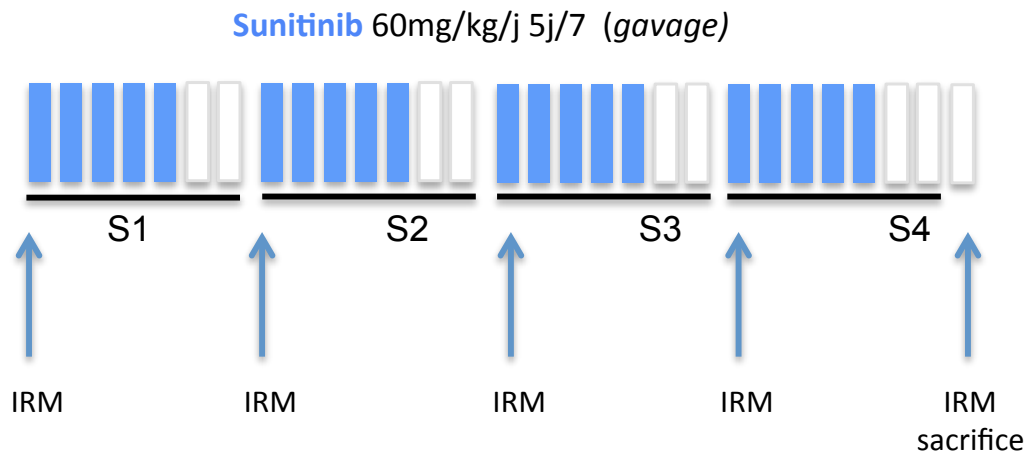
## B. Evaluation de la réponse au traitement

### I. Thérapies antiangiogéniques

Les thérapies ciblées semblent être actuellement le traitement le plus prometteur pour les patients atteints de PCC/PGL malins, notamment les thérapies ciblant l'angiogenèse VEGF-dépendante comme le sunitinib. Les PCC/PGL sont des tumeurs très vascularisées, notamment les PCC/PGL malins et dépendants de *SDHB*, et cette hypervascularisation est liée à une surexpression de VEGF [33, 207, 171, 374, 375, 173, 376, 172]. Il y a donc un rationnel fort pour les antiangiogéniques dans notre modèle murin. Dans le cadre de notre participation au programme européen FP7 (Seventh Framework Programme), le choix s'est porté sur le sunitinib.

Nous avons donc prévu de traiter les souris *Sdhb<sup>-/-</sup>* avec du Sunitinib (Sunitinib Malate (Sutent) ref 1611--1000, Clinisciences), par gavage gastrique 5 jours par semaine.

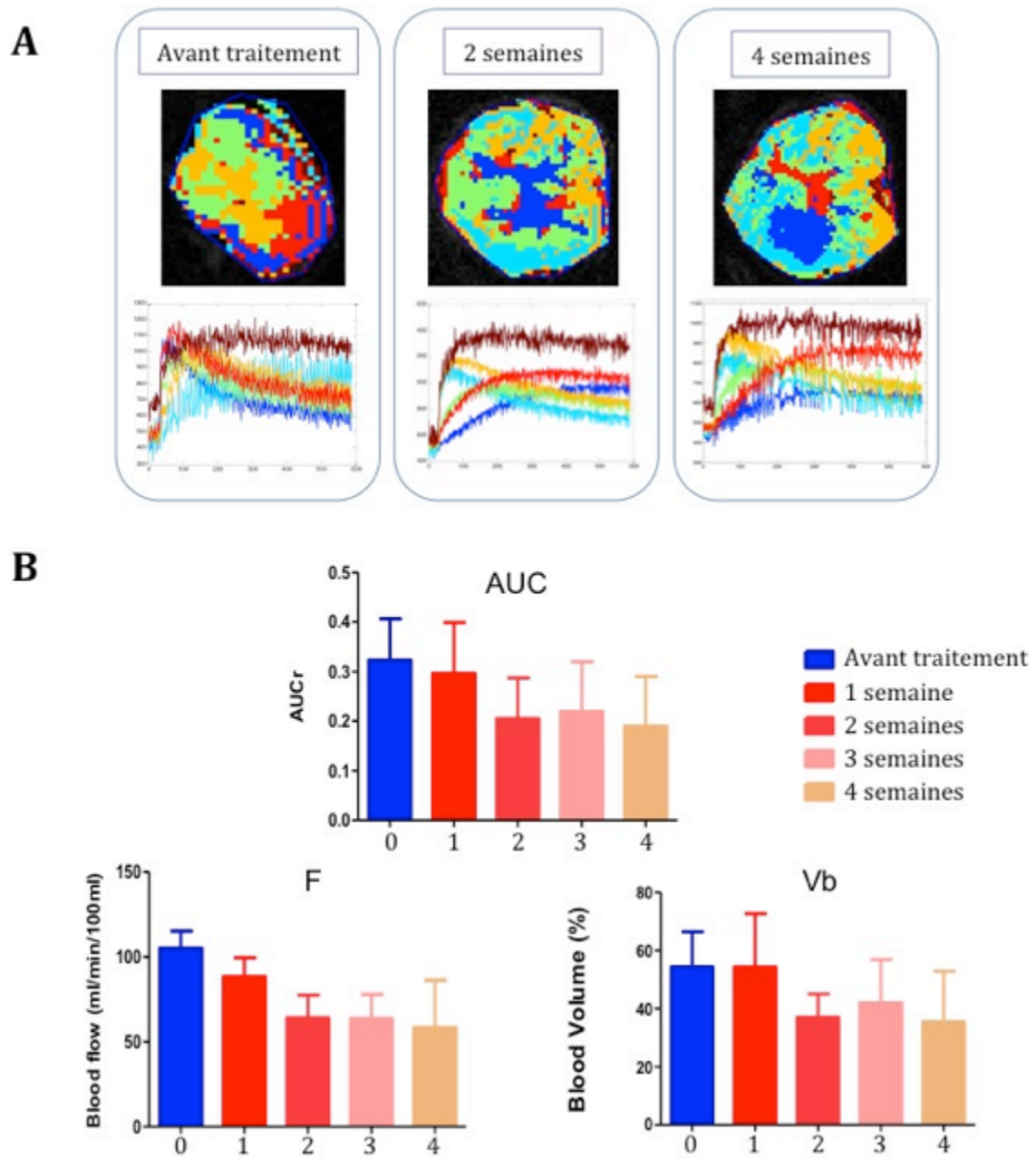
Une première série de souris *Sdhb<sup>-/-</sup>* a été traitée pendant 5 jours à la dose de 40mg/j, sans effet ni sur la croissance ni sur la vascularisation étudiée par IRM-DCE (*données non présentées*). Suite à ces résultats et en se basant sur les quelques études disponibles dans la littérature concernant l'utilisation du sunitinib chez la souris [377, 378], le choix s'est porté sur une dose plus élevée de sunitinib à 60mg/kg/j. Les souris ont été également traitées sur une plus longue période (4 semaines), selon le schéma thérapeutique présenté Figure 34.



**Figure 34 : Plan thérapeutique de l'administration de sunitinib aux souris *Sdhb*<sup>-/-</sup>**

Ce schéma thérapeutique a été conduit sur 8 souris *Sdhb*<sup>-/-</sup>, dans un premier temps sans groupe contrôle afin de ne pas multiplier inutilement le nombre d'animaux nécessaires. Les résultats préliminaires ont montré l'apparition d'une zone centrale avasculaire et une tendance (non significative) à la diminution de l'AUCr (réhaussement global corrigé par la fonction d'entrée vasculaire) après 2 semaines de traitement, sans ralentissement de la croissance (Figure 35). Cette diminution était secondaire à la fois à une diminution du débit sanguin vasculaire (F, ml/min/100ml de tissu) et de la fraction de volume sanguin (Vb, % de tissu).

La même expérience avec ajout d'un groupe contrôle traité par le véhicule et d'une évaluation également par <sup>1</sup>H-MRS est actuellement en cours de réalisation sur 20 souris avec une efficacité sur la croissance tumorale.



**Figure 35 : Evaluation par IRM-DCE du traitement par 60mg/kg/j de sunitinib chez une série de 8 souris avec tumeur *Sdhb*<sup>-/-</sup>.**

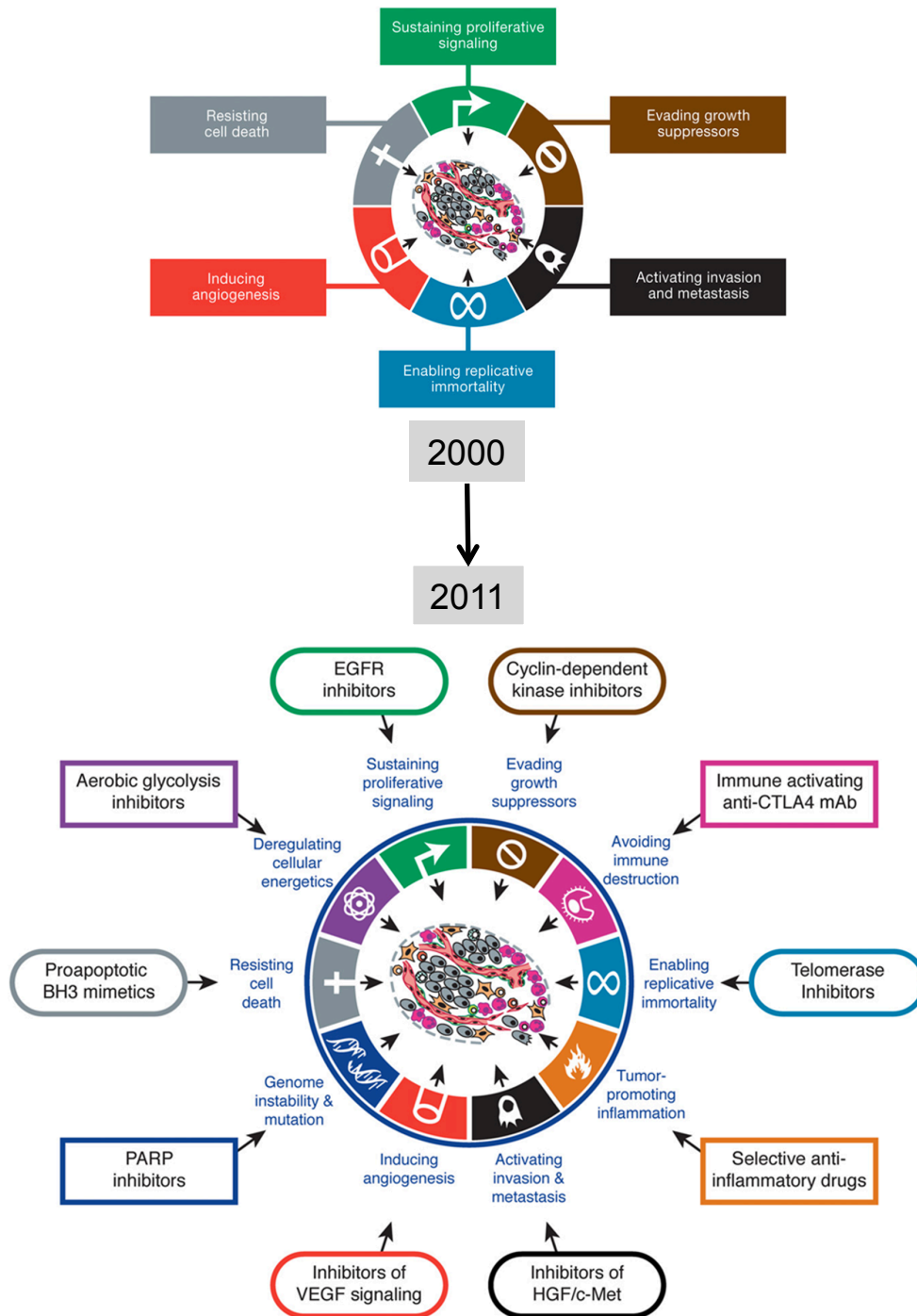
Après segmentation automatique de l'image obtenue 10 minutes après l'injection de produit de contraste, apparition dès 2 semaines de traitement d'une zone centrale avasculaire (la zone bleu foncé sur l'image segmentée). Cette nécrose est toujours présente à 4 semaines (A). La modélisation du signal des 60 premières secondes post-injection montre une tendance à la diminution du rehaussement global (AUC), secondaire à une baisse du débit de perfusion (F) et de la fraction volumique capillaire (Vb) dans la tumeur.

## II. Autres pistes innovantes

Mes travaux de thèse ont permis la mise au point d'une véritable plateforme pré-clinique dédiée au développement de thérapies innovantes pour la prise en charge des patients avec PCC/PGL métastatiques secondaires aux mutations *SDHB*. Ceci ouvre la possibilité à la fois de tester de nouvelles thérapies issues de l'étude de la tumorigenèse des PCC/PGL sur un plan fondamental mais également de développer de nouvelles pistes d'imagerie pour l'étude de la réponse au traitement.

En effet, les directions actuelles prises par la recherche sur le cancer en général commencent à quitter le domaine de l'angiogenèse pour se consacrer au métabolisme tumoral, considéré par *Hanahan* et *Weinberg* comme un des « hallmarks » émergents impliqués dans le développement du cancer (Figure 36).

Grâce aux travaux antérieurs de mon équipe d'accueil, nous savons qu'une des conséquences de l'accumulation de succinate dans les tumeurs avec mutation *SDHx* est le défaut de déméthylation de l'ADN et des histones [114]. De façon intéressante, dans cette étude, l'utilisation d'un agent déméthylant à faible dose (decitabine, Dacogen®) *in vitro* inhibait la prolifération et la migration des imCC *Sdhb*<sup>-/-</sup>. Ces observations nous conduisent à envisager ces agents comme une thérapie potentielle des PCC/PGL *SDHx*-dépendants et notre modèle murin est prêt pour le lancement de premiers tests pré-cliniques. De plus, l'inhibition de TET2 (impliquée dans la déméthylation de l'ADN) dans les imCC *Sdhb*<sup>-/-</sup> était reversée par l'addition au milieu de culture de 2-oxoglutarate, substrat des dioxygénases-dépendantes du 2-oxoglutarate (comprenant les TET, les histones déméthylases, les prolylhydroxylases et certaines collagène prolylhydroxylases) avec lequel le succinate entre en compétition. Le 2-oxoglutarate est un acide organique, intermédiaire du cycle de Krebs, présent naturellement dans toutes les cellules de l'organisme. Il n'a pas de toxicité a priori et pourrait également être testé dans notre modèle avec des études de pharmacocinétique afin de déterminer les voies possibles d'administration.



