



**HAL**  
open science

# Impact des mutations SDH sur la réponse antitumorale et identification de nouveaux biomarqueurs

Constance Lamy

► **To cite this version:**

Constance Lamy. Impact des mutations SDH sur la réponse antitumorale et identification de nouveaux biomarqueurs. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ023 . tel-03419851v1

**HAL Id: tel-03419851**

**<https://theses.hal.science/tel-03419851v1>**

Submitted on 8 Nov 2021 (v1), last revised 17 Nov 2021 (v2)

**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.



IMPACT DES MUTATIONS *SDH* SUR LA  
REPONSE ANTITUMORALE ET IDENTIFICATION  
DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS  
*Impact of SDH mutations on antitumoral response and  
identification of new biomarkers*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n° 569,  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat: Sciences pharmacologiques  
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Inserm, Radiothérapie  
Moléculaire et Innovation Thérapeutique, 94800, Villejuif, France  
Réfèrent : Faculté de Pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,  
le 25 juin 2021, par**

**Constance LAMY**

**Composition du Jury**

**Jean-Yves SCOAZEC**

PU-PH, Université Paris Saclay

Président

**David TAÏEB**

PU-PH, Université d'Aix Marseille

Rapporteur & Examineur

**Jean-Emmanuel SARRY**

DR2, Université de Toulouse 3

Rapporteur & Examineur

**Karine ANDRÉAU**

MCU, Université de Paris

Examinatrice

**Direction de la thèse**

**Angelo PACI**

PU-PH, Université Paris Saclay

Directeur de thèse

**Sophie BROUTIN**

PharmD-PhD, Université Paris Saclay

Co-encadrante

**Éric BAUDIN**

PH, Gustave Roussy

Membre invité

**Julien HADOUX**

PH, Gustave Roussy

Membre invité

*À Charlotte C. & Jean D-S.,  
les deux étoiles qui m'ont donné la force d'accomplir ce travail*

# REMERCIEMENTS

---

**A Monsieur le Professeur Jean-Yves Scoazec,**

Je tenais à vous remercier d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. C'est un véritable honneur de pouvoir bénéficier de votre expertise sur les paragangliomes à travers ce travail de thèse.

**A Monsieur le Professeur David Taïeb,**

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de m'avoir également accompagnée durant ces 4 années de thèse. Vos conseils et votre écoute ont été un véritable atout dans l'accomplissement de ce projet doctoral. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

**A Monsieur le Docteur Jean-Emmanuel Sarry,**

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je suis très honorée de pouvoir bénéficier de votre expertise pour juger mon projet de thèse et du temps que vous avez accordé à ce dernier.

**A Madame le Docteur Karine Andréau**

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je vous suis très reconnaissante pour votre disponibilité et honorée de bénéficier de votre expertise pour juger ce travail.

**A Messieurs les Docteurs Eric Baudin et Julien Hadoux,**

Je tenais à vous remercier sincèrement d'avoir une nouvelle fois accepté de participer à mon jury de thèse. Je suis extrêmement reconnaissante de la confiance que vous m'avez accordée durant ces 4 années, d'avoir maintenu un échange régulier pour faire avancer nos différents projets. Travailler main dans la main avec votre expertise clinique et la recherche préclinique a été un réel plaisir et a confirmé mon envie de faire avancer la recherche sur les paragangliomes.

**A Monsieur le Professeur Angelo Paci,**

Je voudrais te remercier de m'avoir accueillie dans ton équipe en Master 2 puis en thèse et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet de thèse si passionnant. Je te remercie d'avoir participé à cet encadrement de thèse en me transmettant tes connaissances en pharmacologie et chimie analytique et en m'intégrant pleinement à ton service. Je te suis reconnaissante de m'avoir accompagnée dans l'accomplissement de ce travail.

**A Madame le Docteur Sophie Broutin,**

Je voudrais sincèrement te remercier d'avoir accepté de m'encadrer tout d'abord en Master 2 puis en thèse. Je suis extrêmement reconnaissante de l'implication que tu as pu avoir durant toutes ces années, aussi bien sur le plan scientifique qu'humain. C'est avec un peu de nostalgie que je termine cette thèse sous ton encadrement mais je n'oublierai pas tous les moments que nous avons pu partager pour faire avancer ce projet : de son élaboration jusqu'aux présentations en congrès et à la correction de ce manuscrit, un réel aboutissement ! Je voulais surtout te remercier de m'avoir laissé cette autonomie dont j'avais besoin tout en étant présente pour me guider sur le bon chemin. En espérant que notre collaboration s'étendra à de nouveaux projets dans le futur !

*Ce travail de thèse a été une expérience riche sur le plan scientifique et humain. Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et le soutien des personnes croisées durant ces années.*

En particulier je tenais à remercier,

Le **Dr Lluis Mir**, le **Dr Jean-Luc Perfettini** et le **Pr Eric Deutsch** de m'avoir accueillie au sein de leurs unités recherche et équipes. Je tenais à remercier tous les membres passés et présents de ces unités que j'ai cotoyés au quotidien ainsi que les stagiaires que j'ai pu encadrer. Vous m'avez toujours apporté soutien et bonne humeur. Un vrai bonheur de pouvoir travailler dans ces conditions. Un grand merci à **Awatef**, **Ali** et **Lucas** pour votre présence ces derniers mois. J'espère que l'on pourra prolonger nos pauses café !

Le service de pharmacologie avec qui j'ai pu passer de longues heures autour de la LC-MS/MS. Je voulais vous remercier pour votre bonne humeur et votre soutien : **Lionel**, **Clémence**, **Cynthia**, **David**, **Louis**, **Julia**, **Atmane** et **Vianney**...

Le comité 070 et plus précisément, Les Dr **Abir Alghuzlan**, **Hubert Tissot**, **Sophie Leboulleux** et **Matthieu Faron** ainsi que tous les **patients** qui ont accepté de participer à cette étude. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre investissement dans ce travail qui je l'espère sera couronné de réussite et pourra bénéficier aux patients.

Le service de biochimie et plus précisément le Dr **Caroline Pradon** ainsi que **Nicolas** et **Cédric** pour votre patience et surtout votre disponibilité pour constituer notre banque de sérums.

Le service de cytogénétique et plus précisément le Dr **Sophie Cotteret**, pour son aide à la réalisation des caryotypes et ses conseils pour l'analyse.

Les plateformes de l'Institut Gustave Roussy : **UMS Ammica**, **PFIC** et la **plateforme de métabolomique**. Je tenais à vous remercier pour votre aide dans ce travail. Plus particulièrement, un grand merci à **Sylvère Durand** pour les heures passées à la réalisation de ces deux grosses études de métabolomique. Ta gentillesse et ton écoute ont été précieuses pour l'accomplissement de ce travail.

J'ai également eu la chance de croiser le chemin de personnes qui sont devenues à ce jour de véritables amis : **Charlotte Canet-Jourdan**, je te remercie pour ton écoute et tes conseils toujours avisés. Je te remercie de m'avoir motivée et remonté le moral dans les moments les plus difficiles. **Laetitia Nebot-Bral**, ta bonne humeur que l'on n'a plus besoin de rappeler. Je te remercie pour ton écoute et tes encouragements, je n'oublierai pas nos jeudis avec Charlotte et Amaury, essentiels pour la réussite de nos thèses !

**Marco Bruschi** et **Manon Lancien**, les petits nouveaux avec lesquels j'ai fait ma rentrée dans l'unité 8203. Nos cafés à se raconter nos vies, les longues heures passées en culture cellulaire et nos barbecues ont été des moments importants pour supporter la pression que peut engendrer une thèse. J'ai eu beaucoup de chance de pouvoir compter sur vous deux et de vous compter parmi mes amis.

**Marion Barthé**, toi que je connais depuis la licence, je suis fière de voir le chemin que l'on a parcouru ensemble et surtout de ce prix poster partagé ! Je voulais te remercier sincèrement pour ton aide et ton soutien apportés durant cette thèse qui n'a fait que souder notre amitié.

A mes amis de longue date : **Nj**, **Stella**, **Arnaud**, **Cécile**, **Arthur**, **Paul-poule**, **Paloma** et **Charlotte**... Je tenais à vous remercier pour votre soutien quotidien, d'avoir fait semblant de comprendre ce que je faisais mais surtout me rappeler que vous étiez fiers de mon parcours. Merci de m'avoir remonté le moral avec les bons apéros du Sud-Ouest que j'aime tant. Vous êtes la preuve que l'on peut accomplir de grandes choses tout en restant soi-même.

A ma famille,

**papa** et **maman**, je n'ai pas assez de mots pour vous remercier de m'avoir accompagnée toutes ces années et surtout de m'avoir répété que vous étiez fiers de moi. Cette réussite, je vous la dois en partie.

A ma sœur, **Héloïse**, qui ne sait probablement toujours pas sur quel cancer je travaille (ça rentrera un jour !) mais qui a toujours été sensible à cette expérience et qui m'a toujours apporté son soutien.

A mon frère, **Thibault**, avec qui j'ai eu la chance et le plaisir de partager notre passion pour la recherche et la science de manière générale. L'accomplissement de ce travail est également un flambeau que je te tends pour la réussite de tes études.

A **Tas** et **tonton Bru**, vous qui m'avez ouvert la voie du monde médical. Je vous remercie pour votre soutien sans faille et votre fierté que vous avez si souvent partagée pour la réussite de cette thèse.

A **Mehdi**, mon grand-frère de cœur et partenaire de sparing, je voulais te remercier d'avoir corrigé mon anglais, d'avoir été présent toutes ces longues années. C'est grâce à tes conseils que j'ai pu soulever des montagnes, alors un grand merci.

A **Hadi** et **Grany**, je tenais à vous remercier de me rappeler que « *le travail, c'est la santé* » et donc de rendre ces longues heures passées au labo moins pénibles. Grany, je te suis extrêmement reconnaissante d'avoir corrigé ce travail de thèse et de t'y être intéressée. Je te dois une partie de cette réussite.

A **Amaury**, mon binôme de paillasse et de vie. Je pense que je n'aurai jamais suffisamment de mots pour te remercier de m'avoir soutenue durant toutes ces années. Tu n'as jamais hésité à m'épauler sur une manip même si elle tombait un dimanche ou alors à m'encourager ces dernières semaines d'écriture. Pouvoir échanger sur nos projets de thèse qui sont très proches, m'a permis d'apprendre énormément de choses et a contribué à la réussite de mes projets. Je voudrais vraiment te remercier d'avoir été extrêmement fier de mes petites réussites dans cette aventure qu'est la thèse, et je te donne rendez-vous dans un an pour célébrer la réussite de la tienne !

# SOMMAIRE

---

SOMMAIRE.....	1
ABRÉVIATIONS.....	3
LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX.....	7
AVANT-PROPOS .....	8
1. INTRODUCTION.....	9
1.1. MÉTABOLISME ET CANCERS.....	10
1.1.1. Généralités sur les cancers .....	10
1.1.2. Le métabolisme énergétique cellulaire.....	13
1.1.2.1. La glycolyse.....	14
1.1.2.2. Le cycle de Krebs.....	16
1.1.2.3. La chaîne de transport des électrons et la phosphorylation oxydative.....	17
1.1.3. Altérations métaboliques et cancers.....	18
1.1.3.1. Absorption dérégulée du glucose et des acides aminés .....	18
1.1.3.2. Utilisation de modes opportunistes d'acquisition des nutriments .....	20
1.1.3.3. La demande accrue d'azote .....	21
1.1.3.4. Interactions métaboliques avec l'environnement.....	22
1.1.3.5. Utilisation de la glycolyse et des intermédiaires du cycle de Krebs pour la production de NADPH24	
1.1.3.6. Mutations des enzymes du cycle de Krebs et tumorigenèse .....	26
1.1.4. La Succinate déshydrogénase (SDH).....	27
1.1.4.1. Structure et fonctions.....	27
1.1.4.2. Rôle du succinate .....	29
1.1.4.3. Anomalie de la SDH.....	31
1.1.4.4. Cas particulier des cancers.....	32
1.2. FOCUS SUR LES PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES (PPGL).....	33
1.2.1. Définition.....	33
1.2.2. Physiopathologie.....	34
1.2.2.1. Origine embryonnaire .....	34
1.2.2.2. Localisation et sécrétions hormonales .....	35
1.2.3. Classification moléculaire .....	37
1.2.3.1. Le cluster « pseudohypoxique ».....	38
1.2.3.2. Le cluster « signalisation Wnt ».....	40
1.2.3.3. Le cluster « signalisation des kinases ».....	40
1.2.3.4. Les nouveaux gènes de susceptibilité.....	41
1.2.4. Diagnostic de la maladie.....	43
1.2.4.1. Manifestations cliniques.....	43
1.2.4.2. Imageries.....	43
1.2.4.3. Les marqueurs biologiques.....	46
1.2.5. Diagnostic des mutations SDH .....	51
1.2.5.1. L'immunohistochimie.....	51
1.2.5.2. Le génotypage par NGS .....	52
1.2.5.3. Émergence d'une nouvelle approche .....	53
1.2.6. Prise en charge des PPGL.....	54
1.2.6.1. Les traitements de référence.....	54
1.2.6.2. Les traitements innovants .....	55
2. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE .....	57

<b>3.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>60</b>
3.1.	<i>ÉTABLISSEMENT DES 2 PREMIERS MODÈLES CELLULAIRES DE PHÉOCHROMOCYTOME HUMAIN SDHB INVALIDÉ DE FAÇON STABLE.....</i>	61
3.1.1.	Introduction.....	61
3.1.1.1.	Les modèles précliniques de PPGL.....	61
3.1.1.2.	Focus sur la technologie du CRISPR-Cas9.....	68
3.1.2.	Article 1: « Establishment of the first stable invalidated <i>SDHB</i> <sup>+/−</sup> human pheochromocytoma cell lines ».....	70
3.1.3.	Discussion de l'article et conclusions.....	71
3.2.	<i>ÉVALUATION DE NOUVELLES THÉRAPIES DANS LES PPGL SDH MUTÉ.....</i>	74
3.2.1.	Principales cibles thérapeutiques.....	74
3.2.1.1.	L'hypoxie.....	75
3.2.1.2.	L'hyperméthylation de l'ADN et des histones.....	75
3.2.1.3.	Les mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN.....	76
3.2.1.4.	Places des combinaisons de traitements.....	77
3.2.2.	Évaluation préclinique de la combinaison Témazolomide/inhibiteurs de PARP et impact de l'inactivation du gène <i>SDHB</i> .....	78
3.2.2.1.	Matériels et méthodes.....	78
3.2.2.2.	Résultats.....	80
3.2.2.3.	Discussion et perspectives.....	85
3.3.	<i>LE SUCCINATE : UN NOUVEAU BIOMARQUEUR DANS LE DIAGNOSTIC MUTATIONNEL ET LE SUIVI DES PATIENTS PPGL SDHB MUTÉ.....</i>	87
3.3.1.	Introduction.....	87
3.3.1.1.	Place des biomarqueurs en cancérologie.....	87
3.3.1.2.	Intérêt du succinate comme biomarqueur chez les porteurs de mutations <i>SDHB</i> .....	89
3.3.2.	Développement et validation analytique d'une méthode de dosage du succinate par UPLC-MS/MS....	90
3.3.2.1.	<b>Article 2:</b> «Quantification of accumulated succinic acid, linked to Succinate Dehydrogenase (SDH) loss-of-function mutations, by a fully validated liquid tandem mass spectrometry method suitable for preclinical and clinical applications ».....	91
3.3.2.2.	Discussion de l'article et conclusions.....	92
3.3.3.	Évaluation de l'utilité clinique du succinate sérique comme biomarqueur chez les patients atteints d'un PPGL <i>SDHB</i> muté et leurs apparentés sains.....	93
3.3.3.1.	<b>Article 3:</b> « Succinate: a serum biomarker of <i>SDHB</i> mutated paragangliomas and pheochromocytomas ».....	94
3.3.3.2.	Discussion de l'article et conclusions.....	95
3.4.	<i>ÉTUDE DE MÉTABOLOMIQUE ET DÉCOUVERTE DE NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES.....</i>	97
3.4.1.	Introduction.....	97
3.4.2.	Perte d'expression de <i>BCAT1</i> dans les PPGL <i>SDHB</i> muté : identification de nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques potentiels.....	100
3.4.2.1.	Matériels et méthodes.....	101
3.4.2.2.	Résultats.....	103
3.4.3.	Discussion et perspectives.....	106
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>108</b>
<b>5.</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>119</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>124</b>



# ABRÉVIATIONS

---

## Chiffres et symboles

**$\alpha$ KG** :  $\alpha$ -Kétoglutarate

**$\alpha$ KGDH** :  $\alpha$ -Kétoglutarate  
déshydrogénase

**$\alpha$ KIC** :  $\alpha$ -Kétoisocaproate

**$\alpha$ KIV** :  $\alpha$ -Kétoisovalérate

**$\alpha$ KMV** :  $\alpha$ -Kéto- $\beta$ -méthylvalérate

**2-HG** : 2-Hydroxyglutarate

## A

**ACLY** : ATP citrate lyase

**ACO** : Aconitase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AhR** : Récepteur arylhydrocarboné

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATP** : Adénosine triphosphate

## B

**BAM** : Biocompatible anchor for a  
membrane

**BCAA** : Branched-chain amino acid

**BCAT1** : Branched-chain  
aminotransferase 1

**BCAT2** : Branched-chain  
aminotransferase 2

**BCKA** : Branched-chain  $\alpha$ -keto acid

**BCKDH** : Branched-chain  $\alpha$ -keto acid  
dehydrogenase complex

## C

**CAD** : Carbamoyl-phosphate synthétase

**CAIX** : Anhydrase carbonique de type IX

**CgA** : Chromogranine A

**c-MET** : Protéine tyrosine kinase MET

**CMTF** : Carcinome médullaire de la  
thyroïde familial

**COMT** : Catéchol-O-méthyltransférase

**CRP** : Protéine C réactive

**CS** : Citrate synthase

**CT** : Computed tomography

## D

**DBH** : Dopamine- $\beta$ -hydroxylase

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DNMT** : DNA methyltransferase

**DOPA** : Dihydroxyphénylalanine

**DTPA** : Diéthylènetriaminepentaacétique

## E

**EGF** : Epidermal growth factor

**EGFR** : Epidermal growth factor receptor

**EMA** : European medicines agency

**EMT** : Epithelial mesenchymal transition

**EPO** : Érythropoïétine

## F

**FAD/FADH2** : Flavine adénine dinucleotide

**FDA** : Food and drug administration

**FH** : Fumarate hydratase

## G

**GAPDH** : Glyceraldehyde-3-phosphate  
déshydrogénase

**GC-MS/MS** : Chromatographie gazeuse couplée à la  
spectrométrie de masse en tandem

**GLDH** : Glutamate déshydrogénase

**GTP** : Guanine triphosphate

**GTPase** : Guanosine triphosphatase

## H

**hbFGF** : Human basic fibroblast growth factor  
**HDAC** : Histone déacétylase  
**HDR** : Homology Directed Repair  
**HGF** : Hepatocyte growth factor  
**HIF2 $\alpha$**  : Hypoxia inducible factor de type 2 $\alpha$   
**HK** : Hexokinase  
**HNK-1** : Human natural killer de type 1  
**HRR** : Homologous recombination repair  
**hTERT** : Human telomerase reverse transcriptase

## I

**IC** : Index de combinaison  
**IDH** : Isocitrate déshydrogénase  
**IDO1** : Indoleamine-2, 3-dioxygénase  
**IHC** : Immunohistochimie  
**IL1 $\beta$**  : Interleukine 1  $\beta$   
**IL10** : Interleukine 10  
**IRM** : Imagerie par résonance magnétique  
**ITK** : Inhibiteur tyrosine kinase  
**ITS** : Insulin transferring selenium

## J

**JmjC** : Jumonji C  
**JMJD2** : Jumonji Domain 2

## K

**KDM** : Lysine déméthylase

## L

**L-DOPA** : L-dihydroxyphényléthylamine  
**LC-ECD** : Chromatographie liquide couplée à la détection électrochimique  
**LC-MS/MS** : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

**LHCCR** : Léiomyomatose héréditaire et cancer des cellules rénales

**LIF** : Leukemia inhibitory factor

**LPL** : Lysophospholipide

## M

**MAO** : Monoamine oxydase  
**MAPK** : Mitogen-activated protein kinases  
**MBL** : Mannan-binding lectin  
**MCT1** : Transporteur monocarboxylate  
**MDH** : Malate déshydrogénase  
**MGMT** : 6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase  
**MIBG** : Méta-iodobenzylguanidine  
**MMP** : Métalloprotéinase matricielle  
**MRS** : Magnetic resonance spectroscopy  
**mTOR** : Mechanistic target of rapamycin

## N

**NAD/NADH** : Nicotinamide adénine dinucleotide  
**NAMPT** : Nicotinamide phosphoribosyltransférase  
**NEM2** : Néoplasie endocrinienne multiple de type 2  
**NF1** : Neurofibromatose de type 1  
**NGF** : Nerve growth factor  
**NGS** : Next-generation sequencing  
**NHEJ** : Non homologous end joining  
**NIH** : National institutes of health  
**NK** : Natural killer  
**NSE** : Neuron-specific enolase  
**NSG** : NOD-scid gamma

## O

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

## P

**PAH** : Phénylalanine hydroxylase  
**PAM** : Protospacer adjacent motif  
**PARP** : Poly(ADP-ribose) polymerase  
**PASS** : Pheochromocytoma of adrenal gland scaled score  
**PC** : Pyruvate carboxylase  
**PD** : Progression disease  
**PDH** : Pyruvate déshydrogénase  
**PDX** : Patient derived xenograft  
**PFK** : Phosphofructokinase  
**PGI** : Phosphoglucose isomérase  
**PGK** : Phosphoglycerate kinase  
**PGM** : Phosphoglycerate mutase  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase  
**PK** : Pyruvate kinase  
**PHD** : Prolyl hydroxylase domain  
**PNMT** : Phényléthanolamine *N*-méthyltransférase  
**PPGL** : Phéochromocytome et paragangliome

## R

**RC** : Réponse complète  
**RECIST** : Response evaluation criteria in solid tumor  
**RMS** : Spectroscopie par résonance magnétique  
**ROS** : Reactive oxygen species  
**RP** : Réponse partielle

## S

**SD** : Stable disease  
**SDH** : Succinate déshydrogénase  
**shARN** : Short hairpin ARN  
**siARN** : Small interfering ARN  
**SSA** : Somatostatin analogue

**SSTR** : Somatostatin receptor  
**Succinyl-CoA** : Succinyl-Coenzyme A  
**SUCLG** : Succinyl-CoA synthetase  
**SUVmax** : Standardized uptake value

## T

**TALEN** : Transcription activator-like effector nuclease  
**TCGA** : The cancer genome atlas  
**TDO2** : Tryptophane-2, 3-dioxygénase  
**TET** : Ten eleven translocation  
**TH** : Tyrosine hydroxylase  
**TLG** : Tumor lesion glycolysis  
**TLR** : Toll-liked receptors  
**TMTV** : Total metabolic tumor volume  
**TNE** : Tumeur neuroendocrinne  
**TPI** : Triosephosphate isomerase

## V

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor  
**VHL** : Von Hippel-Lindau  
**VMAT** : Vesicular mono-amine transporter

## W

**WES** : Whole exome sequencing  
**WT** : Wild-type

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> : Les "Hallmarks of cancer" et exemples de stratégies thérapeutiques ciblées.....	12
<b>Figure 2</b> : Illustration de la voie métabolique glycolytique chez l'homme.....	14
<b>Figure 3</b> : Illustration de la voie métabolique du cycle de Krebs ainsi que des voies métaboliques interconnectées.....	15
<b>Figure 4</b> : Illustration de la chaîne de transport des électrons par phosphorylation oxydative.....	17
<b>Figure 5</b> : L'effet Warburg des cellules cancéreuses.....	18
<b>Figure 6</b> : Illustration de l'absorption du glucose et de la glutamine dans une cellule cancéreuse.....	19
<b>Figure 7</b> : Illustration des différents modes opportunistes d'acquisition des nutriments.....	20
<b>Figure 8</b> : Illustration des apports accrus d'azote dans les voies de synthèses métaboliques essentielles à la cellule cancéreuse.....	22
<b>Figure 9</b> : Impact du métabolisme sur l'environnement tumoral.....	23
<b>Figure 10</b> : Compensations métaboliques des cellules proliférante.....	24
<b>Figure 11</b> : Mutations du cycle de Krebs associées aux cancers.....	26
<b>Figure 12</b> : Structure de la succinate déshydrogénase (SDH).....	28
<b>Figure 13</b> : Rôles du succinate dans le métabolisme et la signalisation cellulaire.....	29
<b>Figure 14</b> : Système paraganglionnaire présentant les sites potentiels de la maladie.....	33
<b>Figure 15</b> : Les cellules dérivées de la crête neurale.....	34
<b>Figure 16</b> : Illustration de la voie de synthèse des catécholamines.....	35
<b>Figure 17</b> : Biosynthèse des catécholamines dans les cellules chromaffines.....	36
<b>Figure 18</b> : Répartition des gènes mutés chez les patients atteints d'un PPGL.....	37
<b>Figure 19</b> : Classification moléculaire des PPGL.....	38
<b>Figure 20</b> : Illustration des différents immuno-marquages réalisés dans le diagnostic et la caractérisation de tissus tumoraux provenant de patients atteints de PPGL.....	50
<b>Figure 21</b> : IHC SDHA/SDHB sur des tissus <i>SDH</i> -WT et <i>SDH</i> muté.....	51
<b>Figure 22</b> : Illustration de l'application du système CRISPR-Cas9.....	68
<b>Figure 23</b> : Dérégulations des voies métaboliques et épigénétiques dans les cancers <i>SDH</i> muté.....	74
<b>Figure 24</b> : Évaluation de l'effet antiprolifératif de la 5-Azacytidine, du Sunitinib, du Témzolomide, du Talazaporib et du FK866 sur les lignées parentale (PAR), contrôle négatif (CN) et les clones <i>SDHB</i> <sup>+/-</sup> (#1 et #2).....	81
<b>Figure 25</b> : Évaluation de la combinaison du Témzolomide et du Talazaporib sur les clones <i>SDHB</i> <sup>+/-</sup> (#1 et #2).....	83
<b>Figure 26</b> : Évaluation de la combinaison du Témzolomide et du FK866 sur les clones <i>SDHB</i> <sup>+/-</sup> (#1 et #2).....	84
<b>Figure 27</b> : Les différentes étapes de développement d'un biomarqueur.....	87
<b>Figure 28</b> : Activité de BCAT et implication des BCAAs et BCKAs dans le métabolisme du cancer.....	97
<b>Figure 29</b> : Illustration de la voie mTOR et stratégies thérapeutiques associées.....	98
<b>Figure 30</b> : Représentation de différences métabolomiques identifiées entre les clones <i>SDHB</i> <sup>+/-</sup> (#1 et #3) et la lignée parentale hPheo1 (PAR) à l'état basal.....	103
<b>Figure 31</b> : Expression protéique des isoformes de BCAT (BCAT1 et BCAT2) dans les clones <i>SDHB</i> <sup>+/-</sup> (#1 et #3), dans la lignée contrôle négatif du CRISPR-Cas9 (CN) et dans la lignée parentale de phéochromocytome humain hPheo1 (PAR).....	104
<b>Figure 32</b> : Expression protéique des complexes impliqués dans l'activation de la voie mTOR dans les clones <i>SDHB</i> <sup>+/-</sup> et dans la lignée parentale de phéochromocytome humain hPheo1 (PAR).....	105

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1</b> : Nom, localisation chromosomique et nombre d'exons relatifs aux gènes SDHA, SDHB, SDHC et SDHD.....	27
<b>Tableau 2</b> : Recommandations du type d'imagerie à pratiquer selon le statut moléculaire de la maladie (PPGL).....	45
<b>Tableau 3</b> : Valeurs cibles de normétanéphrines, métanéphrines et 3 méthoxytyramine libres dans le plasma et l'urine ou déconjugués dans l'urine (pmol/L); H: homme; F: femme .....	47
<b>Tableau 4</b> : Représentation du score gradué de phéochromocytome (Pheochromocytoma of Adrenal Gland Scaled Score, PASS).....	49
<b>Tableau 5</b> : Critères descriptifs recommandés lors du développement de nouveaux modèles précliniques de PPGL.....	62
<b>Tableau 6</b> : Récapitulatif des différents modèles précliniques de PPGL disponibles à ce jour. ....	66
<b>Tableau 7</b> : Liste des principaux modèles précliniques ( <i>in vitro et vivo</i> ) présentant une invalidation <i>SDH</i> .67	

## AVANT-PROPOS

---

La dérégulation du métabolisme cellulaire est l'une des caractéristiques communes aux cellules cancéreuses. Associées à l'effet Warburg, des mutations oncogéniques sont impliquées dans des modifications de voies métaboliques, favorisant la tumorigenèse. En particulier, des mutations de gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs, voie métabolique mitochondriale, ont été identifiées dans différents types de cancer.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la succinate déshydrogénase (SDH), complexe II de la chaîne de transport des électrons et enzyme du cycle de Krebs convertissant le succinate en fumarate. A ce jour, des mutations touchant les gènes codant pour les 4 sous-unités de la SDH (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC* et *SDHD*) ont été décrites dans les cancers du rein, cancers du sein, tumeurs stromales gastro-intestinale et plus fréquemment dans les phéochromocytomes et paragangliomes (PPGL). Les mutations *SDH* entraînent une perte de fonction de l'enzyme, conduisant à une accumulation intracellulaire du succinate. Ce dernier joue le rôle d'oncométabolite en inhibant les dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -kétoglutarate, identifiées comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Dans ce travail de thèse, nous avons plus spécifiquement porté intérêt aux mutations *SDH* des PPGL, tumeurs neuroendocrines (TNE) très rares. Les mutations touchant le gène *SDHB* ont notamment été associées à un haut risque de développement d'une forme métastatique de PPGL, dont la survie médiane est de 6,7 ans à partir du diagnostic des métastases. Les options thérapeutiques actuelles sont limitées dans ce cancer et le développement d'études cliniques permettant d'évaluer de nouveaux traitements est complexe, du fait de la rareté de cette pathologie. La réalisation d'études précliniques et translationnelles est donc essentielle pour améliorer la prise en charge de ces patients.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a porté sur « *l'impact des mutations SDH sur la réponse antitumorale de nouveaux traitements et l'identification de nouveaux biomarqueurs* », dans des modèles de PPGL.

Ce travail a été réalisé successivement dans les équipes du Pr Angelo Paci et du Dr Jean-Luc Perfettini au sein des unités de recherche CNRS UMR8203 (2017-2019) et Inserm U1030 (2020-2021), respectivement dirigées par le Dr Lluís Mir et le Pr Éric Deutsch. Les résultats obtenus à l'issue de cette thèse seront valorisés par la publication de 5 articles scientifiques dans des journaux à comité de lecture internationale dont 2 sont d'ores et déjà soumis et 3 sont en cours de préparation.

---

# 1. Introduction

---

## 1.1. MÉTABOLISME ET CANCERS

### 1.1.1. Généralités sur les cancers

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), « *le cancer est un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. Les cellules cancéreuses peuvent être caractérisées par une prolifération rapide et peuvent essaimer dans d'autres organes, formant ce que l'on appelle des métastases* », principale cause de décès par cancer [1].

En 2020, l'OMS a recensé la survenue de près de 20 millions de nouveaux cas de cancers dans le monde et près de 10 millions de décès associés (~51,6%), ce qui en fait la 2<sup>ème</sup> cause de décès dans le monde après les cardiopathies ischémiques et donc un problème de santé publique majeur. Plusieurs facteurs de risque peuvent être associés à la survenue d'un cancer [2] :

- Les agents infectieux
- La consommation d'alcool
- L'exposition au soleil et aux rayonnements ultra-violets
- Les rayonnements ionisants ou à l'exposition à la radiofréquence par des champs électromagnétiques
- La malnutrition
- La sédentarité
- L'obésité
- Les cancérigènes alimentaires
- Les contaminations de l'air/eau/sol/alimentation
- L'exposition liée à son activité professionnelle
- La prise d'hormones
- Le tabagisme

Le tabagisme est le premier facteur de risques à l'origine de 22% des décès dus au cancer [3]. D'autre part, on peut noter que le diagnostic et la prise en charge des cancers sont très hétérogènes en fonction des pays. Un constat difficile montre que 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à faibles revenus ou intermédiaires. Ces mêmes pays ne disposent que d'environ 30% des services et équipements nécessaires pour le diagnostic et le traitement de patients atteints de cancers.

D'autre part, le coût économique de la prise en charge des cancers est très important et en constante augmentation, notamment en lien avec la mise sur le marché de traitements innovants (ex : anticorps thérapeutiques monoclonaux, CAR-T cells). A titre d'exemple, en 2017, le coût annuel total du cancer en France était estimé à 28 milliards d'euros. De ce fait, cette maladie est un vrai enjeu de santé publique



avec un réel impact économique en lien avec la prise en charge des patients qui reste à ce jour encore très inégale d'un pays à un autre [2, 4].

Cependant, au fil des années les différents travaux de recherche menés dans le monde n'ont cessé de révolutionner le domaine de la cancérologie. Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires de l'oncogenèse a été fortement améliorée et le développement de nouvelles technologies innovantes a permis d'affiner le diagnostic de la maladie et d'optimiser la prise en charge des patients avec des stratégies thérapeutiques plus ciblées et plus personnalisées (ex : thérapies moléculaires ciblées). Ces innovations ont été notamment associées à l'obtention de plusieurs prix Nobel de médecine. Paul C. Lauterbur et Peter Mansfield ont été récompensés en 2003 pour leurs travaux sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM), aujourd'hui couramment utilisée pour le diagnostic et le suivi des cancers [5]. En 2016, le japonais Yoshinori Ohsumi a reçu le prix Nobel de médecine pour ses travaux sur l'autophagie, un type de mort cellulaire de plus en plus étudié dans le traitement des cancers [6]. James P. Allison et Tasuku Honjo ont été récompensés en 2018 pour leurs découvertes concernant les immunothérapies, nouvelle classe thérapeutique qui a révolutionné la prise en charge des patients atteints de cancer avec une amélioration de la réponse au traitement et de la survie globale [7]. Enfin, Gregg L. Semanza, Peter J. Ratcliffe et William Kaelin Jr. ont reçu en 2019 le prix Nobel de médecine pour leurs travaux sur la capacité des cellules à s'adapter à la consommation d'oxygène disponible, ce qui a conduit à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques autour de l'hypoxie et au développement de nouveaux traitements prometteurs [8].

Ces grandes découvertes ont contribué à l'amélioration des connaissances actuelles des cancers, dont Hanahan & Weinberg ont décrit les caractéristiques communes aux cellules cancéreuses, connues sous le terme de « *Hallmarks of cancer* » et pour lesquelles des stratégies thérapeutiques spécifiques ont été associées (Figure 1).

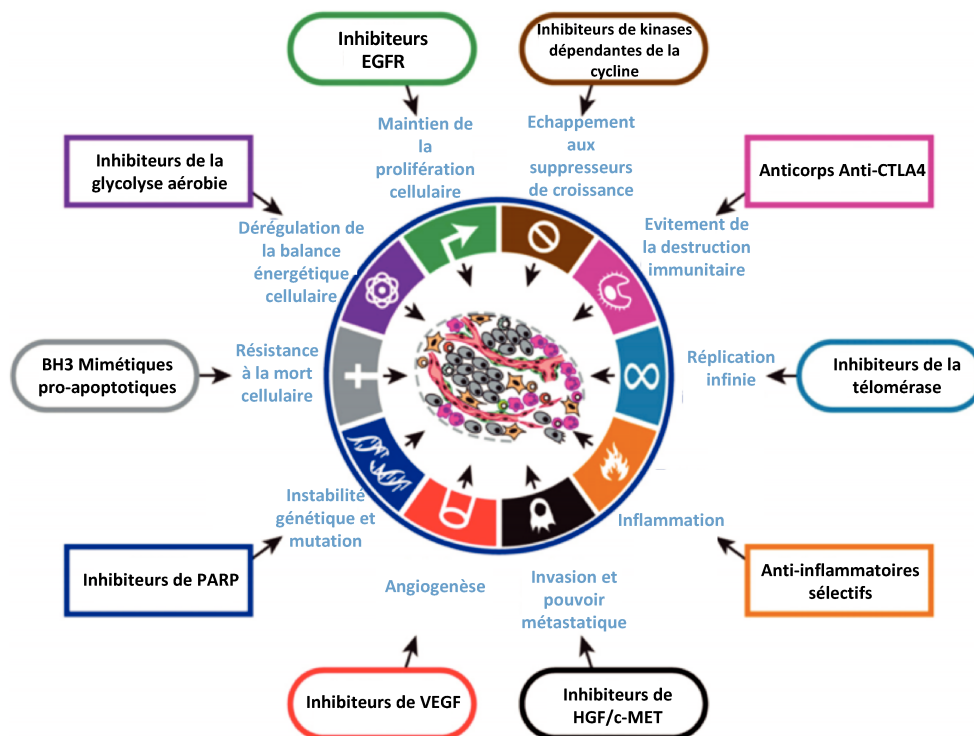
En 2000, ils identifiaient tout d'abord six « *Hallmarks of cancer* » [9] :

- Le maintien de la prolifération cellulaire
- L'échappement aux agents suppresseurs de croissance
- Les capacités d'invasion et le pouvoir métastatique
- La réplication infinie
- L'induction de l'angiogenèse
- La résistance à la mort cellulaire

Onze ans plus tard, Hanahan & Weinberg complètent ces caractéristiques par 4 nouveaux « Hallmarks of cancer » [10] :

- L'évitement de la destruction immunitaire
- L'inflammation
- L'instabilité génétique
- La dérégulation de la balance énergétique cellulaire

Le **métabolisme cellulaire** des cellules cancéreuses est de plus en plus étudié et permet d'expliquer certaines dérégulations métaboliques impliquées dans la survie cellulaire. Cependant, de nombreuses voies métaboliques restent encore inexplorées, ce qui pourrait conduire dans les prochaines années à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques.



**Figure 1** : Les "Hallmarks of cancer" et exemples de stratégies thérapeutiques ciblées (d'après Hanahan et Weinberg, 2011).

### 1.1.2. Le métabolisme énergétique cellulaire

Selon le NIH<sup>1</sup>, « *le métabolisme cellulaire correspond à la somme de tous les changements chimiques qui ont lieu dans une cellule et grâce auxquels l'énergie et les composants de base sont fournis pour les processus essentiels, comprenant la dégradation et l'élimination de molécules (catabolisme) et la synthèse de nouvelles molécules (anabolisme)* ».

Le métabolisme des cellules est composé d'un réseau dense et complexe, dont les voies métaboliques sont très souvent enchevêtrées les unes aux autres. Plusieurs voies métaboliques sont à l'origine de la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La plus connue est la respiration cellulaire qui correspond à l'ensemble des processus métaboliques de la cellule convertissant l'énergie contenue dans une molécule de glucose en molécule d'ATP [11]. Elle est notamment déclinée en respiration cellulaire anaérobie (en absence d'oxygène) et aérobie (liée à une consommation d'oxygène). La **respiration cellulaire aérobie** est la source d'énergie la plus importante avec 36 molécules d'ATP produites contre 2 molécules d'ATP produites par la fermentation lactique en condition d'anaérobie [12, 13]. Elle comprend 3 étapes : la **glycolyse**, le **cycle de Krebs** et la **phosphorylation oxydative** par la chaîne de transport des électrons.

---

<sup>1</sup> *National Institutes of Health*

### 1.1.2.1. La glycolyse

Cette voie métabolique se déroule dans le cytosol des cellules. Elle correspond à l'enchaînement de 10 réactions enzymatiques faisant intervenir les enzymes suivantes (Figure 2) :

- 1- L'hexokinase (HK)
- 2- La phosphoglucose isomérase (PGI)
- 3- La phosphofructokinase (PFK)
- 4- L'aldolase
- 5- La triose-phosphate isomérase (TPI)
- 6- La glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)
- 7- La phosphoglycérate kinase (PGK)
- 8- La phosphoglycérate mutase (PGM)
- 9- L'énolase
- 10- La pyruvate kinase (PK)

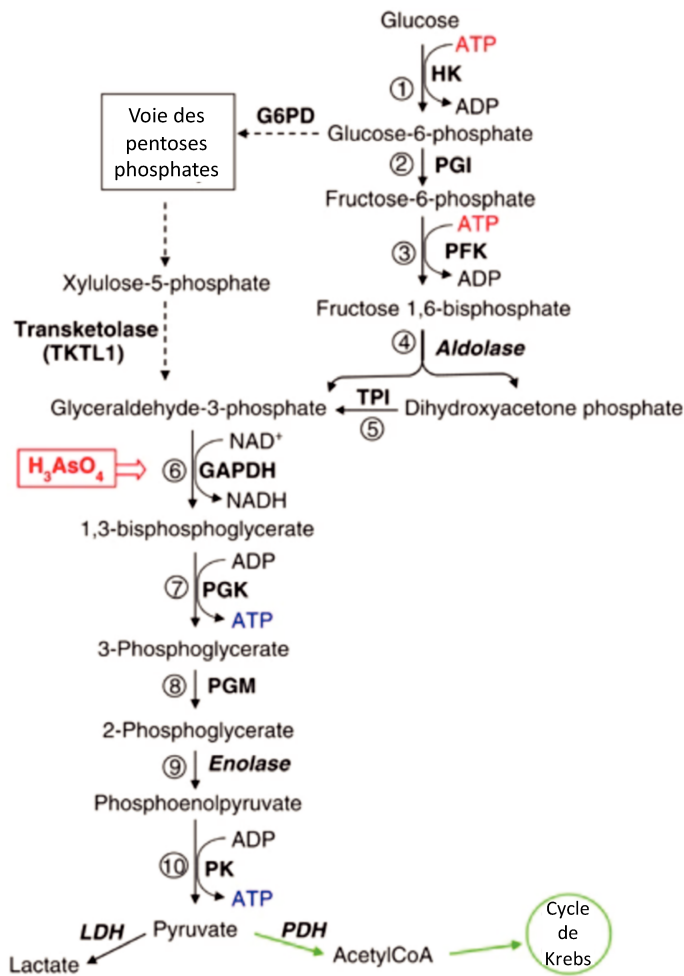
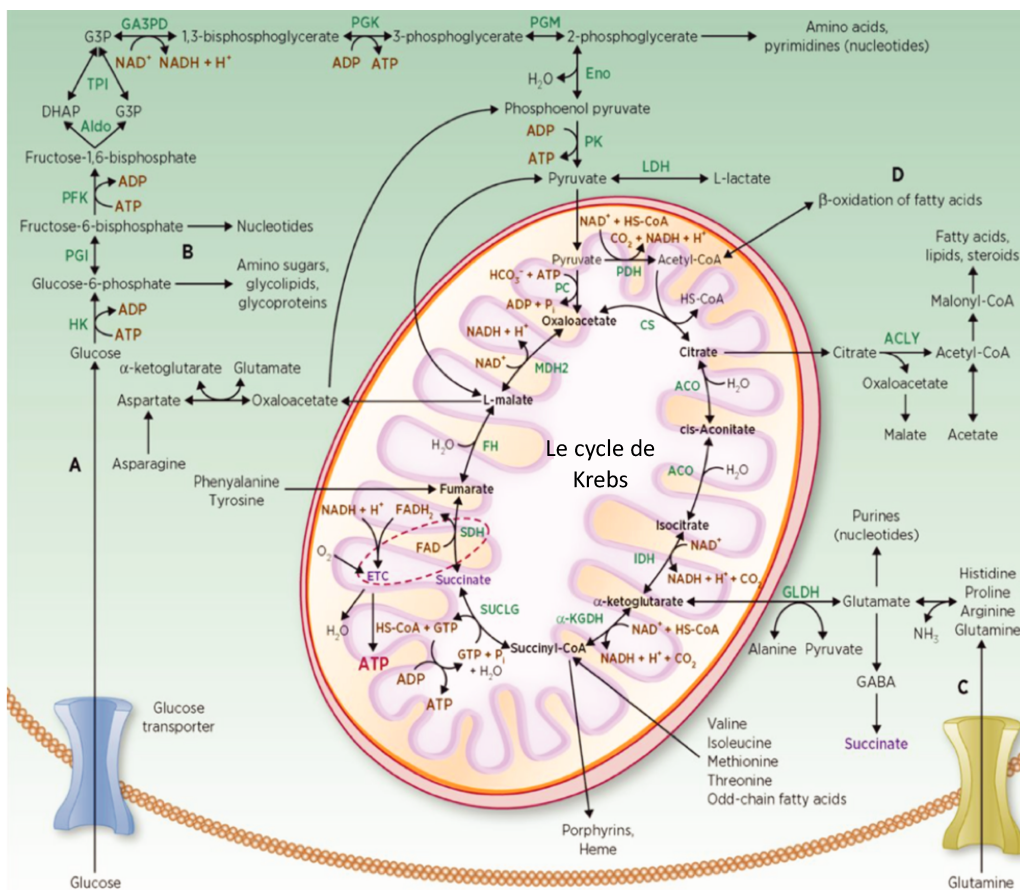


Figure 2 : Illustration de la voie métabolique glycolytique chez l'homme (d'après Pelicano & al, 2006).

Au total, une molécule de glucose apportée à l'organisme, généralement par l'alimentation, est petit à petit transformée pour produire 2 molécules de pyruvate ainsi que 4 molécules d'ATP, 2 molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), 2 molécules d'eau et des protons utiles pour la dernière phase de la respiration cellulaire [13–15]. Par la suite, le pyruvate produit va entrer dans la matrice mitochondriale pour être décarboxylé en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), métabolite qui sera par la suite dégradé dans le cycle de Krebs.

Par ailleurs, certains intermédiaires de la glycolyse sont également impliqués dans d'autres voies métaboliques. C'est le cas entre autres du **glucose-6-phosphate**, retrouvé dans les voies de synthèse des sucres aminés (osamines), des glycolipides et des glycoprotéines ; du **fructose-6-phosphate**, impliqué dans la voie de synthèse des nucléotides et du **2-phosphoglycérate**, retrouvé dans la voie de synthèse des acides aminés et des nucléotides (pyrimidines) (**Figure 3**).



**Figure 3** : Illustration de la voie métabolique du cycle de Krebs ainsi que des voies métaboliques interconnectées (d'après Jochmanova et Pacak, 2016).

### 1.1.2.2. Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs également appelé cycle de l'acide citrique est une voie métabolique se déroulant dans la matrice mitochondriale. Il fait intervenir **la pyruvate déshydrogénase** (PDH) et **la pyruvate carboxylase** (PC) qui transforment respectivement, le pyruvate produit par la glycolyse en acétyl-CoA et en oxaloacétate, essentiels à son activité. Par la suite, l'enchaînement cyclique de 9 étapes est catalysé par 8 enzymes (**Figure 3**) [16–18] :

1. **La citrate synthase** (CS) transforme l'oxaloacétate en citrate.
2. **L'aconitase** (ACO) transforme le citrate en cis-aconitate puis en isocitrate.
3. **L'isocitrate déshydrogénase** (IDH) transforme l'isocitrate en  $\alpha$ -kétoglutarate.
4. **L' $\alpha$ -kétoglutarate déshydrogénase** ( $\alpha$ KGDH) transforme l' $\alpha$ -kétoglutarate en succinyl-coenzyme A (Succinyl-CoA).
5. **La succinyl-CoA synthétase** (SUCLG) transforme le succinyl-CoA en succinate.
6. **La succinate déshydrogénase** (SDH) transforme le succinate en fumarate.
7. **La fumarate hydratase** (FH) transforme le fumarate en malate.
8. **La malate déshydrogénase** (MDH) transforme le malate à nouveau en oxaloacétate.

Au total, 2 molécules de CO<sub>2</sub>, 3 molécules de NADH, 1 molécule de Flavine adénine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>), 1 molécule de Guanine triphosphate (GTP) et des protons sont produits au cours de ce cycle. Certains intermédiaires du cycle de Krebs sont également impliqués dans d'autres voies métaboliques (**Figure 3**). C'est notamment le cas de :

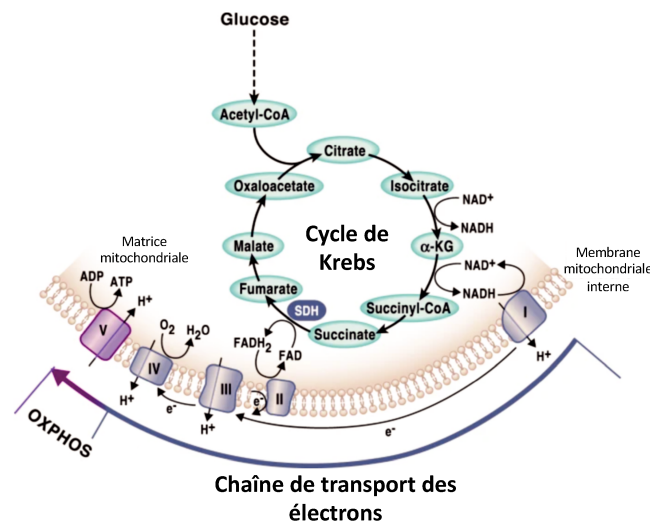
- **L'acétyl-CoA**, impliqué dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras.
- **Le citrate**, impliqué dans les voies de synthèse des acides gras, des lipides et des stéroïdes.
- **L' $\alpha$ -kétoglutarate**, impliqué dans la voie de synthèse des nucléotides (purine) et des acides aminés. Par ailleurs, il est capable de produire du succinate, en passant par la synthèse du glutamate.
- **Le succinyl-CoA**, impliqué dans la production des porphyrines de fer (hème). En revanche, cet intermédiaire peut également être produit par d'autres voies métaboliques (acides aminés et acides gras).
- **Le L-malate**, impliqué dans la synthèse d'intermédiaires de la glycolyse, tels que le phosphoénolpyruvate et le pyruvate.

### 1.1.2.3. La chaîne de transport des électrons et la phosphorylation oxydative

L'oxydation des co-facteurs  $\text{NAD}^+$  et  $\text{FAD}^{2+}$  respectivement, en  $\text{NADH}$  et  $\text{FADH}_2$ , au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs permet de produire des **électrons** qui seront amenés jusqu'à la chaîne de transport des électrons. Cette dernière se situe sur la membrane mitochondriale interne et est composée de 4 complexes enzymatiques :

- **Le complexe I** : la NADH déshydrogénase
- **Le complexe II** : la succinate déshydrogénase
- **Le complexe III** : la cytochrome c réductase
- **Le complexe IV** : la cytochrome c oxydase

Le  $\text{NADH}$  et le  $\text{FADH}_2$  transportent les électrons, respectivement au complexe I et au complexe II. Le transport se poursuit en passant par l'ubiquinone jusqu'au complexe III qui assure le transfert jusqu'au complexe IV par l'intermédiaire du cytochrome C. A cette étape, l'oxygène présent sera réduit en molécule d'eau. Au total, le passage des électrons à travers les différents complexes entraîne la création d'un **gradient électrochimique de protons** qui sera finalement utilisé par l'**ATP synthase**, également appelée **complexe V**, pour phosphoryler les molécules d'ADP en **ATP**, première source d'énergie nécessaire à l'activité cellulaire (**Figure 4**) [13].



**Figure 4** : Illustration de la chaîne de transport des électrons par phosphorylation oxydative (d'après *Martínez-Reyes et S. Chandel, 2020*).

Des dérégulations des voies métaboliques précédemment décrites ont pu être observées dans différentes pathologies et plus précisément dans la survenue d'un grand nombre de cancers, comme nous allons le détailler.

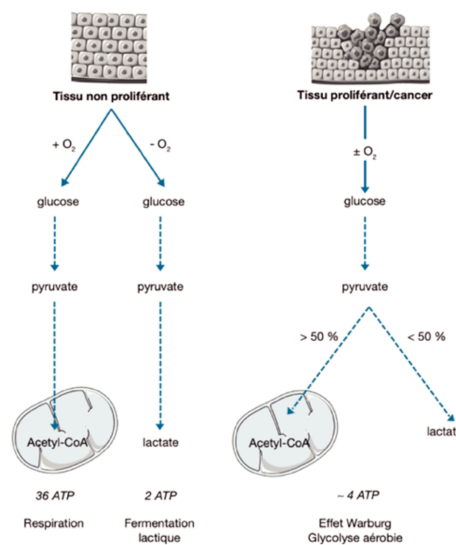
### 1.1.3. Altérations métaboliques et cancers

Le métabolisme du cancer repose sur l'altération des voies métaboliques, favorisant l'acquisition et le maintien de propriétés malignes, et dont la survenue est fréquemment liée à des mutations d'oncogènes [19]. Ces dérégulations ont pu être classées selon 6 critères communs, autrement appelés les « *hallmarks of cancer metabolism* » [20]:

- L'absorption dérégulée du glucose et des acides aminés
- L'utilisation de modes opportunistes d'acquisition des nutriments
- La demande accrue d'azote
- Les altérations de la régulation des gènes induites par le métabolisme
- Les interactions métaboliques avec le micro-environnement
- L'utilisation de la glycolyse et des intermédiaires du cycle de Krebs pour la biosynthèse et la production de NADPH

#### 1.1.3.1. Absorption dérégulée du glucose et des acides aminés

Dans un contexte tumoral, les cellules cancéreuses puisent leur énergie dans 2 sources principales de nutriments : le **glucose** et la **glutamine**. Dans les années 1920, Otto Warburg décrit une théorie, communément appelée « **l'effet Warburg** », basée sur le principe que les cellules cancéreuses produisent de l'énergie grâce à une augmentation de l'activité glycolytique suivie d'une fermentation de l'acide lactique dans le cytosol, en condition d'aérobie contrairement aux cellules saines qui dans les mêmes conditions d'aérobie produiront de l'acétyl-CoA pour entrer par la suite dans le cycle de Krebs (**Figure 5**) [21, 22].

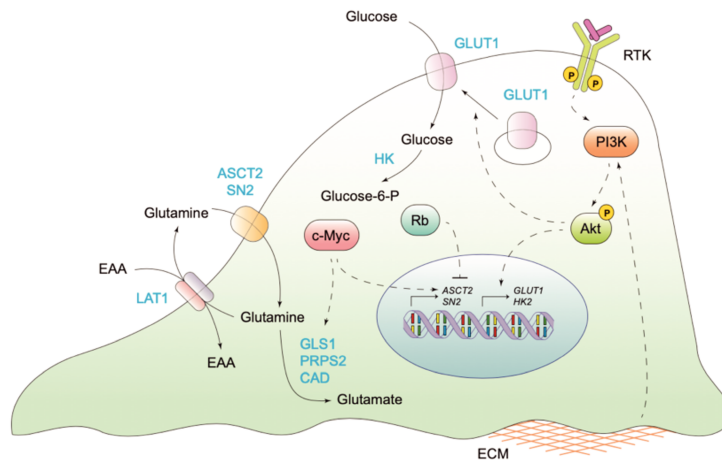


**Figure 5** : L'effet Warburg des cellules cancéreuses (d'après Puyraimond-Zemmour et Vignot, 2013).



Une des raisons pouvant expliquer la survenue de l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses est que la consommation accrue du glucose peut être facilitée par l'accumulation d'altérations oncogéniques. C'est notamment le cas des gènes ciblant la voie PI3 kinase/AKT, à l'origine d'une stimulation de l'activité du transporteur **GLUT1**, impliqué dans l'internalisation du glucose extracellulaire et des enzymes de la glycolyse : **HK** et **PFK** (Figure 6).

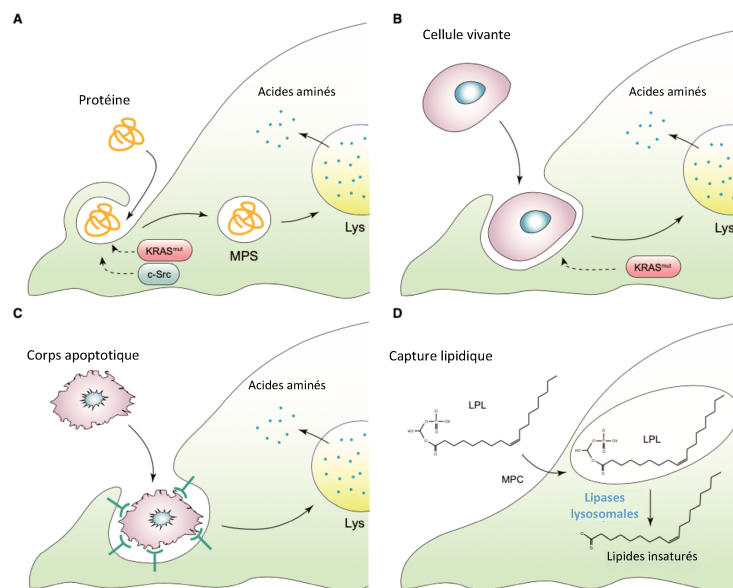
Dans les années 1950, Harry Eagle a décrit pour la première fois que la présence de glutamine en excès était nécessaire à la croissance optimale des cellules tumorales [23]. Les voies de signalisation qui régulent les apports en glutamine sont moins décrites. Toutefois, il semblerait qu'il existe une augmentation de l'activité du facteur de transcription **c-myc** qui induit la synthèse de transporteurs de la glutamine, facilitant ainsi l'utilisation de la glutamine par les cellules cancéreuses proliférantes (Figure 6) [24, 25]. Le glucose et la glutamine ont un rôle important dans la cellule cancéreuse car ils sont, entre autres, la source d'apports de carbone et d'azote utilisés par la suite pour la biosynthèse des nucléotides et des acides aminés non essentiels, cruciaux pour le maintien de l'activité et de la survie cellulaire.



**Figure 6** : Illustration de l'absorption du glucose et de la glutamine dans une cellule cancéreuse (d'après Pavlova et Thompson, 2016).

### 1.1.3.2. Utilisation de modes opportunistes d'acquisition des nutriments

De manière générale, lorsque les besoins en nutriments de la cellule cancéreuse ne sont pas suffisamment couverts, cette dernière est capable d'accumuler de nouvelles mutations lui permettant de développer des capacités de captation de nutriments par des modes dits « opportunistes », permettant le maintien de la prolifération et de la survie cellulaire [26–29]. Des mutations des gènes *KRAS* et *c-Src* permettent ainsi à la cellule tumorale d'internaliser les protéines extracellulaires par un phénomène de macropinocytose puis de capter les **acides aminés libres** par dégradation lysosomale (Figure 7A). Les acides aminés libres peuvent être également récupérés par la digestion de cellules vivantes ou en cours d'apoptose, respectivement par des phénomènes d'entose<sup>1</sup> et de phagocytose (Figures 7B et 7C). Enfin, les cellules soumises à l'hypoxie vont importer les acides gras insaturés qu'elles trouvent dans le milieu environnant sous forme de lysophospholipides (LPL) afin de combler leur déficit (Figure 7D).