**Figure 36 : Evolution des « hallmarks » du cancer.** Adapté d'après Hanahan et Weinberg, 2011 [379]. Depuis la description des 6 phénomènes biologiques (« hallmarks ») impliqués dans le développement du cancer en 2000 par Hanahan et Weinberg, de nombreux travaux ont impliqué de nouvelles voies de dérégulation permettant d'imaginer de nouvelles cibles thérapeutiques. La dérégulation du métabolisme énergétique et notamment l'utilisation de la glycolyse anaérobie fait partie de ces concepts émergents.

En collaboration avec l'équipe de Daniel Tennant à l'Université de Birmingham, nous avons pu étudier de façon approfondie le métabolisme des cellules *Sdhb* déficientes par une technique de flux métabolique avec du glucose, de la glutamine et de l'aspartate marqués au  $^{13}\text{C}$  (Article 4 en annexe). Nous avons pu mettre en évidence, en accord avec les résultats d'une équipe concurrente publiés au même moment [380], de nouvelles cibles thérapeutiques indispensables à la survie et à la prolifération de ces cellules comme la pyruvate décarboxylase ou l'aspartate aminotransférase. Ces enzymes étant possiblement largement utilisées dans d'autres organes, une étude de toxicité chez l'animal est absolument indispensable.

Enfin, ce modèle pourrait permettre d'évaluer des associations thérapeutiques, de façon séquentielle ou concomitante, perspective encore limitée chez les patients à l'heure actuelle par la peur du cumul des toxicités.



## CONCLUSION

A mon arrivée dans le laboratoire nous disposions d'un modèle cellulaire de cellules chromaffines *Sdhb*-déficientes, la caractérisation d'un modèle murin prédisposé aux tumeurs *Sdhb* était en cours, et la collaboration avec l'équipe d'imagerie de l'angiogénèse n'avait pas commencée.

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en lumière les obstacles importants à l'élaboration d'un modèle prédisposé de PCC/PGL chez la souris. Dans l'état de l'art actuel et des connaissances, ce projet a été jugé possiblement non réalisable et mis en suspens.

Nous avons néanmoins pu rebondir en créant un modèle d'allogreffes, qui nous a permis de mettre en place les techniques d'imagerie nécessaires à l'étude de la réponse précoce au traitement par thérapies ciblées.

Grâce à ce modèle qui reproduit le marqueur biochimique de la mutation *SDHB*, nous avons mis au point et transféré en clinique une technique d'imagerie innovante permettant de détecter *in vivo* l'accumulation de succinate, oncométabolite principal responsable de la tumorigénèse des PCC/PGL SDH-dépendants. Cet outil permettra à l'avenir la détection et le suivi (éventuellement sous traitement) des lésions tumorales chez les patients porteurs de mutation *SDHx* et la caractérisation fonctionnelle en préopératoire ou en cas de non-indication chirurgicale, des variants de signification inconnue identifiées sur l'un des gènes *SDHx*. L'identification préopératoire des patients porteurs de mutations *SDHx* pourra également guider de façon pertinente le chirurgien dans ses choix ou modifier les recommandations de prise en charge.

Ce travail représente en outre le préalable à la mise en route d'essais précliniques, qui ont d'ores et déjà commencé, et porte l'espoir que les outils développés permettront les avancées nécessaires au traitement des patients avec PCC/PGL malins.





## **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

1. DeLellis R, Heitz P, Eng C. Adrenal tumours: Introduction. WHO Classification of tumours-Pathology and Genetics- Tumours of endocrin organs. 2004.
2. Stenstrom G, Svardsudd K. Pheochromocytoma in Sweden 1958-1981. An analysis of the National Cancer Registry Data. *Acta medica Scandinavica*. 1986;220(3):225-32.
3. Beard CM, Sheps SG, Kurland LT, Carney JA, Lie JT. Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clinic proceedings*. 1983;58(12):802-4.
4. Baysal BE. Hereditary paraganglioma targets diverse paraganglia. *Journal of medical genetics*. 2002;39(9):617-22.
5. Lenders JW, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K. Pheochromocytoma. *Lancet*. 2005;366(9486):665-75. doi:10.1016/S0140-6736(05)67139-5.
6. Bronner-Fraser M, Fraser SE. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature*. 1988;335(6186):161-4. doi:10.1038/335161a0.
7. Bronner ME, LeDouarin NM. Development and evolution of the neural crest: an overview. *Developmental biology*. 2012;366(1):2-9. doi:10.1016/j.ydbio.2011.12.042.
8. Adams MS, Bronner-Fraser M. Review: the role of neural crest cells in the endocrine system. *Endocrine pathology*. 2009;20(2):92-100. doi:10.1007/s12022-009-9070-6.
9. Lee KY, Oh YW, Noh HJ, Lee YJ, Yong HS, Kang EY et al. Extraadrenal paragangliomas of the body: imaging features. *AJR American journal of roentgenology*. 2006;187(2):492-504. doi:10.2214/AJR.05.0370.
10. Flatmark T. Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta physiologica Scandinavica*. 2000;168(1):1-17. doi:10.1046/j.1365-201x.2000.00596.x.
11. Eisenhofer G, Huynh TT, Hiroi M, Pacak K. Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2001;2(3):297-311.
12. Henry JP, Botton D, Sagne C, Isambert MF, Desnos C, Blanchard V et al. Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *The Journal of experimental biology*. 1994;196:251-62.
13. Amara SG, Sonders MS, Zahniser NR, Povlock SL, Daniels GM. Molecular physiology and regulation of catecholamine transporters. *Advances in pharmacology*. 1998;42:164-8.
14. Nagatsu T, Stjarne L. Catecholamine synthesis and release. Overview. *Advances in pharmacology*. 1998;42:1-14.
15. Schulz C, Eisenhofer G, Lehnert H. Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release. *Frontiers of hormone research*. 2004;31:1-25.
16. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological reviews*. 2004;56(3):331-49. doi:10.1124/pr.56.3.1.
17. Amar L, Servais A, Gimenez-Roqueplo AP, Zinzindohoue F, Chatellier G, Plouin PF. Year of diagnosis, features at presentation, and risk of recurrence in patients with pheochromocytoma or secreting paraganglioma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(4):2110-6. doi:10.1210/jc.2004-1398.
18. Plouin PF, Chatellier G, Delahousse M, Rougeot MA, Duclos JM, Pagny JY et al. [Detection, diagnosis and localization of pheochromocytoma. 77 cases in a population of 21,420 hypertensive patients]. *Presse medicale*. 1987;16(44):2211-5.

19. Giavarini A, Chedid A, Bobrie G, Plouin PF, Hagege A, Amar L. Acute catecholamine cardiomyopathy in patients with pheochromocytoma or functional paraganglioma. *Heart*. 2013;99(19):1438-44. doi:10.1136/heartjnl-2013-304073.
20. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(6):1915-42. doi:10.1210/jc.2014-1498.
21. La Batide-Alanore A, Chatellier G, Plouin PF. Diabetes as a marker of pheochromocytoma in hypertensive patients. *Journal of hypertension*. 2003;21(9):1703-7. doi:10.1097/01.hjh.0000084729.53355.ce.
22. Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *Jama*. 2002;287(11):1427-34.
23. Peaston RT, Graham KS, Chambers E, van der Molen JC, Ball S. Performance of plasma free metanephrines measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the diagnosis of pheochromocytoma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411(7-8):546-52. doi:10.1016/j.cca.2010.01.012.
24. Willemsen JJ, Ross HA, Lenders JW, Sweep FC. Stability of urinary fractionated metanephrines and catecholamines during collection, shipment, and storage of samples. *Clinical chemistry*. 2007;53(2):268-72. doi:10.1373/clinchem.2006.075218.
25. Lenders JW, Willemsen JJ, Eisenhofer G, Ross HA, Pacak K, Timmers HJ et al. Is supine rest necessary before blood sampling for plasma metanephrines? *Clinical chemistry*. 2007;53(2):352-4. doi:10.1373/clinchem.2006.076489.
26. Eisenhofer G, Lenders JW, Siegert G, Bornstein SR, Friberg P, Milosevic D et al. Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status. *European journal of cancer*. 2012;48(11):1739-49. doi:10.1016/j.ejca.2011.07.016.
27. van Duinen N, Steenvoorden D, Kema IP, Jansen JC, Vriends AH, Bayley JP et al. Increased urinary excretion of 3-methoxytyramine in patients with head and neck paragangliomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(1):209-14. doi:10.1210/jc.2009-1632.
28. Tischler AS, Kimura N, McNicol AM. Pathology of pheochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1073:557-70. doi:10.1196/annals.1353.059.
29. Thompson LD. Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(5):551-66.
30. Wu D, Tischler AS, Lloyd RV, DeLellis RA, de Krijger R, van Nederveen F et al. Observer variation in the application of the Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score. *The American journal of surgical pathology*. 2009;33(4):599-608. doi:10.1097/PAS.0b013e318190d12e.
31. van der Harst E, Bruining HA, Jaap Bonjer H, van der Ham F, Dinjens WN, Lamberts SW et al. Proliferative index in pheochromocytomas: does it predict the occurrence of metastases? *The Journal of pathology*. 2000;191(2):175-80. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200006)191:2<175::AID-PATH615>3.0.CO;2-Z.
32. Kimura N, Takayanagi R, Takizawa N, Itagaki E, Katabami T, Kakoi N et al. Pathological grading for predicting metastasis in pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(3):405-14. doi:10.1530/ERC-13-0494.

33. Favier J, Plouin PF, Corvol P, Gasc JM. Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors. *The American journal of pathology*. 2002;161(4):1235-46. doi:10.1016/S0002-9440(10)64400-8.
34. Oudijk L, van Nederveen F, Badoual C, Tissier F, Tischler AS, Smid M et al. Vascular pattern analysis for the prediction of clinical behaviour in pheochromocytomas and paragangliomas. *PloS one*. 2015;10(3):e0121361. doi:10.1371/journal.pone.0121361.
35. Lloyd R. Adrenal tumours: Introduction. *WHO Classification of tumours-Pathology and Genetics-Tumours of endocrine organs*. IARC Press; 2004.
36. Whitelaw BC, Prague JK, Mustafa OG, Schulte KM, Hopkins PA, Gilbert JA et al. Pheochromocytoma [corrected] crisis. *Clinical endocrinology*. 2014;80(1):13-22. doi:10.1111/cen.12324.
37. Gimenez-Roqueplo AP, Dahia PL, Robledo M. An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm Metab Res*. 44(5):328-33.
38. Burnichon N, Buffet A, Parfait B, Letouze E, Laurendeau I, Lorient C et al. Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma. *Human molecular genetics*. 2012;21(26):5397-405. doi:10.1093/hmg/dd374.
39. Crona J, Delgado Verdugo A, Maharjan R, Stalberg P, Granberg D, Hellman P et al. Somatic mutations in H-RAS in sporadic pheochromocytoma and paraganglioma identified by exome sequencing. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(7):E1266-71. doi:10.1210/jc.2012-4257.
40. Buffet A, Venisse A, Nau V, Roncellin I, Boccio V, Le Pottier N et al. A decade (2001-2010) of genetic testing for pheochromocytoma and paraganglioma. *Horm Metab Res*. 2012;44(5):359-66.
41. Favier J, Buffet A, Gimenez-Roqueplo AP. HIF2A mutations in paraganglioma with polycythemia. *The New England journal of medicine*. 2012;367(22):2161; author reply - 2. doi:10.1056/NEJMc1211953#SA1.
42. Burnichon N, Vescovo L, Amar L, Libe R, de Reynies A, Venisse A et al. Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Human molecular genetics*. 2011;20(20):3974-85. doi:10.1093/hmg/ddr324.
43. Falchetti A, Marini F, Luzi E, Tonelli F, Brandi ML. Multiple endocrine neoplasms. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(1):149-63.
44. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993;363(6428):458-60. doi:10.1038/363458a0.
45. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(12):5658-71. doi:10.1210/jcem.86.12.8070.
46. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. *International RET mutation consortium analysis*. *Jama*. 1996;276(19):1575-9.
47. Wells SA, Jr., Asa SL, Dralle H, Elisei R, Evans DB, Gagel RF et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015;25(6):567-610. doi:10.1089/thy.2014.0335.
48. Pinson S, Wolkenstein P. [Neurofibromatosis type 1 or Von Recklinghausen's disease]. *Rev Med Interne*. 2005;26(3):196-215.
49. Boyd KP, Korf BR, Theos A. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(1):1-14; quiz 5-6.

50. Riccardi VM, Lewis RA. Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants. *Am J Hum Genet.* 1988;42(2):284-9.
51. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics.* 2000;105(3 Pt 1):608-14.
52. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell.* 1990;62(1):187-92.
53. Theos A, Korf BR. Pathophysiology of neurofibromatosis type 1. *Ann Intern Med.* 2006;144(11):842-9.
54. Rieubland C, Vidaud D, Jacquemont S. [NF1: Molecular testing in clinical practice]. *Ann Dermatol Venereol.* 2007;134(8-9):678-81. doi:MDOI-AD-08-2007-134-8-0151-9638-101019-200520010 [pii].
55. Pasmant E, Parfait B, Luscan A, Goussard P, Briand-Suleau A, Laurendeau I et al. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations? *European journal of human genetics : EJHG.* 2015;23(5):596-601. doi:10.1038/ejhg.2014.145.
56. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med.* 2002;346(19):1459-66.
57. Hammel PR, Vilgrain V, Terris B, Penfornis A, Sauvanet A, Correas JM et al. Pancreatic involvement in von Hippel-Lindau disease. *The Groupe Francophone d'Etude de la Maladie de von Hippel-Lindau. Gastroenterology.* 2000;119(4):1087-95.
58. Neumann HP, Wiestler OD. Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus. *Lancet.* 1991;337(8749):1052-4.
59. Brauch H, Kishida T, Glavac D, Chen F, Pausch F, Hofler H et al. Von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet.* 1995;95(5):551-6.
60. Hoffman MA, Ohh M, Yang H, Klco JM, Ivan M, Kaelin WG, Jr. von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Human molecular genetics.* 2001;10(10):1019-27.
61. Crosse PA, Maher ER, Jones MH, Richards FM, Latif F, Phipps ME et al. Genetic linkage between von Hippel-Lindau disease and three microsatellite polymorphisms refines the localisation of the VHL locus. *Hum Mol Genet.* 1993;2(3):279-82.
62. Baysal BE, van Schothorst EM, Farr JE, James MR, Devilee P, Richard CW, 3rd. A high-resolution STS, EST, and gene-based physical map of the hereditary paraganglioma region on chromosome 11q23. *Genomics.* 1997;44(2):214-21.
63. Heutink P, van der Mey AG, Sandkuijl LA, van Gils AP, Bardoel A, Breedveld GJ et al. A gene subject to genomic imprinting and responsible for hereditary paragangliomas maps to chromosome 11q23-qter. *Hum Mol Genet.* 1992;1(1):7-10.
64. Mariman EC, van Beersum SE, Cremers CW, van Baars FM, Ropers HH. Analysis of a second family with hereditary non-chromaffin paragangliomas locates the underlying gene at the proximal region of chromosome 11q. *Hum Genet.* 1993;91(4):357-61.
65. Mariman EC, van Beersum SE, Cremers CW, Struycken PM, Ropers HH. Fine mapping of a putatively imprinted gene for familial non-chromaffin paragangliomas to chromosome 11q13.1: evidence for genetic heterogeneity. *Hum Genet.* 1995;95(1):56-62.
66. Niemann S, Steinberger D, Muller U. PGL3, a third, not maternally imprinted locus in autosomal dominant paraganglioma. *Neurogenetics.* 1999;2(3):167-70.



67. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*. 2000;287(5454):848-51.
68. Niemann S, Muller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet*. 2000;26(3):268-70.
69. Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E et al. Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *American journal of human genetics*. 2001;69(1):49-54. doi:10.1086/321282.
70. Hederstedt L. Structural biology. Complex II is complex too. *Science*. 2003;299(5607):671-2. doi:10.1126/science.1081821.
71. Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephore N, Bayley JP, Kunst H et al. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science*. 2009;325(5944):1139-42.
72. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*. 1995;11(2):144-9.
73. Burnichon N, Briere JJ, Libe R, Vescovo L, Riviere J, Tissier F et al. SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet*. 2010;19(15):3011-20.
74. van Nederveen FH, Gaal J, Favier J, Korpershoek E, Oldenburg RA, de Bruyn EM et al. An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *The Lancet Oncology*. 2009;10(8):764-71. doi:10.1016/S1470-2045(09)70164-0.
75. Menara M, Oudijk L, Badoual C, Bertherat J, Lepoutre-Lussey C, Amar L et al. SDHD Immunohistochemistry: A New Tool to Validate SDHx Mutations in Pheochromocytoma/Paraganglioma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(2):E287-91. doi:10.1210/jc.2014-1870.
76. Korpershoek E, Favier J, Gaal J, Burnichon N, van Gessel B, Oudijk L et al. SDHA immunohistochemistry detects germline SDHA gene mutations in apparently sporadic paragangliomas and pheochromocytomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(9):E1472-6. doi:10.1210/jc.2011-1043.
77. Baysal BE, Farr JE, Rubinstein WS, Galus RA, Johnson KA, Aston CE et al. Fine mapping of an imprinted gene for familial nonchromaffin paragangliomas, on chromosome 11q23. *American journal of human genetics*. 1997;60(1):121-32.
78. Gimenez-Roqueplo AP, Caumont-Prim A, Houzard C, Hignette C, Hernigou A, Halimi P et al. Imaging work-up for screening of paraganglioma and pheochromocytoma in SDHx mutation carriers: a multicenter prospective study from the PGL.EVA Investigators. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(1):E162-73. doi:10.1210/jc.2012-2975.
79. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Crespin M, Nau V et al. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer research*. 2003;63(17):5615-21.
80. Amar L, Baudin E, Burnichon N, Peyrard S, Silvera S, Bertherat J et al. Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(10):3822-8. doi:10.1210/jc.2007-0709.
81. Benn DE, Gimenez-Roqueplo AP, Reilly JR, Bertherat J, Burgess J, Byth K et al. Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. *The*

- Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2006;91(3):827-36. doi:10.1210/jc.2005-1862.
82. Bayley JP, Kunst HP, Cascon A, Sampietro ML, Gaal J, Korpershoek E et al. SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and pheochromocytoma. *Lancet Oncol.* 11(4):366-72.
83. Kunst HP, Rutten MH, de Monnik JP, Hoefsloot LH, Timmers HJ, Marres HA et al. SDHAF2 (PGL2-SDH5) and hereditary head and neck paraganglioma. *Clin Cancer Res.* 17(2):247-54.
84. Zhu WD, Wang ZY, Chai YC, Wang XW, Chen DY, Wu H. Germline mutations and genotype-phenotype associations in head and neck paraganglioma patients with negative family history in China. *European journal of medical genetics.* 2015;58(9):433-8. doi:10.1016/j.ejmg.2015.05.008.
85. Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M et al. A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology.* 1998;115(5):1090-5.
86. McWhinney SR, Pasini B, Stratakis CA, International Carney T, Carney-Stratakis Syndrome C. Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations. *The New England journal of medicine.* 2007;357(10):1054-6. doi:10.1056/NEJMc071191.
87. Pasini B, McWhinney SR, Bei T, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Muchow M et al. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *European journal of human genetics : EJHG.* 2008;16(1):79-88. doi:10.1038/sj.ejhg.5201904.
88. Stratakis CA, Carney JA. The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications. *Journal of internal medicine.* 2009;266(1):43-52. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02110.x.
89. Janeway KA, Kim SY, Lodish M, Nose V, Rustin P, Gaal J et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(1):314-8. doi:10.1073/pnas.1009199108.
90. Oudijk L, Gaal J, Korpershoek E, van Nederveen FH, Kelly L, Schiavon G et al. SDHA mutations in adult and pediatric wild-type gastrointestinal stromal tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(3):456-63. doi:10.1038/modpathol.2012.186.
91. Pantaleo MA, Astolfi A, Urbini M, Nannini M, Paterini P, Indio V et al. Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFRA wild-type GIST. *European journal of human genetics : EJHG.* 2014;22(1):32-9. doi:10.1038/ejhg.2013.80.
92. Wagner AJ, Remillard SP, Zhang YX, Doyle LA, George S, Hornick JL. Loss of expression of SDHA predicts SDHA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(2):289-94. doi:10.1038/modpathol.2012.153.
93. Killian JK, Miettinen M, Walker RL, Wang Y, Zhu YJ, Waterfall JJ et al. Recurrent epimutation of SDHC in gastrointestinal stromal tumors. *Science translational medicine.* 2014;6(268):268ra177. doi:10.1126/scitranslmed.3009961.
94. Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M et al. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *Jama.* 2004;292(8):943-51. doi:10.1001/jama.292.8.943.



95. Ricketts C, Woodward ER, Killick P, Morris MR, Astuti D, Latif F et al. Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(17):1260-2. doi:10.1093/jnci/djn254.
96. Vanharanta S, Buchta M, McWhinney SR, Virta SK, Peczkowska M, Morrison CD et al. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *American journal of human genetics*. 2004;74(1):153-9. doi:10.1086/381054.
97. Ricketts CJ, Forman JR, Rattenberry E, Bradshaw N, Lalloo F, Izatt L et al. Tumor risks and genotype-phenotype-proteotype analysis in 358 patients with germline mutations in SDHB and SDHD. *Human mutation*. 2010;31(1):41-51. doi:10.1002/humu.21136.
98. Malinoc A, Sullivan M, Wiech T, Schmid KW, Jilg C, Straeter J et al. Biallelic inactivation of the SDHC gene in renal carcinoma associated with paraganglioma syndrome type 3. *Endocrine-related cancer*. 2012;19(3):283-90. doi:10.1530/ERC-11-0324.
99. Ricketts CJ, Shuch B, Vocke CD, Metwalli AR, Bratslavsky G, Middleton L et al. Succinate dehydrogenase kidney cancer: an aggressive example of the Warburg effect in cancer. *The Journal of urology*. 2012;188(6):2063-71. doi:10.1016/j.juro.2012.08.030.
100. Armstrong R, Greenhalgh KL, Rattenberry E, Judd B, Shukla R, Losty PD et al. Succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) gene deletion associated with a composite paraganglioma/neuroblastoma. *Journal of medical genetics*. 2009;46(3):215-6. doi:10.1136/jmg.2008.060749.
101. Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(11):1432-43. doi:10.1016/j.bbabi.2011.07.003.
102. Lopez-Jimenez E, de Campos JM, Kusak EM, Landa I, Leskela S, Montero-Conde C et al. SDHC mutation in an elderly patient without familial antecedents. *Clinical endocrinology*. 2008;69(6):906-10. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03368.x.
103. Xekouki P, Pacak K, Almeida M, Wassif CA, Rustin P, Nesterova M et al. Succinate dehydrogenase (SDH) D subunit (SDHD) inactivation in a growth-hormone-producing pituitary tumor: a new association for SDH? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(3):E357-66. doi:10.1210/jc.2011-1179.
104. Xekouki P, Szarek E, Bullova P, Giubellino A, Quezado M, Mastroyannis SA et al. Pituitary adenoma with paraganglioma/pheochromocytoma (3PAs) and succinate dehydrogenase defects in human and mice. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;97(5):E4297. doi:10.1210/jc.2014-4297.
105. Zbuk KM, Patocs A, Shealy A, Sylvester H, Miesfeldt S, Eng C. Germline mutations in PTEN and SDHC in a woman with epithelial thyroid cancer and carotid paraganglioma. *Nature clinical practice Oncology*. 2007;4(10):608-12. doi:10.1038/ncponc0935.
106. Qin Y, Yao L, King EE, Buddavarapu K, Lenci RE, Chocron ES et al. Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet*. 2011;43(3):229-33.
107. Abermil N, Guillaud-Bataille M, Burnichon N, Venisse A, Manivet P, Guignat L et al. TMEM127 screening in a large cohort of patients with pheochromocytoma and/or paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(5):E805-9.
108. Yao L, Schiavi F, Cascon A, Qin Y, Inglada-Perez L, King EE et al. Spectrum and prevalence of FP/TMEM127 gene mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Jama*. 2010;304(23):2611-9.
109. Comino-Mendez I, Gracia-Aznarez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-Garcia LJ, Leton R et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nature genetics*. 2011;43(7):663-7. doi:10.1038/ng.861.

110. Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*. 2000;16:653-99. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.653.
111. Burnichon N, Cascon A, Schiavi F, Morales NP, Comino-Mendez I, Abermil N et al. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(10):2828-37. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0160.
112. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature genetics*. 2002;30(4):406-10. doi:10.1038/ng849.
113. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-12. doi:10.1126/science.1164382.
114. Letouze E, Martinelli C, Loriot C, Burnichon N, Abermil N, Ottolenghi C et al. SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer cell*. 2013;23(6):739-52. doi:10.1016/j.ccr.2013.04.018.
115. Cascon A, Comino-Mendez I, Curras-Freixes M, de Cubas AA, Contreras L, Richter S et al. Whole-Exome Sequencing Identifies MDH2 as a New Familial Paraganglioma Gene. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(5). doi:10.1093/jnci/djv053.
116. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England journal of medicine*. 2009;361(11):1058-66. doi:10.1056/NEJMoa0903840.
117. Murugan AK, Bojdani E, Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;393(3):555-9. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.095.
118. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*. 2009;360(8):765-73. doi:10.1056/NEJMoa0808710.
119. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-44. doi:10.1038/nature08617.
120. Gaal J, Burnichon N, Korpershoek E, Roncelin I, Bertherat J, Plouin PF et al. Isocitrate dehydrogenase mutations are rare in pheochromocytomas and paragangliomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(3):1274-8. doi:10.1210/jc.2009-2170.
121. Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, Warren MB, Glenn GM, Turner ML et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *American journal of human genetics*. 2003;73(1):95-106. doi:10.1086/376435.
122. Alam NA, Rowan AJ, Wortham NC, Pollard PJ, Mitchell M, Tyrer JP et al. Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency. *Human molecular genetics*. 2003;12(11):1241-52.
123. Lehtonen HJ, Kiuru M, Ylisaukko-Oja SK, Salovaara R, Herva R, Koivisto PA et al. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *Journal of medical genetics*. 2006;43(6):523-6. doi:10.1136/jmg.2005.036400.
124. Castro-Vega LJ, Buffet A, De Cubas AA, Cascon A, Menara M, Khalifa E et al. Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and

- paragangliomas. *Human molecular genetics*. 2014;23(9):2440-6. doi:10.1093/hmg/ddt639.
125. Clark GR, Sciacovelli M, Gaude E, Walsh DM, Kirby G, Simpson MA et al. Germline FH mutations presenting with pheochromocytoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(10):E2046-50. doi:10.1210/jc.2014-1659.
126. Zhuang Z, Yang C, Lorenzo F, Merino M, Fojo T, Kebebew E et al. Somatic HIF2A gain-of-function mutations in paraganglioma with polycythemia. *The New England journal of medicine*. 2012;367(10):922-30. doi:10.1056/NEJMoa1205119.
127. Taieb D, Yang C, Delenne B, Zhuang Z, Barlier A, Sebag F et al. First report of bilateral pheochromocytoma in the clinical spectrum of HIF2A-related polycythemia-paraganglioma syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(5):E908-13. doi:10.1210/jc.2013-1217.
128. Yang C, Sun MG, Matro J, Huynh TT, Rahimpour S, Prchal JT et al. Novel HIF2A mutations disrupt oxygen sensing, leading to polycythemia, paragangliomas, and somatostatinomas. *Blood*. 2013;121(13):2563-6. doi:10.1182/blood-2012-10-460972.
129. Buffet A, Smati S, Mansuy L, Menara M, Lebras M, Heymann MF et al. Mosaicism in HIF2A-related polycythemia-paraganglioma syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(2):E369-73. doi:10.1210/jc.2013-2600.
130. Lorenzo FR, Yang C, Ng Tang Fui M, Vankayalapati H, Zhuang Z, Huynh T et al. A novel EPAS1/HIF2A germline mutation in a congenital polycythemia with paraganglioma. *Journal of molecular medicine*. 2013;91(4):507-12. doi:10.1007/s00109-012-0967-z.
131. Comino-Mendez I, de Cubas AA, Bernal C, Alvarez-Escola C, Sanchez-Malo C, Ramirez-Tortosa CL et al. Tumoral EPAS1 (HIF2A) mutations explain sporadic pheochromocytoma and paraganglioma in the absence of erythrocytosis. *Human molecular genetics*. 2013;22(11):2169-76. doi:10.1093/hmg/ddt069.
132. Toledo RA, Qin Y, Srikantan S, Morales NP, Li Q, Deng Y et al. In vivo and in vitro oncogenic effects of HIF2A mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(3):349-59. doi:10.1530/ERC-13-0101.
133. Dahia PL, Ross KN, Wright ME, Hayashida CY, Santagata S, Barontini M et al. A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS genetics*. 2005;1(1):72-80. doi:10.1371/journal.pgen.0010008.
134. Eisenhofer G, Huynh TT, Pacak K, Brouwers FM, Walther MM, Linehan WM et al. Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(4):897-911. doi:10.1677/erc.1.00838.
135. Lopez-Jimenez E, Gomez-Lopez G, Leandro-Garcia LJ, Munoz I, Schiavi F, Montero-Conde C et al. Research resource: Transcriptional profiling reveals different pseudohypoxic signatures in SDHB and VHL-related pheochromocytomas. *Molecular endocrinology*. 2010;24(12):2382-91. doi:10.1210/me.2010-0256.
136. Castro-Vega LJ, Letouze E, Burnichon N, Buffet A, Disderot PH, Khalifa E et al. Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nature communications*. 2015;6:6044. doi:10.1038/ncomms7044.
137. Castro-Vega LJ, Lepoutre-Lussey C, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective. *Oncogene*. 2015. doi:10.1038/onc.2015.172.
138. Oudijk L, de Krijger RR, Rapa I, Beuschlein F, de Cubas AA, Dei Tos AP et al. H-RAS mutations are restricted to sporadic pheochromocytomas lacking specific clinical or