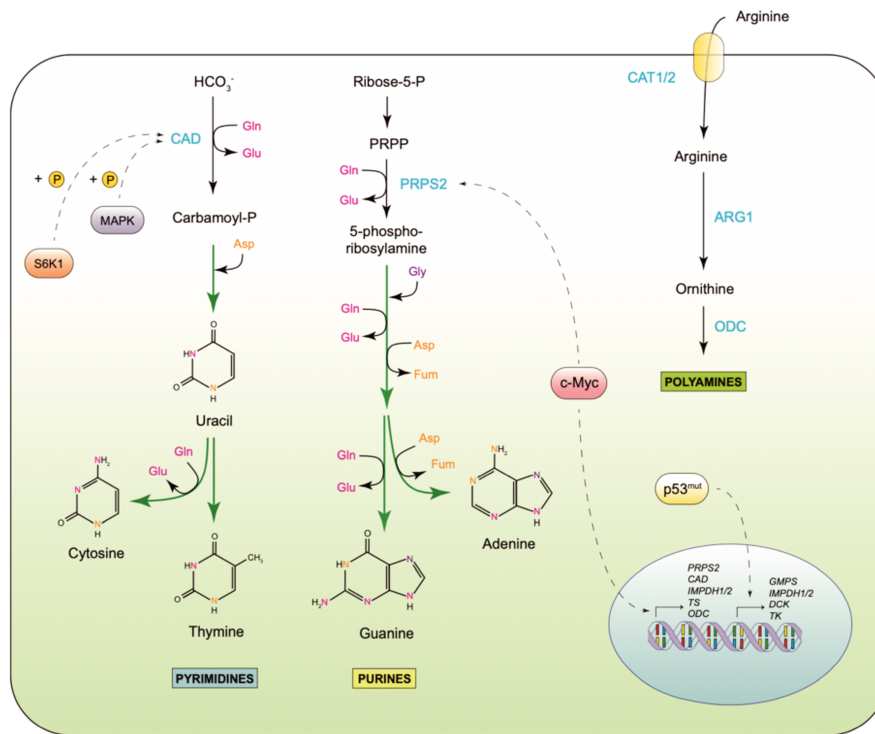


**Figure 7 :** Illustration des différents modes opportunistes d'acquisition des nutriments **A.** Capture des protéines extracellulaires par macropinocytose ; **B.** Capture des cellules vivantes par entose ; **C.** Capture de corps apoptotiques par phagocytose ; **D.** Capture des lysophospholipides extracellulaires (LPL) (d'après Pavlova et Thompson, 2016).

<sup>1</sup> Mort cellulaire par cannibalisme entre cellules tumorales

### 1.1.3.3. *La demande accrue d'azote*

Pour sa survie, la cellule cancéreuse développe un besoin accru de carbone et d'azote pour assurer l'activité des voies de biosynthèse des nucléotides, des acides aminés non essentiels et des polyamines, qui sont essentiels à la conservation de ses capacités de prolifération et de croissance (**Figure 8**). Plus particulièrement, la **glutamine** est la première source d'apport d'azote et est impliquée dans la voie de synthèse des nucléotides. Comme décrit précédemment, des dérégulations de **c-myc** entraînent une augmentation des concentrations intracellulaires de la glutamine qui, dans ce cas, va permettre de favoriser la synthèse des bases puriques et pyrimidiques des nucléotides. Outre c-myc, des dérégulations de la protéine **p53**, impliquée entre autres dans la régulation du cycle cellulaire, sont également associées à la synthèse des nucléotides. Parallèlement, l'activité de l'enzyme **carbamoyl-phosphate synthétase 2** (CAD), notamment impliquée dans la synthèse des pyrimidines, est régulée par la voie des MAPK et la protéine S6K1 dépendantes de mTORC1. Cependant, cette activité dépend également de la disponibilité en glutamine intracellulaire car cette dernière contribue à l'activation de mTORC1. D'autre part, la glutamine est également transformée par la glutaminase en glutamate, qui peut notamment être donneur d'azote dans la synthèse d'acides aminés non essentiels par transamination. Enfin, l'apport exogène d'un acide aminé non-essentiel qui est l'**arginine**, sert de précurseur à la synthèse accrue de polyamines, produits azotés importants pour le maintien de la prolifération des cellules cancéreuses [20].



**Figure 8 :** Illustration des apports accrus d'azote dans les voies de synthèses métaboliques essentielles à la cellule cancéreuse (d'après Pavlova et Thompson, 2016).

#### 1.1.3.4. Interactions métaboliques avec l'environnement

Des changements phénotypiques ont pu être observés dans l'environnement des cellules cancéreuses, au niveau des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (**Figure 9**) [30].

Les interactions des cellules cancéreuses avec leur environnement se font par le biais de la sécrétion de facteurs de croissance, de modifications de la matrice extracellulaire, d'interactions intercellulaires et de modifications métaboliques du milieu extracellulaire environnant. La consommation accrue de glucose et de glutamine par la cellule cancéreuse entraîne une accumulation de **lactate** dans le milieu extracellulaire. Ce dernier est à l'origine de différentes régulations des cellules du système immunitaire. En effet, le lactate accumulé va atténuer l'activation des cellules dendritiques, des cellules T et freiner la migration des monocytes [31–33]. Il va également entraîner la reprogrammation des macrophages vers un profil dit M2-like<sup>1</sup>, leur donnant les caractéristiques de macrophages immunosuppresseurs et anti-inflammatoires [34]. D'autre part, une stabilisation du facteur de transcription HIF1 $\alpha$  par l'hypoxie et une activation de la voie NF- $\kappa$ B/PI3 kinase induisent la sécrétion du facteur de croissance endothélial

<sup>1</sup> Profil de macrophages leur conférant un phénotype anti-inflammatoire

vasculaire (VEGF) et le développement de l'angiogenèse [35].

Par ailleurs, le lactate accumulé stimule la production d'acide hyaluronique par les fibroblastes, ce qui a pour conséquence de développer les capacités d'invasion des cellules tumorales [36]. Une acidification du milieu extracellulaire par le transporteur monocarboxylate 1 (MCT1) et l'anhydrase carbonique IX (CAIX) entraîne une stimulation des métalloprotéinases matricielles (MMP) et des cathepsines, ce qui a pour conséquences une dégradation de la matrice extracellulaire par protéolyse et le développement de l'invasion tumorale [37].

Enfin, certaines tumeurs solides sont capables de dégrader le tryptophane extracellulaire pour le transformer en kynurénine par le biais de deux dioxygénases : l'indoleamine-2, 3-dioxygénase (IDO1) et la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO2). La kynurénine va agir comme ligand avec le récepteur arylhydrocarboné (AhR), ce qui va avoir pour conséquence la stimulation des cellules T régulatrices qui vont à leur tour supprimer la réponse immunitaire antitumorale. La seconde conséquence est la stimulation de la communication autocrine des cellules cancéreuses conduisant à la dégradation de la matrice extracellulaire et au développement de l'invasion [38]. Enfin, le microenvironnement peut également avoir des effets sur le métabolisme des cellules tumorales. La condition hypoxique va altérer la phosphorylation oxydative qui nécessite la présence d'oxygène pour fonctionner, ce qui peut entraîner des dérégulations des voies de signalisation ainsi que de la transcription des gènes impactés.

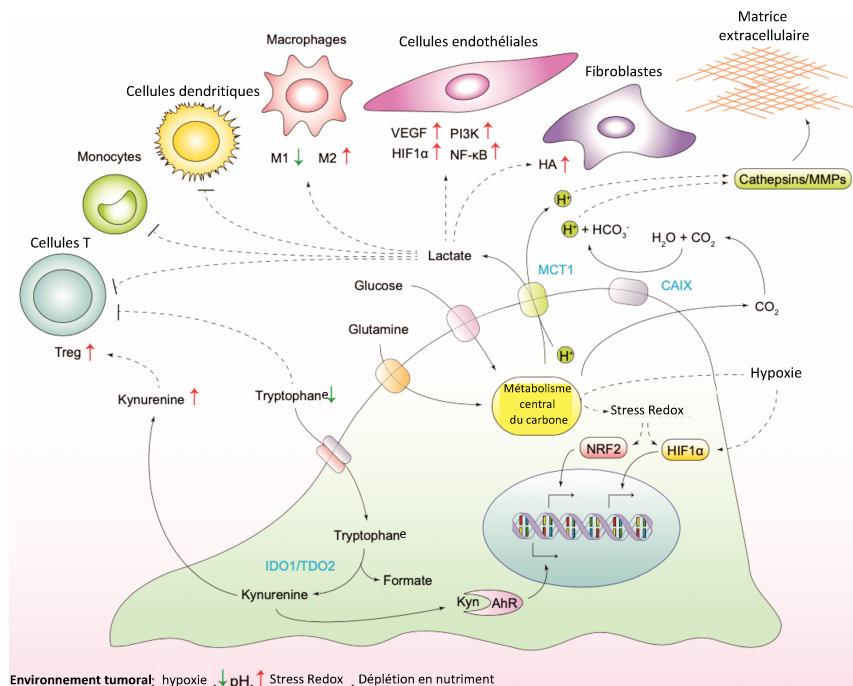


Figure 9 : Impact du métabolisme sur l'environnement tumoral (D'après Pavlova & Thompson, 2016).

### 1.1.3.5. Utilisation de la glycolyse et des intermédiaires du cycle de Krebs pour la production de NADPH

Les besoins métaboliques des cellules cancéreuses dépendent de leurs capacités. Les cellules quiescentes ont tendance à consommer du glucose pour synthétiser de l'acétyl-CoA qui rentrera dans le cycle de Krebs afin de produire du NADH et du FADH<sub>2</sub>. Ces derniers, vont être *in fine* convertis en ATP par phosphorylation oxydative dans la chaîne de transport des électrons. A l'opposé, une cellule proliférante utilisera ses sources en carbone pour la synthèse d'acides gras, de cholestérol, de dérivés sucrés, de glycérol, de nucléotides et d'acides aminés non essentiels associés à la production de NADPH. L'effet Warburg d'une cellule cancéreuse proliférante peut s'expliquer par le fait qu'elle préfère transformer le pyruvate en lactate afin de conserver son métabolisme du glucose (Figure 10).

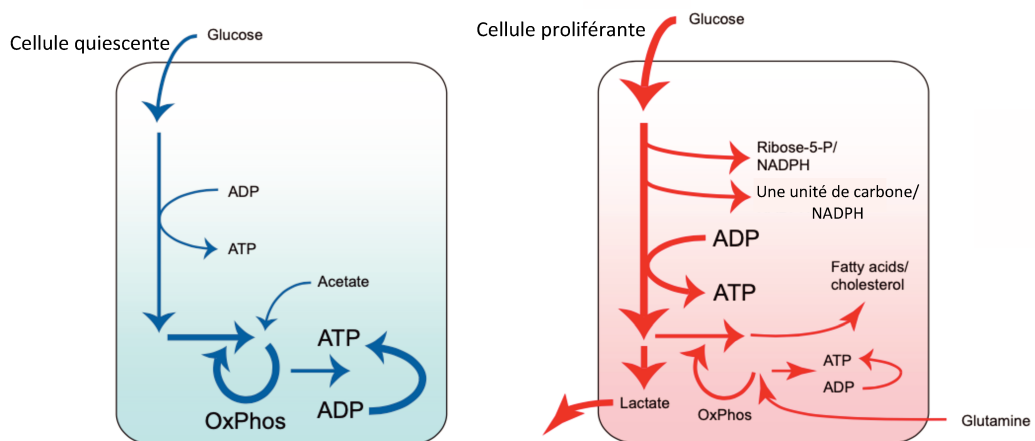


Figure 10 : Compensations métaboliques des cellules proliférantes (D'après Pavlova et Thompson, 2016).

En effet, l'activité du cycle de Krebs couplée à la phosphorylation oxydative, a un effet de rétrocontrôle négatif sur l'activité glycolytique du fait de la production importante de molécules d'ATP. Ainsi, la synthèse de molécules de NADPH est énergétiquement plus intéressante pour le maintien de l'activité proliférative de la cellule cancéreuse que la synthèse de molécules d'ATP. D'autre part, la cellule proliférante va également utiliser des intermédiaires de la glycolyse et donc une partie de son métabolisme impliquant du carbone pour la biosynthèse de nouveaux métabolites. Plus particulièrement, le glucose-6-phosphate est impliqué dans la voie de synthèse des pentoses phosphates, le fructose-6-phosphate dans la voie de synthèse des hexosamines, le glycéraldéhyde-3-phosphate dans la biosynthèse du glycérol-3-phosphate et le 3-phospho-glycérate dans la synthèse de

la sérine et de la glycine.

L'activité glycolytique est anormalement élevée dans les cellules cancéreuses proliférantes afin d'impliquer ses différents intermédiaires dans la biosynthèse de composés essentiels au maintien de sa survie. L'activité glycolytique excédante sera quant à elle transformée *in fine* en lactate pour un gain d'énergie en comparaison à la synthèse de NADH par le cycle de Krebs qui est plus énergétique pour la cellule. Les mitochondries sont d'autant plus à l'abri de cet excès de glycolyse, car le pyruvate qui entre dans le cycle de Krebs est transformé en citrate pour être sécrété dans le cytosol et être converti en oxaloacétate et en acétyl-CoA. L'oxaloacétate sera par la suite transformé en malate puis ré-internalisé dans la mitochondrie afin de maintenir l'anaplérose<sup>1</sup> tandis que l'acétyl-CoA est impliqué dans la biosynthèse des lipides et l'acétylation des protéines.

Le cycle de Krebs permet également de synthétiser des acides aminés non essentiels qui permettent notamment de contribuer au bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative et au développement de la tumorigenèse [39]. Par ailleurs, la glutamine joue un rôle essentiel dans le maintien de l'activité du cycle de Krebs. Pour ce faire, la glutamine extracellulaire est internalisée dans la mitochondrie et convertie par la glutaminase en glutamate qui sera lui-même transformé en  $\alpha$ -kétoglutarate par la glutamate déshydrogénase avant d'être utilisé par le cycle de Krebs [20, 40]. Cependant, malgré ces compensations métaboliques, les cellules en prolifération accumulent une activité de transport d'électrons qui est supérieure à celle de l'ATP synthase. La conséquence de ce phénomène est la production en excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui participent à la tumorigenèse [20].

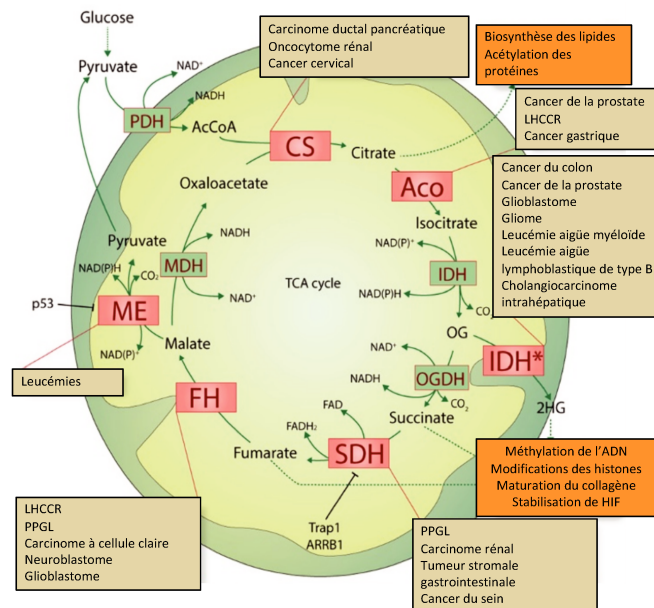
---

<sup>1</sup> Réaction chimique permettant la synthèse d'une espèce chimique intermédiaire d'une voie métabolique

### 1.1.3.6. Mutations des enzymes du cycle de Krebs et tumorigenèse

La découverte de mutations oncogéniques d'enzymes métaboliques a confirmé l'implication du métabolisme cellulaire dans la tumorigenèse [41–43]. Plus particulièrement, des mutations des gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs ont été retrouvées dans différents types de cancers :

- La **citrate synthase** (CS) associée au carcinome ductal pancréatique, à l'oncocytome rénal et au cancer cervical [44–46].
- L'**aconitase** (ACO) associée au cancer de la prostate, à la LHCCR<sup>1</sup> et au cancer gastrique [47–49].
- L'**isocitrate déshydrogénase** (IDH) associée au cancer du côlon, au cancer de la prostate, au gliome et glioblastome, à la leucémie aigüe myéloïde et leucémie aigüe lymphoblastique de type B et le cholangiocarcinome intra hépatique [50–55].
- La **succinate déshydrogénase** (SDH) associée aux PPGL, au carcinome rénal, aux tumeurs stromales gastro-intestinales et au cancer du sein [17, 56–59].
- La **fumarate hydratase** (FH) associée à la LHCCR, aux phéochromocytomes et paragangliomes (PPGL), au carcinome à cellule claire, au neuroblastome et au glioblastome [60–64].
- La **malate déshydrogénase** (MDH) aux leucémies [65, 66] (**Figure 11**).



**Figure 11** : Mutations du cycle de Krebs associées aux cancers (D'après *Gaude et Frezza, 2014*).

Dans le cadre de ce travail de thèse, intitulé « *Impact des mutations SDH sur la réponse antitumorale et identification de nouveaux biomarqueurs* », nous nous sommes notamment intéressés aux mutations *SDH*, qui seront décrites dans la suite de ce manuscrit.

<sup>1</sup> Léiomyomatose héréditaire et cancer des cellules rénales



## 1.1.4. La Succinate déshydrogénase (SDH)

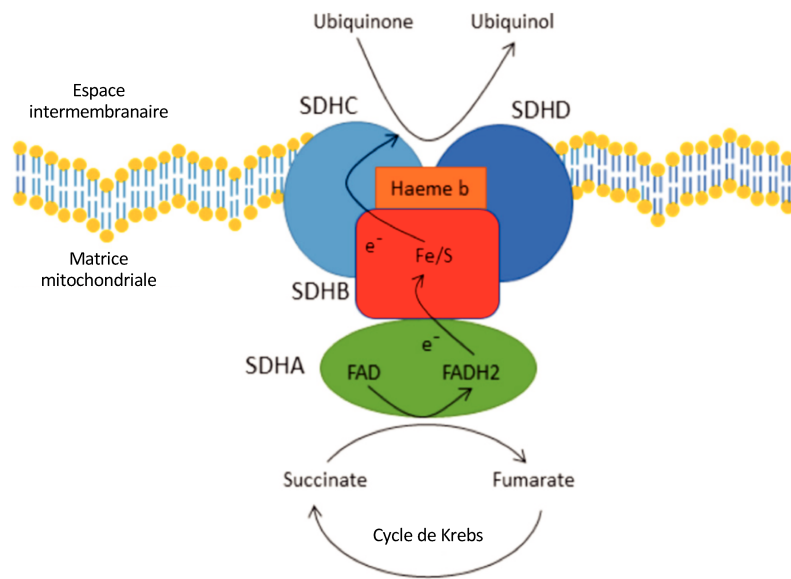
### 1.1.4.1. Structure et fonctions

La succinate déshydrogénase (SDH) est une enzyme mitochondriale composée de 4 sous-unités (A, B, C et D) dont les gènes appartiennent au génome nucléaire. La localisation chromosomique et le nombre d'exons varient entre les gènes *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* (**Tableau 1**) [67–69].

**Tableau 1** : Nom, localisation chromosomique et nombre d'exons relatifs aux gènes *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* et *SDHD*.

Nom du gène	Localisation chromosomique	Nombre d'exons
<i>SDHA</i>	5p15.33	16
<i>SDHB</i>	1p35-36.1	8
<i>SDHC</i>	1q21	6
<i>SDHD</i>	11q23	4

Ce complexe de phosphorylation oxydative est le seul à ne pas être codé par le génome mitochondrial et il est le seul complexe respiratoire à ne pas pomper ses protons à travers la membrane mitochondriale interne [70]. Sa structure comprend une tête hydrophile qui fait protrusion dans la matrice mitochondriale et une queue hydrophobe qui s'ancre à la membrane mitochondriale interne (**Figure 12**) [71]. La tête du complexe protéique comprend la flavoprotéine SDHA (composée de 664 acides aminés avec un poids moléculaire de 73 kDa) et la sous-unité SDHB contenant des centres fer-soufre (Fe-S) pour former le site catalytique (composée de 280 acides aminés avec un poids moléculaire de 32 kDa). Le domaine membranaire comprend quant à lui les sous-unités SDHC (composée de 169 acides aminés avec un poids moléculaire de 19 kDa) et SDHD (composée de 159 acides aminés avec un poids moléculaire de 17 kDa) ainsi qu'un cofacteur, l'hème b, liant les deux sous-unités et un site de liaison pour l'ubiquinone (**Figure 12**) [72–74].

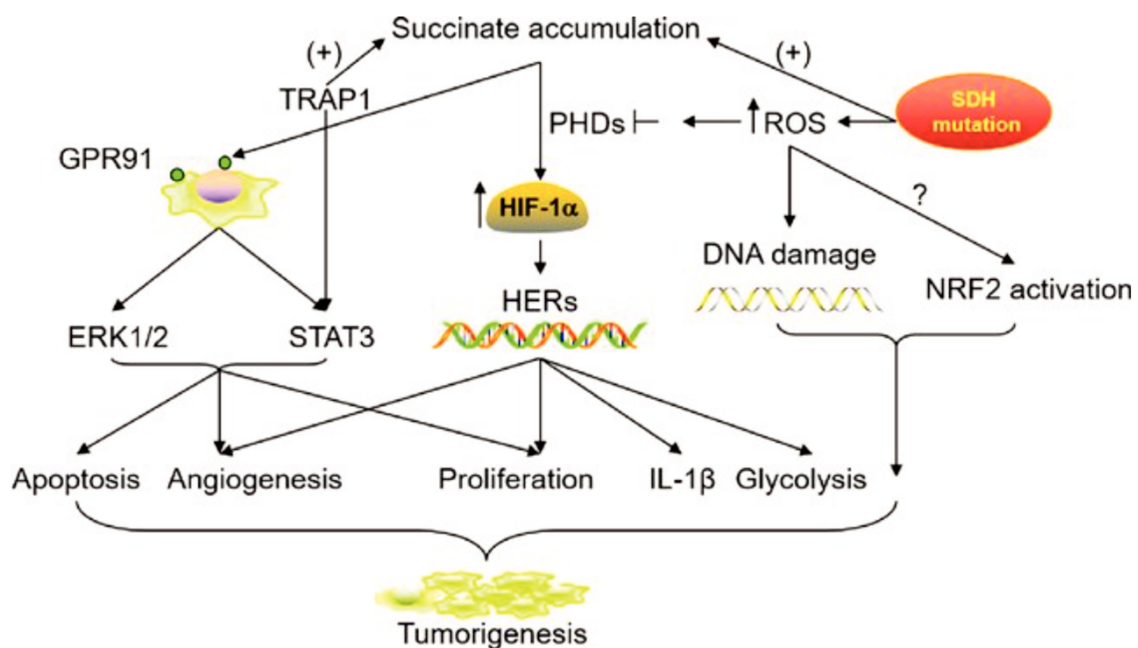


**Figure 12** : Structure de la succinate déshydrogénase (SDH) (Daprès *Aldera et Dhirendra, 2018*).

La SDH est impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale en tant que complexe II. Elle est également une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse l'oxydation du succinate en fumarate accompagnée de la réduction de son cofacteur FAD en FADH<sub>2</sub> [74]. Plus particulièrement, la fixation du succinate à la sous-unité **SDHA** entraîne un changement de conformation du domaine, permettant sa juxtaposition au FAD et par la suite son oxydation en fumarate. Cette étape génère des électrons libres qui atteignent la sous-unité **SDHB** en traversant les centres Fe-S jusqu'à atteindre la molécule d'ubiquinone liée à la sous-unité **SDHD**, qui sera réduite en ubiquinol (**Figure 12**). Deux nouveaux facteurs ont été décrits comme complétant l'assemblage du complexe SDH : **SDHAF1** qui est une petite protéine retrouvée dans la matrice mitochondriale, permettant l'insertion des résidus Fe-S dans la sous-unité SDHB et **SDHAF2** autrement appelée SDH5 qui est une protéine mitochondriale responsable de la flavination de SDHA, essentielle pour la formation du complexe [75, 76]. Par ailleurs, l'activité de la SDH peut être modulée par des phosphorylations post-transcriptionnelles, des acétylations de SDHA, des inhibiteurs compétitifs du succinate (malate, malonate et oxaloacétate) mais également par des anomalies des gènes codant pour les différentes sous-unités comme cela a pu être décrit dans différentes pathologies [67, 70, 74].

### 1.1.4.2. Rôles du succinate

Le succinate correspond à la forme ionisée de l'acide succinique et joue le rôle d'intermédiaire métabolique en condition physiologique. Comme décrit dans le paragraphe précédent, le succinate est un métabolite du cycle de Krebs qui joue le rôle de substrat pour la SDH afin de produire du fumarate. Cependant, il est également impliqué dans d'autres voies métaboliques liées au cycle de Krebs, telles que les voies de synthèse des glucides, des acides gras, des acides aminés, du cholestérol ou de l'hème (Figure 13) [77].



**Figure 13** : Rôles du succinate dans le métabolisme et la signalisation cellulaire (D'après Zhao et al, 2015)

Par ailleurs, le succinate intracellulaire est capable de traverser les membranes mitochondriales par le biais de transporteurs (SLC25A10) et de porines pour se retrouver dans la circulation sanguine. Dans ce cas, il agit comme une molécule de signalisation extracellulaire associée à une fonction hormonale grâce à la reconnaissance d'un récepteur couplé à la protéine G, GPR91 autrement appelé SUCNR1<sup>1</sup>, exprimé par un certain nombre de tissus spécifiques (adipocytes, foie, rétine, cœur, cellules immunitaires, plaquettes, reins, ...).

D'autre part, dans des conditions d'accumulation du succinate, l'oxydation rapide de ce dernier par la SDH peut entraîner un transport inverse d'électrons, pouvant être à l'origine de la production de ROS et créer un microenvironnement pro-oxydant (Figure 13) [77].

Enfin, l'accumulation du succinate intracellulaire est capable d'inhiber les dioxygénases dépendantes de

<sup>1</sup>Récepteur succinate 1

l' $\alpha$ -kétoglutarate. Plus particulièrement, l'inhibition de la PHD<sup>1</sup> qui transforme physiologiquement HIF $\alpha$  en HIF $\alpha$  dihydroxylé a pour conséquence une accumulation de HIF $\alpha$ , la mise en place de l'hypoxie et le développement de l'angiogenèse [78]. Une autre dioxygénase dépendante de l' $\alpha$ -kétoglutarate est également inhibée par l'accumulation du succinate. C'est le cas de TET<sup>2</sup> qui transforme physiologiquement, la 5-méthylcytosine (5-mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC). La conséquence de son inhibition est une accumulation de la 5-mC associée à une hyperméthylation de l'ADN [79]. En outre, le succinate accumulé peut également inhiber les dioxygénases KDM4A et KDM4B, ce qui a pour conséquence un blocage de la voie de réparation de l'ADN par recombinaison homologue [80].

Lors d'anomalies de la SDH, le succinate joue le rôle de métabolite pouvant entraîner des dérégulations associées à la survenue de différentes pathologies, qui seront décrites dans le prochain paragraphe.

---

<sup>1</sup> *Prolyl hydroxylase domain*

<sup>2</sup> *Ten eleven translocation*

### 1.1.4.3. Anomalie de la SDH

Une perte de fonction de la SDH a été décrite dans l'encéphalomyélopathie nécrosante subaigüe ou **syndrome de Leigh**. Ce trouble du développement neurologique peut être d'origine génétique et associé dans 2% des cas à des mutations inhibitrices du gène *SDHA* [81, 82]. Des déficits partiels de *SDHA* ont également été observés dans des cas isolés de patients présentant une **atrophie optique tardive**, une **ataxie** et une **myopathie proximale** [83]. Des mutations inhibitrices du gène *SDHA* ont également été décrites dans des cas rares de **cardiomyopathies néonatales** [84].

Des mutations inhibitrices des gènes *SDHB* et *SDHD* ont été associées au **syndrome de Cowden** chez des patients présentant une mutation du gène *PTEN* [85].

Par ailleurs, des anomalies de l'activité de la SDH ont été observées lors de **lésions d'ischémie-reperfusion**. En effet, la réaction enzymatique est inversée en condition ischémique allant de la consommation de fumarate à la production de succinate. En condition de reperfusion, le succinate est à nouveau oxydé par la SDH, entraînant la production de ROS [86]. Un phénomène similaire a été observé dans la **reprogrammation des macrophages** dans le contexte de **maladies inflammatoires**. Une augmentation de l'oxydation du succinate par la SDH a été observée dans les macrophages pro-inflammatoires dits M1-like conduisant à la production de ROS et d'Interleukine 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). L'effet inverse est également observé dans les macrophages anti-inflammatoires dits M2-like [87].

#### 1.1.4.4. Cas particulier des cancers

Des mutations des gènes codant pour la SDH ont été retrouvées dans différents types de cancers. Trois pour cent (3%) des **cancers du sein** sont associés à des mutations *SDHA* et *SDHB*. La présence de ces mutations semble être corrélée à un jeune âge au diagnostic et à une histologie de bas grade [59]. Une perte de fonction de la SDH est estimée entre 0,05% et 0,2% des cas de **carcinomes rénaux**, avec une majorité de mutations *SDHB* et plus rarement *SDHC* [57, 88].

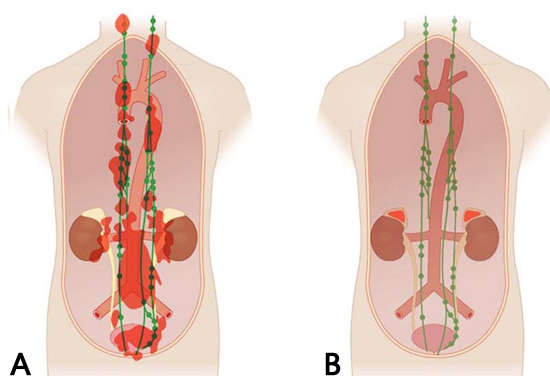
Dans les **tumeurs stromales gastro-intestinales** (GIST), les mutations *SDH* sont associées à 10% des cas et sont souvent retrouvées en absence de mutations des gènes *PDGFRA* et *KIT*. Plus particulièrement, les mutations *SDHA* représentent 30% des GIST *SDH* muté. Les gènes *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* sont minoritairement mutés dans les GIST (20 à 30%). Dans de nombreux cas, ces mutations sont germinales et sont également associées à la présence d'un paragangliome [58, 89]. Des cas plus rares de mutations des gènes codant pour la SDH ont été décrits dans les **adénomes pituitaires** dont leur implication dans la tumorigenèse est encore débattue [90], dans les **cancers papillaires de la thyroïde** [85], les **neuroblastomes** [91], les **hyperplasies médullaires de la surrénale** [92] et les **séminomes testiculaires** [93]. Enfin, les **phéochromocytomes** et les **paragangliomes** (PPGL) sont les cancers les plus touchés par les mutations *SDH*. A ce jour, on retrouve 10% de mutations *SDHB*, suivi de 9% de mutations *SDHD*, <5% de mutations *SDHA*, 1% de mutations *SDHC* et <1% de mutations *SDHAF2* dans les PPGL [94, 95]. De ce fait, nous nous sommes intéressés aux PPGL dans ce travail de thèse afin d'étudier « *l'impact des mutations SDH sur la réponse antitumorale et l'identification de nouveaux biomarqueurs* ».

## 1.2. FOCUS SUR LES PHÉOCHROMOCYTOMES ET PARAGANGLIOMES (PPGL)

### 1.2.1. Définition

Les **paragangliomes** sont des tumeurs neuroendocrines (TNE) développées aux dépens des **paraganglions**, groupements de cellules constituant le système nerveux autonome (sympathique et parasymphatique) qui s'étendent de la base du crâne au plancher pelvien (**Figure 13A**).

Les **phéochromocytomes** sont des paragangliomes qui se développent spécifiquement dans la partie centrale de la glande surrénale appelée **médullosurrénale** (**Figure 13B**) [96].



**Figure 14** : Système paraganglionnaire présentant les sites potentiels de la maladie (en rouge)  
A. Paragangliome ; B. Phéochromocytome (atteinte des surrénales) (D'après *WM Manger, 1996*).

La prévalence des PPGL est très faible, de moins de 0,05% dans la population générale et augmente chez les patients hypertendus à 0,2 - 0,6% [97–101]. L'incidence annuelle dans la population générale est de respectivement, 0,2/1 000 000 et 2/1 000 000 pour les phéochromocytomes et les paragangliomes [102–106]. Dans des données d'autopsie, l'estimation du diagnostic fortuit d'un PPGL s'élève à 0,05%, ce qui indique qu'il existe un certain nombre de cas de patients pour lesquels le diagnostic de la présence d'un PPGL n'a pas été réalisé de leur vivant [107, 108]. Du fait de leur rareté, les PPGL sont classés parmi les maladies orphelines (OMIM #171300).

## 1.2.2. Physiopathologie

### 1.2.2.1. Origine embryonnaire

Les cellules de la glande surrénale et des paraganglions prennent naissance à partir de la crête neurale lors de l'embryogenèse. Les cellules de la crête neurale correspondent aux bords de la gouttière neurale et se rejoignent pour former la face dorsale du tube neural. Grâce au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et à leur propriété de multipotence, la migration des cellules de la crête neurale se généralise à l'ensemble de l'embryon pour donner différents types cellulaires [109]. Elles sont notamment à l'origine (**Figure 14**) [110, 111]:

- Du système nerveux autonome
- Des cellules musculaires
- Des os et cartilages
- Du système dentaire
- Des tissus conjonctifs
- Des mélanocytes
- Des ongles
- Des poils
- Du système endocrinien comprenant les cellules de la thyroïde, les cellules chromaffines de la médullosurrénale, les paraganglions sympathiques et les cellules non-chromaffines des paraganglions parasympathiques.

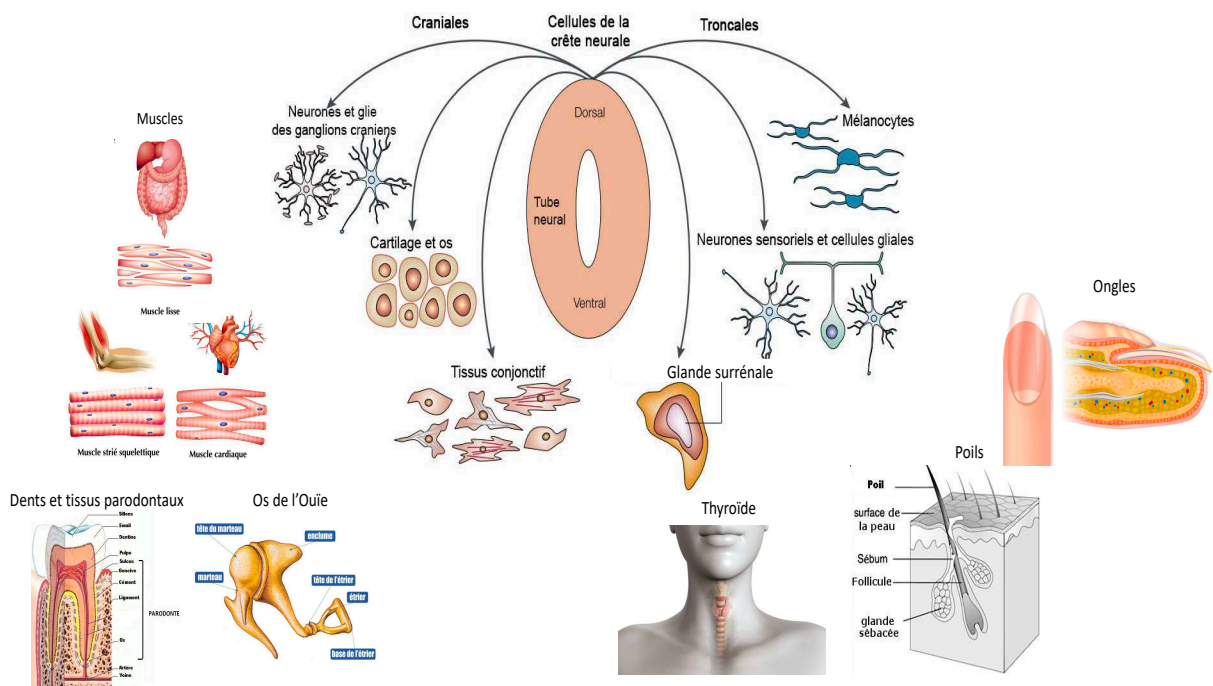


Figure 15 : Les cellules dérivées de la crête neurale (D'après *Knecht and Bronner-Fraser, 2002*).

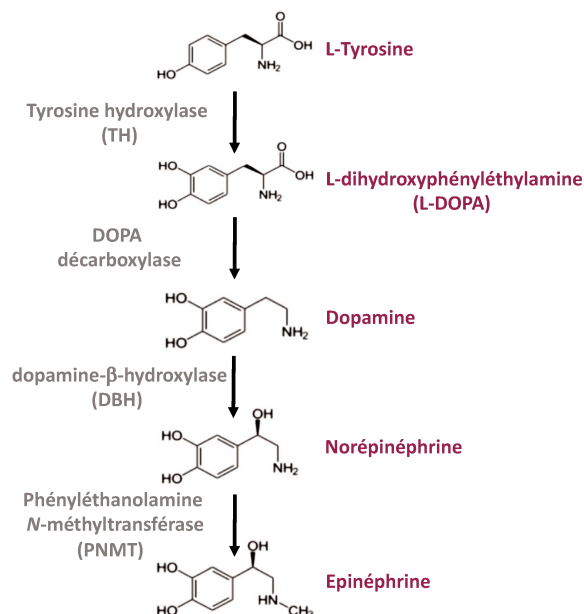


### 1.2.2.2. Localisation et sécrétions hormonales

Les PPGL ont des caractéristiques différentes selon leur localisation et leur capacité à sécréter des catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) qui agissent en tant qu'hormones ou neurotransmetteurs. De ce fait, les PPGL sont généralement classés en 2 groupes :

- Les **paragangliomes du système sympathique** se situent dans la région abdomino-pelvienne ou thoracique (région para-cardiaque incluse). Dans la région abdominale, lorsque la tumeur est localisée dans la **médullosurrénale** et sécrète des **catécholamines**, alors le paragangliome est considéré comme étant un **phéochromocytome** [112]. De manière générale, ces paragangliomes peuvent sécréter des catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine), et sont dans ce cas dits **fonctionnels**.
- Les **paragangliomes du système parasympathique** sont souvent localisés dans la région cervicale et sont généralement **non fonctionnels**.

La synthèse des catécholamines est réalisée à partir d'une molécule de **L-Tyrosine** qui est peu à peu transformée en adrénaline autrement appelée épinéphrine en passant par différents intermédiaires qui sont respectivement la **L-dihydroxyphényléthylamine (L-DOPA)**, la **dopamine** et la **noradrénaline** (norépinéphrine). Cette biosynthèse est catalysée par différentes enzymes qui sont respectivement la **Tyrosine Hydroxylase (TH)**, la **dopa décarboxylase**, la **dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH)** et la **phényléthanolamine N-méthyltransférase (PNMT)** (**Figure 15**). La L-Tyrosine est souvent apportée par l'alimentation ou bien par la conversion de la L-Phénylalanine par la Phénylalanine Hydroxylase (PAH).



**Figure 16** : Illustration de la voie de synthèse des catécholamines (D'après Pinoli et al., 2017).

La libération des catécholamines fait suite à une stimulation neuronale pour être ensuite re-captées par la terminaison présynaptique et stockées dans des granules de sécrétions appelés pool de réserve. Dans ce cas, les catécholamines se retrouvent associées à d'autres protéines dont le **neuropeptide Y**, la **somatostatine**, la **substance P** et la **chromogranine A** (CgA) (**Figure 16**) [113]. Les catécholamines échappant à la recapture sont libérées dans les liquides de l'organisme (plasma et urine) et sont par la suite dégradées chimiquement par deux enzymes : la **MonoAmine Oxydase** (MAO) et la **Catéchol-O-méthyltransférase** (COMT). Cette dernière est notamment responsable de la transformation de la **noradrénaline**, l'**adrénaline** et la **dopamine** en respectivement **normétanéphrine**, **métanéphrine** et **3-méthoxytyramine**, seuls métabolites détectables dans le sang et les urines de patients atteints d'un PPGL [114–116].

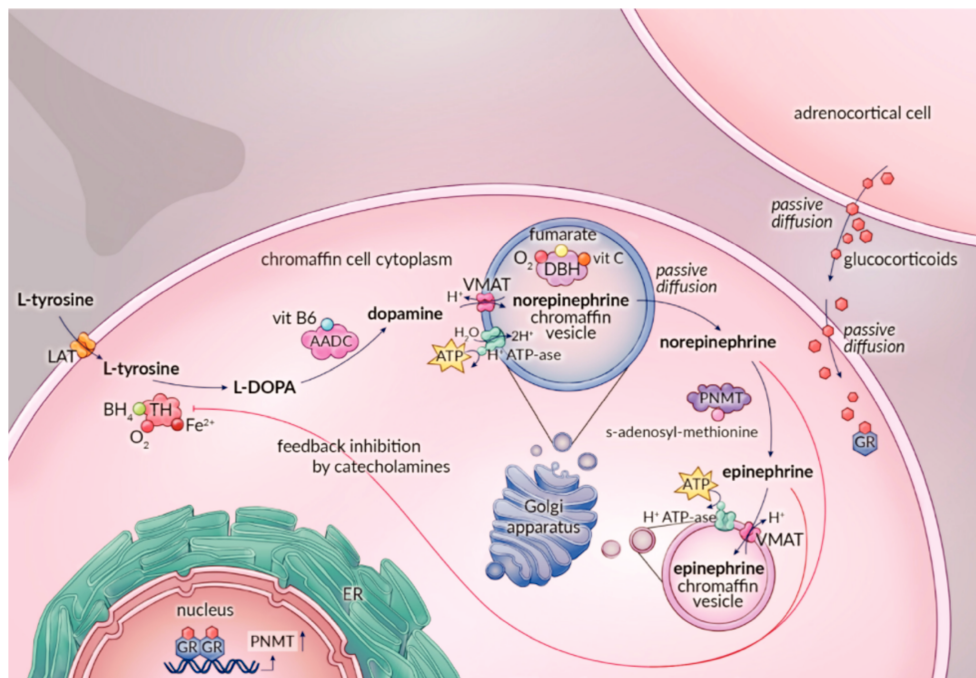


Figure 17 : Biosynthèse des catécholamines dans les cellules chromaffines (Berends & al, 2019).

### 1.2.3. Classification moléculaire

Les PPGL sont des tumeurs neuroendocrines rares caractérisées par un fort déterminisme génétique. En effet, les PPGL sont les tumeurs présentant le plus grand nombre de mutations avec plus de 20 gènes de susceptibilité identifiés parmi lesquels on compte environ 40% de mutations germinales (Figure 17) [117]. D'autre part, des mutations somatiques de gènes connus comme étant impliqués dans la tumorigenèse sont retrouvées dans 30 à 40% des cas de patients ayant un PPGL. Trente pour cent (30%) des patients atteints d'un PPGL sont dits sporadiques, c'est-à-dire pour lesquels aucune mutation dans le panel des 20 gènes de susceptibilité n'a pu être identifiée (Figure 17) [99, 118–120]. Enfin, 12% des patients atteints d'un PPGL apparemment sporadique semblent être finalement porteurs de l'un des gènes de susceptibilité [121].

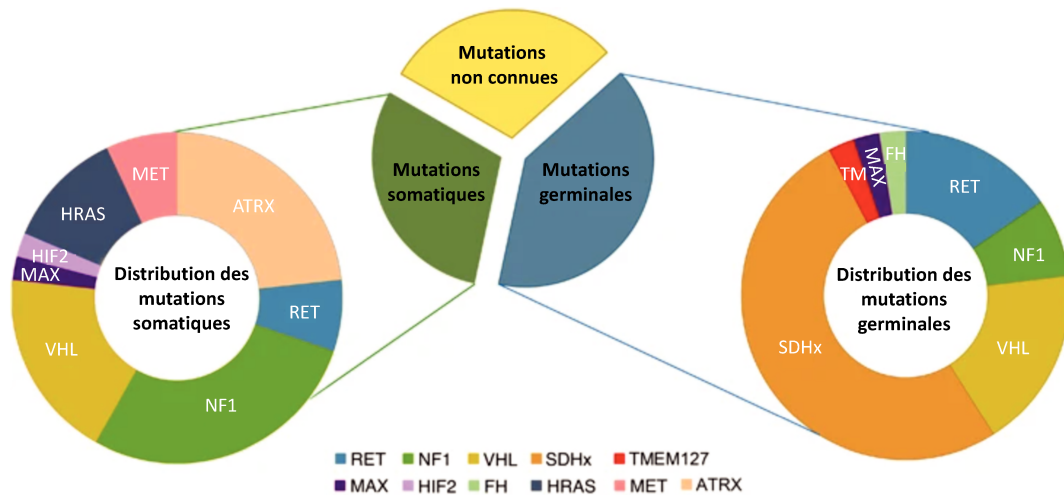


Figure 18 : Répartition des gènes mutés chez les patients atteints d'un PPGL (D'après Castro-vega et al., 2016).

L'Atlas du Génome du Cancer (TCGA) a divisé les PPGL en trois groupes selon leur profil moléculaire : le groupe associé à une **pseudohypoxie** (10-20% des cas), le groupe lié à des **dérégulations de la voie Wnt** (5-10% des cas) et le groupe associé à des **dérégulations de la voie des kinases** (50 à 60% des cas) (Figure 18) [122, 123]. Ces trois groupes sont caractérisés selon 2 critères :

- Une différenciation cellulaire croissante
- Un risque de développement métastatique décroissant

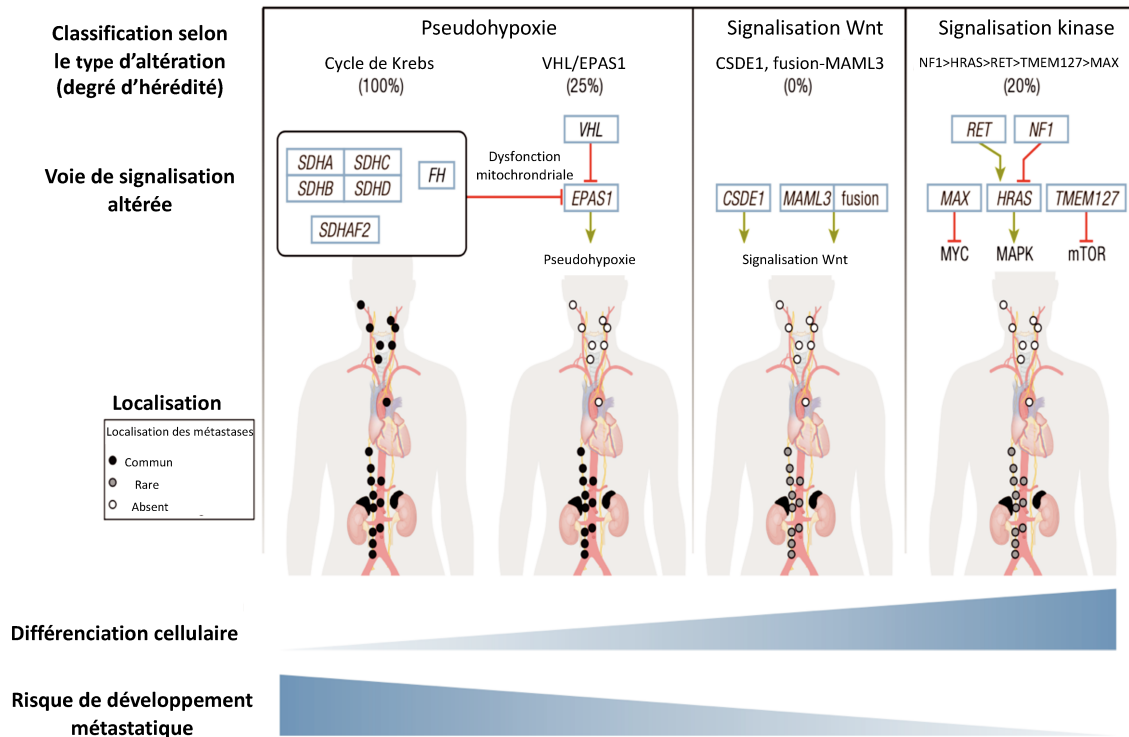


Figure 19 : Classification moléculaire des PPGL (D'après Crona & al, 2017).

### 1.2.3.1. Le cluster « pseudohypoxique »

Les patients de ce groupe peuvent sécréter de manière anormalement élevée de la noradrénaline et de la dopamine mais les sécrétions d'adrénaline restent dans les limites physiologiques [124].

Les mutations dans ce groupe concernent tout d'abord des gènes impliqués dans le cycle de Krebs : **FH** et **SDH**. Les mutations du gène codant pour la FH ont été récemment associées au développement des PPGL. Dans 40% des cas de PPGL FH muté, les patients présentent au diagnostic un PPGL métastatique ou multiple sans sécrétion associée [61, 79].

Dans les années 2000, la découverte des mutations des gènes codant pour les **sous-unités de la SDH** et le facteur d'assemblage **SDHAF2** a été majeure pour la compréhension de la tumorigenèse des PPGL. Ces gènes sont impliqués dans la moitié des cas de PPGL présentant une mutation héréditaires [125, 126]. Ces gènes sont dits suppresseurs de tumeurs et lorsqu'une mutation de l'un de ces gènes (**SDHA, SDHB, SDHC, SDHD**) est associée à une perte d'hétérozygotie somatique, suivant l'hypothèse de Knudson (modèle du « two-hit »), cela induit une perte de fonction totale de la SDH, une accumulation du succinate, et le développement d'un paragangliome ou d'un phéochromocytome [79, 127]. Ces mutations germinales sont transmises de manière autosomique dominante pour les gènes **SDHA, SDHB**

et *SDHC* et associées à une transmission paternelle pour les gènes *SDHD* et *SDHAF2*. Cependant la transmission maternelle a été récemment évoquée et associée à un risque de développement d'un PPGL dans 5% des cas [128].

Les mutations *SDHD* sont associées dans 97% des cas à un paragangliome cervical et multiple<sup>1</sup> dans 2/3 des cas. La pénétrance est estimée à 86% à l'âge de 50 ans [112, 129].

Les mutations germinales *SDHB* prédisposent à un PPGL abdominal, cervical ou multiple dans respectivement, 60%, 40% et 20% des cas [95]. La pénétrance est estimée à 50% à l'âge de 50 ans [130]. Une mutation *SDHB* est un facteur de **prédisposition de la malignité** et est retrouvée dans 36% des cas de patients présentant un PPGL métastatique [112, 129, 131, 132]. Ces patients ont une **survie médiane de 6,7 années** après le diagnostic des métastases. Cependant, il est important de noter qu'à stade égal de la maladie en comparaison à un PPGL sporadique, la présence d'une mutation *SDHB* n'est pas forcément associée à un plus mauvais pronostic, contrairement à ce qui a pu être décrit ces dernières années [133, 134]. D'autre part, des mutations *SDHB* associées à des mutations somatiques des gènes *ATRX* ou *TERT* ont été décrites dans le phénomène d'immortalisation cellulaire [95].

Les gènes *SDHA*, *SDHC* et *SDHAF2* sont beaucoup plus rarement impliqués dans l'oncogenèse des PPGL. Les mutations *SDHC* sont retrouvées en majorité dans les paragangliomes cervicaux [112]. Soixante-dix pour cent (70%) des patients atteints d'une mutation *SDHA* présentent un paragangliome cervical, et 16% des PPGL sont d'origine abdominale ou thoracique [135]. Les mutations *SDHAF2* ont quant à elles été décrites chez très peu de patients qui en l'occurrence présentaient un paragangliome cervical seul ou multiple bénin [136, 137].

D'autres gènes mutés sont également retrouvés dans ce groupe, notamment ceux codant pour le syndrome de **Von Hippel-Lindau** (VHL), 24% des cas de patients *VHL* muté développant un PPGL [95]. Il existe deux types de maladies VHL : le **type 1** et le **type 2** associés respectivement à un faible et à un haut risque de développement de PPGL. Les patients atteints d'une mutation *VHL* développent souvent un PPGL avant l'âge de 20 ans, localisé dans la médullosurrénale (bilatéral dans 40 à 60% des cas) ou dans l'abdomen. Les histoires familiales de mutations *VHL* associées à la survenue d'un PPGL sont retrouvées dans 2 cas sur 3 [131].

Deux autres gènes ont été identifiés dans la survenue des PPGL pseudo-hypoxiques : *EPAS1*, également appelé *HIF2 $\alpha$*  et *EGLN1*, également appelé *PHD2*. Ces deux gènes codent pour des protéines impliquées dans la réponse hypoxique. Des mutations somatiques « gain de fonction » du gène *EPAS1* ont été retrouvées chez des patients atteints d'un PPGL qui peut être multiple dans 50% des cas et apparaît à

---

<sup>1</sup> Maladie présentant plusieurs localisations primaires

un jeune âge [138–141]. D'autre part, des mutations germinales « perte de fonction » du gène *EGLN1* ont été décrites chez deux patients atteints d'un PPGL accompagné d'une polyglobulie [142, 143]. Enfin, une nouvelle mutation germinale de l'isoforme du gène *PHD1* a été identifiée en 2015. Elle entraîne une perte de fonction de la protéine « Prolyl-Hydroxylase Domain » (PHD) et une activation du facteur induit par l'hypoxie, HIF2 $\alpha$ , contribuant ainsi au développement d'un phéochromocytome [143].

### 1.2.3.2. Le cluster « signalisation Wnt »

Récemment, un nouveau groupe a été décrit par le TCGA : celui regroupant les mutations associées aux **altérations de la voie Wnt**. Plus particulièrement, des mutations somatiques des gènes *CSDE1* et *MAML3* activant les voies de signalisation Wnt et Hedgehog ont été retrouvées dans des cas de phéochromocytomes. Aucun cas de mutations germinales n'a été décrit à ce jour et les patients porteurs de ces mutations présentaient un phéochromocytome localisé ou métastatique [123].

### 1.2.3.3. Le cluster « signalisation des kinases »

Les PPGL de ce groupe sont souvent sécrétants, généralement bénins mais peuvent être associés à un haut risque de récurrence et au développement d'une forme multiple de la maladie [124].

Le gène codant pour la **neurofibromatose de type 1** (*NF1*) est retrouvé muté dans 0,1-5,7% des cas pour lesquels le diagnostic d'un PPGL survient à un âge médian de 40 ans [131, 144]. Dans ce contexte, les PPGL sont métastatiques dans 10% des cas et bilatéraux dans 20 à 40% des cas [144].

Les mutations du proto-oncogène codant pour un récepteur à activité tyrosine kinase, *RET*<sup>1</sup>, sont très souvent associées à la survenue d'une néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM2). Ces mutations sont notamment retrouvées dans trois phénotypes différents :

- Les **NEM2A** (apparition d'un carcinome médullaire de la thyroïde, d'un phéochromocytome et d'un hyperparathyroïdisme)
- Les **NEM2B** ou syndrome de Gorlin (apparition d'un carcinome médullaire de la thyroïde, d'un phéochromocytome, de névromes muqueux, une gangliomatose de l'estomac ou de l'intestin et un habitus marfanoïde)
- Le carcinome médullaire de la thyroïde familial (CMTF) ou syndrome de Farndon

---

<sup>1</sup> *Rearranged During Transfection*

Les phéochromocytomes sont retrouvés dans 50% des NEM2A et NEM2B à un âge médian de 30 ans et sont bilatéraux dans les 2 cas sur 3 [129, 131, 145].

Les mutations du gène *TMEM127*, régulateur négatif de la voie mTOR, ont été découvertes plus récemment (2010) et sont notamment associées aux phéochromocytomes familiaux et aux nouvelles formes syndromiques de PPGL. Ces mutations prédisposent à un phéochromocytome sécrétant, bilatéral dans 15 à 65% des cas, apparaissant à un âge médian de 35 ans [146, 147].

Des mutations du gène *HRAS*, qui code pour la GTP<sup>1</sup>ase HRAS impliquée dans la division cellulaire, ont également été associées à la survenue de PPGL et ont été découvertes dans le cas de patients qui semblaient être sporadiques. De plus, ces mutations sont uniquement d'origine somatique [148–150]. Des mutations du gène *MAX* ont également été retrouvées dans des cas de PPGL. Le gène *MAX* code pour un facteur de transcription de type « *leucine zipper* » et fait partie du réseau MYC/MAX/MXD, impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose [151, 152]. Les PPGL *MAX* muté sécrètent souvent de la noradrénaline et leur développement apparaît en moyenne à l'âge de 34 ans. Les patients porteurs de mutation *MAX* développent soit un paragangliome abdominal soit un phéochromocytome qui peut être bilatéral dans 50% des cas avec la présence d'une maladie dite familiale dans 40% des cas [153].

#### 1.2.3.4. Les nouveaux gènes de susceptibilité

De nouveaux gènes de susceptibilité ont été identifiés dans quelques cas de patients atteints d'un PPGL mais n'ont pas encore été référencés par le TCGA.

Une mutation du gène *IRP1* a été découverte dans le cas d'un phéochromocytome associé à une polyglobulie. IRP1 est un régulateur du métabolisme cellulaire du fer. Dans les cellules déficientes en fer, une délétion de ce gène entraîne une perte de fonction de la protéine IRP1 ce qui a pour conséquence une stabilisation de HIF2 $\alpha$  et une stimulation de l'expression de l'érythropoïétine (EPO) [154–156].

Une mutation germinale du gène codant pour la **malate déshydrogénase de type 2** (*MDH2*) a été décrite chez 5 patients présentant un PPGL multiple et métastatique chez 2 cas [157, 158]. MDH2 est une enzyme du cycle de Krebs qui convertit le malate en oxaloacétate et est également impliquée dans la navette malate-asparte.

---

<sup>1</sup> *Guanosine triphosphatase*

Une mutation « gain de fonction » du gène **GOT2**, codant pour la transaminase mitochondriale glutamate-oxaloacétate et faisant également partie de la navette malate-aspartate a été observée chez un patient atteint d'un PPGL multiple métastatique [159].

Des mutations germinales du gène **SLC25A11** ont été identifiées chez 8 patients présentant un paragangliome abdominal métastatique dont 6 avaient plus de 50 ans. Ce gène code pour un transporteur 2-oxoglutarate-malate et fait partie également de la navette malate-aspartate [160].

Une mutation récurrente du gène **DLST** a été retrouvée chez 4 patients présentant un PPGL multiple [161]. Ce gène code pour une S-succinyltransférase dihydrolipoamide impliquée dans le complexe protéique de l' $\alpha$ -kétoglutarate déshydrogénase, enzyme du cycle de Krebs qui catalyse la transformation de l' $\alpha$ -kétoglutarate ( $\alpha$ KG) en succinyl-CoA.

Des mutations germinales et somatiques des gènes **MET** et **MERTK** ont été associées à la survenue de PPGL [148, 162]. Ces oncogènes sont notamment impliqués dans la voie de signalisation des MAPK.

Des mutations germinales et somatiques de gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN ont été également identifiées. C'est notamment le cas du gène **H3F3A** retrouvé muté chez 2 patients atteints d'un PPGL multiple associé à des tumeurs osseuses à cellules géantes [162] ; du gène **DNMT3A** retrouvé chez un patient atteint d'un PPGL multiple et un patient atteint d'un PPGL dans un contexte familial [163] ; du gène **KIF1B $\beta$**  retrouvé chez 2 patients mais dont le rôle dans la tumorigenèse des PPGL n'a pas été réellement prouvé à ce jour [164, 165].



## 1.2.4. Diagnostic de la maladie

### 1.2.4.1. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques des patients sont souvent le premier critère permettant d'évoquer le diagnostic d'un PPGL. Selon le NIH, elles sont souvent liées à un **excès de sécrétion catécholaminergique**. L'un des symptômes les plus fréquents est une **forte hypertension** qui peut être difficile à contrôler et peut entraîner des palpitations cardiaques fortes, rapides ou irrégulières. Des maux de tête, une transpiration abondante, une appréhension ou une anxiété morbide, des tremblements et une pâleur extrême peuvent également accompagner l'hypertension. Cette dernière est absente dans 10 à 20% des cas et au contraire paroxystique<sup>1</sup> dans 30% des cas [166]. Dans de rares cas, la crise catécholaminergique peut être accompagnée d'une cardiomyopathie aigüe, d'une hypertension sévère, d'une encéphalopathie, d'une hyperglycémie, d'une fièvre, d'une acidose lactique et d'une défaillance de l'un des organes [167]. Selon la localisation du PPGL des symptômes plus rares peuvent y être associés dont la présence d'une masse palpable, d'une toux, d'une voix rauque, d'une dysphagie, d'une perte d'audition, d'acouphènes, d'une paralysie des nerfs crâniens, de douleurs abdominales, d'une hématurie ainsi que de saignements gastro-intestinaux [90, 168–170].