- pathological features: data from a multi-institutional series. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(7):E1376-80. doi:10.1210/jc.2013-3879.
139. Flynn A, Benn D, Clifton-Bligh R, Robinson B, Trainer AH, James P et al. The genomic landscape of pheochromocytoma. *The Journal of pathology*. 2015;236(1):78-89. doi:10.1002/path.4503.
140. Fishbein L, Khare S, Wubbenhorst B, DeSloover D, D'Andrea K, Merrill S et al. Whole-exome sequencing identifies somatic ATRX mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nature communications*. 2015;6:6140. doi:10.1038/ncomms7140.
141. Plouin PF, Duclos JM, Soppelsa F, Boublil G, Chatellier G. Factors associated with perioperative morbidity and mortality in patients with pheochromocytoma: analysis of 165 operations at a single center. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(4):1480-6. doi:10.1210/jcem.86.4.7392.
142. Castinetti F, Qi XP, Walz MK, Maia AL, Sanso G, Peczkowska M et al. Outcomes of adrenal-sparing surgery or total adrenalectomy in pheochromocytoma associated with multiple endocrine neoplasia type 2: an international retrospective population-based study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(6):648-55. doi:10.1016/S1470-2045(14)70154-8.
143. Volkin D, Yerram N, Ahmed F, Lankford D, Baccala A, Gupta GN et al. Partial adrenalectomy minimizes the need for long-term hormone replacement in pediatric patients with pheochromocytoma and von Hippel-Lindau syndrome. *Journal of pediatric surgery*. 2012;47(11):2077-82. doi:10.1016/j.jpedsurg.2012.07.003.
144. Dupin C, Lang P, Dessard-Diana B, Simon JM, Cuenca X, Mazon JJ et al. Treatment of head and neck paragangliomas with external beam radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2014;89(2):353-9. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.02.010.
145. Gilbo P, Morris CG, Amdur RJ, Werning JW, Dziegielewska PT, Kirwan J et al. Radiotherapy for benign head and neck paragangliomas: a 45-year experience. *Cancer*. 2014;120(23):3738-43. doi:10.1002/cncr.28923.
146. Liscak R, Urgosik D, Chytka T, Simonova G, Novotny J, Jr., Vymazal J et al. Leksell Gamma Knife radiosurgery of the jugulotympanic glomus tumor: long-term results. *Journal of neurosurgery*. 2014;121 Suppl:198-202. doi:10.3171/2014.7.GKS14923.
147. Amar L, Fassnacht M, Gimenez-Roqueplo AP, Januszewicz A, Prejbisz A, Timmers H et al. Long-term postoperative follow-up in patients with apparently benign pheochromocytoma and paraganglioma. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2012;44(5):385-9. doi:10.1055/s-0031-1301339.
148. Rafat C, Zinzindohoue F, Hernigou A, Hignette C, Favier J, Tenenbaum F et al. Peritoneal implantation of pheochromocytoma following tumor capsule rupture during surgery. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(12):E2681-5. doi:10.1210/jc.2014-1975.
149. Favier J, Briere JJ, Burnichon N, Riviere J, Vescovo L, Benit P et al. The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PloS one*. 2009;4(9):e7094. doi:10.1371/journal.pone.0007094.
150. Arias-Stella J. Human carotid body at high altitudes. *American Journal of Pathology*. 1969;55:82a.
151. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72. doi:10.1126/science.1059796.
152. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer cell*. 2005;7(1):77-85. doi:10.1016/j.ccr.2004.11.022.



153. Briere JJ, Favier J, Benit P, El Ghouzzi V, Lorenzato A, Rabier D et al. Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1alpha nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Human molecular genetics*. 2005;14(21):3263-9. doi:10.1093/hmg/ddi359.
154. Morin A, Letouze E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014;135(10):2237-48. doi:10.1002/ijc.29080.
155. Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL et al. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer cell*. 2005;8(2):143-53. doi:10.1016/j.ccr.2005.06.017.
156. Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L, Ternette N, Sahgal N, Lockstone H et al. Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer cell*. 2011;20(4):524-37. doi:10.1016/j.ccr.2011.09.006.
157. Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S, Harris AL. Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer research*. 2000;60(24):7106-13.
158. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394(6692):485-90. doi:10.1038/28867.
159. Chen J, Zhao S, Nakada K, Kuge Y, Tamaki N, Okada F et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. *The American journal of pathology*. 2003;162(4):1283-91.
160. Favier J, Lapointe S, Maliba R, Sirois MG. HIF2 alpha reduces growth rate but promotes angiogenesis in a mouse model of neuroblastoma. *BMC cancer*. 2007;7:139. doi:10.1186/1471-2407-7-139.
161. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(16):9082-7.
162. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(13):5675-86. doi:10.1128/MCB.25.13.5675-5686.2005.
163. Pollard PJ, El-Bahrawy M, Poulosom R, Elia G, Killick P, Kelly G et al. Expression of HIF-1alpha, HIF-2alpha (EPAS1), and their target genes in paraganglioma and pheochromocytoma with VHL and SDH mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(11):4593-8. doi:10.1210/jc.2006-0920.
164. Favier J, Gimenez-Roqueplo AP. Pheochromocytomas: the (pseudo)-hypoxia hypothesis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2010;24(6):957-68. doi:10.1016/j.beem.2010.10.004.
165. Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T et al. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha ) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(9):7520-30. doi:10.1074/jbc.M211298200.
166. Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-

- 2alpha in stem cells. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(9):3514-26. doi:10.1128/MCB.26.9.3514-3526.2006.
167. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development*. 1997;11(1):72-82.
168. Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R. Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer research*. 2005;65(8):3299-306. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4130.
169. Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Molecular cancer research : MCR*. 2007;5(7):655-65. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0072.
170. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76. doi:10.1038/nm0603-669.
171. Kolomecki K, Stepien H, Bartos M, Kuzdak K. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours. *Endocrine regulations*. 2001;35(1):9-16.
172. Zielke A, Middeke M, Hoffmann S, Colombo-Benkmann M, Barth P, Hassan I et al. VEGF-mediated angiogenesis of human pheochromocytomas is associated to malignancy and inhibited by anti-VEGF antibodies in experimental tumors. *Surgery*. 2002;132(6):1056-63; discussion 63. doi:10.1067/msy.2002.128613.
173. Salmenkivi K, Heikkila P, Liu J, Haglund C, Arola J. VEGF in 105 pheochromocytomas: enhanced expression correlates with malignant outcome. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2003;111(4):458-64.
174. Eisenhofer G, Walther MM, Huynh TT, Li ST, Bornstein SR, Vortmeyer A et al. Pheochromocytomas in von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(5):1999-2008. doi:10.1210/jcem.86.5.7496.
175. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Mourad JJ, Plouin PF, Corvol P et al. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *American journal of human genetics*. 2001;69(6):1186-97. doi:10.1086/324413.
176. Gimenez-Roqueplo AP, Favier J, Rustin P, Rieubland C, Kerlan V, Plouin PF et al. Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(10):4771-4. doi:10.1210/jc.2002-020525.
177. Favier J, Igaz P, Burnichon N, Amar L, Libe R, Badoual C et al. Rationale for anti-angiogenic therapy in pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine pathology*. 2012;23(1):34-42. doi:10.1007/s12022-011-9189-0.
178. Racker E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Molecular and cellular biochemistry*. 1974;5(1-2):17-23.
179. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P et al. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(10):3436-44. doi:10.1128/MCB.21.10.3436-3444.2001.
180. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(24):9361-74.
181. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):269-70.

182. Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2007;39(3):223-9. doi:10.1007/s10863-007-9080-3.
183. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*. 2006;3(3):177-85. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002.
184. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism*. 2006;3(3):187-97. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.012.
185. Wigfield SM, Winter SC, Giatromanolaki A, Taylor J, Koukourakis ML, Harris AL. PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. *British journal of cancer*. 2008;98(12):1975-84. doi:10.1038/sj.bjc.6604356.
186. Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007;129(1):111-22. doi:10.1016/j.cell.2007.01.047.
187. Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M et al. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*. 2003;3(8):1620-32. doi:10.1002/pmic.200300464.
188. Craven RA, Stanley AJ, Hanrahan S, Dods J, Unwin R, Totty N et al. Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma. *Proteomics*. 2006;6(9):2853-64. doi:10.1002/pmic.200500549.
189. Hervouet E, Demont J, Pecina P, Vojtiskova A, Houstek J, Simonnet H et al. A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis*. 2005;26(3):531-9. doi:10.1093/carcin/bgi001.
190. Qing G, Simon MC. Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Current opinion in genetics & development*. 2009;19(1):60-6. doi:10.1016/j.gde.2008.12.001.
191. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine*. 2004;10(8):858-64. doi:10.1038/nm1075.
192. Gort EH, van Haaften G, Verlaan I, Groot AJ, Plasterk RH, Shvarts A et al. The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha. *Oncogene*. 2008;27(11):1501-10. doi:10.1038/sj.onc.1210795.
193. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*. 2003;425(6955):307-11. doi:10.1038/nature01874.
194. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nature cell biology*. 2008;10(3):295-305. doi:10.1038/ncb1691.
195. Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T et al. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *The American journal of pathology*. 2003;163(4):1437-47. doi:10.1016/S0002-9440(10)63501-8.
196. Luo D, Wang J, Li J, Post M. Mouse snail is a target gene for HIF. *Molecular cancer research* : MCR. 2011;9(2):234-45. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0214.
197. Yang MH, Wu KJ. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell cycle*. 2008;7(14):2090-6.

198. Thiery JP, Chua K, Sim WJ, Huang R. [Epithelial mesenchymal transition during development in fibrosis and in the progression of carcinoma]. *Bulletin du cancer*. 2010;97(11):1285-95. doi:10.1684/bdc.2010.1206.
199. Hayry V, Salmenkivi K, Arola J, Heikkila P, Haglund C, Sariola H. High frequency of SNAIL-expressing cells confirms and predicts metastatic potential of pheochromocytoma. *Endocrine-related cancer*. 2009;16(4):1211-8. doi:10.1677/ERC-09-0049.
200. Waldmann J, Slater EP, Langer P, Buchholz M, Ramaswamy A, Walz MK et al. Expression of the transcription factor snail and its target gene twist are associated with malignancy in pheochromocytomas. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(7):1997-2005. doi:10.1245/s10434-009-0480-y.
201. Lorient C, Burnichon N, Gadessaud N, Vescovo L, Amar L, Libe R et al. Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(6):E954-62. doi:10.1210/jc.2011-3437.
202. Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors. *Cancer letters*. 2004;204(2):197-211. doi:10.1016/S0304-3835(03)00456-7.
203. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. Minireview: RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004;145(12):5448-51. doi:10.1210/en.2004-0922.
204. Ibanez CF. Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(2). doi:10.1101/cshperspect.a009134.
205. Wagner SM, Zhu S, Nicolescu AC, Mulligan LM. Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2. *Clinics*. 2012;67 Suppl 1:77-84.
206. Ayala-Ramirez M, Feng L, Johnson MM, Ejaz S, Habra MA, Rich T et al. Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(3):717-25. doi:10.1210/jc.2010-1946.
207. Feng F, Zhu Y, Wang X, Wu Y, Zhou W, Jin X et al. Predictive factors for malignant pheochromocytoma: analysis of 136 patients. *The Journal of urology*. 2011;185(5):1583-90. doi:10.1016/j.juro.2010.12.050.
208. John H, Ziegler WH, Hauri D, Jaeger P. Pheochromocytomas: can malignant potential be predicted? *Urology*. 1999;53(4):679-83.
209. Chrisoulidou A, Kaltsas G, Ilias I, Grossman AB. The diagnosis and management of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(3):569-85. doi:10.1677/ERC-07-0074.
210. Goldstein RE, O'Neill JA, Jr., Holcomb GW, 3rd, Morgan WM, 3rd, Neblett WW, 3rd, Oates JA et al. Clinical experience over 48 years with pheochromocytoma. *Annals of surgery*. 1999;229(6):755-64; discussion 64-6.
211. Hadoux J, Favier J, Scoazec JY, Leboulleux S, Al Ghuzlan A, Caramella C et al. SDHB mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or paraganglioma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014;135(11):2711-20. doi:10.1002/ijc.28913.
212. Sisson JC, Shapiro B, Beierwaltes WH, Glowniak JV, Nakajo M, Mangner TJ et al. Radiopharmaceutical treatment of malignant pheochromocytoma. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1984;25(2):197-206.