### 1.2.4.2. Imageries

La place de l'imagerie (conventionnelle et fonctionnelle) dans la prise en charge d'un PPGL est primordiale. En effet, selon le type d'imagerie et la forme de PPGL développée (+/- métastatique ; +/- mutations), le diagnostic de la présence de la maladie, la caractérisation de son extension et de son suivi est possible.

- Les imageries conventionnelles

Le diagnostic de la présence d'une masse localisée provenant d'un paragangliome ou d'un phéochromocytome peut se faire par le biais d'imageries radiologiques conventionnelles telles que **l'imagerie par résonance magnétique (IRM)** ou la **tomodensitométrie** autrement appelée « computed tomography » (CT). L'utilisation de la tomodensitométrie est recommandée par rapport à l'IRM du fait de son excellente résolution spatiale pour le thorax, l'abdomen et le pelvis [171]. Cependant, l'utilisation de l'IRM est privilégiée dans différents cas : en présence d'un PPGL métastatique, pour la détection d'un

---

<sup>1</sup> Associé au plus haut degré d'intensité

paragangliome à la base du crâne et du cou ou chez des patients porteurs de clips chirurgicaux ou des patients pour lesquels l'exposition aux rayonnements doit être limitée (enfants, femmes enceintes, sujets apparentés sains des patients atteints d'un PPGL familial) ou si le patient est allergique aux agents de contraste du CT [171].

D'autre part, le primo-diagnostic d'un PPGL par imagerie radiologique conventionnelle n'est suffisant que si la masse est localisée dans la surrenale et associée à un taux très élevé de métanéphrines (métabolites produits lors de la dégradation des catécholamines). Dans le cas où le site est différent de la surrenale, l'utilisation d'imageries fonctionnelles basées sur l'activité métabolique de la cellule cancéreuse spécifique aux PPGL peut être envisagée pour confirmer l'origine de la tumeur [172–174].

- Les imageries fonctionnelles

**La scintigraphie par [<sup>123</sup>I]Iobenguane/[<sup>123</sup>I]méta-iodobenzylguanidine (MIBG)** utilise un analogue de la guanidine, structurellement proche de la norépinéphrine. Le radiotracer MIBG et la norépinéphrine suivent la même voie de transport jusqu'au cytoplasme et sont stockés dans les granules neuro-sécrétoires via les transporteurs vésiculaires de monoamines (VMAT). Le MIBG a la particularité de se concentrer spécifiquement dans les tissus sécrétant des catécholamines facilitant la détection d'une masse tumorale [175]. La sensibilité et la spécificité de cette technique chez des patients atteints d'un phéochromocytome sont respectivement de 83-100% et 95-100%. Cependant, cette technique n'est pas recommandée dans les cas suivants : si le patient est porteur d'une mutation *SDHB* ou si le PPGL est métastatique, réduisant la positivité du diagnostic à moins de 50% [176].

**La scintigraphie au pentétréotide** marqué à l'**indium-111** (<sup>111</sup>In) est également recommandée pour le diagnostic des PPGL. Le pentétréotide est un conjugué diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) de l'octréotide qui est un analogue de la somatostatine (SSA) à longue durée d'action. Ce radiotracer se lie spécifiquement aux récepteurs de la somatostatine, surexprimés sur les membranes cellulaires de nombreuses cellules neuroendocriniennes dont les PPGL [175]. Cette technologie a une meilleure sensibilité que l' [<sup>123</sup>I]-MIBG pour le diagnostic des paragangliomes de la tête et du cou [177, 178].

**La tomographie par émission de positons (TEP)** marqué au **gallium-68** (<sup>68</sup>Ga), **couplée à des analogues de la somatostatine** ([<sup>68</sup>Ga]-DOTA-SSA) regroupe 3 technologies différentes : le DOTA-Tyr3-octréotide (DOTATOC), le DOTA-Tyr3-octréotate (DOTATATE) et le DOTA-Nal3-octréotide (DOTANOC). Cette imagerie est basée sur le ciblage des différents isoformes des récepteurs à la somatostatine (SSTR) tels que le SSTR2 et SSTR1 qui sont les plus surexprimés dans les PPGL ainsi que SSTR3, SSTR4 et SSTR5 qui sont un petit peu moins spécifiques que les deux précédents [179]. La TEP [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-SSA est très

utile pour détecter les masses tumorales extra-surrénales, les PPGL métastatiques ainsi que les PPGL *SDH* muté et est plus sensible que la scintigraphie [<sup>123</sup>I]-MIBG [175, 180, 181].

La TEP marquée à la **fluorodopa** (<sup>18</sup>F), [<sup>18</sup>F]FDOPA est basée sur le principe que les PPGL peuvent capter et décarboxyler la DOPA<sup>1</sup>. De ce fait, le [<sup>18</sup>F]FDOPA pourra être converti en [<sup>18</sup>F]fluorodopamine avant d’être stocké dans les vésicules neurosécrétoires, facilitant la détection des PPGL. La TEP [<sup>18</sup>F]FDOPA a une sensibilité et une spécificité respectivement, de 79% et 95% pour détecter la présence d’un PPGL [182]. Enfin la sensibilité de cette imagerie est supérieure dans les PPGL sporadiques aux *SDH* muté, que la maladie soit localisée ou métastatique [183, 184].

La TEP marquée au **fluorodésoxyglucose** (<sup>18</sup>F), [<sup>18</sup>F]FDG est basée sur la captation du glucose. Le [<sup>18</sup>F]FDG est phosphorylé en [<sup>18</sup>F]FDG-6P représentant l’activité glycolytique de la cellule tumorale. Cet effet est notamment accentué dans le cas des PPGL *SDH* muté qui entraînent une dérégulation de l’activité du cycle de Krebs permettant une meilleure captation du radiotracer [185, 186]. La sensibilité de ce type d’imagerie est relativement élevée (80-100%) tandis que la spécificité est moins bonne. L’utilisation de la TEP [<sup>18</sup>F]FDG semble notamment être pertinente dans le cas des PPGL métastatiques *SDHB* muté [175].

Selon *Taïeb et al.*, le choix pertinent du type d’imagerie dépend notamment des caractéristiques de la maladie. Les auteurs préconisent en premier choix l’utilisation de la TEP [<sup>18</sup>F]FDOPA ou du [<sup>123</sup>I]-MIBG pour les **phéochromocytomes apparemment sporadiques**. La TEP [<sup>18</sup>F]FDOPA est également recommandée dans le cas des **phéochromocytomes familiaux hors mutations SDH**. Enfin, le [<sup>68</sup>Ga]-SSA est préconisé dans le cas des **paragangliomes sporadiques de la tête et du cou** et des **PPGL extra-surrénaux sympathiques et/ou multifocaux et/ou métastatiques et/ou présentant une mutation SDH** (Tableau 2).

**Tableau 2** : Recommandations du type d’imagerie à pratiquer selon le statut moléculaire de la maladie (PPGL) (D’après *Taïeb&al*; 2019).

	Première intention	Seconde intention	Troisième intention si [ <sup>18</sup> F]FDOPA ou [ <sup>68</sup> Ga]SSA n’est pas disponible
Phéochromocytome (sporadique)	[ <sup>18</sup> F]FDOPA ou [ <sup>123</sup> I]MIBG	[ <sup>68</sup> Ga]SSA	[ <sup>18</sup> F]FDG
Phéochromocytome héréditaire (sauf <i>SDH</i> ): <i>NF1/RET/VHL/MAX</i>	[ <sup>18</sup> F]FDOPA	[ <sup>123</sup> I]MIBG ou [ <sup>68</sup> Ga]SSA	[ <sup>18</sup> F]FDG
Paragangliome de la tête et du cou (sporadique)	[ <sup>68</sup> Ga]SSA	[ <sup>18</sup> F]FDOPA	[ <sup>111</sup> In]SSA/[ <sup>99m</sup> Tc]SSA
Paragangliome sympathique extra-surrénalien et/ou PPGL multifocal et/ou PPGL métastatique et/ou PPGL <i>SDH</i> muté	[ <sup>68</sup> Ga]SSA	[ <sup>18</sup> F]FDG et [ <sup>18</sup> F]FDOPA	[ <sup>18</sup> F]FDG et [ <sup>123</sup> I]MIBG ou [ <sup>18</sup> F]FDG et [ <sup>111</sup> In]SSA/[ <sup>99m</sup> Tc]SSA

<sup>1</sup> *Dihydroxyphénylalanine*

### 1.2.4.3. Les marqueurs biologiques

Plusieurs marqueurs biologiques circulants et tissulaires sont couramment utilisés pour le diagnostic des PPGL en lien avec la sécrétion excessive de catécholamines.

- Les marqueurs circulants

Parmi les marqueurs biologiques circulants, la quantification des **métanéphrines** et de la **chromogranine A** (CgA) est primordiale pour le diagnostic de la maladie.

Comme décrits précédemment, les métanéphrines est le nom donné à un ensemble regroupant la métanéphrine, la normétanéphrine et la 3-méthoxytyramine. Il s'agit des métabolites de dégradation des catécholamines qui sont quantifiables chez les patients atteints d'un PPGL pour déterminer le profil sécrétoire de la tumeur. Quatre-vingt pour cent (80%) des patients atteints d'un PPGL ont des taux de **métanéphrines** supérieurs à 2 fois la normale, ce qui est un indicateur fort pour le diagnostic de la maladie. Leur quantification se fait actuellement dans deux matrices (**plasma** et **urine**) et selon deux technologies différentes (**LC-ECD**<sup>1</sup> et **LC-MS/MS**<sup>2</sup>) [99, 187, 188]. D'un point de vue analytique, il est conseillé de quantifier les métanéphrines par LC-MS/MS du fait de meilleures sensibilité, spécificité et précision [188, 189].

Dans un premier temps, la mesure des formes déconjuguées et libres de la métanéphrine, de la normétanéphrine et de la 3-méthoxytyramine est possible dans le plasma et dans l'urine. La quantification des formes libres de métanéphrine et de normétanéphrine est à privilégier pour diagnostiquer la présence d'un PPGL [171, 190]. La mesure plasmatique de la 3-méthoxytyramine est quant à elle utile dans le cas où les PPGL sécrètent de la dopamine (produit de dégradation de la dopamine). La précision diagnostique est sensiblement équivalente entre la quantification des métanéphrines dans le plasma et celle dans l'urine chez des patients à faible risque de développement d'un PPGL. Cependant, elle est supérieure dans le plasma à celle dans l'urine chez des patients à haut risque de développer la maladie, dans le contexte de surveillance [189–191]. Actuellement, la quantification des métanéphrines déconjuguées dans des urines de 24h, est toujours pratiquée dans de nombreux laboratoires de biologie médicale. Cependant il a été observé que cette méthodologie entraîne une hausse de résultats faux-positifs et que la quantification des métanéphrines libres est à privilégier [99].

---

<sup>1</sup>Chromatographie liquide couplée à la détection électrochimique

<sup>2</sup>Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Des valeurs seuils pour la normétanéphrine, la métanéphrine et la 3-méthoxytyramine ont été déterminées lorsque les métabolites sont sous forme libre dans le plasma et dans l'urine ou sous forme déconjuguée dans l'urine. Elles ont été ajustées selon l'âge et optimisées afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de chaque valeur seuil par LC-MS/MS (**Tableau 3**) [192]. D'autre part, il est important de souligner que certaines prises médicamenteuses sont à l'origine d'une sécrétion de métanéphrines sans lien avec un PPGL et peuvent par conséquent fausser le résultat de métanéphrines plasmatiques libres. Parmi elles, l'activation du système sympathique et la prise de médicaments de la classe des antidépresseurs, la phénoxybenzamine, les inhibiteurs de la mono-amine oxydase (MAO), les sympathomimétiques et la Levodopa sont impliquées dans ce phénomène [99, 193].

**Tableau 3** : Valeurs cibles de normétanéphrines, métanéphrines et 3 méthoxytyramine libres dans le plasma et l'urine ou déconjugués dans l'urine (pmol/L) ; H : homme ; F : femme (D'après *Eisenhofer& al, 2019*).

Valeur cible sélectionnée	Plasma libre	Urinaire libre	Urinaire déconjugué
Normétanéphrine	542-1092	H :280 – F : 242	H : 2708 – F : 2313
Métanéphrine	446	H :299 – F : 248	H :2051 – F : 1408
3-méthoxytyramine	107	H :751 – F : 550	H :6793 – F : 5853
Sensibilité (%)	97,9	93,4	92,9
Spécificité (%)	94,2	94,2	92,1

Enfin, le choix de la quantification du type de métanéphrine dépend également du statut mutationnel des patients atteints d'un PPGL. Les mutations des gènes impliqués dans le groupe « signalisation des kinases » (*RET, NFI*) entraînent généralement une augmentation des taux circulants de la métanéphrine et de la normétanéphrine. Dans le cas des patients atteints d'une mutation d'un gène impliqué dans le groupe « pseudohypoxique », la normétanéphrine est à privilégier et la 3-méthoxytyramine plasmatique est également à inclure.

**La chromogranine A (CgA)** est l'autre marqueur biologique circulant, couramment utilisé dans le diagnostic et le suivi de patients atteints d'un PPGL. La CgA est une protéine sécrétée par les cellules chromaffines, que l'on retrouve liée aux catécholamines lorsque ces dernières sont stockées dans les granules de sécrétions. De ce fait, la CgA peut représenter le volume et la sécrétion tumoral [113]. De ce fait, la CgA est devenue un marqueur important dans le diagnostic des TNE<sup>1</sup> dont les PPGL [194]. Des valeurs élevées de CgA stockées ou/et sécrétées avec les catécholamines peuvent indiquer la présence d'une masse tumorale mais également la malignité du PPGL [195]. La CgA est notamment libérée par les cellules tumorales par exocytose et la quantification de CgA libre est corrélée à la masse tumorale,

<sup>1</sup> Tumeur neuroendocrine

faisant de la CgA un marqueur sensible et spécifique pour le diagnostic des PPGL [196–198]. Des études comparant l'utilité de la CgA en complément de la mesure des métanéphrines par des tests radio-immunologiques ont montré que la CgA (valeur normale <150 µg/L) avait une sensibilité et une spécificité respectivement de 90% et 99% montrant l'utilité de ce biomarqueur plasmatique en complément des métanéphrines pour diagnostiquer les PPGL [199, 200].

- Les marqueurs tissulaires

Si la biopsie d'une tumeur de patient atteint d'un PPGL est disponible, une caractérisation du profil anatomopathologique doit être réalisée. Une coloration par l'**hématoxyline**, l'**éosine** et le **safran** (HES) permet d'identifier respectivement le noyau, le cytoplasme et les fibres de collagène de la cellule cancéreuse. La coloration HES permet notamment de décrire les caractéristiques communes aux cellules de PPGL. Par immunohistochimie (IHC), des marqueurs protéiques complémentaires tels que le **Ki67**, reflétant la prolifération cellulaire, sont associés à la coloration HES afin de compléter le **PASS**<sup>1</sup> [201, 202]. Ce dernier a été établi par *Thompson et al.*, et regroupe différents critères permettant de donner un score de malignité aux PPGL. Ces critères correspondent à (**Tableau 4**) :

- L'invasion capsulaire et cellulaire
- L'extension dans le tissu adipeux péri-surrénalien
- Une excroissance diffuse de plus de 10% du volume tumoral
- Une nécrose abondante
- Une forte cellularité
- Un enroulement des cellules tumorales même lorsqu'elles sont focales
- Une monotonie cellulaire
- Une augmentation de la mitose et l'observation de mitoses atypiques
- Un profond polymorphisme nucléaire
- Une hyperchromasie nucléaire

---

<sup>1</sup> *Pheochromocytoma of Adrenal Gland Scaled Score*

**Tableau 4 :** Représentation du score gradué de phéochromocytome (Pheochromocytoma of Adrenal Gland Scaled Score, PASS) (D'après *De Wailly & al, 2012*).

Caractéristique microscopique	Score
Invasion capsulaire	1
Invasion vasculaire	1
Extension dans le tissu adipeux péri-surrénalien	2
Présence d'excroissance diffuse (> 10% du volume tumoral)	2
Nécrose de la tumeur centrale ou confluyente	2
Forte cellularité	2
Enroulement des cellules tumorales même lorsqu'elles sont focales	2
Monotonie cellulaire	2
Augmentation des figures mitotiques	2
Figures mitotiques atypiques	2
Polymorphisme nucléaire profond	1
Hyperchromasie nucléaire	1

D'autres marquages IHC peuvent être réalisés pour compléter la caractérisation anatomo-pathologique:

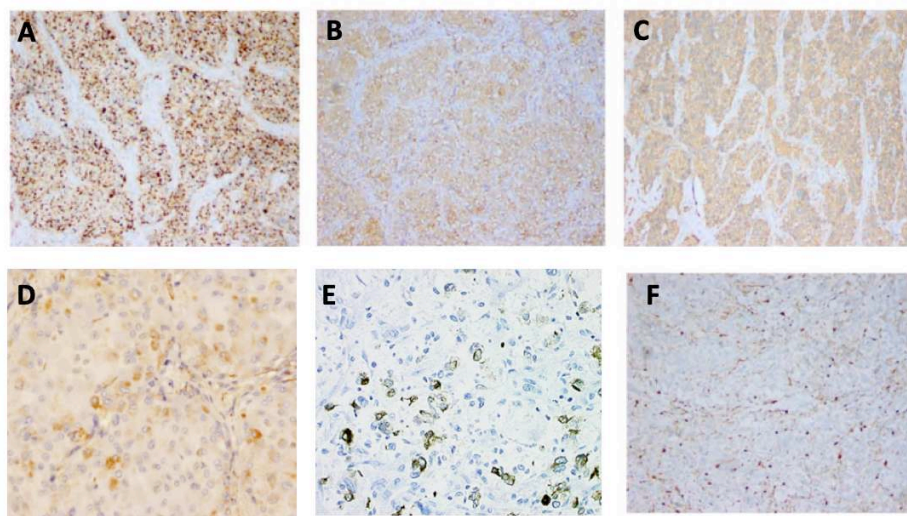
- La **chromogranine A** dont le marquage peut être réalisé en complément du dosage sérique, permettant l'identification de cellules différenciées et associées à un profil sécrétoire de catécholamines (**Figure 19A**) [199, 203].
- L'**énolase neuro-spécifique** (NSE) qui est généralement positive dans les PPGL, mais qui ne permet cependant pas de différencier les tumeurs bénignes<sup>1</sup> des tumeurs malignes<sup>2</sup> (**Figure 19B**) [204].
- La **synaptophysine** qui est une glycoprotéine souvent retrouvée dans les tumeurs neuroendocrines et plus particulièrement dans les PPGL. Son expression en IHC est différente selon le statut de malignité de la tumeur. En effet, la positivité de la synaptophysine est plus fréquente dans les PPGL malins que bénins (**Figure 19C**) [204].
- La **vimentine** et la **desmine** sont des membres de la famille des filaments intermédiaires qui peuvent être recherchés en IHC dans les tumeurs de PPGL. Une étude a notamment montré que la positivité de la vimentine est associée plus souvent à des tumeurs bénignes que malignes (**Figure 19D**) [205, 206].
- Les **cytokératines de type AE1 et AE3** sont également couramment testées. Leur absence d'expression est corrélée au diagnostic des tumeurs de PPGL ce qui permet de les distinguer

<sup>1</sup> Excroissance ne présentant pas les caractéristiques d'une cellule cancéreuse, n'envahissant pas les tissus voisins et ne se propageant pas à d'autres parties du corps

<sup>2</sup> Cellules anormales se divisant sans contrôle, pouvant envahir les tissus voisins et se propageant à d'autres parties du corps par les systèmes sanguins et lymphatiques

des autres TNE (**Figure 19E**) [207].

- **La protéine S100** ou pS100 est synthétisée par les cellules astrogliales lui conférant le rôle de marqueur des cellules neuroendocriniennes. Son expression en IHC est notamment retrouvée dans les cellules sustentaculaires des PPGL. Plusieurs études ont montré que pS100 est également un marqueur de la malignité dans les PPGL car son expression est généralement retrouvée dans les tumeurs bénignes tandis que son absence d'expression est plutôt retrouvée dans les tumeurs malignes (**Figure 19F**) [201, 208–210].



**Figure 20** : Illustration des différents immuno-marquages réalisés dans le diagnostic et la caractérisation de tissus tumoraux provenant de patients atteints de PPGL.

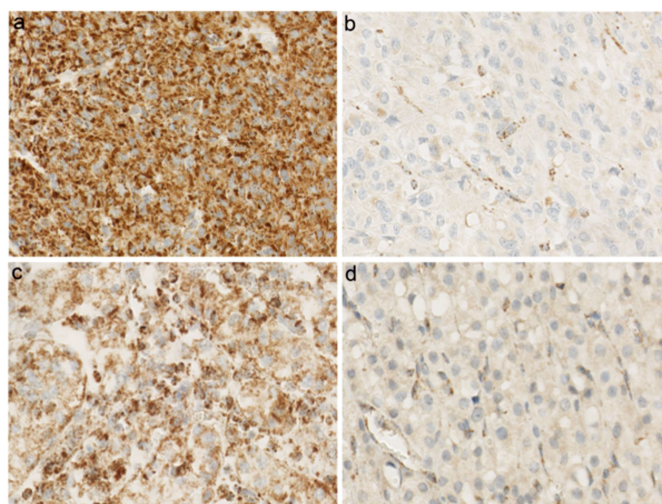
**A.** Marquage de la chromogranine A (X100) (D'après *Yu & al, 2020*) ; **B.** Marquage de la NSE (X100) (D'après *Yu & al, 2020*) ; **C.** Marquage de la synaptophysine (X100) (D'après *Yu & al, 2020*) ; **D.** Marquage de la vimentine (X100) (D'après *Feng & al, 2009*) ; **E.** Marquage des cytokératines AE1 et AE3 (X100) (D'après *Dermawan & al, 2019*) ; **F.** Marquage de la pS100 (X100) (D'après *Yu & al, 2020*)



## 1.2.5. Diagnostic des mutations *SDH*

### 1.2.5.1. L'immunohistochimie

Une technique couramment utilisée en clinique pour diagnostiquer les mutations *SDH* sur pièce tumorale est l'immunohistochimie (IHC). Le diagnostic est basé sur un **double immunomarquage** des protéines **SDHA** et **SDHB**. Lorsque le **marquage SDHB** est **négatif** mais que le **marquage SDHA** est **positif** cela signifie qu'il est fortement probable que le patient soit porteur d'une **mutation *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*** ou ***SDHAF2***. La perte de marquage SDHB dans le cas des tumeurs *SDH* muté est liée au fait que l'ensemble du complexe SDH devient instable et que la sous-unité B est dégradée dans le cytoplasme, tandis que l'immunomarquage de la sous-unité A reste quant à lui préservé [211, 212]. En revanche, un **double marquage négatif SDHA/SDHB** est en faveur d'une **mutation *SDHA*** (**Figure 20**) [213].



**Figure 21** : IHC SDHA/SDHB sur des tissus *SDH*-WT et *SDH* muté.

**A.** Immunomarquage granulaire positif SDHA dans un GIST *SDH*-WT ; **B.** Immunomarquage négatif SDHA dans un GIST *SDHA* muté (coloration positive dans les cellules endothéliales comme contrôle positif) ; **C.** Immunomarquage positif SDHB dans un carcinome rénal à cellules claires *SDH*-WT ; **D.** Immunomarquage négatif SDHB dans un carcinome rénal à cellules claires *SDHB* muté (D'après *Oudijk & al, 2018*)

L'IHC est une technique considérée comme étant rapide, fiable, bon marché et présente une sensibilité et spécificité respectivement de 95% et 82% pour la détection de mutations *SDH* [214].

Cependant, il est fréquemment observé un faible immunomarquage diffus de SDHB dans le cytoplasme en particulier chez les PPGL *SDHD* muté pouvant entraîner des faux-positifs dans l'interprétation [215, 216]. Dans ce cas, il est intéressant de regarder la coloration des cellules endothéliales qui est généralement plus intense et granuleuse permettant de considérer que le marquage SDHB est négatif. Afin de pallier cette problématique, l'immunomarquage de la sous-unité SDHD s'est avéré complémentaire à l'interprétation par les anatomopathologistes [211, 217]. De manière assez surprenante, un marquage SDHD négatif est observé dans les tumeurs *SDH*-WT tandis que les tumeurs *SDH* muté ont un immunomarquage SDHD positif. Une hypothèse évoquée est que l'épitope de la protéine SDHD serait caché dans le domaine transmembranaire empêchant sa reconnaissance par l'anticorps (*SDH*-WT), tandis que lorsque le complexe SDH devient instable (*SDH* muté), l'épitope serait alors accessible permettant un marquage positif en IHC [217].

Bien que l'IHC soit très utile pour l'identification de mutations *SDH*, elle ne permet cependant pas de différencier les mutations *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* à partir d'un simple comarquage SDHA/SDHB. D'autre part, le variant impliqué dans ces mutations n'est pas non plus déterminé et cette méthode est inadaptée en l'absence de pièce tumorale. Dans ce cas, une approche alternative et complémentaire est réalisée : le **génotypage**.

#### 1.2.5.2. *Le génotypage par NGS*

Afin de confirmer et/ou définir le statut mutationnel, le génotypage est recommandé pour les patients dans un contexte de PPGL familial. Il est préconisé dans un premier temps d'extraire l'**ADN tumoral** lorsque celui-ci est disponible afin d'identifier la présence de mutations potentiellement impliquées dans le phénomène de tumorigenèse [126, 218]. Par la suite, ces mêmes mutations sont recherchées dans l'**ADN germinale** à partir d'un prélèvement sanguin ou salivaire. Cela permet de classer la mutation comme étant **somatique** ou **germinale**, ce qui est nécessaire pour optimiser la prise en charge du patient et de sa famille. Grâce à l'émergence dans les années 2000 des **méthodes de séquençage dites de nouvelle génération** (NGS), le séquençage du génome entier est désormais possible de manière rapide, précise et de plus en plus abordable [219].

Pour diagnostiquer la présence de mutations prédisposant à la survenue d'un PPGL, l'utilisation d'un **panel de gènes ciblés et validés par NGS** est actuellement recommandé [220, 221]. Ce panel comprend l'ensemble des gènes de prédispositions précédemment décrits et impliqués dans les différents clusters

« pseudo-hypoxique », « la voie de signalisation des kinases » et « les dérégulations de Wnt ». Concernant les gènes codant pour la SDH, un consensus préconise de distinguer 2 modalités de dépistage chez les apparentés sains potentiellement porteurs d'une mutation *SDH* en deux groupes selon la pénétrance de la mutation : un test génétique est recommandé à partir de l'âge de 5 ans si une mutation *SDHB* est recherchée contre 10 ans si c'est le cas d'une mutation *SDHA*, *SDHC*, *SDHD* ou *SDHAF2* [222]. En revanche, il n'y a pas de limite d'âge pour la recherche de mutations dans le cas où le patient est déjà atteint d'un PPGL.

On peut enfin noter que le NGS génère de nombreuses données à analyser, pouvant conduire à détecter de nouveaux variants à signification inconnue, nécessitant des investigations complémentaires pour confirmer l'implication de ces derniers dans la tumorigenèse des PPGL [125].

### 1.2.5.3. Émergence d'une nouvelle approche

Une piste émergente pour le diagnostic mutationnel de la SDH en complément de l'IHC et en attendant la confirmation par NGS, est la détection voire la quantification des métabolites dérégulés. En effet, la perte de fonction de la SDH entraîne une diminution de la production de fumarate et une accumulation du succinate qui joue le rôle d'oncométabolite. La quantification du succinate et/ou du ratio succinate/fumarate a été proposée pour évaluer la fonctionnalité enzymatique de la SDH et donc accéder indirectement à son statut mutationnel.

Dans une étude récente, une méthode de **spectroscopie par résonance magnétique** (<sup>1</sup>H-MRS) couplée à l'IRM, développée par une équipe de l'HEGP, a permis la détection de mutations *SDH* chez 49 patients atteints d'un PPGL avec de très bonnes sensibilité (87%) et spécificité (100%) [223]. Cependant, cette méthode reste qualitative, relativement « lourde » en lien avec la nécessité d'une imagerie IRM et uniquement adaptée aux patients atteints d'un PPGL.

Dans une autre étude, la quantification du ratio succinate/fumarate par **LC-MS/MS** dans des tumeurs *ex-vivo* s'est avérée très sensible (99,2%). Outre ce ratio, la mise en place d'algorithmes d'apprentissage automatiques a permis d'établir des modèles prédictifs afin d'interpréter les données de métabolomique. La combinaison de l'IHC avec le profilage métabolique a permis d'obtenir 185 prédictions correctes du statut mutationnel sur 186 tumeurs analysées [224]. L'utilisation de la LC-MS/MS semble être une alternative à la <sup>1</sup>H-MRS car cette méthode est robuste, rapide, bon marché et adaptée au diagnostic indirect de la présence des mutations *SDH* chez des patients atteints d'un PPGL à partir d'un prélèvement sanguin ou urinaire. Cet aspect sera discuté dans les prochains paragraphes [225, 226]. On peut d'ores et déjà noter que cette approche, certes prometteuse, est encore au stade de développement et n'a pas encore une place en pratique clinique.

## 1.2.6. Prise en charge des PPGL

### 1.2.6.1. Les traitements de référence

A ce jour, la **résection chirurgicale**, lorsqu'elle est possible, est le seul traitement curatif des PPGL. Associée, une prise en charge pré-opératoire est particulièrement importante pour éviter le risque d'hypotension suite à la résection de la tumeur qui peut être à l'origine d'un relargage abondant de catécholamines lorsque le PPGL est fonctionnel. Il est donc recommandé d'administrer aux patients des **inhibiteurs des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques** avant chirurgie [171]. Les techniques chirurgicales les plus fréquemment pratiquées afin de minimiser les gestes invasifs sont la laparoscopie transabdominale et la rétro-péritonéoscopie qui n'affectent que très peu l'hémodynamique intra-opératoire [227, 228]. Lorsque la tumeur est extra-surrénalienne, la quantité de catécholamines sécrétée est moindre n'impliquant pas forcément un traitement pré-opératoire. Cependant, dans ce cas précis la résection chirurgicale n'est pas toujours possible, souvent liée au fait que les tumeurs sont à un stade avancé pouvant entraîner des complications graves pour le patient [99].

Lorsque la maladie est inopérable et/ou métastatique, d'autres alternatives thérapeutiques sont envisageables telles que la **radiothérapie** (traitement localisé) et l'administration de **chimiothérapies** (traitement systémique) [124].

La chimiothérapie de référence est appelée **CVD** et correspond à une combinaison de Cyclophosphamide, Vincristine et Dacarbazine. Elle a montré une efficacité plus importante chez les patients porteurs de mutations *SDH* (70% de patients répondeurs) en comparaison aux patients sporadiques (30% de patients répondeurs). Dans 50% des cas cette chimiothérapie entraîne une diminution des symptômes et une régression de la tumeur mais seulement de manière temporaire [229, 230]. De ce fait, la prise en charge thérapeutique des PPGL avancés et/ou métastatiques reste limitée et l'intervention de différents experts médicaux (oncologues, chirurgiens, radiothérapeutes, généticiens, anatomopathologistes, spécialistes en médecine nucléaire) est nécessaire pour définir la stratégie thérapeutique à mettre en place [99]. Par ailleurs, la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes et prometteuses est essentielle pour améliorer la prise en charge de patients atteints de PPGL.

### 1.2.6.2. Les traitements innovants

La prise en charge des PPGL peu avancés ou métastatiques, en complément de la chirurgie et de la chimiothérapie, peut être réalisée par de nouvelles technologies de **radiothérapie interne vectorisée**. Celles-ci à base de  $^{131}\text{I}$ -MIBG et de  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE, ont récemment montré une efficacité. Il a été observé que les patients porteurs d'une mutation *SDHB* présentaient plus souvent une réponse partielle (RP) ou une réponse complète (RC) que les autres patients suite à l'application de  $^{131}\text{I}$ -MIBG [231]. L'utilisation du  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE a permis l'amélioration de la survie globale des patients, seul ou en combinaison avec de la capécitabine [232, 233]. Ces deux options de radiothérapie ne sont pas encore accessibles dans tous les centres malgré leur autorisation de mise sur le marché par la FDA<sup>1</sup>, ce qui explique le fait qu'elles soient toujours classées dans les traitements innovants à ce jour. Par ailleurs, un cas de patient atteint d'un PPGL métastatique *SDHB* muté et traité au  $^{223}\text{Ra}$  radium dichloride a été rapporté, montrant un soulagement de la douleur chez ce patient [234]. Cependant, l'évaluation de l'efficacité du traitement reste à confirmer.

Concernant les **chimiothérapies**, la mise en place d'études cliniques reste limitée du fait de la rareté de la pathologie. Cependant, de nouveaux traitements prometteurs ont été évalués au cas par cas chez des patients atteints de PPGL.

Le **Témazolomide**, agent alkylant, semble être une alternative à la dacarbazine. Les patients porteurs d'une mutation *SDHB* sont par ailleurs plus sensibles que les patients sporadiques à ce traitement, en lien avec une perte d'expression de la **O<sup>6</sup>-méthylguanine-ADN méthyltransférase** (MGMT), protéine impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN [235]. Son efficacité devrait être évaluée dans un essai clinique de phase II, **JuMMPPinT01**, dirigée par le Dr Éric BAUDIN (Gustave roussy, Villejuif) chez des patients atteints d'un PPGL. Par ailleurs l'efficacité du **Témazolomide** en combinaison avec un **inhibiteur de PARP** (Olaparib) est en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase II chez des patients atteints d'un PPGL avancé et/ou métastatique et/ou non résécable (ClinicalTrials.gov : NCT04394858).

De façon générale, les **thérapies ciblées** sur des anomalies moléculaires (ex : inhibiteurs d'activité kinase) et les **immunothérapies** de type inhibiteurs de checkpoint immunitaires, ont montré un intérêt majeur dans la prise en charge de nombreux cancers. Ces stratégies ont notamment fait la preuve de leur efficacité tout en limitant les effets indésirables souvent importants avec les chimiothérapies dites conventionnelles. Concernant les PPGL, ceux du groupe « pseudo-hypoxique » sont caractérisés par des

---

<sup>1</sup>Food and Drug Administration

mutations impliquant le développement de l'angiogénèse. Dans ce cas, l'évaluation d'**inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase** et plus particulièrement du VEGFR, tel que le **Sunitinib** semble pertinente. Le traitement de 17 patients atteints d'un PPGL par le Sunitinib est associé à une réponse partielle chez 3 patients et une maladie stable chez 5 patients. La réponse au traitement est plus importante chez les patients porteurs de mutations *RET* ou *SDH* [236, 237]. L'efficacité du Sunitinib chez des patients atteints d'un PPGL métastatique en progression est évaluée dans une étude de phase II, **FIRSTMAPPP** (ClinicalTrials.gov : NCT01371201), dirigée par le Dr E. Baudin (Gustave Roussy, Villejuif). L'analyse des résultats obtenus dans cette étude est en cours.

D'autre part, des études précliniques ont montré l'efficacité d'un inhibiteur de **PI3K** (BYL719) et de **mTORC1/2** (Everolimus) sur des modèles cellulaires de phéochromocytome *SDHB*<sup>-/-</sup> et sur des lignées primaires de patients sporadiques ou muté pour *NF1*. L'effet de ces traitements entraîne un effet antiprolifératif et cytotoxique avec induction de l'apoptose [238]. L'évaluation de ce type de traitement a été réalisée dans une étude de phase II chez des patients atteints de PPGL (ClinicalTrials.gov : **PheoCarcRAD001**, NCT01152827). Les résultats de cette étude ont montré une efficacité modeste chez les patients atteints d'un PPGL, pour lesquels le statut mutationnel n'a pas été établi [239].

Une nouvelle approche immunothérapeutique a été évaluée dans un modèle murin de phéochromocytome métastatique *SDH*-WT basée sur l'injection d'un polysaccharide **mannan-BAM**<sup>1</sup> couplé à des **ligands TLR**<sup>2</sup>, en association avec un anticorps **anti-CD40**. Cette stratégie a pour conséquence d'activer les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules neutrophiles pour éliminer les cellules tumorales. L'application de cette stratégie immunothérapeutique a entraîné une forte réponse antitumorale associée à une réduction des lésions métastatiques et une amélioration significative de la survie des souris traitées [240].

Il est enfin à noter que l'évaluation d'anticorps anti-PD1<sup>3</sup> tels que le Nivolumab et le Pembrolizumab ainsi que les anticorps anti-CTLA4<sup>4</sup> tel que l'Ipilimumab sont en cours d'évaluation dans des études cliniques de phase II chez des patients présentant des tumeurs rares dont les PPGL (ClinicalTrials.gov : NCT02834013 et NCT02721732). Cependant, l'évaluation de l'efficacité des immunothérapies devrait être également menée dans le cas spécifique des PPGL porteur d'une mutation *SDHB* pour lesquels le développement métastatique est fréquemment associé. Les résultats obtenus à l'issue de ces différentes études pourraient permettre l'introduction des immunothérapies dans la prise en charge des PPGL, qui à ce jour reste encore très limitée.

---

<sup>1</sup> *Biocompatible anchor for a membrane*

<sup>2</sup> *Toll-like receptors*

<sup>3</sup> *Programmed death-1*

<sup>4</sup> *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

---

## 2. Objectifs des travaux de thèse

---

Les PPGL sont des tumeurs neuroendocrines rares, dont les formes métastatiques ont des taux de réponse à la radiothérapie et aux chimiothérapies conventionnelles relativement faibles (taux de survie médian de 6,7 ans après le diagnostic des métastases) [134, 241]. Si le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est un enjeu majeur pour ces patients, il reste cependant limité du fait de la rareté de la pathologie avec des difficultés importantes à mettre en place des essais cliniques.

Les PPGL sont caractérisés par un très fort déterminisme génétique avec 40% des mutations germinales dont 50% touchent les gènes codant pour la SDH (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* et *SDHAF2*) [94]. Ces mutations entraînent une perte de fonction de l'enzyme conduisant à une accumulation du succinate. Ce dernier agit comme oncométabolite, inhibant les dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -kétooglutarate, ce qui a pour conséquence de déréguler des voies de signalisation identifiées comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles (hyperméthylation de l'ADN, réparation de l'ADN et angiogenèse) [78, 94, 242].

L'évaluation clinique de nouvelles stratégies thérapeutiques est particulièrement complexe dans le cas des maladies rares, renforçant l'intérêt des études précliniques et translationnelles. Celles-ci participent notamment à la meilleure compréhension des mécanismes d'oncogenèse, à l'évaluation de nouveaux traitements et à l'identification de nouveaux biomarqueurs. Elles doivent pour cela, reposer sur l'utilisation de modèles pertinents et représentatifs des différentes formes de la maladie. Enfin, l'accumulation du succinate induite par les mutations *SDH* permet par ailleurs d'envisager ce métabolite comme un biomarqueur potentiel des cancers *SDH* muté.

Dans ce contexte ce travail de thèse a porté sur « *l'impact des mutations SDH sur la réponse antitumorale et l'identification de nouveaux biomarqueurs* », dont les objectifs sont :

- le développement et la caractérisation d'un nouveau modèle cellulaire de PPGL présentant une invalidation stable du gène *SDHB*,
- l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les principales voies dérégulées par l'accumulation du succinate, seules et en combinaison,
- l'évaluation du succinate comme biomarqueur des PPGL *SDH* muté,
- la caractérisation *in vitro* et *in vivo* des modifications du profil métabolomique induit par les mutations *SDH*.



Au final ce projet devrait permettre :

- de disposer de nouveaux outils précliniques plus pertinents pour étudier les mécanismes d'oncogenèse des PPGL *SDHB* muté et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques,
- de sélectionner de nouveaux traitements prometteurs dont les patients pourraient bénéficier à terme,
- de caractériser l'intérêt de nouveaux biomarqueurs potentiels pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'un PPGL *SDH* muté (diagnostic et suivi),
- d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques métaboliques.

---

# 3. Résultats et discussion

---

## 3.1. ÉTABLISSEMENT DES 2 PREMIERS MODÈLES CELLULAIRES DE PHÉOCHROMOCYTOME HUMAIN *SDHB* INVALIDÉ DE FAÇON STABLE

### 3.1.1. Introduction

#### 3.1.1.1. Les modèles précliniques de PPGL

Les modèles précliniques de PPGL (*in vitro* et *in vivo*) disponibles à ce jour sont limités en nombre et en type. Certains ont été développés à partir d'un tissu tumoral tandis que d'autres correspondent à des tissus sains caractérisés par la présence d'invalidations de gènes impliqués dans l'oncogenèse de PPGL. En particulier, nous pouvons noter que les modèles précliniques de PPGL *SDH* muté sont rares et qu'aucun n'est d'origine humaine.

Différentes approches ont pu être réalisées pour obtenir des modèles de PPGL représentatifs des différents types cliniques et moléculaires de la maladie, à savoir : l'établissement de modèles cellulaires immortalisés, de modèles *vivo* développant la maladie de manière spontanée après mutation d'un oncogène et enfin l'établissement de PDX<sup>1</sup> à partir de tumeurs fraîches de patients.

*Bayley et Devilee* ont récemment fait le constat que, globalement, les modèles précliniques de PPGL (*in vitro* et *in vivo*) développés n'étaient **pas suffisamment caractérisés**, pouvant remettre en question leur pertinence. En parallèle, les auteurs ont proposé un panel de caractéristiques, et les tests associés, qu'il conviendrait de contrôler lors du développement d'un nouveau modèle de PPGL afin de mieux définir les avantages et les limites de ce dernier (**Tableau 5**) [243].

---

<sup>1</sup> Patient derived xenograft

**Tableau 5** : Critères descriptifs recommandés lors du développement de nouveaux modèles précliniques de PPGL (D'après *Bayley et Devilee, 2020*).

Critère descriptif recommandé	Test suggéré
Espèce	PCR spécifique à l'espèce puis séquençage Sanger; NGS; Caryotypage
Génotypage unique (en comparaison à des lignées cellulaires déjà existantes)	Analyse des répétitions en tandem courtes (STR) et comparaison avec les profils de lignées cellulaires existantes
Confirmer le diagnostic de PPGL	La tumeur d'origine présente une morphologie attendue et présente l'expression de la CgA et/ou de la TH et/ou de la synaptophysine et/ou de la NSE
Les altérations génomiques correspondent à la tumeur d'origine dans un modèle <i>SDH</i> muté	La lignée cellulaire présente une absence d'expression en IHC de <i>SDHB</i> et/ou <i>SDHA</i>
Etablir l'identité des cellules proliférantes	Double marquage BrdU/Edu avec la synaptophysine, la CgA et/ou TH
Nombre et taux de doublement de la population pour considérer la lignée cellulaire comme immortelle	Décrire avec précision le temps de doublement et considérer la lignée cellulaire comme immortelle avec au moins 50 doublements de population
Cryopréservation de la lignée cellulaire à des passages précoces	Maintenir des passages précoces pour la culture de cellules et éviter la dérive du modèle
Expression des profils génétiques et/ou protéiques caractéristiques	PCR et séquençage Sanger; profil transcriptomique par séquençage ARN; IHC; immunofluorescence; western blot
Suivi régulier du phénotype des cellules en culture (avant chaque expérience)	Analyse de la morphologie des cellules au microscope, évaluation de la sécrétion de catécholamines. Confirmer l'expression de la CgA et/ou la TH et/ou la synaptophysine et/ou la NSE Confirmer le peu ou l'absence d'expression de la SDHB/SDHA en IHC Evaluer que le temps de doublement ne change pas au cours des différents passages en culture
Rendre la lignée cellulaire accessible à la communauté scientifique	ATCC (American Type Culture Collection) ou autres dépositaires

Les modèles précliniques de PPGL développés à ce jour présentent des caractéristiques tissulaires et moléculaires spécifiques et sont dans la grande majorité d'origine **animale** (bovin, rat et souris) (**Tableaux 6 et 7**) [243–245]. Le modèle cellulaire le plus ancien, développé en 1976 par Llyod Greene et Arthur Tischler, appelé **PC12**, est un modèle de phéochromocytome de rat, apparemment sporadique. Les caractéristiques importantes de cette lignée sont sa capacité à développer des neurites après une exposition au facteur de croissance neural (NGF), la présence des granules typiques des cellules chromaffines et la sécrétion de catécholamines [246].

Il existe plusieurs modèles cellulaires de PPGL d'origine humaine. Les lignées **EGP1** et **PTJ64p**, issues respectivement d'un paragangliome carotidien métastatique et d'un paragangliome jugulotympanique, qui sont apparemment sporadiques. Peu caractérisées, leur origine neuroendocrinienne a même été remise en cause. Enfin on peut noter que la lignée PTJ64p n'est pas sécrétante [247, 248].

Les lignées cellulaires **KNA** et **KAT45** sont issues d'un phéochromocytome humain, apparemment

sporadique et présentent des caractéristiques proches de la lignée cellulaire PC12 notamment en termes d'expression et de sécrétion des catécholamines. Cependant, le maintien de la prolifération de ces lignées cellulaires fut difficile et leur développement et leur caractérisation furent abandonnés [249, 250]. La lignée cellulaire progénitrice **hPheo1** est issue d'un phéochromocytome humain apparemment sporadique et a été immortalisée par hTERT<sup>1</sup>. Cette lignée cellulaire peut sécréter des catécholamines après induction de sa différenciation et une délétion sur le chromosome 9 (Del9p22) a également été mise en évidence. Cependant, le caryotype de la tumeur d'origine ne présentait pas les mêmes altérations chromosomiques que la lignée hPheo1, ce qui fait que l'origine tumorale est à ce jour encore discutée. En effet, les auteurs décrivent ce modèle comme étant une population subclonale de cellules tumorales progénitrices, suggérant que son origine ne proviendrait pas de cellules neuroendocriniennes différenciées mais plutôt d'une autre population de cellules présentes dans la tumeur du patient [251]. A ce jour, la lignée hPheo1 reste considérée comme la seule lignée cellulaire humaine issue d'un phéochromocytome et disponible.

Des modèles précliniques *in vivo* ont été obtenus à partir de souris pour lesquelles différentes mutations ont été induites et qui ont spontanément développé un PPGL après une irradiation secondaire. Le développement tumoral dans ces modèles *vivo* a permis dans un second temps d'établir des lignées cellulaires. C'est notamment le cas des modèles cellulaires **MTT** et **MPC**, issus d'un phéochromocytome développé chez des souris irradiées et porteuses d'une mutation hétérozygote **NF1**. Pour mémoire, ces mutations sont caractéristiques du cluster de PPGL associé aux dérégulations de la voie des MAP kinases. La lignée cellulaire MPC présente de nombreuses anomalies chromosomiques qui n'ont pas été recherchées dans la lignée MTT. Concernant la capacité de ces cellules à sécréter des catécholamines, il a été observé une expression des différents marqueurs, tels que la présence de la tyrosine hydroxylase (TH) et de la phényléthanolamine N-méthyltransférase (PNMT). En outre, ces deux modèles semblent intéressants pour évaluer les mécanismes d'oncogenèse en lien avec les dérégulations des MAP kinases mais également pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées sur ces voies [252–254].

Un autre modèle de PPGL, issu d'un modèle *vivo* et largement utilisé dans la littérature pour étudier les dérégulations induites par la présence de mutations **SDHB** est le modèle **imCC** [255]. Cette lignée cellulaire a été développée grâce à l'utilisation initiale d'un système de recombinaison Cre-Lox, entraînant une invalidation homozygote du gène **SDHB** chez une souris immunodéficiente, qui n'a cependant jamais développé de PPGL, du fait d'une létalité embryonnaire. Le modèle imCC correspond donc à des cellules chromaffines saines issues de souris **SDHB**<sup>-/-</sup>, ce qui est un point limitant pour étudier

---

<sup>1</sup> *Transcriptase inverse de la télomérase humaine*

l'impact des mutations *SDH* dans un contexte tumoral. On peut noter cependant que plusieurs études réalisées sur cette lignée cellulaire ont permis de mettre en évidence de nombreuses dérégulations (hyperméthylation, hypoxie, métabolisme) retrouvées chez des patients atteints d'un PPGL *SDH* muté [255–257].

Cette technologie de recombinaison Cre-Lox a également été utilisée pour l'inactivation du gène *SDHD* dans 2 modèles de **souris** immunodéficientes pour lesquels l'inactivation totale du gène est létale. De ce fait, les auteurs ont développé un modèle porteur d'une recombinase CRE inducible et un modèle spécifique du tissu catécholaminergique, dans le but d'étudier si la perte d'expression de *SDHD* pouvait être responsable du phénomène de tumorigenèse [258].

Enfin, les modèles cellulaires **RS0** et **RS1/2** sont tous deux issus de phéochromocytomes de rats irradiés après inactivation hétérozygote du gène *SDHB* par la technologie **TALEN**<sup>1</sup>. RS0 présente des caractéristiques connues des tumeurs PPGL, comme l'expression de TH et la sécrétion de dopamine, généralement associées à la sécrétion de catécholamines. En immunohistochimie (IHC), RS0 montre une perte totale d'expression de *SDHB* tandis que RS1/2 a un marquage plus diffus de la protéine [259]. De ce fait, le modèle RS0 est l'unique modèle de phéochromocytome présentant une inactivation du gène *SDHB* de façon stable. La principale limite de ce modèle est qu'il n'est pas d'origine humaine, ce qui pourrait être une source de variabilité dans les mécanismes moléculaires de tumorigenèse.

On peut noter qu'outre les modèles murins développant spontanément une tumeur de PPGL, il existe dans la littérature des modèles *in vivo* de xéno greffes (ectotopique ou orthotopique) de lignées cellulaires de PPGL sur des modèles de souris immunodéficientes. Par exemple, la lignée cellulaire EGP1 a été xéno greffée avec succès pour des études de radiorésistance [260].

Enfin, le développement de PDX est un enjeu prometteur pour l'obtention de modèles précliniques pertinents. En effet, les PDX consistent en la greffe de tumeur fraîche de patients, permettant de représenter les différentes formes cliniques des cancers et donc d'être au plus proche de la maladie décrite chez les patients. Le choix d'un modèle murin adéquat est primordial afin de maximiser le taux de prise de greffe. Plus particulièrement, une étude menée sur des cellules tumorales congelées de 13 patients (10 *SDHB* muté, 1 sporadique et 2 de statut inconnu) xéno greffées sur des souris NOD-Scid Gamma (NSG) déficientes en cellules B, T et NK, a permis de mettre en évidence que le taux de prise de greffe reste faible (23%) et le développement de tumeurs long (11 mois post injection). Cependant, l'utilisation de ce modèle de souris pour le développement de **PDX** semble être pertinent pour les futures

---

<sup>1</sup> *Transcription activator-like effector nuclease*

tentatives qui restent à ce jour encore infructueuses dans le cas des PPGL [261]. Un premier modèle de PDX à partir de PPGL a pu être établi dans une autre étude, cependant les cellules greffées n'exprimaient pas la chromogranine A ni la synaptophysine, remettant en cause l'origine du tissu [262].

En revanche, un modèle **PDX de GIST *SDHB*** muté a été développé et caractérisé [263]. Les auteurs décrivent des caractéristiques communes entre la tumeur primaire et le PDX : une prolifération importante liée à une forte expression du Ki67, une morphologie caractérisée par la présence de toutes petites cellules présentant une activité autophagique, un profil pseudohypoxique bien défini en lien avec la présence des mutations *SDH*. De ce fait, ce modèle semble pertinent pour étudier les effets de la consommation d'oxygène, l'évaluation de nouvelles thérapies ciblant l'hypoxie mais également l'autophagie, encore très peu étudiée dans les PPGL *SDH* muté.

**Tableau 6 :** Récapitulatif des différents modèles précliniques de PGL disponibles à ce jour (D'après Bayley et Devilee, 2020).

Espèce	Nom de la lignée cellulaire	Tissu d'origine	Bénin/métastatique	Références
Rat	PC12	Médullosurrénale	Non renseigné	Greene et Tischler, 1976
Rat	MAH	Cellules précurseurs de la médullosurrénale	Bénin	Birren et Anderson, 1990
Rat	RAD5.2	Cellules précurseurs de la médullosurrénale	Bénin	Eaton, 2000
Rat	RS0 et RS1/2	Médullosurrénale	Bénin	Powers, 2020
Bovin	BADA.20	Cellules précurseurs de la médullosurrénale	Bénin	Eaton, 2000
Souris	Non renseigné	Médullosurrénale	Bénin	Tischler et al., 1993
Souris	PATH.1/PATH.2	Médullosurrénale	Bénin	Suri et al., 1993
Souris	Non renseigné	Médullosurrénale	Bénin	Cairns et al., 1997
Souris	MPC	Médullosurrénale	Non renseigné	Jacks et al., 1994 Powers et al., 2000, 2002, 2004
Souris	tsAM5D	Médullosurrénale	Bénin	Murata et al., 2003
Souris	MTT	Médullosurrénale	Métastatique	Martinova et al., 2009
Souris	imCC	Médullosurrénale	Cellules non tumorales	Letouzé et al., 2013
Humain	EPG1	Carotide	Métastatique	Stuschke et al., 1992, 1995
Humain	KNA	Médullosurrénale	Bénin	Pfragner et al., 1998 Weinhäusel et al., 2003
Humain	KAT45	Médullosurrénale	Bénin	Venihaki et al., 1998
Humain	PTJ64p	Jugulotympanique	Bénin	Cama et al., 2013 Florio et al., 2017
Humain	hPHEO1	Médullosurrénale	Bénin	Ghayee et al., 2013



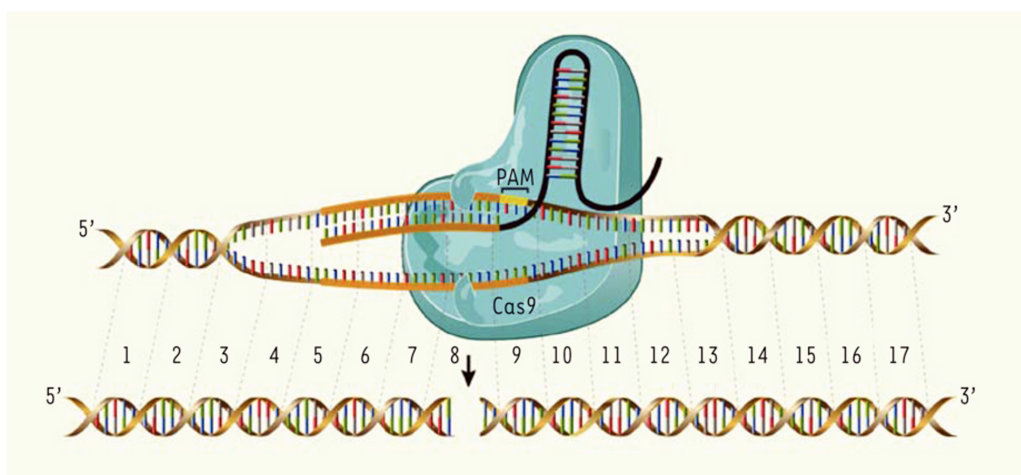
Tableau 7 : Liste des principaux modèles précliniques (*in vitro et in vivo*) présentant une invalidation SDH.

Gène invalidé	Nature du tissu	Espèce	Technique d'invalidation utilisée	Références
<i>SDHB</i>	Cellules chromaffines non-tumorales	Souris	Système de recombinaison Cre-Lox	Letouzé et al., 2013
<i>SDHB</i>	Phéochromocytome	Rat	Système TALEN	Powers et al., 2020
<i>SDHB</i>	GIST	Humain	PDX	Powers et al., 2018
<i>SDHB</i>	Non applicable	Poisson zèbre	CRISPR-Cas9. Induction d'une mutation germinale hétérozygote et homozygote dans un modèle de poisson zèbre	Dona et al., 2021
<i>SDHB</i>	Carcinome colorectal	Humain	CRISPR-Cas9	Kitazawa et al., 2017
<i>SDHC</i>	Cellules de cancer du sein	Humain	CRISPR-Cas9	Røslund et al., 2019
<i>SDHD</i>	Non applicable	Souris	Système de recombinaison Cre-Lox; Induction d'une mutation <i>SDHD</i> germinale par injection de blastocyste présentant la mutation <i>SDHD</i>	Diaz-Castro et al., 2012
<i>SDHAF2</i>	Cellules de cancer du sein	Humain	CRISPR-Cas9	Bezawork-Geleta et al., 2016

### 3.1.1.2. Focus sur la technologie du CRISPR-Cas9

L'inactivation des gènes dans les modèles de PPGL a été réalisée la plupart du temps par des techniques d'inactivation transitoire, de type **shARN**, par de petits ARN interférents (**siARN**) ou par des agents pharmacologiques (malonate, atpenines). Le développement de modèles cellulaires de PPGL présentant une inactivation stable du gène *SDHB* est à la fois plus pertinente et plus complexe. Toutefois, une technique révolutionnaire est envisageable : celle du **CRISPR-Cas9**<sup>1</sup>.

La technique du CRISPR-Cas9 a été développée dans les années 2010 et récompensée en 2020 par le prix Nobel de chimie attribué aux deux chercheuses à l'origine de sa découverte : la française Emmanuelle Charpentier et l'américaine Jennifer Doudna [264]. La **nucléase Cas9** a d'abord été découverte chez la bactérie et dégrade des séquences d'ADN étrangères à l'organisme, en jouant le rôle de « système immunitaire bactérien » contre les infections virales. Cette enzyme est également qualifiée de « ciseau moléculaire » lorsqu'elle est couplée à un ARN guide. **L'ARN guide** consiste en une séquence d'ARN complémentaire à une séquence d'environ 20 nucléotides du gène ciblé. Afin que la Cas9 puisse agir, l'ARN guide doit cibler une séquence du gène qui précède un motif PAM<sup>2</sup>. La Cas9 a deux régions d'activité nucléase : la première va se lier au motif PAM en aval de la séquence ciblée mais également au complexe formé par l'ARN guide et l'ADN (**Figure 21**, en bleu). Une fois fixée, la Cas9 va pouvoir entraîner une cassure double brin de l'ADN. Par la suite, l'ADN va réparer cette cassure généralement par jonction d'extrémités non-homologues (**NHEJ**) ou par recombinaison homologue, si une séquence d'ADN présentant des séquences d'homologie s'insère de part et d'autre des sites de coupure [265].



**Figure 22** : Illustration de l'application du système CRISPR-Cas9 (D'après Tremblay, 2015).

<sup>1</sup> Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Cas9

<sup>2</sup> Protospacer Adjacent Motif

La technologie du CRISPR-Cas9 se différencie des technologies d'inactivation de gènes plus anciennes comme TALEN ou ZFN<sup>1</sup> par la reconnaissance de l'ARN guide vers un site PAM facile à mettre en place et adaptable à tout type de séquence de nucléotides. Cette méthode est efficace, simple, rapide et bon marché en comparaison aux autres technologies, ce qui fait qu'elle est à ce jour de plus en plus utilisée. D'autre part, il est possible par CRISPR-Cas9 de modifier l'expression de gènes en induisant une perte d'expression ou « *Knock-out* », un gain d'expression ou « *Knock-in* » ou en insérant un variant spécifique par délétion, insertion ou substitution de nucléotides.

Plusieurs modèles précliniques *SDH* invalidé par CRISPR-Cas9 ont été développés afin d'étudier les dérégulations induites par la perte de fonction de cette enzyme mitochondriale. Plus particulièrement, des mutations hétérozygotes et homozygotes du gène *SDHB* ont été induites dans un modèle de **zebrafish** (Tableau 7) [266]. Ce modèle pertinent est utilisé en substitution de la souris car cette dernière ne permet pas le développement de la maladie quand la mutation est hétérozygote tandis qu'une mutation homozygote entraîne une létalité embryonnaire chez cette dernière [267]. Ce modèle semble regrouper les caractéristiques des PPGL connues chez les patients malgré le fait que le contexte tumoral est absent dans ce dernier. L'inactivation du gène *SDHB* par CRISPR-Cas9 a également été réalisée sur un modèle cellulaire humain de **carcinome colorectal** (Tableau 7) [268]. Ainsi, l'induction d'une mutation homozygote du gène *SDHB* fut réalisée avec succès et a permis de mettre en évidence les dérégulations métaboliques décrites dans les cancers telles que l'activité accrue de la glycolyse et de la glutaminolyse permettant l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux traitements potentiellement prometteurs.