213. van Hulsteijn LT, Niemeijer ND, Dekkers OM, Corssmit EP. (131)I-MIBG therapy for malignant paraganglioma and pheochromocytoma: systematic review and meta-analysis. *Clinical endocrinology*. 2014;80(4):487-501. doi:10.1111/cen.12341.
214. Gonias S, Goldsby R, Matthay KK, Hawkins R, Price D, Huberty J et al. Phase II study of high-dose [131I]metaiodobenzylguanidine therapy for patients with metastatic pheochromocytoma and paraganglioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(25):4162-8. doi:10.1200/JCO.2008.21.3496.
215. Huang H, Abraham J, Hung E, Averbuch S, Merino M, Steinberg SM et al. Treatment of malignant pheochromocytoma/paraganglioma with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine: recommendation from a 22-year follow-up of 18 patients. *Cancer*. 2008;113(8):2020-8. doi:10.1002/cncr.23812.
216. Nomura K, Kimura H, Shimizu S, Kodama H, Okamoto T, Obara T et al. Survival of patients with metastatic malignant pheochromocytoma and efficacy of combined cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine chemotherapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(8):2850-6. doi:10.1210/jc.2008-2697.
217. Berruti A, Baudin E, Gelderblom H, Haak HR, Porpiglia F, Fassnacht M et al. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 7:vii131-8. doi:10.1093/annonc/mds231.
218. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6. doi:10.1056/NEJM197111182852108.
219. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):401-10. doi:10.1038/nrc1093.
220. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell cycle*. 2006;5(16):1779-87.
221. Hahn NM, Reckova M, Cheng L, Baldrige LA, Cummings OW, Sweeney CJ. Patient with malignant paraganglioma responding to the multikinase inhibitor sunitinib malate. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(3):460-3. doi:10.1200/JCO.2008.19.9380.
222. Jimenez C, Cabanillas ME, Santarpia L, Jonasch E, Kyle KL, Lano EA et al. Use of the tyrosine kinase inhibitor sunitinib in a patient with von Hippel-Lindau disease: targeting angiogenic factors in pheochromocytoma and other von Hippel-Lindau disease-related tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(2):386-91. doi:10.1210/jc.2008-1972.
223. Joshua AM, Ezzat S, Asa SL, Evans A, Broom R, Freeman M et al. Rationale and evidence for sunitinib in the treatment of malignant paraganglioma/pheochromocytoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(1):5-9. doi:10.1210/jc.2008-1836.
224. Park KS, Lee JL, Ahn H, Koh JM, Park I, Choi JS et al. Sunitinib, a novel therapy for anthracycline- and cisplatin-refractory malignant pheochromocytoma. *Japanese journal of clinical oncology*. 2009;39(5):327-31. doi:10.1093/jjco/hyp005.
225. Ayala-Ramirez M, Chougnat CN, Habra MA, Palmer JL, Leboulleux S, Cabanillas ME et al. Treatment with sunitinib for patients with progressive metastatic pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(11):4040-50. doi:10.1210/jc.2012-2356.
226. Herrmann E, Bierer S, Wulfiging C. Update on systemic therapies of metastatic renal cell carcinoma. *World journal of urology*. 2010;28(3):303-9. doi:10.1007/s00345-010-0519-5.

227. Gorre ME, Sawyers CL. Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Current opinion in hematology*. 2002;9(4):303-7.
228. O'Connor R, Clynes M, Dowling P, O'Donovan N, O'Driscoll L. Drug resistance in cancer - searching for mechanisms, markers and therapeutic agents. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2007;3(6):805-17. doi:10.1517/17425255.3.6.805.
229. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(8):592-603. doi:10.1038/nrc2442.
230. Jimenez C, Rohren E, Habra MA, Rich T, Jimenez P, Ayala-Ramirez M et al. Current and future treatments for malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Current oncology reports*. 2013;15(4):356-71. doi:10.1007/s11912-013-0320-x.
231. Dancey JE. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer biology & therapy*. 2006;5(9):1065-73.
232. Druce MR, Kaltsas GA, Fraenkel M, Gross DJ, Grossman AB. Novel and evolving therapies in the treatment of malignant pheochromocytoma: experience with the mTOR inhibitor everolimus (RAD001). *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2009;41(9):697-702. doi:10.1055/s-0029-1220687.
233. Oh DY, Kim TW, Park YS, Shin SJ, Shin SH, Song EK et al. Phase 2 study of everolimus monotherapy in patients with nonfunctioning neuroendocrine tumors or pheochromocytomas/paragangliomas. *Cancer*. 2012;118(24):6162-70. doi:10.1002/cncr.27675.
234. Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Yang Y, Komatsu N, Togitani K et al. The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(10):2522-30. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0071.
235. Molina AM, Feldman DR, Voss MH, Ginsberg MS, Baum MS, Brocks DR et al. Phase 1 trial of everolimus plus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. 2012;118(7):1868-76. doi:10.1002/cncr.26429.
236. Jacques AE, Sahdev A, Sandrasagara M, Goldstein R, Berney D, Rockall AG et al. Adrenal pheochromocytoma: correlation of MRI appearances with histology and function. *Eur Radiol*. 2008;18(12):2885-92. doi:10.1007/s00330-008-1073-z.
237. Gravel G, Niccoli P, Rohmer V, Moulin G, Borson-Chazot F, Rousset P et al. The value of a rapid contrast-enhanced angio-MRI protocol in the detection of head and neck paragangliomas in SDHx mutations carriers: a retrospective study on behalf of the PGL.EVA investigators. *Eur Radiol*. 2015. doi:10.1007/s00330-015-4024-5.
238. Caoili EM, Korobkin M, Francis IR, Cohan RH, Platt JF, Dunnick NR et al. Adrenal masses: characterization with combined unenhanced and delayed enhanced CT. *Radiology*. 2002;222(3):629-33. doi:10.1148/radiol.2223010766.
239. Bravo EL, Tagle R. Pheochromocytoma: state-of-the-art and future prospects. *Endocrine reviews*. 2003;24(4):539-53. doi:10.1210/er.2002-0013.
240. Kessler RM, Ellis JR, Jr., Eden M. Analysis of emission tomographic scan data: limitations imposed by resolution and background. *Journal of computer assisted tomography*. 1984;8(3):514-22.
241. Soret M, Bacharach SL, Buvat I. Partial-volume effect in PET tumor imaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2007;48(6):932-45. doi:10.2967/jnumed.106.035774.
242. Buvat I. Understanding the limitations of SUV. *Médecine Nucléaire*. 2007:165-72. doi:10.1016/j.mednuc.2007.03.003.

243. Taieb D, Sebag F, Barlier A, Tessonnier L, Palazzo FF, Morange I et al. 18F-FDG avidity of pheochromocytomas and paragangliomas: a new molecular imaging signature? *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2009;50(5):711-7. doi:10.2967/jnumed.108.060731.
244. Timmers HJ, Kozupa A, Chen CC, Carrasquillo JA, Ling A, Eisenhofer G et al. Superiority of fluorodeoxyglucose positron emission tomography to other functional imaging techniques in the evaluation of metastatic SDHB-associated pheochromocytoma and paraganglioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(16):2262-9. doi:10.1200/JCO.2006.09.6297.
245. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
246. Timmers HJ, Chen CC, Carrasquillo JA, Whatley M, Ling A, Havekes B et al. Comparison of 18F-fluoro-L-DOPA, 18F-fluoro-deoxyglucose, and 18F-fluorodopamine PET and 123I-MIBG scintigraphy in the localization of pheochromocytoma and paraganglioma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(12):4757-67. doi:10.1210/jc.2009-1248.
247. Taieb D, Neumann H, Rubello D, Al-Nahhas A, Guillet B, Hindie E. Modern nuclear imaging for paragangliomas: beyond SPECT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2012;53(2):264-74. doi:10.2967/jnumed.111.098152.
248. King KS, Chen CC, Alexopoulos DK, Whatley MA, Reynolds JC, Patronas N et al. Functional imaging of SDHx-related head and neck paragangliomas: comparison of 18F-fluorodihydroxyphenylalanine, 18F-fluorodopamine, 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose PET, 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy, and 111In-pentetreotide scintigraphy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(9):2779-85. doi:10.1210/jc.2011-0333.
249. Treglia G, Cocciolillo F, de Waure C, Di Nardo F, Gualano MR, Castaldi P et al. Diagnostic performance of 18F-dihydroxyphenylalanine positron emission tomography in patients with paraganglioma: a meta-analysis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2012;39(7):1144-53. doi:10.1007/s00259-012-2087-y.
250. Hoegerle S, Ghanem N, Althoefer C, Schipper J, Brink I, Moser E et al. 18F-DOPA positron emission tomography for the detection of glomus tumours. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2003;30(5):689-94. doi:10.1007/s00259-003-1115-3.
251. Janssen I, Blanchet EM, Adams K, Chen CC, Millo C, Herscovitch P et al. Superiority of [68Ga]-DOTATATE PET/CT to other functional imaging modalities in the localization of SDHB-associated metastatic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2751.
252. Kroiss A, Putzer D, Frech A, Decristoforo C, Uprimny C, Gasser RW et al. A retrospective comparison between 68Ga-DOTA-TOC PET/CT and 18F-DOPA PET/CT in patients with extra-adrenal paraganglioma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2013;40(12):1800-8. doi:10.1007/s00259-013-2548-y.
253. Kroiss A, Shulkin BL, Uprimny C, Frech A, Gasser RW, Url C et al. (68)Ga-DOTATOC PET/CT provides accurate tumour extent in patients with extraadrenal paraganglioma compared to (123)I-MIBG SPECT/CT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2015;42(1):33-41. doi:10.1007/s00259-014-2892-6.
254. Naswa N, Kumar A, Sharma P, Bal C, Malhotra A, Kumar R. Imaging carotid body chemodectomas with (6)(8)Ga-DOTA-NOC PET-CT. *The British journal of radiology*. 2012;85(1016):1140-5. doi:10.1259/bjr/17448792.

255. Naswa N, Sharma P, Nazar AH, Agarwal KK, Kumar R, Ammini AC et al. Prospective evaluation of (6)(8)Ga-DOTA-NOC PET-CT in pheochromocytoma and paraganglioma: preliminary results from a single centre study. *Eur Radiol.* 2012;22(3):710-9. doi:10.1007/s00330-011-2289-x.
256. Sharma P, Thakar A, Suman KCS, Dhull VS, Singh H, Naswa N et al. 68Ga-DOTANOC PET/CT for baseline evaluation of patients with head and neck paraganglioma. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 2013;54(6):841-7. doi:10.2967/jnumed.112.115485.
257. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 1987;238(4826):491-7.
258. Haubner R, Wester HJ, Weber WA, Mang C, Ziegler SI, Goodman SL et al. Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer research.* 2001;61(5):1781-5.
259. Deshayes E, Dunet V, Rüegg C, Prior JO. Imagerie de la néoangiogenèse. *Médecine Nucléaire.* 2012;38(10):619-26.
260. Beer AJ, Haubner R, Sarbia M, Goebel M, Luderschmidt S, Grosu AL et al. Positron emission tomography using [18F]Galacto-RGD identifies the level of integrin alpha(v)beta3 expression in man. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2006;12(13):3942-9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0266.
261. Beer AJ, Grosu AL, Carlsen J, Kolk A, Sarbia M, Stangier I et al. [18F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging of alphavbeta3 expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007;13(22 Pt 1):6610-6. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0528.
262. Schnell O, Krebs B, Carlsen J, Miederer I, Goetz C, Goldbrunner RH et al. Imaging of integrin alpha(v)beta(3) expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography. *Neuro-oncology.* 2009;11(6):861-70. doi:10.1215/15228517-2009-024.
263. Beer AJ, Lorenzen S, Metz S, Herrmann K, Watzlowik P, Wester HJ et al. Comparison of integrin alphaVbeta3 expression and glucose metabolism in primary and metastatic lesions in cancer patients: a PET study using 18F-galacto-RGD and 18F-FDG. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 2008;49(1):22-9. doi:10.2967/jnumed.107.045864.
264. Dumont RA, Deininger F, Haubner R, Maecke HR, Weber WA, Fani M. Novel (64)Cu- and (68)Ga-labeled RGD conjugates show improved PET imaging of alpha(nu)beta(3) integrin expression and facile radiosynthesis. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 2011;52(8):1276-84. doi:10.2967/jnumed.111.087700.
265. Pohle K, Notni J, Bussemer J, Kessler H, Schwaiger M, Beer AJ. 68Ga-NODAGA-RGD is a suitable substitute for (18)F-Galacto-RGD and can be produced with high specific activity in a cGMP/GRP compliant automated process. *Nuclear medicine and biology.* 2012;39(6):777-84. doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.02.006.
266. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer.* 2009;45(2):228-47. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026.
267. Battle MR, Goggi JL, Allen L, Barnett J, Morrison MS. Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, an 18F-labeled alphaVbeta3-integrin and alphaV beta5-integrin imaging agent. *Journal of nuclear medicine : official*



- publication, Society of Nuclear Medicine. 2011;52(3):424-30. doi:10.2967/jnumed.110.077479.
268. Rylova SN, Barnucz E, Fani M, Braun F, Werner M, Lassmann S et al. Does imaging alphavbeta3 integrin expression with PET detect changes in angiogenesis during bevacizumab therapy? *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2014;55(11):1878-84. doi:10.2967/jnumed.114.137570.
269. Taieb D, Timmers HJ, Hindie E, Guillet BA, Neumann HP, Walz MK et al. EANM 2012 guidelines for radionuclide imaging of pheochromocytoma and paraganglioma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2012;39(12):1977-95. doi:10.1007/s00259-012-2215-8.
270. Sachpekidis C, Larribere L, Pan L, Haberkorn U, Dimitrakopoulou-Strauss A, Hassel JC. Predictive value of early 18F-FDG PET/CT studies for treatment response evaluation to ipilimumab in metastatic melanoma: preliminary results of an ongoing study. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2015;42(3):386-96. doi:10.1007/s00259-014-2944-y.
271. Yu HJ, Chen JH, Mehta RS, Nalcioğlu O, Su MY. MRI measurements of tumor size and pharmacokinetic parameters as early predictors of response in breast cancer patients undergoing neoadjuvant anthracycline chemotherapy. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2007;26(3):615-23. doi:10.1002/jmri.21060.
272. Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS et al. Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nature reviews Clinical oncology*. 2009;6(6):327-38. doi:10.1038/nrclinonc.2009.63.
273. Cuenod CA, Balvay D. Perfusion and vascular permeability: basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI. *Diagnostic and interventional imaging*. 2013;94(12):1187-204. doi:10.1016/j.diii.2013.10.010.
274. Leach MO, Brindle KM, Evelhoch JL, Griffiths JR, Horsman MR, Jackson A et al. The assessment of antiangiogenic and antivascular therapies in early-stage clinical trials using magnetic resonance imaging: issues and recommendations. *British journal of cancer*. 2005;92(9):1599-610. doi:10.1038/sj.bjc.6602550.
275. O'Connor JP, Tofts PS, Miles KA, Parkes LM, Thompson G, Jackson A. Dynamic contrast-enhanced imaging techniques: CT and MRI. *The British journal of radiology*. 2011;84 Spec No 2:S112-20. doi:10.1259/bjr/55166688.
276. O'Connor JP, Jayson GC. Do imaging biomarkers relate to outcome in patients treated with VEGF inhibitors? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(24):6588-98. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1501.
277. Jayson GC, Zweit J, Jackson A, Mulatero C, Julyan P, Ranson M et al. Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833 anti-VEGF antibody: implications for trial design of antiangiogenic antibodies. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(19):1484-93.
278. O'Connor JP, Jackson A, Parker GJ, Roberts C, Jayson GC. Dynamic contrast-enhanced MRI in clinical trials of antivascular therapies. *Nature reviews Clinical oncology*. 2012;9(3):167-77. doi:10.1038/nrclinonc.2012.2.
279. Flaherty KT, Rosen MA, Heitjan DF, Gallagher ML, Schwartz B, Schnall MD et al. Pilot study of DCE-MRI to predict progression-free survival with sorafenib therapy in renal cell carcinoma. *Cancer biology & therapy*. 2008;7(4):496-501.
280. Fournier LS, Oudard S, Thiam R, Trinquart L, Banu E, Medioni J et al. Metastatic renal carcinoma: evaluation of antiangiogenic therapy with dynamic contrast-enhanced CT. *Radiology*. 2010;256(2):511-8. doi:10.1148/radiol.10091362.