Enfin, des invalidations des gènes *SDHC* et *SDHAF2* par CRISPR-Cas9 dans des lignées humaines de **cancers du sein** ont été également développées (Tableau 7) [269, 270]. L'application du CRISPR-Cas9 pour l'inactivation des gènes codant pour la SDH apparaît être une technologie relativement facile en termes d'utilisation et efficace pour le développement de nouveaux modèles précliniques pertinents. Cependant, à ce jour il n'existe aucun modèle de PPGL humain présentant une invalidation **stable** de gènes codant pour la SDH. De ce fait, dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons travaillé sur l'inactivation du gène *SDHB* par **CRISPR-Cas9** à partir de la seule lignée cellulaire humaine de phéochromocytome disponible (**hPheo1**).

---

<sup>1</sup> Nucléase à doigt de zinc

### 3.1.2. Article 1: « Establishment of the first stable invalidated *SDHB*<sup>+/-</sup> human pheochromocytoma cell lines »

Cette partie fait l'objet d'un article scientifique, présenté ci-dessous, et sera discuté par la suite (paragraphe 3.1.3).

« *Establishment of the first stable invalidated SDHB<sup>+/-</sup> human pheochromocytoma cell lines* »

Constance Lamy, Amaury Bongers, Abir Al Ghuzlan, Jean-Yves Scoazec, Jean-Luc Perfettini, Eric Baudin, Julien Hadoux, Angelo Paci, Sophie Broutin. *Article en rédaction*.

Ce travail a eu pour objectif de développer et caractériser un nouveau modèle cellulaire de phéochromocytome humain présentant une invalidation stable du gène *SDHB*, utile et pertinent pour améliorer les connaissances des mécanismes d'oncogenèse, identifier de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles et évaluer de nouveaux traitements.

Pour cela, la seule lignée cellulaire humaine de phéochromocytome (hPheo1) disponible à ce jour a été utilisée. L'invalidation du gène *SDHB* a été réalisée en utilisant la technologie du CRISPR-Cas9, en ciblant l'exon 2 du gène. En parallèle, une lignée cellulaire appelée « *contrôle négatif* » de transfection a également été développée par l'utilisation d'un vecteur vide ne ciblant aucune séquence codante de l'ADN. Une caractérisation chromosomique, génique, protéique et phénotypique a été réalisée.

1 **Establishment of the first stable invalidated *SDHB*<sup>+/-</sup> human**  
2 **pheochromocytoma cell lines**

3 Constance Lamy<sup>1,2</sup>, Amaury Bongers<sup>2,3</sup>, Abir Al Ghuzlan<sup>4</sup>, Sophie Cotteret<sup>4</sup>, Jean-Yves  
4 Scoazec<sup>4</sup>, Jean-Luc Perfettini<sup>1,2</sup>, Eric Baudin<sup>6</sup>, Julien Hadoux<sup>6</sup>, Angelo Paci<sup>1,4,6</sup>, Sophie  
5 Broutin<sup>1,4\*</sup>

6  
7 1. Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, Inserm1030, Molecular radiotherapy and Therapeutic Innovation, F-  
8 94805, Villejuif, France.

9 2. Gustave Roussy, F-94805, Villejuif, France.

10 3. Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, Inserm, Molecular dynamic of hematopoietic transformation, F-94805,  
11 Villejuif, France.

12 4. Gustave Roussy, Department of Medical Biology and Pathology, F-94805, Villejuif, France

13 5. Gustave Roussy, Department of Endocrine Oncology, F-94805; Villejuif, France

14 6. Service de pharmacocinétique, faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay, F-92296, Châtenay-Malabry,  
15 France

16 \*Corresponding author:

17 Dr Sophie Broutin

18 *Department of Medical Biology and Pathology*

19 *Gustave Roussy*

20 *114 rue Edouard Vaillant, Villejuif, 94805, France*

21 *Tel: +33142114057*

22 [sophie.broutin@gustaveroussy.fr](mailto:sophie.broutin@gustaveroussy.fr)

23 **Short title:**

24 Human pheochromocytoma *SDHB* mutated cell lines

25 **Keywords:**

26 Pheochromocytoma, succinate dehydrogenase, human, preclinical model, hPheo1

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38 **Abstract**

39

40 Pheochromocytomas and paragangliomas (PPGL) are very rare neuroendocrine tumors characterized  
41 by a large spectrum of hereditary predispositions. *SDHB* is the more frequently mutated gene involved  
42 in the PPGL tumorigenesis and accounts for almost 50% of germline mutations. Due to the paucity of  
43 this pathology, the development of preclinical studies is crucial. Several PPGL cellular models have  
44 already been developed, but no one corresponds to a human *SDHB* invalidated one. In this study, we  
45 have established the two first stably invalidated *SDHB*<sup>+/-</sup> human pheochromocytoma cell lines using the  
46 CRISPR/Cas9 technic, from the hPheo1 cellular model. Exon 2 of the *SDHB* gene has been targeted.  
47 From the 360 transfected clones, 2 had a heterozygous invalidation of *SDHB* and display specific  
48 characteristics of *SDHB*-related pheochromocytoma patients. In particular, we showed that both clones  
49 *SDHB*<sup>+/-</sup> have an increase of intracellular and extracellular succinate levels, a malignant characteristic  
50 linked to an absence of pS100 expression, an increase of Ki67 and migration capacity and a  
51 hypermethylated profile linked to an increase of 5-methylcytosine expression and a decrease of 5-  
52 hydroxymethylcytosine expression. Moreover, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase expression  
53 is also decreased associated with an increase of promotor hypermethylation.  
54 In conclusion, we have established a new relevant PPGL model, with the 2 first stably invalidated  
55 *SDHB*<sup>+/-</sup> human pheochromocytoma cell lines displaying molecular and phenotypic characteristics of  
56 *SDHB* pheochromocytomas.

57

58

59

58 **Introduction**

59

60 Pheochromocytomas and paragangliomas (PPGL) are very rare neuroendocrine tumors characterized  
61 by a large spectrum of hereditary predisposition including more than 40% of germline mutations (Buffet  
62 et al., 2020; Favier et al., 2015). *SDHB*, encoding for the subunit B of the succinate dehydrogenase  
63 (SDH), is the most frequently mutated gene involved in the PPGL tumorigenesis and accounts for almost  
64 50% of germline mutations (Castro-Vega et al., 2016). Moreover, *SDHB* mutations may be an indicator  
65 of malignancies, associated with a median survival of 6.7-year after the diagnosis of metastases (Crona  
66 et al., 2019; Hescot et al., 2019; Lenders et al., 2020; Turkova et al., 2016). SDH is a four subunit  
67 enzyme (SDHA, SDHB, SDHC and SDHD) of the tricarboxylic acid cycle (TCA), that catalyzes the  
68 oxidation of succinate into fumarate (Aldera and Govender, 2018; Rutter et al., 2010). *SDHB* mutations  
69 induce a loss of function of the protein leading to an accumulation of succinate which acts as an  
70 oncometabolite inhibiting  $\alpha$ -ketoglutarate dependent dioxygenases (Castro-Vega et al., 2016; Richter et  
71 al., 2014). In particular, succinate inhibits : HIF- $\alpha$  Prolyl Hydroxylase Domain (PHD) enzymes with an  
72 accumulation of Hypoxia-Inducible Factor (HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ ) which leads to the development of hypoxia  
73 and angiogenesis (Kluckova and Tennant, 2018; Selak et al., 2005), and Ten Eleven Translocation  
74 (TET) domain which leads to DNA and histones hypermethylation (Letouzé et al., 2013; Morin et al.,  
75 2020). In line with the DNA hypermethylation, inhibition of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase  
76 (MGMT) caused by a hypermethylation of its promotor has been described in *SDHB* PPGL tumors  
77 patients (Hadoux et al., 2014). More recently, an increase of Nicotamide Adenine Dinucleotide (NAD)/  
78 Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) activity has also been correlated to a SDH inhibition (Pang et  
79 al., 2018).

80 *SDHB* PPGL are very rare tumors and the set-up of clinical studies remains complex. Development of  
81 preclinical studies, relying on relevant *in vitro* and *in vivo* models is thus essential to improve our  
82 understanding of molecular mechanism of PPGL oncogenesis, to identify therapeutic targets and  
83 evaluate new therapeutic strategies. Several PPGL cellular models have been developed so far, mostly  
84 rodent ones but also few human cell lines, such as the hPheo1 cell line (Bayley and Devilee, 2020;  
85 Birren and Anderson, 1990; Eaton et al., 2000; Florio et al., 2017; Ghayee et al., 2013; Greene and  
86 Tischler, 1976; Martinelli et al., 2020; Martiniova et al., 2009; Pfragner et al., 1998; Powers et al., 2020;

87 Stuschke et al., 1995; Venihaki et al., 1998). Nevertheless, no human PPGL model with a stably  
88 invalidated *SDHB* mutation is yet available. The rare human *SDHB* invalidated models are either non-  
89 tumoral chromaffin cells (Dona et al., 2021; Letouzé et al., 2013b) or correspond to a colon or GIST  
90 cancer cell lines (Kitazawa et al., 2017; Powers et al., 2018). Moreover, the limit of this model is that is  
91 not a human cell line, which may induce some physio-pathological differences. Consequently, we have  
92 developed a new stably invalidated *SDHB*<sup>+/-</sup> human pheochromocytoma cell line from hPheo1 using the  
93 CRISPR/Cas9 technic and characterized it according to new suggestions (Bayley and Devilee, 2020).

94

95



96 **Material and methods**

97 **Cell line**

98 Human pheochromocytoma cell line hPheo1 is a gift from Ghayee's lab (Ghayee et al., 2013). All cell  
99 lines were maintained in an ACL4 medium (Gazdar and Oie, 1986) with 10% fetal calf serum (Eurobio,  
100 Les Ulis, France) in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

101 **Generation of *SDHB* invalidated cells**

102 Invalidation of *SDHB* gene has been realized as previously published (Kitazawa et al., 2017). Briefly,  
103 hPheo1 cells were plated at 300 000 cells/3mL/well on 6-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland)  
104 and cultured overnight. Cells were then co-transfected with 1 µg of *SDHB* homology directed repair  
105 (HDR) plasmid (Santa Cruz Biotechnology, Texas, United States) and 1 µg of *SDHB* clustered regularly  
106 interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 knockout plasmid (Santa Cruz Biotechnology) or  
107 with 1 µg of a control CRISPR/Cas9 plasmid (Santa Cruz Biotechnology) as described by the  
108 manufacturer. After 48 hours post transfection, cells were selected with 1 µg/mL of puromycin (Sigma  
109 Aldrich, Missouri, United States) for 5 days and the medium was changed every 2 days. After puromycin  
110 selection, cells transfected with the control CRISPR/Cas9 plasmid were collected as polyclonal cells  
111 while cells transfected with the *SDHB* knockout plasmid were cloned by cell sorter on 96-well plates  
112 (TPP). A final concentration of 50µg/mL of uridine (Sigma Aldrich) was added to the culture medium  
113 (King and Attardi, 1989).

114 **DNA extraction and quantification**

115 DNA extraction was performed with a QIAamp DNA mini kit following the manufacturer's instructions  
116 (Qiagen, Venlo, Netherlands). DNA was quantified using a Nanodrop 2000 spectrophotometer  
117 (Thermofisher Scientific).

118 **PCR and sequence analysis**

119 A total of 50 ng of genomic DNA was mixed with 0.5µM of pre-designed primers for the *SDHB* exon 2  
120 site (forward 5'-GTTACATCTGTTGTGCCAGC-3', reverse 5'-GGATGTAAAAGCATGTCCC-3')  
121 (Eurofins genomics, Les Ulis, France) and using the DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix  
122 technology (Thermofisher Scientific) following the manufacturer's instructions. PCR was performed

123 under the following conditions on the Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Thermofisher Scientific): 3 min at  
124 95°C, followed by 30 cycles of 30 sec at 95 °C, 30 sec at 60°C, 1 min at 72°C. The final extension was  
125 performed 10 min at 72°C. Sequences of purified DNA were analyzed by FinchTV® (version 1.4.0,  
126 Geospiza, Inc.) and Serial Cloner® (version 2.6, SerialBasics) softwares.

## 127 **Karyotypage**

128 On a T-75 flask (TPP, Trasadingen, Switzerland) with 10 million of cells, 50µg/µL of colchicine were  
129 added. Cells were incubated during 1h at 37°C before retrieving the cellular pellet. 10mL of hypotonic  
130 KCL solution heated at 37°C were then added and cells were stored at 37°C during 30 min. 1mL of  
131 fixing solution (2/3 methanol – 1/3 acid acetic) was added and mixed. This step was repeated twice. A  
132 drop of this solution was placed on a slide and keep at room temperature during 24 h. Chromosome  
133 marking was realized with a denaturation step at 80°C with phosphate buffer during 11 min and then  
134 with a Giemsa coloration. The metaphases were photographed and chromosomes were classified  
135 according to their size and banding.

## 136 **Western blot**

137 Cell pellets were washed three times with Phosphate Buffer Saline (PBS) (Thermofisher Scientific)  
138 before adding 200 µL of 1X RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Massachusetts, United States)  
139 containing phosphatase and protease inhibitors (Sigma Aldrich) for cell lysis. Cells were kept at 4°C  
140 during 30 min with regular mix by pulse-vortexing, centrifuged at 20.000 g during 10 min and the  
141 supernatant was recovered. Protein concentration was measured with a BCA Assay Kit (Thermofisher  
142 Scientific, Massachusetts, United States). A total of 10 ng of proteins were heated at 95°C during 10  
143 min in presence of 1x NuPAGE LDS sample buffer (Thermofisher Scientific) and 1X NuPAGE Reducing  
144 Agent (Thermofisher Scientific). Proteins were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis  
145 (PAGE) using 10% SDS-PAGE gel (Thermofisher Scientific) and 1X NuPAGE MOPS SDS Running  
146 Buffer (Thermofisher Scientific) at 150V during 1h30min. Proteins were then transferred on a  
147 nitrocellulose membrane 0.45 µM (Thermofisher Scientific) using a TRIS-Glycine 1X buffer (Euromedex,  
148 Souffelweyersheim, France) at 100V, 2h, 4°C. Proteins were saturated with PBS 1X containing 0.1%  
149 Tween 20 (PBS-T) and 5% milk during 2h at room temperature. Membranes were incubated overnight  
150 at 4°C with the following specific primary antibodies: anti-SDHB (mouse monoclonal, Thermofisher  
151 Scientific, 459230, 1:1000), anti-HSC-70 (mouse monoclonal, Santacruz Biotechnology, sc-7298,

152 1 :1000), anti-Chr-A (mouse monoclonal, Santacruz Biotechnology , sc-393941, 1 :1000), anti-TH  
153 (mouse monoclonal, Santacruz Biotechnology, sc-25269, 1 :1000) anti-COMT (mouse monoclonal,  
154 Santacruz Biotechnology, sc-137253, 1 :1000), anti-Vinculin (mouse monoclonal, Sigma aldrich,  
155 V9131, 1 :1000) and anti-MGMT (mouse monoclonal, Thermofisher Scientific, MA5-13506, 1 :500).  
156 Next, membranes were washed 6 times with PBS-T and incubated with a horseradish peroxidase (HRP)  
157 – conjugated anti-mouse secondary antibody (goat polyclonal, Santacruz Biotechnology, sc-2031, 1:40  
158 000) for 1h at room temperature and washed 6 times with PBS-T. The revelation of the proteins was  
159 realized using ECL prime (GE Healthcare, Illinois, United States). Signals were visualized on the  
160 ImageQuant LAS 4000 system (GE Healthcare) and quantified using ImageJ® (version 2.0.0, National  
161 Institutes of Health).

### 162 **Succinate quantification**

163 Cells were plated at 200 000 cells/2mL/well 6-well plates (TPP) during 4 days. Total cell culture media  
164 was removed and stored at -20°C before succinate quantification (extracellular levels). Corresponding  
165 dry pellets were lysed with a methanol-water solution (MeOH: H<sub>2</sub>O, 80/20) solution at -80°C, kept in ice  
166 for 30min with regular mix by pulse-vortexing and then centrifuged at 20.000g, 10min. The lysis  
167 supernatant was removed and stored at -20°C before succinate quantification (intracellular levels). The  
168 succinate quantification was realized using a full validated UPLC-MS/MS method (Lamy *et al.*, 2021).  
169 Briefly, succinate extraction was performed with a Solid Phase Extraction (SPE) (Phenomenex,  
170 Torrance, California, United States) using the Freedom EVO® 150 robot (TECAN, Männedorf, Swiss).  
171 Succinate quantification was performed on a Waters Acquity® UPLC system (Waters, Milford, MA, USA).  
172 Datas were normalized on cell count.

### 173 **Immunocytochemistry**

174 Dry cell pellets were fixed with paraformaldehyde (4%; w/v) overnight at 4°C. Immunohistochemical  
175 staining was performed on 3-µm thick unstained sections with antibodies anti-Ki67(mouse monoclonal,  
176 clone M-MIB1, Agilent, M724001-2, 1: 50) and anti-pS100 (mouse monoclonal, clone M-4C4.9, Ventana,  
177 1:1000) on Ventana Automated Immunostainer (BenchMarker Ultra, Ventana Medical System, Inc.)  
178 according to the manufacturer's manual.

179

180 **Migration assay**

181 A total of 40 000 cells/100 $\mu$ L/well were plated on 96-well ImageLock microplates (Sartorius, Goettingen,  
182 Germany). The scratch was realized using the WoundMaker<sup>TM</sup> (Sartorius) as described by the  
183 manufacturer. Scratch recovery follow-up was performed with an Incucyte S3 camera (Sartorius).  
184 Photos were taken and recorded every 2h during 60h.

185 **Cell differentiation conditions**

186 hPheo1 parental (PAR), and clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (#1 and #2) cell lines were cultured with a differentiation  
187 medium which was composed of DMEM/F-12 (Thermofisher Scientific), containing 20 ng/mL of basic  
188 fibroblast growth factor (hbFGF) (Sigma Aldrich), 20 ng/mL of epidermal growth factor (EGF)  
189 (Thermofisher Scientific), 1% of insulin transferring selenium (ITS-G) (Thermofisher Scientific) and 10  
190 ng/mL of leukemia inhibitory factor (LIF) (Sigma Aldrich) without fetal calf serum. Differentiation was  
191 induced with an addition of 20 ng/mL of BMP4 (Sigma Aldrich), 20 ng/mL of nerve growth factor (NGF)  
192 (Sigma Aldrich) and 10  $\mu$ M of dexamethasone (DEX) (Sigma Aldrich). Half of the medium was replaced  
193 by fresh medium every two days up to fourteen days after induction of differentiation as previously  
194 described (Chung et al., 2009).

195 **Dot Blot**

196 Serial dilution of DNA (from 1000 ng to 100 ng) was mixed with 10% of NaOH 1M, heated at 95°C during  
197 5 min and keep in ice 2min. The reaction was neutralized with an addition of 30% of saline-sodium  
198 citrate (SSC) buffer (ITW reagents, Castellar del Vallès, Barcelona, Spain). The DNA deposit of all the  
199 quantities (from 1000 ng to 100 ng) was performed on a Hybond N+ membrane (GE Healthcare) and  
200 the crosslink was realized with UV application during 7 min. DNA was saturated with TBS 1X with 0.1%  
201 Tween 20 (TBS-T) and 5% milk during 2h at room temperature. Membranes were incubated overnight  
202 at 4°C with the following specific primary antibodies: anti-5-mC (mouse monoclonal, Active Motif, 39649,  
203 1 :1000) and anti-5-hmC (rabbit polyclonal, Active Motif, 39769, 1 :1000). Next, membranes were  
204 washed 6 times with TBS-T and incubated with the horseradish peroxidase (HRP) - conjugated anti-  
205 mouse secondary antibody (goat polyclonal, Santacruz Biotechnology, sc-2031, 1:40 000) or  
206 horseradish peroxidase (HRP) - conjugated anti-rabbit secondary antibody (goat polyclonal,  
207 SouthernBiotech, 4050-05, 1:40 000) for 1h at room temperature and washed 6 times with TBS-T. The

208 revelation of the proteins was realized using ECL prime (GE Healthcare). Signals were visualized on  
209 the ImageQuant LAS 4000 system (GE Healthcare) using ImageJ® software (version 2.0.0, National  
210 Institutes of Health).

### 211 **Methylation assay**

212 Methylation assay was realized using EpiJET DNA Methylation Analysis Kit (MspI/HpaII) (Thermofisher  
213 Scientific). A total of 1 µg of genomic DNA was digested following the manufacturer's instructions during  
214 4h at 37°C. A total of 10 ng of genomic DNA were then mixed with 10 µM of primers specific for the  
215 *MGMT* promotor site (forward 5'- GTCTGGGGGTCCTGACTA-3', reverse 5'-  
216 CCCGTACCTTTTCCTGTCAC -3'), *MGMT* intron site (forward 5'- TGAATGACCTGCTCAGTGGC -3',  
217 reverse 5' CCCTGGCCAATCCTGTGTCATT -3') and *BCAT1* promotor site (forward 5'  
218 CGAAGATTCGGAGCCAGCG 3', reverse 5' CTCAGCTCGAGCTTCCCTCGT 3') (Eurofins genomics)  
219 using the SYBR™ Select Master Mix (Thermofisher Scientific) following the manufacturer's instructions.  
220 Quantitative PCR (qPCR) was performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermofisher  
221 Scientific) under the following conditions: 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95 °C, 1  
222 min at 60°C followed by 30 sec at 95°C, 1 min at 60°C, 30 sec at 95°C and 15 sec at 60°C.

### 223 **Immunofluorescence**

224 A total of 300 000 cells/500 µL/well were plated on 24-well plate (TPP) containing 13 mm slide in each  
225 well (VWR, Radnor, Pennsylvania, United States) and cultured overnight. Media was then removed and  
226 adherent cells were washed with 250 µL of PBS 1X. Cells were fixed with paraformaldehyde (4%; w/v)  
227 during 10 minutes at room temperature. Cell permeabilization was performed with triton 0.3% during 5  
228 minutes at room temperature and then wash twice with 250 µL PBS 1X. Blocking step was performed  
229 with PBS 1X with 10% SVF during 1h in a humid chamber. Primary antibody incubation was performed  
230 during 2h with γH2A-X antibody (ser139; JBW301 clone) (mouse monoclonal, Sigma Aldrich, 05-636, 1:  
231 100) and then washed with 250 µL of PBS 1X. After 1h of incubation with a secondary antibody anti-  
232 mouse Alexa fluor-488 Green (Thermofisher Scientific), cells were washed with 250 µL PBS 1X. Slides  
233 were analyzed with a Leica DMI 8 microscope (x63) (Leica, Wetzlar, Germany) connected with C11440  
234 camera (Hamamatsu Photonics) and LASX® (Leica) software.

235 **Statistical analysis**

236 Statistical analyses were performed with GraphPad Prism® (version 8.00, GraphPad Software, La Jolla,  
237 CA USA) softwares. Kruskal-Wallis tests were used to compare median values. *P* values are  
238 represented as follow: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01.

239

240

241

242 **Results**

243 **Establishment and selection of clones *SDHB*<sup>+/-</sup> and control cell lines**

244 The co-transfection of the unique human pheochromocytoma (hPheo1) cell line with the *SDHB* clustered  
245 regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 knockout plasmid and the *SDHB*  
246 homology directed repair (HDR) plasmid, followed by the puromycin selection has been realized as  
247 previously described (Kitazawa et al., 2017). A total of 360 puromycin resistant clones were obtained  
248 and isolated one by one with a cell sorter. Two clones were selected and further characterized in this  
249 study. In parallel, we have decided to compare both clones to a Negative Control of the CRISPR/Cas9  
250 (NC) and the parental hPheo1 cell line (PAR). Characterization NC and PAR has shown no statistical  
251 differences between both controls, which is the confirmation that the introduction of puromycin  
252 resistance gene doesn't affect the *SDHB* expression and both controls are similar (Suppl. Fig. 1).

253 **Genotyping confirms the heterozygous mutation of the *SDHB* gene**

254 Sanger sequencing of the exon 2 of the *SDHB* gene in the PAR cell line and the Negative Control (NC)  
255 have shown no modification in comparison with the universal *SDHB* wild-type DNA sequence (Fig.1A,  
256 right), while the 2 selected clones *SDHB* invalidated have shown a heterozygous profile. More precisely,  
257 in one allele, clone #1 displays an addition of one adenine leading to the production of a stop codon  
258 whereas in one allele, clone #2 shows a deletion of 30 nucleotides (Fig.1B and Fig.1C, right).

259

260 **Karyotype analysis confirms the initial profile of the parental hPheo1 cell line**

261 First we showed that the karyotype analysis has shown that 2 clones (#1 et #2) had a similar and closest  
262 chromosomic profile to the hPheo1 parental cell line, previously published by Ghayee & al. More  
263 particularly, a single cytogenetic abnormality one chromosome 9 (del9p22) has been shown by the  
264 authors and was also found in this study (Fig.1A, left). The same abnormality has been observed in #1  
265 et #2. However, both clones *SDHB* invalidated have shown another cytogenetic abnormality; a trisomy  
266 of chromosome 2 (Fig.1B and Fig.1C, left), in comparison with the parental hPheo1 cell line (PAR).

267

268 ***SDHB* invalidation leads to an increase of succinate levels**

269 First, *SDHB* protein expression was assessed by western blot. A decrease of 52% and 48% was  
270 observed in #1 and #2, respectively in comparison to the negative control (Fig.2A). We then investigated  
271 the functional impact of *SDHB* inhibition, through succinate levels. We observed a significant increase  
272 of extracellular succinate in #1 (28.5 nmol/1.10<sup>6</sup> cells) and #2 (23.6 nmol/1.10<sup>6</sup> cells) in comparison to  
273 the NC cell line (5.8 nmol/1.10<sup>6</sup> cells) (Fig.2B). In line, same results were obtained at the intracellular  
274 levels in #1 (0.5 nmol/1.10<sup>6</sup> cells) and #2 (0.6 nmol/1.10<sup>6</sup> cells) in comparison to the NC cell line (0.3  
275 nmol/1.10<sup>6</sup> cells) (Fig.2C).

276 **Clones *SDHB* invalidated show an aggressive phenotype**

277 Malignant pheochromocytoma are characterized by a negative pS100 immunohistochemistry staining  
278 (de Wailly et al., 2012). In line, we confirmed that pS100 staining was negative in hPheo1 parental cell  
279 line as previously described by Ghayee & al. and in #1 and #2 clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (Fig.3A). Ki67 staining,  
280 correlated to proliferation ability, was increased in both clones *SDHB* invalidated in comparison to the  
281 PAR cell line (Fig.3A). This result has been associated with an increase of migration profile of #1 and  
282 #2 in comparison with the NC cell line (Fig.3B). No statistical difference has been observed between the  
283 NC cell line and the PAR cell line (data not shown).

284 **Clones *SDHB* invalidated can secrete catecholamines after differentiation**

285 Pheochromocytoma tumors are well known to secrete catecholamines; chromogranin A is a biomarker  
286 of secretion commonly used in clinical routine. In this case, we have differentiated all cell lines (PAR;  
287 #1; #2) as described in material and methods section to confirm the results previously obtained by  
288 Ghayee & al concerning the potential of cells to secrete catecholamines (Suppl. Fig2). Chromogranin A  
289 expression is only observed when PAR, #1 et #2 were differentiated, except of #2 which also express  
290 Chromogranin A in presence of the differentiation medium (Fig.3C). Tyrosine Hydroxylase (TH) and  
291 Catecol-O-methyltransferase (COMT) are enzymes involved in the catecholamines production. When  
292 cells (PAR; #1; #2) were cultured in ACL4 medium or were differentiated, we have observed an increase  
293 of TH expression than the differentiated medium condition in PAR and #1. However, TH expression was  
294 increase when #2 is differentiated in comparison to the differentiated medium condition and ACL4



295 medium condition. COMT expression was observed when all cell lines were differentiated, except for #2  
296 which expressed COMT when it was cultured in the differentiation medium (Fig.3D).

### 297 **Hypermethylated profile of clones *SDHB* invalidated**

298 DNA hypermethylation profile of *SDHB* mutated pheochromocytoma is associated with an accumulation  
299 of 5-methylcytosine (5-mC) and a decrease of 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) (Letouzé et al., 2013).  
300 An increase of 5-mC expression has been observed in #1 and #2 in comparison to the NC cell line  
301 (Fig.4A). No difference of 5-mC expression has been observed between the NC cell line and the PAR  
302 cell line (data not shown). In contrary, a decrease of 5-hmC expression was observed in both #1 and #2  
303 clones in comparison to the NC cell line (Fig.4B). Furthermore, the inhibition of MGMT has been  
304 described in *SDHB* PPGL patients in correlation with an hypermethylation of MGMT promotor (Hadoux  
305 et al., 2014). In our two models *SDHB* invalidated, the decrease of MGMT expression around 52% and  
306 42% for #1 and #2, respectively, has been confirmed by western blot in comparison to the NC cell line  
307 (Fig.4C). No difference has been observed between NC cell line and PAR cell line (data not shown).  
308 Moreover, a methylation assay has been realized in a specific region of MGMT promotor in both clones  
309 *SDHB* invalidated and in NC cell line. A significant increase of methylation has been observed in #1  
310 (50%) ( $p < 0.05$ ) and #2 (30%) in comparison to the NC cell line (Fig.4D). No difference has been  
311 observed between the NC cell line and the PAR cell line (data not shown). No statistical difference has  
312 been observed in the MGMT intron and in S138P2 promotor which have been used as negative control  
313 (Supp. Fig. 3A, 3B). However, there is no increase of  $\gamma$ H2A-X expression in both clones *SDHB*  
314 invalidated in comparison to the NC and the PAR cell lines as  $\gamma$ H2A-X positive cells accounted for 4%,  
315 5%, 4% and 7% for PAR, NC, #1 and #2, respectively (Supp. Fig. 3C).