281. Hahn OM, Yang C, Medved M, Karczmar G, Kistner E, Karrison T et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging pharmacodynamic biomarker study of sorafenib in metastatic renal carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(28):4572-8. doi:10.1200/JCO.2007.15.5655.
282. Han KS, Jung DC, Choi HJ, Jeong MS, Cho KS, Joung JY et al. Pretreatment assessment of tumor enhancement on contrast-enhanced computed tomography as a potential predictor of treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma patients receiving antiangiogenic therapy. *Cancer*. 2010;116(10):2332-42. doi:10.1002/cncr.25019.
283. Hsu CY, Shen YC, Yu CW, Hsu C, Hu FC, Hsu CH et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging biomarkers predict survival and response in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib and metronomic tegafur/uracil. *Journal of hepatology*. 2011;55(4):858-65. doi:10.1016/j.jhep.2011.01.032.
284. Yopp AC, Schwartz LH, Kemeny N, Gultekin DH, Gonen M, Bamboat Z et al. Antiangiogenic therapy for primary liver cancer: correlation of changes in dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging with tissue hypoxia markers and clinical response. *Annals of surgical oncology*. 2011;18(8):2192-9. doi:10.1245/s10434-011-1570-1.
285. Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Catalano OA et al. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(18):3027-35. doi:10.1200/JCO.2008.20.9908.
286. Kreisl TN, Zhang W, Odia Y, Shih JH, Butman JA, Hammoud D et al. A phase II trial of single-agent bevacizumab in patients with recurrent anaplastic glioma. *Neuro-oncology*. 2011;13(10):1143-50. doi:10.1093/neuonc/nor091.
287. Verhoeff JJ, Lavini C, van Linde ME, Stalpers LJ, Majoie CB, Reijneveld JC et al. Bevacizumab and dose-intense temozolomide in recurrent high-grade glioma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(8):1723-7. doi:10.1093/annonc/mdp591.
288. Galban CJ, Chenevert TL, Meyer CR, Tsien C, Lawrence TS, Hamstra DA et al. The parametric response map is an imaging biomarker for early cancer treatment outcome. *Nature medicine*. 2009;15(5):572-6. doi:10.1038/nm.1919.
289. Law M, Young RJ, Babb JS, Peccerelli N, Chheang S, Gruber ML et al. Gliomas: predicting time to progression or survival with cerebral blood volume measurements at dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. *Radiology*. 2008;247(2):490-8. doi:10.1148/radiol.2472070898.
290. Harada K, Honmou O, Liu H, Bando M, Houkin K, Kocsis JD. Magnetic resonance lactate and lipid signals in rat brain after middle cerebral artery occlusion model. *Brain research*. 2007;1134(1):206-13. doi:10.1016/j.brainres.2006.11.075.
291. Henson JW, Gaviani P, Gonzalez RG. MRI in treatment of adult gliomas. *The Lancet Oncology*. 2005;6(3):167-75. doi:10.1016/S1470-2045(05)01767-5.
292. Wang W, Hu Y, Lu P, Li Y, Chen Y, Tian M et al. Evaluation of the diagnostic performance of magnetic resonance spectroscopy in brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(11):e112577. doi:10.1371/journal.pone.0112577.
293. Chen CY, Lirng JF, Chan WP, Fang CL. Proton magnetic resonance spectroscopy-guided biopsy for cerebral glial tumors. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2004;103(6):448-58.

294. Magalhaes A, Godfrey W, Shen Y, Hu J, Smith W. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors correlated with pathology. *Academic radiology*. 2005;12(1):51-7. doi:10.1016/j.acra.2004.10.057.
295. Moller-Hartmann W, Herminghaus S, Krings T, Marquardt G, Lanfermann H, Pilatus U et al. Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions. *Neuroradiology*. 2002;44(5):371-81. doi:10.1007/s00234-001-0760-0.
296. Preul MC, Caramanos Z, Collins DL, Villemure JG, Leblanc R, Olivier A et al. Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nature medicine*. 1996;2(3):323-5.
297. Hall WA, Martin AJ, Liu H, Nussbaum ES, Maxwell RE, Truwit CL. Brain biopsy using high-field strength interventional magnetic resonance imaging. *Neurosurgery*. 1999;44(4):807-13; discussion 13-4.
298. Martin AJ, Liu H, Hall WA, Truwit CL. Preliminary assessment of turbo spectroscopic imaging for targeting in brain biopsy. *AJNR American journal of neuroradiology*. 2001;22(5):959-68.
299. Kwock L, Smith JK, Castillo M, Ewend MG, Collichio F, Morris DE et al. Clinical role of proton magnetic resonance spectroscopy in oncology: brain, breast, and prostate cancer. *The Lancet Oncology*. 2006;7(10):859-68. doi:10.1016/S1470-2045(06)70905-6.
300. Sarkar BK, Chakraborty C, Sharma AR, Bae KJ, Sharma G, Doss GP et al. Novel biomarker for prostate cancer diagnosis by MRS. *Frontiers in bioscience*. 2014;19:1186-201.
301. Katz-Brull R, Lavin PT, Lenkinski RE. Clinical utility of proton magnetic resonance spectroscopy in characterizing breast lesions. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(16):1197-203.
302. Kvistad KA, Bakken IJ, Gribbestad IS, Ehrnholm B, Lundgren S, Fjosne HE et al. Characterization of neoplastic and normal human breast tissues with in vivo (1)H MR spectroscopy. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 1999;10(2):159-64.
303. Leong KM, Lau P, Ramadan S. Utilisation of MR spectroscopy and diffusion weighted imaging in predicting and monitoring of breast cancer response to chemotherapy. *Journal of medical imaging and radiation oncology*. 2015;59(3):268-77. doi:10.1111/1754-9485.12310.
304. Andronesi OC, Kim GS, Gerstner E, Batchelor T, Tzika AA, Fantin VR et al. Detection of 2-hydroxyglutarate in IDH-mutated glioma patients by in vivo spectral-editing and 2D correlation magnetic resonance spectroscopy. *Science translational medicine*. 2012;4(116):116ra4. doi:10.1126/scitranslmed.3002693.
305. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, Hatanpaa KJ, Rakheja D, Kovacs Z et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nature medicine*. 2012;18(4):624-9. doi:10.1038/nm.2682.
306. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*. 1981;27(1 Pt 2):223-31.
307. Marx JL. Building bigger mice through gene transfer. *Science*. 1982;218(4579):1298.
308. Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*. 1982;300(5893):611-5.
309. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(12):7380-4.

310. Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, Hageman JR, Huang S, Williams PJ et al. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(22):8927-31.
311. Koller BH, Smithies O. Inactivating the beta 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(22):8932-5.
312. Hamilton DL, Abremski K. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *Journal of molecular biology*. 1984;178(2):481-6.
313. Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(15):6861-5.
314. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992;356(6366):215-21. doi:10.1038/356215a0.
315. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*. 1992;359(6393):295-300. doi:10.1038/359295a0.
316. Lavigne A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Molecular and cellular biology*. 1989;9(9):3982-91.
317. Allemand I, Angulo JF. Transgenic and knock-out models for studying DNA repair. *Biochimie*. 1995;77(10):826-32.
318. Schulz N, Propst F, Rosenberg MP, Linnoila RI, Paules RS, Kovatch R et al. Pheochromocytomas and C-cell thyroid neoplasms in transgenic c-mos mice: a model for the human multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. *Cancer research*. 1992;52(2):450-5.
319. Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nature genetics*. 1994;7(3):353-61. doi:10.1038/ng0794-353.
320. Gnarr JR, Ward JM, Porter FD, Wagner JR, Devor DE, Grinberg A et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(17):9102-7.
321. Ma W, Tessarollo L, Hong SB, Baba M, Southon E, Back TC et al. Hepatic vascular tumors, angiectasis in multiple organs, and impaired spermatogenesis in mice with conditional inactivation of the VHL gene. *Cancer research*. 2003;63(17):5320-8.
322. Haase VH, Glickman JN, Socolovsky M, Jaenisch R. Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(4):1583-8. doi:10.1073/pnas.98.4.1583.
323. Piruat JI, Pintado CO, Ortega-Saenz P, Roche M, Lopez-Barneo J. The mitochondrial SDHD gene is required for early embryogenesis, and its partial deficiency results in persistent carotid body glomus cell activation with full responsiveness to hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(24):10933-40. doi:10.1128/MCB.24.24.10933-10940.2004.
324. Bayley JP, van Minderhout I, Hogendoorn PC, Cornelisse CJ, van der Wal A, Prins FA et al. Sdhd and SDHD/H19 knockout mice do not develop paraganglioma or pheochromocytoma. *PloS one*. 2009;4(11):e7987. doi:10.1371/journal.pone.0007987.



325. You MJ, Castrillon DH, Bastian BC, O'Hagan RC, Bosenberg MW, Parsons R et al. Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(3):1455-60. doi:10.1073/pnas.022632099.
326. Korpershoek E, Loonen AJ, Corvers S, van Nederveen FH, Jonkers J, Ma X et al. Conditional Pten knock-out mice: a model for metastatic pheochromocytoma. *The Journal of pathology*. 2009;217(4):597-604. doi:10.1002/path.2492.
327. Nikitin AY, Juarez-Perez MI, Li S, Huang L, Lee WH. RB-mediated suppression of spontaneous multiple neuroendocrine neoplasia and lung metastases in Rb+/- mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(7):3916-21.
328. Smith-Hicks CL, Sizer KC, Powers JF, Tischler AS, Costantini F. C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *The EMBO journal*. 2000;19(4):612-22. doi:10.1093/emboj/19.4.612.
329. Lai EW, Rodriguez OC, Aventian M, Cromelin C, Fricke ST, Martiniova L et al. ErbB-2 induces bilateral adrenal pheochromocytoma formation in mice. *Cell cycle*. 2007;6(15):1946-50.
330. Urosevic J, Sauzeau V, Soto-Montenegro ML, Reig S, Desco M, Wright EM et al. Constitutive activation of B-Raf in the mouse germ line provides a model for human cardio-facio-cutaneous syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5015-20. doi:10.1073/pnas.1016933108.
331. Puc J, Placha G, Wocial B, Podsypanina K, Parsons R, Gaciong Z. Analysis of PTEN mutation in non-familial pheochromocytoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1073:317-31.
332. van Nederveen FH, Perren A, Dannenberg H, Petri BJ, Dinjens WN, Komminoth P et al. PTEN gene loss, but not mutation, in benign and malignant pheochromocytomas. *The Journal of pathology*. 2006;209(2):274-80.
333. Riccardi VM. Von Recklinghausen neurofibromatosis. *The New England journal of medicine*. 1981;305(27):1617-27.
334. Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW et al. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev*. 1994;8(9):1019-29.
335. Benit P, El-Khoury R, Schiff M, Sainsard-Chanet A, Rustin P. Genetic background influences mitochondrial function: modeling mitochondrial disease for therapeutic development. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):210-7. doi:S1471-4914(10)00036-5 [pii] 10.1016/j.molmed.2010.03.001.
336. Tischler AS, Sheldon W, Gray R. Immunohistochemical and morphological characterization of spontaneously occurring pheochromocytomas in the aging mouse. *Veterinary pathology*. 1996;33(5):512-20.
337. Ghayee HK, Bhagwandin VJ, Stastny V, Click A, Ding LH, Mizrachi D et al. Progenitor cell line (hPheo1) derived from a human pheochromocytoma tumor. *PloS one*. 2013;8(6):e65624. doi:10.1371/journal.pone.0065624.
338. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(7):2424-8.
339. Hopewell R, Ziff EB. The nerve growth factor-responsive PC12 cell line does not express the Myc dimerization partner Max. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(7):3470-8.

340. Powers JF, Evinger MJ, Tsokas P, Bedri S, Alroy J, Shahsavari M et al. Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice. *Cell and tissue research*. 2000;302(3):309-20.
341. Tao-Cheng JH, Dosemeci A, Bressler JP, Brightman MW, Simpson DL. Characterization of synaptic vesicles and related neuronal features in nerve growth factor and ras oncogene differentiated PC12 cells. *Journal of neuroscience research*. 1995;42(3):323-34. doi:10.1002/jnr.490420306.
342. Martiniova L, Lai EW, Elkahoun AG, Abu-Asab M, Wickremasinghe A, Solis DC et al. Characterization of an animal model of aggressive metastatic pheochromocytoma linked to a specific gene signature. *Clinical & experimental metastasis*. 2009;26(3):239-50. doi:10.1007/s10585-009-9236-0.
343. Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, Zhu H et al. Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & development*. 2012;26(12):1326-38. doi:10.1101/gad.191056.112.
344. Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(2):718-31. doi:10.1128/MCB.01338-07.
345. Her YF, Nelson-Holte M, Maher LJ, 3rd. Oxygen concentration controls epigenetic effects in models of familial paraganglioma. *PloS one*. 2015;10(5):e0127471. doi:10.1371/journal.pone.0127471.
346. Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *European journal of cancer*. 2004;40(6):852-7. doi:10.1016/j.ejca.2003.11.021.
347. Cekanova M, Rathore K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug design, development and therapy*. 2014;8:1911-21. doi:10.2147/DDDT.S49584.
348. Huynh AS, Abrahams DF, Torres MS, Baldwin MK, Gillies RJ, Morse DL. Development of an orthotopic human pancreatic cancer xenograft model using ultrasound guided injection of cells. *PloS one*. 2011;6(5):e20330. doi:10.1371/journal.pone.0020330.
349. Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical pharmacology*. 2014;87(1):150-61. doi:10.1016/j.bcp.2013.06.020.
350. Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetical research*. 1966;8(3):295-309.
351. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annual review of immunology*. 1991;9:323-50. doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.001543.
352. Denorme M, Yon L, Roux C, Gonzalez BJ, Baudin E, Anouar Y et al. Both sunitinib and sorafenib are effective treatments for pheochromocytoma in a xenograft model. *Cancer letters*. 2014;352(2):236-44. doi:10.1016/j.canlet.2014.07.005.
353. Giubellino A, Woldemichael GM, Sourbier C, Lizak MJ, Powers JF, Tischler AS et al. Characterization of two mouse models of metastatic pheochromocytoma using bioluminescence imaging. *Cancer letters*. 2012;316(1):46-52. doi:10.1016/j.canlet.2011.10.019.
354. Favier J, Igaz P, Burnichon N, Amar L, Libe R, Badoual C et al. Rationale for anti-angiogenic therapy in pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Pathol*. 2012;23(1):34-42.

355. Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(13):1753-9. doi:10.1200/JCO.2006.07.3049.
356. O'Connor JP, Jackson A, Parker GJ, Jayson GC. DCE-MRI biomarkers in the clinical evaluation of antiangiogenic and vascular disrupting agents. *Br J Cancer*. 2007;96(2):189-95.
357. Weber WA. Positron emission tomography as an imaging biomarker. *J Clin Oncol*. 2006;24(20):3282-92.
358. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W. WHO classification of tumours of the central nervous system 4th ed. Lyon, France. IARC Press; 2007.
359. Pollard PJ, Briere JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Human molecular genetics*. 2005;14(15):2231-9. doi:10.1093/hmg/ddi227.
360. Rao JU, Engelke UF, Rodenburg RJ, Wevers RA, Pacak K, Eisenhofer G et al. Genotype-specific abnormalities in mitochondrial function associate with distinct profiles of energy metabolism and catecholamine content in pheochromocytoma and paraganglioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(14):3787-95. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3922.
361. Richter S, Peitzsch M, Rapizzi E, Lenders JW, Qin N, de Cubas AA et al. Krebs cycle metabolite profiling for identification and stratification of pheochromocytomas/paragangliomas due to succinate dehydrogenase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(10):3903-11. doi:10.1210/jc.2014-2151.
362. Loriot C, Domingues M, Berger A, Menara M, Ruel M, Morin A et al. Deciphering the molecular basis of invasiveness in Sdhbdeficient cells. *Oncotarget*. 2015;in press.
363. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis*. 2005;26(3):513-23. doi:10.1093/carcin/bgh261.
364. Saxena M, Christofori G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Molecular oncology*. 2013;7(2):283-96. doi:10.1016/j.molonc.2013.02.009.
365. Terme M, Tartour E, Taieb J. VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology*. 2013;2(8):e25156. doi:10.4161/onci.25156.
366. Voron T, Tartour E, Taieb J, Terme M. [Impact of VEGF-A in exhaustion of intratumoral T cells]. *Medecine sciences : M/S*. 2015;31(5):473-5. doi:10.1051/medsci/20153105004.
367. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(2):139-48. doi:10.1084/jem.20140559.
368. Lendvai N, Pawlosky R, Bullova P, Eisenhofer G, Patocs A, Veech RL et al. Succinate-to-fumarate ratio as a new metabolic marker to detect the presence of SDHB/D-related paraganglioma: initial experimental and ex vivo findings. *Endocrinology*. 2014;155(1):27-32. doi:10.1210/en.2013-1549.
369. Lepoutre-Lussey C, Thibault C, Buffet A, Morin A, Badoual C, Benit P et al. From Nf1 to Sdhb knockout: Successes and failures in the quest for animal models of

- pheochromocytoma. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015. doi:10.1016/j.mce.2015.06.027.
370. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(4):820-3.
371. Horsfall FL, Jr. *Current Concepts of Cancer*. *Canadian Medical Association journal*. 1963;89:1224-9.
372. Tischler AS, Shih TS, Williams BO, Jacks T. Characterization of Pheochromocytomas in a Mouse Strain with a Targeted Disruptive Mutation of the Neurofibromatosis Gene *Nf1*. *Endocrine pathology*. 1995;6(4):323-35.
373. Tischler A, Favier J. Models of pheochromocytoma: what's on the horizon? *Int J Endo Oncol*. 2015;2(3):171-4. doi:DOI:10.2217/IJE.15.14.
374. Liu Q, Djuricin G, Staren ED, Gattuso P, Gould VE, Shen J et al. Tumor angiogenesis in pheochromocytomas and paragangliomas. *Surgery*. 1996;120(6):938-42; discussion 42-3.
375. Rooijens PP, de Krijger RR, Bonjer HJ, van der Ham F, Nigg AL, Bruining HA et al. The significance of angiogenesis in malignant pheochromocytomas. *Endocrine pathology*. 2004;15(1):39-45.
376. Takekoshi K, Isobe K, Yashiro T, Hara H, Ishii K, Kawakami Y et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cognate receptors in human pheochromocytomas. *Life sciences*. 2004;74(7):863-71.
377. Ebos JM, Lee CR, Christensen JG, Mutsaers AJ, Kerbel RS. Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(43):17069-74. doi:10.1073/pnas.0708148104.
378. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(1):327-37.
379. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
380. Cardaci S, Zheng L, MacKay G, van den Broek NJ, MacKenzie ED, Nixon C et al. Pyruvate carboxylation enables growth of SDH-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. *Nature cell biology*. 2015. doi:10.1038/ncb3233.



# ANNEXES



## ANNEXES

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à d'autres projets, en collaboration avec des membres de notre équipe mais également avec des équipes externes.

### A. Article 4 : la voie de la pyruvate carboxylase est incontournable dans les cellules présentant un déficit en succinate déshydrogénase

Au cours des quinze dernières années, de nombreuses études ont démontré que la grande majorité des oncogènes et suppresseurs de tumeurs régulent le métabolisme cellulaire, de telle façon que les mutations de ces gènes favorisent une utilisation coordonnée des nutriments qui facilite la survie et la prolifération. La SDH est ainsi la première enzyme mitochondriale à avoir été impliquée dans une forme héréditaire de prédisposition au cancer suivie par gènes *IDH1* et *IDH2*, *FH* et tout récemment *MDH2*. L'étude de ces tumeurs a fait l'objet d'un intérêt grandissant au cours de ces dernières années car ces cellules possèdent des activités métaboliques profondément différentes de cellules issues de tissus sains. La compréhension de ces réseaux métaboliques anormaux pourrait mettre en lumière les bases biologiques de la malignité et conduire au développement de thérapies innovantes ciblant le métabolisme tumoral.

Dans cette étude, rendue possible grâce à une collaboration avec le Dr Daniel Tennant de l'université de Birmingham, nous avons utilisé une stratégie de marquage isotopique ( $^{13}C$ ) couplée à la spectrométrie de masse et à la RMN (résonance magnétique nucléaire) afin d'évaluer le destin métabolique du glucose et de la glutamine dans nos cellules ImCC *Sdhb*<sup>-/-</sup> et WT ainsi que dans des cellules de type fibroblastiques surrénaliennes (mouse adrenal fibroblast cells, MAF). Parfaitement en accord les résultats de l'équipe de Gottlieb (Glasgow), publiés quasiment au même moment [380], nous avons démontré que la perte de l'activité SDH était responsable d'un changement dans le métabolisme d'acides aminés non essentiels et notamment que la  $\beta$ -oxydation du pyruvate en oxaloacétate était primordiale, faisant de la pyruvate carboxylase une cible thérapeutique potentielle dans ces cellules.



**Article 4 :**

**Lussey-Lepoutre C\*, Hollinshead K\* et al.**

*« Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism ».*

Nature Communication, Nov 2, 2015

## Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism

Charlotte Lussey-Lepoutre<sup>1,2,3,4</sup>, Kate ER Hollinshead<sup>4,5</sup>, Christian Ludwig<sup>4,5\*</sup>, Mélanie Menara<sup>1,2,4\*</sup>, Aurélie Morin<sup>1,2</sup>, Luis-Jaime Castro-Vega<sup>1,2</sup>, Seth J Parker<sup>6</sup>, Maxime Janin<sup>2,7,8</sup>, Cosimo Martinelli<sup>1,2</sup>, Chris Ottolenghi<sup>2,7,8</sup>, Christian Metallo<sup>6</sup>, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo<sup>1,2,3</sup>, Judith Favier<sup>1,2†</sup> and Daniel A Tennant<sup>5†</sup>.

<sup>1</sup>INSERM, UMR970, Paris-Cardiovascular Research Center at HEGP, Paris, France

<sup>2</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France

<sup>3</sup>Department of Genetics, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

<sup>4</sup>These authors contributed equally to the manuscript

<sup>5</sup>Institute of Metabolism and Systems Research, University of Birmingham, Birmingham, UK

\*

<sup>6</sup>Department of Bioengineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA

<sup>7</sup>Metabolic Biochemistry, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

<sup>8</sup>INSERM, Unit 1124, Paris, France

†These authors jointly supervised the work

Correspondence: J.F. ([judith.favier@inserm.fr](mailto:judith.favier@inserm.fr)) or D.A.T. ([d.tennant@bham.ac.uk](mailto:d.tennant@bham.ac.uk))

### ABSTRACT

The tricarboxylic acid (TCA) cycle is a central metabolic pathway responsible for supplying reducing potential for oxidative phosphorylation and anabolic substrates for cell growth, repair and proliferation. As such it thought to be essential for cell proliferation and tissue homeostasis. However, since the initial report of an inactivating mutation in the TCA cycle enzyme complex, succinate dehydrogenase (SDH) in paraganglioma (PGL), it has become clear that some cells and tissues are not only able to survive with a truncated TCA cycle, but that they are also able of supporting proliferative phenotype observed in tumours. Here, we show that loss of SDH activity leads to changes in the metabolism of non-essential amino acids. In particular, we demonstrate that pyruvate carboxylase is essential to re-supply the depleted pool of aspartate in SDH-deficient cells. Our results demonstrate that the loss of SDH reduces the metabolic plasticity of cells, suggesting vulnerabilities that can be targeted therapeutically.

**B. Article 5 : Le dépistage des sujets asymptomatiques porteurs de mutation *SDHx* doit comprendre une <sup>18</sup>FDG-TEP qui ne doit pas être systématiquement renouvelée à un an**

Après la découverte des gènes *SDHx* au début des années 2000, le dépistage et la surveillance des familles de ces patients s'est rapidement posée. En 2013, les résultats d'une grande étude française multicentrique dirigée par le Pr Gimenez-Roqueplo, directrice de mon équipe d'accueil, a évalué l'intérêt des classiques scintigraphies <sup>123</sup>I-MIBG et SRS ainsi que de l'imagerie conventionnelle. Il en est ressorti un grand intérêt pour l'angio-IRM de la tête et du cou et une très médiocre sensibilité de la médecine nucléaire. La <sup>18</sup>FDG-TEP n'étant pas implémentée encore en routine au moment du lancement de cette étude (2003), elle n'a pu être évaluée.

Au cours de ma première année de thèse, en collaboration avec l'équipe du Pr Schlumberger dans le service de médecine nucléaire de l'institut Gustave Roussy et plus particulièrement sous la supervision du Dr Sophie Leboulleux, j'ai évalué cette imagerie sur une série monocentrique rétrospective de 30 sujets apparentés porteurs d'une mutation *SDHx* mais asymptomatiques. Nous avons démontré que la réalisation systématique d'une <sup>18</sup>FDG-TEP dans cette indication avait permis de dépister 5 patients atteints (2 PGL de la tête et du cou, 2 PGL abdominaux et un PCC) avec une sensibilité parfaite. En revanche, en cas de normalité de cet examen au bilan initial et en prenant en compte son caractère irradiant chez ces sujets sains prédisposés, il nous a paru inutile de le répéter de façon systématique à un an.

**Article 5 :**

**Lepoutre-Lussey C, Caramella C, Bidault F, Déandreis D, Al Ghuzlan A, Borget I, Dumont F, Hartl D, Chougnat C, Deschamps F, Lumbroso J, Guillaud-Bataille M, Schlumberger M, Baudin E et Leboulleux S.**

*« Screening in asymptomatic *SDHx* mutation carriers: Added value of <sup>18</sup>FDG-PET/CT at initial diagnosis and one-year follow-up »*

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015 May;42(6):868-76. doi: 10.1007/s00259-015-3003-z

## Screening in asymptomatic SDHx mutation carriers: added value of $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT at initial diagnosis and 1-year follow-up.

Lepoutre-Lussey C1, Caramella C, Bidault F, Déandreis D, Berdelou A, Al Ghuzlan A, Hartl D, Borget I, Gimenez-Roqueplo AP, Dumont F, Deschamps F, Nascimento C, Lumbroso J, Guillaud Bataille M, Schlumberger M, Baudin E, Leboulleux S.

### Abstract

#### PURPOSE:

Specific recommendations on screening modalities for paraganglioma (PGL) and pheochromocytoma (PCC) in asymptomatic SDHx mutation carriers (relatives) are still lacking. We evaluated the added value of  $(^{18}\text{F})\text{F}$ -FDG PET/CT in comparison with morphological imaging at initial diagnosis and 1 year of follow-up in this population.

#### METHODS:

The study included 30 consecutive relatives with a proven SDHx mutation who were investigated by  $(^{18}\text{F})\text{F}$ -FDG PET/CT, gadolinium-enhanced magnetic resonance angiography of the head and neck, thoracic/abdominal/pelvic (TAP) contrast-enhanced CT and/or TAP MRI.  $(^{123}\text{I})\text{I}$ -MIBG scintigraphy was performed in 20 subjects and somatostatin receptor scintigraphy (SRS) in 20 subjects. The gold standard was based on pathology or a composite endpoint as defined by any other positive imaging method and persistent tumour on follow-up. Images were considered as false-positive when the lesions were not detected by another imaging method or not confirmed at 1 year.

#### RESULTS:

At initial work-up, an imaging abnormality was found in eight subjects (27%). The final diagnosis was true-positive in five subjects (two with abdominal PGL, one with PCC and two with neck PGL) and false-positives in the other three subjects (detected with  $(^{18}\text{F})\text{F}$ -FDG PET/CT in two and TAP MRI in one). At 1 year, an imaging abnormality was found in three subjects of which one was an 8-mm carotid body PGL in a patient with SDHD mutation and two were considered false-positive. The tumour detection rate was 100%

for (18)F-FDG PET/CT and conventional imaging, 80% for SRS and 60% for (123)I-MIBG scintigraphy. Overall, disease was detected in 4% of the subjects at the 1-year follow-up.

**CONCLUSION:**

(18)F-FDG PET/CT demonstrated excellent sensitivity but intermediate specificity justifying combined modality imaging in these patients. Given the slow progression of the disease, if (18)F-FDG PET/CT and MRI are normal at baseline, the second imaging work-up should be delayed and an examination that does not expose the patient to radiation should be used.

**C. Article 6 : Une vision génomique des PCC/PGL**

**Castro-Vega LJ, Lepoutre-Lussey C, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J.**

*“Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective”*

Oncogene. 2015 Jun 1. doi: 10.1038/onc.2015.172.

# Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective

Luis Jaime Castro-Vega<sup>1,2</sup>, Charlotte Lepoutre-Lussey<sup>1,2</sup>, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo<sup>1,2,4</sup> and Judith Favier<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR970, Paris-Cardiovascular Research Center, F-75015, Paris, France

<sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, F-75006 Paris, France

<sup>3</sup>Department of Genetics, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, F-75015, Paris, France

\*Corresponding author: Dr Judith Favier ; e-mail: [judith.favier@inserm.fr](mailto:judith.favier@inserm.fr)

## Abstract

Pheochromocytomas (PCC) and paragangliomas (PGL) are rare neuroendocrine tumors of neural crest origin. These tumors are caused by germline or somatic mutations in known susceptibility genes in up to 70% of cases. Over the past few years, the emergence of high-throughput technologies has enabled the unprecedented characterization of genomic alterations in PCC/PGL, and has improved our understanding of the molecular mechanisms that distinguish the different tumor subtypes. Integrated genomic analyses have shown that the mutation status of PCC/PGL susceptibility genes strongly correlates with multi-omics data. These observations not only emphasize the role of the long-standing susceptibility genes as the main drivers of PCC/PGL tumorigenesis, but also illustrate the functional interdependence between genomic and epigenomic alterations. In this review, we discuss the genomic landscape underlying PCC/PGL, its functional consequences for tumorigenesis and tumor progression, and the potential clinical relevance of this knowledge for the application of precision medicine for patients with PCC/PGL.

**D. Article 7 : Altérations génomiques des PCC/PGL mises en évidence par une approche d'analyse « multi-omics »**

**Castro-Vega LJ, Letouzé E, Burnichon N, Buffet A, Disderot PH, Khalifa E, Lorient C, Elarouci N, Morin A, Ménara M, Lepoutre-Lussey C, Badoual C, Sibony M, Dousset B, Libé R, Zinzindohoue F, Plouin PF, Bertherat J, Amar L, de Reyniès A, Favier J and Gimenez-Roqueplo AP.**

*“Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas”*

Nat Commun. 2015 Jan 27; 6: 6044. doi: 10.1038/ncomms7044.



## Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas

Luis Jaime Castro-Vega<sup>1,2‡</sup>, Eric Letouzé<sup>3‡</sup>, Nelly Burnichon<sup>1,2,4‡</sup>, Alexandre Buffet<sup>1,2,4</sup>, Pierre-Hélène Disderot<sup>1,2</sup>, Emmanuel Khalifa<sup>1,2,4</sup>, Céline Loriot<sup>1,2</sup>, Nabila Elarouci<sup>3</sup>, Aurélie Morin<sup>1,2</sup>, Mélanie Menara<sup>1,2</sup>, Charlotte Lepoutre-Lussey<sup>1,2,13</sup>, Cécile Badoual<sup>1,2,5</sup>, Mathilde Sibony<sup>2,6</sup>, Bertrand Dousset<sup>2,7-9</sup>, Rossella Libé<sup>2,8-11</sup>, Franck Zinzindohoue<sup>2,12</sup>, Pierre-François Plouin<sup>1,2,11,13</sup>, Jérôme Bertherat<sup>2,8-11</sup>, Laurence Amar<sup>1,2,13</sup>, Aurélien de Reyniès<sup>3</sup>, Judith Favier<sup>1,2§</sup> and Anne-Paule Gimenez-Roqueplo<sup>1,2,4,11§\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR970, Paris-Cardiovascular Research Center, F-75015, Paris, France

<sup>2</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France

<sup>3</sup>Programme Cartes d'Identité des Tumeurs, Ligue Nationale Contre Le Cancer, 75013 Paris, France

<sup>4</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Genetics, F-75015, Paris, France

<sup>5</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Pathology, F-75015, Paris, France

<sup>6</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Pathology, F-75006, Paris, France

<sup>7</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Digestive and Endocrine Surgery, F-75006, Paris, France

<sup>8</sup>INSERM, U1016, Institut Cochin, F-75006, Paris, France

<sup>9</sup>CNRS UMR8104, F-75006, Paris, France

<sup>10</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Endocrinology, F-75006, Paris, France

<sup>11</sup>Rare Adrenal Cancer Network COMETE, F-75006, Paris, France

<sup>12</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Surgery, F-75015, Paris, France

<sup>13</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Hypertension unit, F-75015, Paris, France

‡These authors contributed equally to this work

§These authors jointly directed this work

### Abstract

Pheochromocytomas and paragangliomas (PCC/PGL) are neural crest derived tumors with a very strong genetic component. Here, we report the first integrated genomic examination of a large collection of PCC/PGL. SNP array analysis reveals distinct copy-number patterns associated with genetic background. Whole-exome sequencing shows a low mutation rate of 0.3 mutations per megabase, with few recurrent somatic mutations in genes not previously associated with PCC/PGL. DNA methylation arrays and miRNA sequencing identify DNA methylation changes and miRNA expression clusters strongly associated with mRNA expression profiling. Overexpression of the miRNA cluster 182/96/183 is specific in *SDHB*-mutated tumors and induced invasive traits, whereas silencing of the imprinted *DLK1-MEG3* miRNA cluster appears as a potential driver in a subgroup of sporadic tumors. Altogether, the complete genomic landscape of PCC/PGL is mainly driven by distinct germline and/or somatic mutations in susceptibility genes and reveals different molecular entities, characterized by a set of unique genomic alterations.

**E. Article 8 : l'architecture vasculaire facteur de risque de malignité des  
PCC/PGL**

**Oudijk L, van Nederveen F, Badoual C, Tissier F, Tischler AS; Smid M, Gaal J, Lepoutre-Lussey C, Gimenez-Roqueplo AP, Dinjens W.N.M., Korpershoek E, de Krijger R and Favier J.**

*“Vascular Pattern Analysis for the Prediction of Clinical Behaviour in Pheochromocytomas and Paragangliomas”*

PLoS One. 2015 Mar 20;10(3):e0121361. doi: 10.1371/journal.pone.0121361.

## Vascular Pattern Analysis for the Prediction of Clinical Behaviour in Pheochromocytomas and Paragangliomas

Lindsey Oudijk<sup>1</sup>, \*Francien van Nederveen<sup>2</sup>, \*Cécile Badoual<sup>3,4</sup>, \*Frédérique Tissier<sup>5,6</sup>, \*Arthur S. Tischler<sup>7</sup>, Marcel Smid<sup>8</sup>, José Gaal<sup>1</sup>, Charlotte Lepoutre-Lussey<sup>3,9</sup>, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo<sup>3,9,10</sup>, Winand N.M. Dinjens<sup>1</sup>, Esther Korpershoek<sup>1</sup>, #Ronald de Krijger<sup>1,11</sup> and #Judith Favier<sup>3,9</sup>

1- Department of Pathology, Erasmus MC Cancer Institute, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, the Netherlands

2- Laboratory for Pathology, PAL Dordrecht, Dordrecht, the Netherlands

3- Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France

4- Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Département d'anatomo-pathologie, F-75015 Paris, France

5- Department of Pathology, Pitié-Salpêtrière Hospital, AP-HP, Pierre and Marie Curie University, Sorbonne Universities, Paris, France

6- INSERM U1016 CNRS UMR8104, Institut Cochin, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, France

7- Department of Pathology, Tufts University School of Medicine & Tufts Medical Center, Boston, Massachusetts, USA

8- Department of Medical Oncology, Erasmus MC Cancer Institute, Cancer Genomics Netherlands, Rotterdam, The Netherlands

9- INSERM, UMR970, Paris Cardiovascular Research Center, F-75015 Paris, France

10- Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, F-75015 Paris, France

11- Department of Pathology, Reinier de Graaf Hospital, Delft, the Netherlands

\* The authors contributed equally to the work

# Both authors should be considered as co-last authors

Corresponding author: Dr. Judith Favier, [judith.favier@inserm.fr](mailto:judith.favier@inserm.fr)

### Abstract

Pheochromocytomas (PCCs) are neuroendocrine tumors arising from chromaffin cells of the adrenal medulla. Related tumors that arise from the paraganglia outside the adrenal medulla are called paragangliomas (PGLs). PCC/PGLs are usually benign, but approximately 17% of these tumors are malignant, as defined by the development of metastases. Currently, there are no generally accepted markers for identifying a primary PCC or PGL as malignant. In 2002, Favier et al. described the use of vascular architecture for the distinction between benign and malignant primary PCC/PGLs. The aim of this study was to validate the use of vascular pattern analysis as a test for malignancy in a large series of primary PCC/PGLs.

Six independent observers scored a series of 184 genetically well-characterized PCCs and PGLs for the CD34 immunolabeled vascular pattern and these findings were correlated to the clinical outcome. Tumors were scored as malignant if an irregular vascular pattern was observed, including vascular arcs, parallels and networks, while tumors with a regular pattern of short straight capillaries were scored as benign. Mean sensitivity and specificity of vascular architecture, as a predictor of malignancy was 59.7% and 72.9%, respectively. There was significant agreement between the 6 observers (mean  $\kappa=0.796$ ). Mean sensitivity of vascular pattern analysis was higher in tumors >5 cm (63.2%) and in genotype cluster 2 tumors (100%).

In conclusion, vascular pattern analysis cannot be used in a stand-alone manner as a prognostic tool for the distinction between benign and malignant PCC, but could be used as an indicator of malignancy and might be a useful tool in combination with other morphological characteristics.

**F. Article 9: intérêt de l'immunohistochimie SDHD pour la validation des mutations SDHx dans les PCC/PGL**

**Menara M, Oudjik L, Badoual C, Bertherat J, Lepoutre-Lussey C, Amar L, Iturrioz X, Sibony S, Zinzindohoué F, de Krijger R, Gimenez-Roqueplo AP\* and Favier J\*.**

*"SDHD immunohistochemistry: A new tool to validate SDHx mutations in pheochromocytoma/paraganglioma"*

J Clin Endocrinol Metab 2014 Nov 18:jc20141870.

## SDHD immunohistochemistry: A new tool to validate *SDHx* mutations in pheochromocytoma/paraganglioma

Mélanie Menara<sup>1,2</sup>, Lindsey Oudjik<sup>3</sup>, Cécile Badoual<sup>1,2,4</sup>, Jérôme Bertherat<sup>2,5,6,7</sup>, Charlotte Lepoutre-Lussey<sup>1,2</sup>, Laurence Amar<sup>1,2,8</sup>, Xavier Iturrioz<sup>9,10,11</sup>, Mathilde Sibony<sup>2,11,12</sup>, Frank Zinzindohoué<sup>13</sup>, Ronald de Krijger<sup>3</sup>, Anne-Paule Gimenez-Roqueplo<sup>1,2,7,14\*</sup>, Judith Favier<sup>1,2\*</sup>

1. INSERM, UMR U970, Paris Cardiovascular Research Center-PARCC, F-75015 Paris, France
  2. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, F-75006 Paris, France
  3. Department of Pathology, Erasmus MC Cancer Institute, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, the Netherlands
  4. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Département d'anatomo-pathologie, F-75015 Paris, France
  5. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Centre de Référence Maladies Rares de la Surrénale, Service des Maladies Endocriniennes et Métaboliques, F-75014 Paris, France
  6. INSERM, U1016, CNRS UMR8104, Département d'Endocrinologie, Métabolisme & Cancer, Institut Cochin, F-75014 Paris, France
  7. Rare Adrenal Cancer Network-Cortico Médullosurrénale Tumeur Endocrine, Institut National du Cancer, F-75014 Paris, France
  8. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Hypertension Artérielle, F-75015 Paris, France
  9. Collège de France, Centre interdisciplinaire de Recherche en Biologie, F-75005 Paris, France
  10. INSERM U1050, F-75005 Paris, France
  11. CNRS UMR7241, F-75005 Paris, France
  12. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Service d'anatomie-pathologie, F-75014 Paris, France
  13. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Chirurgie digestive, F-75015 Paris, France
  14. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, F-75015 Paris, France
- AP.GR and J.F contributed equally to this work  
Corresponding author: Dr. Judith Favier, [judith.favier@inserm.fr](mailto:judith.favier@inserm.fr)

### ABSTRACT

**Context:** Pheochromocytomas (PCC) and paragangliomas (PGL) may be caused by a germline mutation in 12 different predisposing genes. We previously reported that immunohistochemistry is a useful approach to detect patients harboring *SDHx* mutations. SDHA immunostaining is negative in *SDHA*-mutated tumors only, while SDHB immunostaining is negative in samples mutated on all *SDHx* genes. In some cases of *SDHD* or *SDHC*-mutated tumors, a weak diffuse SDHB labeling has however been described.

**Objective:** Here, we addressed whether the same procedure could be applicable to detect patients with germline *SDHD* mutations, by testing two new commercially available anti-SDHD antibodies.

**Design and Methods:** We performed a retrospective study on 170 PGL/PCC in which we investigated SDHD and SDHB expression by immunohistochemistry.

**Results:** *SDHx*-mutated PGL/PCC showed a completely negative SDHB staining (23/27) or a weak cytoplasmic background (4/27). Unexpectedly, we observed that SDHD immunohistochemistry was positive in *SDHx*-deficient tumors and negative in the other samples. Twenty-six of 27 *SDHx* tumors (including the 4 weakly stained for SDHB) were positive for SDHD. Among non-*SDHx* tumors, 138/143 were positive for SDHB and negative for SDHD. Five cases showed a negative immunostaining for SDHB but were negative for SDHD.

**Conclusion:** Our results demonstrate that a positive SDHD immunostaining predicts the presence of an *SDHx* gene mutation. Because SDHB negative immunostaining is sometimes difficult to interpret in case of background, the addition of SDHD positive immunohistochemistry will be a very useful tool to predict or validate *SDHx* genes variants in PGL/PCC.