316

317

318

319 **Discussion**

320 In this study, we have developed the two first stably invalidated *SDHB*<sup>+/-</sup> human pheochromocytoma  
321 preclinical cells using the hPheo1 cell line and the CRISPR/Cas9 technic (Ghayee et al., 2013).  
322 Mutations in the exon 2 of *SDHB* gene lead to an inhibition of the protein which convinced us to use this  
323 CRISPR/Cas9 targeting method (Gimenez-Roqueplo et al., 2002; Saxena et al., 2016). Moreover, this  
324 *SDHB* invalidation strategy has been recently successful in a human colon cancer model (Kitazawa et  
325 al., 2017). We have chosen to invalidate exon 2 of the *SDHB* gene, because It is located near the iron-  
326 sulfur bonds, essential to the enzymatic activity (Aldera and Govender, 2018).

327 Among 360 puromycin resistant clones, only four have presented a *SDHB* heterozygous mutation which  
328 suggest that *SDHB* homozygous mutation may be lethal for hPheo1 cells in our invalidation conditions,  
329 in link with other observations described in others models, previously described (Dona et al., 2021;  
330 Powers et al., 2020).

331 Among the four clones *SDHB* invalidated, only two clones (#1 and #2) have been selected as they  
332 presented the closest human pheochromocytoma profile. First, *SDHB* expression was decreased  
333 around 50% in comparison with the negative control cell line in accordance with the heterozygous  
334 invalidation. However at a functional level, this partial protein inhibition led to a significant accumulation  
335 of intracellular and extracellular succinate levels. Both clones *SDHB*<sup>+/-</sup> showed a malignant profile with  
336 an absence of pS100 staining (de Wailly et al., 2012), an increase of Ki67 expression and an increased  
337 migration capacity in accordance with *SDHB* pheochromocytoma patients who are likely to develop  
338 metastases (Crona et al., 2019; Hescot et al., 2019; Lenders et al., 2020; Turkova et al., 2016). We have  
339 shown that, #1 and #2 *SDHB* invalidated can secrete catecholamines (TH and COMT expression) and  
340 CgA with an addition of NGF, BMP4 and dexamethasone or with fetal calf serum starvation in clone #2.  
341 An adaptation of cell culture conditions allow to obtain a secreting *SDHB*<sup>+/-</sup> pheochromocytoma model;  
342 Indeed, CgA and metanephrines (metanephrine, normetanephrines, methoxytyramine) levels are  
343 commonly quantified to diagnose pheochromocytoma disease (Lenders et al., 2014). Moreover, both  
344 clones *SDHB* invalidated have shown a DNA hypermethylated profile with an increase of 5-mC  
345 expression and a decrease of 5-hmC expression in comparison with the NC cell line which may be the  
346 consequence of a TET inhibition described in another *SDHB* invalidated cellular model (Letouzé et al.,  
347 2013b; Morin et al., 2020) and in *SDHB* pheochromocytoma tumors (Morin et al., 2014; Xiao et al.,

348 2012). In link with the DNA hypermethylation we have observed a decrease of MGMT expression with  
349 an increase of MGMT promotor hypermethylation as previously described in *SDHB* pheochromocytoma  
350 tumor patients (Hadoux et al., 2014). However, the inhibition of MGMT expression does not lead to an  
351 increase of DNA double stranded cut represented by a same expression of  $\gamma$ H2A-X immunofluorescence  
352 staining. This observation may be correlated with a compensation of increased PARP activity previously  
353 described (Pang et al., 2018).

354 Moreover, Bayley and Devilee have recently observed that a majority of PPGL cellular models are not  
355 well enough characterized. More particularly, species-specific sequencing, genotyping, confirmation of  
356 disease diagnosis, genomic alterations, characterization of *SDH* invalidation, proliferation and  
357 immortalization, morphology and cell line deposit with cell repository are essential criteria to consider  
358 when a new *SDH* invalidated cellular model is developed (Bayley and Devilee, 2020).

359 In conclusion, we have developed the two first stably invalidated *SDHB*<sup>+/-</sup> human pheochromocytoma  
360 cell lines whose characterization is relevant with human *SDHB* pheochromocytomas on several criterias  
361 suggested by Bayley and Devilee. In perspective, this model may be interesting to share with the  
362 scientific community to study other deregulations than DNA hypermethylation such as hypoxia or  
363 NAD<sup>+</sup>/PARP activity as previously investigated (Morin et al., 2020; Pang et al., 2018; Selak et al., 2005).  
364 Another important point is the development of *in vivo* models with the engraftment of these clones  
365 *SDHB*<sup>+/-</sup> invalidated to permit the study of angiogenesis (Facchin et al., 2020) and to evaluate the  
366 potential of new therapeutic strategies to allow in the future to understand the tumorigenesis mechanism  
367 and to purpose new treatment to patients in the context of this rare disease.

368

### 369 **Declaration of interest**

370 There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research  
371 reported.

372

### 373 **Funding**

374 This work was supported by Gustave Roussy.

375 **References**

- 376 Aldera, A.P., Govender, D., 2018. Gene of the month: SDH. *J Clin Pathol* 71, 95–97.  
377 <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204677>
- 378 Bayley, J.-P., Devilee, P., 2020. Advances in paraganglioma–pheochromocytoma cell lines and  
379 xenografts. *Endocrine-Related Cancer* 27, R433–R450. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0434>
- 380 Birren, S.J., Anderson, D.J., 1990. A v-myc-immortalized sympathoadrenal progenitor cell line in  
381 which neuronal differentiation is initiated by FGF but not NGF. *Neuron* 4, 189–201.  
382 [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90094-V](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90094-V)
- 383 Buffet, A., Burnichon, N., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., 2020. An overview of 20 years of  
384 genetic studies in pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Practice & Research Clinical*  
385 *Endocrinology & Metabolism* 34, 101416. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101416>
- 386 Castro-Vega, L.J., Lepoutre-Lussey, C., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Favier, J., 2016. Rethinking  
387 pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective. *Oncogene* 35, 1080–1089.  
388 <https://doi.org/10.1038/onc.2015.172>
- 389 Chung, K.-F., Sicard, F., Vukicevic, V., Hermann, A., Storch, A., Huttner, W.B., Bornstein, S.R.,  
390 Ehrhart-Bornstein, M., 2009. Isolation of Neural Crest Derived Chromaffin Progenitors from Adult  
391 Adrenal Medulla. *Stem Cells* 27, 2602–2613. <https://doi.org/10.1002/stem.180>
- 392 Crona, J., Lamarca, A., Ghosal, S., Welin, S., Skogseid, B., Pacak, K., 2019. Genotype–phenotype  
393 correlations in pheochromocytoma and paraganglioma: a systematic review and individual patient  
394 meta-analysis. *Endocrine-Related Cancer* 26, 539–550. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0024>
- 395 de Wailly, P., Oragano, L., Radé, F., Beaulieu, A., Arnault, V., Levillain, P., Kraimps, J.L., 2012.  
396 Malignant pheochromocytoma: new malignancy criteria. *Langenbecks Arch Surg* 397, 239–246.  
397 <https://doi.org/10.1007/s00423-011-0850-3>
- 398 Dona, M., Waaijers, S., Richter, S., Eisenhofer, G., Korving, J., Kamel, S.M., Bakkers, J., Rapizzi, E.,  
399 Rodenburg, R.J., Zethof, J., Gorissen, M., Flik, G., Deen, P.M.T., Timmers, H.J.L.M., 2021. Loss of  
400 *sdhb* in zebrafish larvae recapitulates human paraganglioma characteristics. *Endocrine-Related Cancer*  
401 28, 65–77. <https://doi.org/10.1530/ERC-20-0308>
- 402 Eaton, M.J., Frydel, B.R., Lopez, T.L., Nie, X.T., Huang, J., McKillop, J., Sagen, J., 2000. Generation  
403 and initial characterization of conditionally immortalized chromaffin cells. *J Cell Biochem* 79, 38–57.
- 404 Facchin, C., Perez-Liva, M., Garofalakis, A., Viel, T., Certain, A., Balvay, D., Yoganathan, T.,  
405 Woszczyk, J., De Sousa, K., Sourdon, J., Provost, J., Tanter, M., Lussey-Lepoutre, C., Favier, J.,  
406 Tavitian, B., 2020. Concurrent imaging of vascularization and metabolism in a mouse model of  
407 paraganglioma under anti-angiogenic treatment. *Theranostics* 10, 3518–3532.  
408 <https://doi.org/10.7150/thno.40687>
- 409 Favier, J., Amar, L., Gimenez-Roqueplo, A.-P., 2015. Paraganglioma and phaeochromocytoma: from  
410 genetics to personalized medicine. *Nat Rev Endocrinol* 11, 101–111.  
411 <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.188>
- 412 Florio, R., De Lellis, L., di Giacomo, V., Di Marcantonio, M.C., Cristiano, L., Basile, M., Verginelli,

413 F., Verzilli, D., Ammazalorso, A., Prasad, S.C., Cataldi, A., Sanna, M., Cimini, A., Mariani-  
414 Costantini, R., Mincione, G., Cama, A., 2017. Effects of PPAR $\alpha$  inhibition in head and neck  
415 paraganglioma cells. PLoS ONE 12, e0178995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178995>

416 Gazdar, A.F., Oie, H.K., 1986. Re: Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small  
417 cell lung cancer in a serum-free defined medium. Cancer Res 46, 6011–6012.

418 Ghayee, H.K., Bhagwandin, V.J., Stastny, V., Click, A., Ding, L.-H., Mizrachi, D., Zou, Y.S., Chari,  
419 R., Lam, W.L., Bachoo, R.M., Smith, A.L., Story, M.D., Sidhu, S., Robinson, B.G., Nwariaku, F.E.,  
420 Gazdar, A.F., Auchus, R.J., Shay, J.W., 2013. Progenitor Cell Line (hPheo1) Derived from a Human  
421 Pheochromocytoma Tumor. PLoS ONE 8, e65624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065624>

422 Gimenez-Roqueplo, A.-P., Favier, J., Rustin, P., Rieubland, C., Kerlan, V., Plouin, P.-F., Rötig, A.,  
423 Jeunemaitre, X., 2002. Functional Consequences of a *SDHB* Gene Mutation in an Apparently Sporadic  
424 Pheochromocytoma. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87, 4771–4774.  
425 <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020525>

426 Greene, L.A., Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal  
427 pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proceedings of the National Academy  
428 of Sciences 73, 2424–2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>

429 Hadoux, J., Favier, J., Scoazec, J.-Y., Leboulleux, S., Al Ghuzlan, A., Caramella, C., Déandreis, D.,  
430 Borget, I., Lorient, C., Chougnet, C., Letouzé, E., Young, J., Amar, L., Bertherat, J., Libé, R., Dumont,  
431 F., Deschamps, F., Schlumberger, M., Gimenez-Roqueplo, A.P., Baudin, E., 2014. *SDHB* mutations  
432 are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or  
433 paraganglioma: Temozolomide for Malignant Pheochromocytoma/Paraganglioma. Int. J. Cancer 135,  
434 2711–2720. <https://doi.org/10.1002/ijc.28913>

435 Hescot, S., Curras-Freixes, M., Deutschbein, T., van Berkel, A., Vezzosi, D., Amar, L., de la  
436 Fouchardière, C., Valdes, N., Riccardi, F., Do Cao, C., Bertherat, J., Goichot, B., Beuschlein, F., Drui,  
437 D., Canu, L., Niccoli, P., Laboureau, S., Tabarin, A., Leboulleux, S., Calsina, B., Libé, R., Faggiano,  
438 A., Schlumberger, M., Borson-Chazot, F., Mannelli, M., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Caron, P.,  
439 Timmers, H.J.L.M., Fassnacht, M., Robledo, M., Borget, I., Baudin, E., European Network for the  
440 Study of Adrenal Tumors (ENS@T), 2019. Prognosis of Malignant Pheochromocytoma and  
441 Paraganglioma (MAPP-Prono Study): A European Network for the Study of Adrenal Tumors  
442 Retrospective Study. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 104, 2367–2374.  
443 <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01968>

444 King, M.P., Attardi, G., 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous  
445 mitochondria by complementation. Science 246, 500–503. <https://doi.org/10.1126/science.2814477>

446 Kitazawa, S., Ebara, S., Ando, A., Baba, Y., Satomi, Y., Soga, T., Hara, T., 2017. Succinate  
447 dehydrogenase B-deficient cancer cells are highly sensitive to bromodomain and extra-terminal  
448 inhibitors. Oncotarget 8, 28922–28938. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15959>

449 Kluckova, K., Tennant, D.A., 2018. Metabolic implications of hypoxia and pseudohypoxia in  
450 pheochromocytoma and paraganglioma. Cell Tissue Res 372, 367–378.  
451 <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2801-6>

452 Lenders, J.W.M., Duh, Q.-Y., Eisenhofer, G., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Grebe, S.K.G., Murad, M.H.,  
453 Naruse, M., Pacak, K., Young, W.F., 2014. Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine

- 454 Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99, 1915–  
455 1942. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1498>
- 456 Lenders, J.W.M., Kerstens, M.N., Amar, L., Prejbisz, A., Robledo, M., Taieb, D., Pacak, K., Crona, J.,  
457 Zelinka, T., Mannelli, M., Deutschbein, T., Timmers, H.J.L.M., Castinetti, F., Dralle, H., Widimský,  
458 J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Eisenhofer, G., 2020. Genetics, diagnosis, management and future  
459 directions of research of pheochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus  
460 of the Working Group on endocrine hypertension of the European society of hypertension. *Journal of*  
461 *Hypertension* Publish Ahead of Print. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002438>
- 462 Letouzé, E., Martinelli, C., Lorient, C., Burnichon, N., Abermil, N., Ottolenghi, C., Janin, M., Menara,  
463 M., Nguyen, A.T., Benit, P., Buffet, A., Marcaillou, C., Bertherat, J., Amar, L., Rustin, P.,  
464 De Reyniès, A., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Favier, J., 2013a. SDH Mutations Establish a  
465 Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma. *Cancer Cell* 23, 739–752.  
466 <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>
- 467 Letouzé, E., Martinelli, C., Lorient, C., Burnichon, N., Abermil, N., Ottolenghi, C., Janin, M., Menara,  
468 M., Nguyen, A.T., Benit, P., Buffet, A., Marcaillou, C., Bertherat, J., Amar, L., Rustin, P.,  
469 De Reyniès, A., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Favier, J., 2013b. SDH Mutations Establish a  
470 Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma. *Cancer Cell* 23, 739–752.  
471 <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.018>
- 472 Martinelli, S., Maggi, M., Rapizzi, E., 2020. Pheochromocytoma/paraganglioma preclinical models:  
473 which to use and why? *Endocrine Connections* 9, R251–R260. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0472>
- 474 Martiniova, L., Lai, E.W., Elkahloun, A.G., Abu-Asab, M., Wickremasinghe, A., Solis, D.C., Perera,  
475 S.M., Huynh, T.-T., Lubensky, I.A., Tischler, A.S., Kvetnansky, R., Alesci, S., Morris, J.C., Pacak, K.,  
476 2009. Characterization of an animal model of aggressive metastatic pheochromocytoma linked to a  
477 specific gene signature. *Clin Exp Metastasis* 26, 239–250. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9236-0>
- 478 Morin, A., Goncalves, J., Moog, S., Castro-Vega, L.-J., Job, S., Buffet, A., Fontenille, M.-J.,  
479 Woszczyk, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Letouzé, E., Favier, J., 2020. TET-Mediated  
480 Hypermethylation Primes SDH-Deficient Cells for HIF2 $\alpha$ -Driven Mesenchymal Transition. *Cell*  
481 *Reports* 30, 4551-4566.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.022>
- 482 Morin, A., Letouzé, E., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Favier, J., 2014. Oncometabolites-driven  
483 tumorigenesis: From genetics to targeted therapy: Oncometabolites-Driven Tumorigenesis. *Int. J.*  
484 *Cancer* 135, 2237–2248. <https://doi.org/10.1002/ijc.29080>
- 485 Pang, Y., Lu, Y., Caisova, V., Liu, Y., Bullova, P., Huynh, T.-T., Zhou, Y., Yu, D., Frysak, Z.,  
486 Hartmann, I., Taïeb, D., Pacak, K., Yang, C., 2018. Targeting NAD<sup>+</sup>/PARP DNA Repair Pathway as a  
487 Novel Therapeutic Approach to SDHB-Mutated Cluster I Pheochromocytoma and Paraganglioma.  
488 *Clin Cancer Res* 24, 3423–3432. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3406>
- 489 Pfragner, R., Behmel, A., Smith, D.P., Ponder, B.A.J., Wirmsberger, G., Rinner, I., Porta, S., Henn, T.,  
490 Niederle, B., 1998. [No title found]. *Journal of Neurocytology* 27, 175–186.  
491 <https://doi.org/10.1023/A:1006959625068>
- 492 Powers, J.F., Cochran, B., Baleja, J.D., Sikes, H.D., Pattison, A.D., Zhang, X., Lomakin, I., Shepard-  
493 Barry, A., Pacak, K., Moon, S.J., Langford, T.F., Stein, K.T., Tothill, R.W., Ouyang, Y., Tischler,  
494 A.S., 2020. A xenograft and cell line model of SDH-deficient pheochromocytoma derived from

495 Sdhb+/- rats. *Endocrine-Related Cancer* 27, 337–354. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0474>

496 Powers, J.F., Cochran, B., Baleja, J.D., Sikes, H.D., Zhang, X., Lomakin, I., Langford, T., Stein, K.T.,  
497 Tischler, A.S., 2018. A unique model for SDH-deficient GIST: an endocrine-related cancer.  
498 *Endocrine-Related Cancer* 25, 943–954. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0115>

499 Richter, S., Peitzsch, M., Rapizzi, E., Lenders, J.W., Qin, N., de Cubas, A.A., Schiavi, F., Rao, J.U.,  
500 Beuschlein, F., Quinkler, M., Timmers, H.J., Opocher, G., Mannelli, M., Pacak, K., Robledo, M.,  
501 Eisenhofer, G., 2014. Krebs Cycle Metabolite Profiling for Identification and Stratification of  
502 Pheochromocytomas/Paragangliomas due to Succinate Dehydrogenase Deficiency. *The Journal of*  
503 *Clinical Endocrinology & Metabolism* 99, 3903–3911. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2151>

504 Rutter, J., Winge, D.R., Schiffman, J.D., 2010. Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and  
505 role in human disease. *Mitochondrion* 10, 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.03.001>

506 Saxena, N., Maio, N., Crooks, D.R., Ricketts, C.J., Yang, Y., Wei, M.-H., Fan, T.W.-M., Lane, A.N.,  
507 Sourbier, C., Singh, A., Killian, J.K., Meltzer, P.S., Vocke, C.D., Rouault, T.A., Linehan, W.M., 2016.  
508 SDHB-Deficient Cancers: The Role of Mutations That Impair Iron Sulfur Cluster Delivery. *JNCLJ*  
509 108, djv287. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv287>

510 Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y.,  
511 Simon, M.C., Thompson, C.B., Gottlieb, E., 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to  
512 oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7, 77–85.  
513 <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.022>

514 Stuschke, M., Budach, V., Stüben, G., Streffer, C., Sack, H., 1995. Heterogeneity in the fractionation  
515 sensitivities of human tumor cell lines: Studies in a three-dimensional model system. *International*  
516 *Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 32, 395–408. [https://doi.org/10.1016/0360-](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00528-7)  
517 [3016\(95\)00528-7](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00528-7)

518 Turkova, H., Prodanov, T., Maly, M., Martucci, V., Adams, K., Widimsky, J., Chen, C.C., Ling, A.,  
519 Kebebew, E., Stratakis, C.A., Fojo, T., Pacak, K., 2016. CHARACTERISTICS AND OUTCOMES  
520 OF METASTATIC SDHB AND SPORADIC PHEOCHROMOCYTOMA/PARAGANGLIOMA: AN  
521 NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH STUDY. *Endocrine Practice* 22, 302–314.  
522 <https://doi.org/10.4158/EP15725.OR>

523 Venihaki, M., Ain, K., Dermitzaki, E., Gravanis, A., Margioris, A.N., 1998. KAT45, a Noradrenergic  
524 Human Pheochromocytoma Cell Line Producing Corticotropin-Releasing Hormone\*. *Endocrinology*  
525 139, 713–722. <https://doi.org/10.1210/endo.139.2.5724>

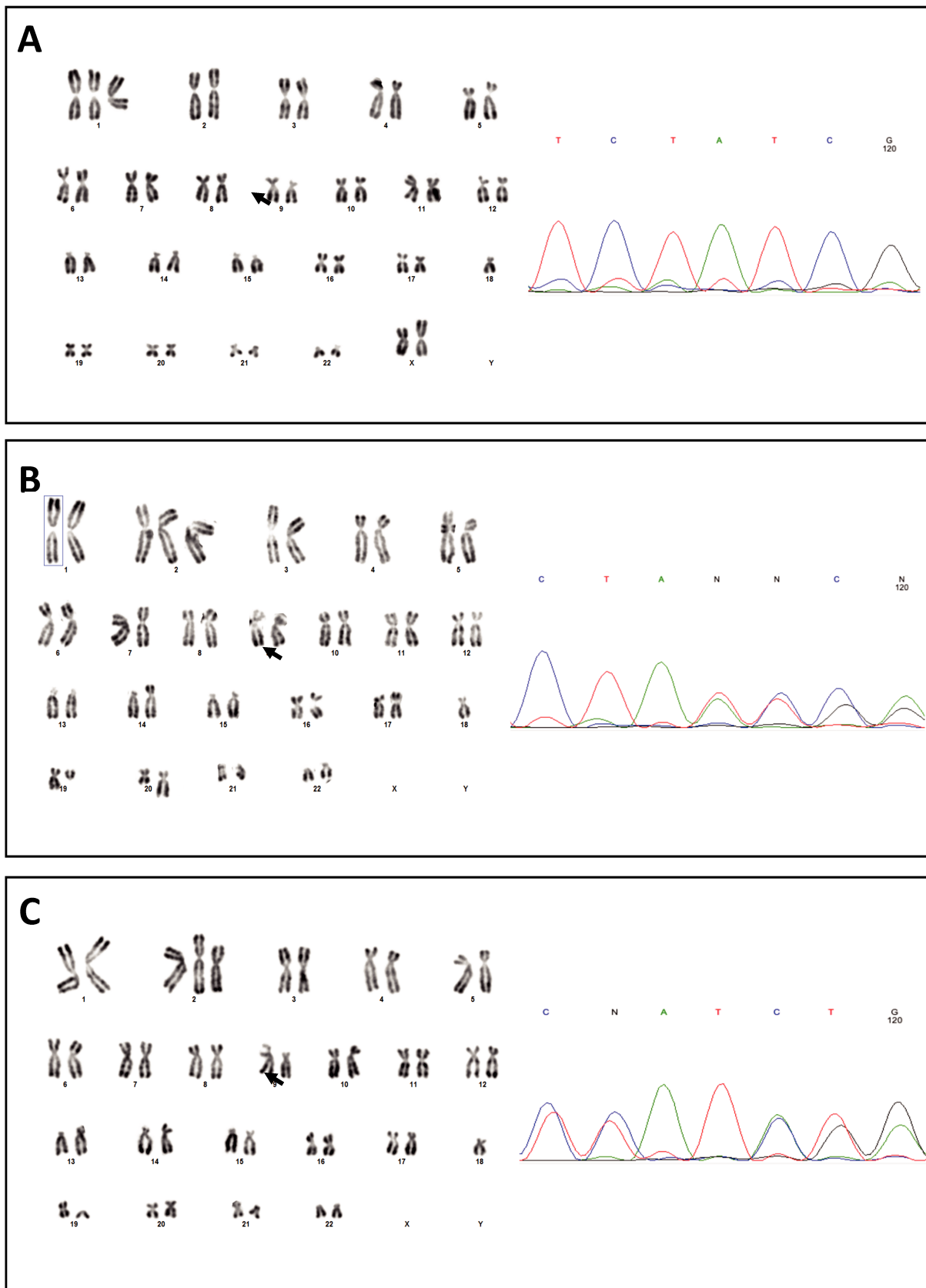
526 Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., Zhao, S., Ye,  
527 D., Xiong, Y., Guan, K.-L., 2012. Inhibition of -KG-dependent histone and DNA demethylases by  
528 fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes &*  
529 *Development* 26, 1326–1338. <https://doi.org/10.1101/gad.191056.112>

530

531

532

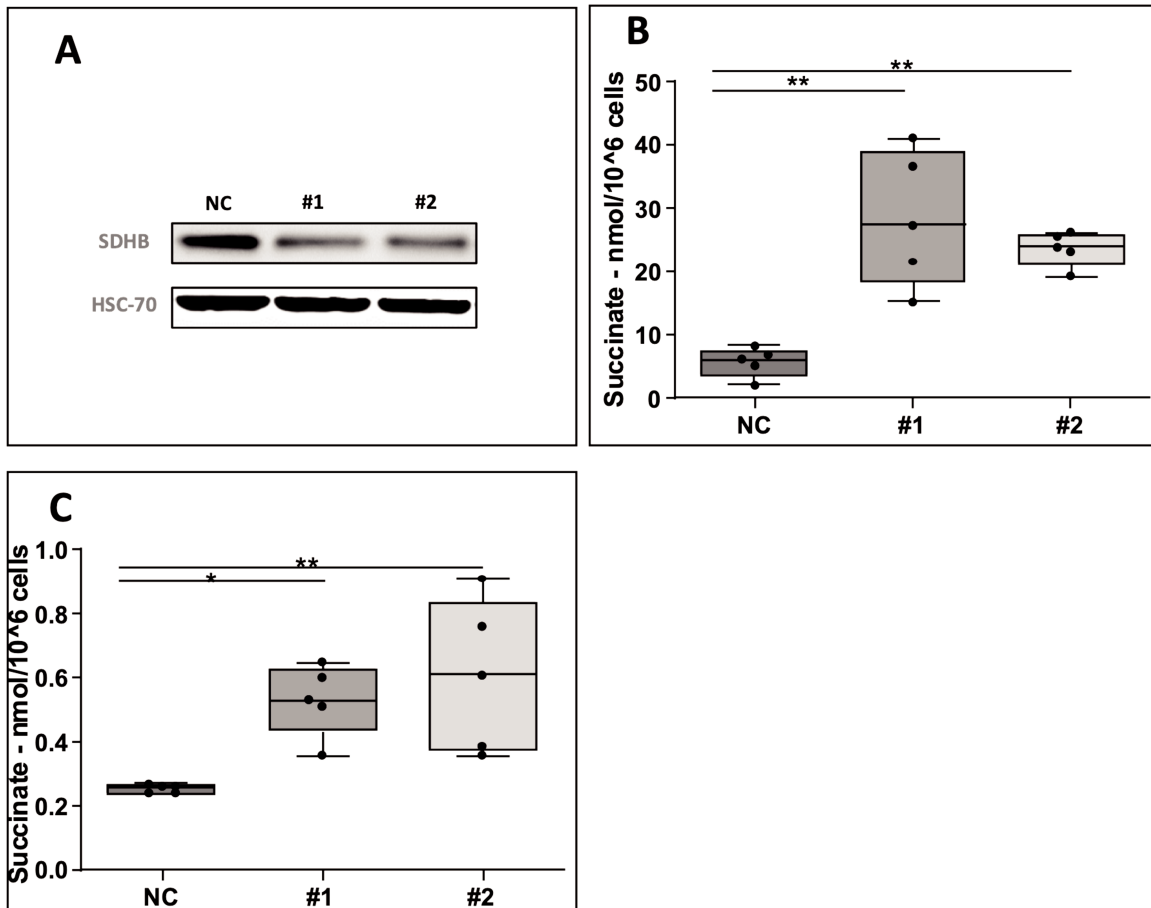
533



**Fig. 1: Karyotype analysis and sequencing of parental hPHEO1 cell line & clones *SDHB* invalidated**

**A)** Karyotype analysis (left) and sequencing of 114-120 nucleotide region of *SDHB* exon 2 (right) of parental human pheochromocytoma cell line (hPHEO1). **B)** Karyotype analysis (left) and sequencing of 114-120 nucleotide region of *SDHB* exon 2 (right) of the clone #1 *SDHB* invalidated. **C)** Karyotype analysis (left) and sequencing of 114-120 nucleotide region of *SDHB* exon 2 (right) of the clone #2 *SDHB* invalidated.



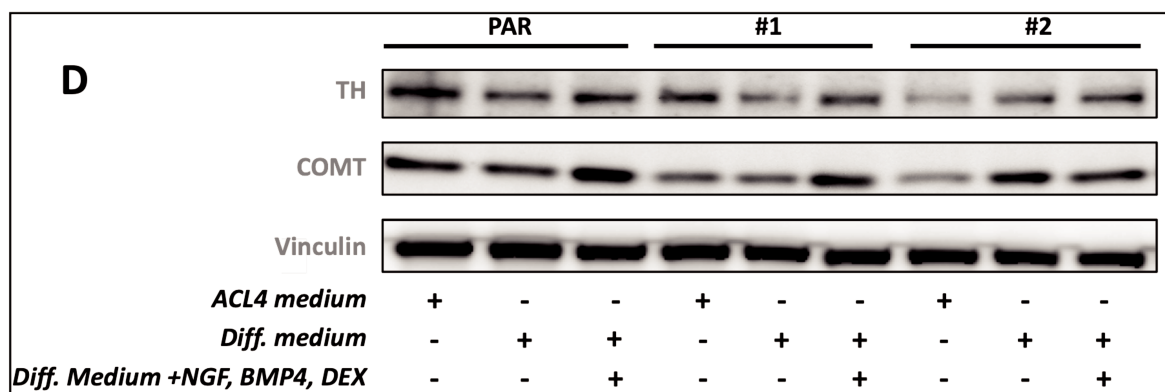
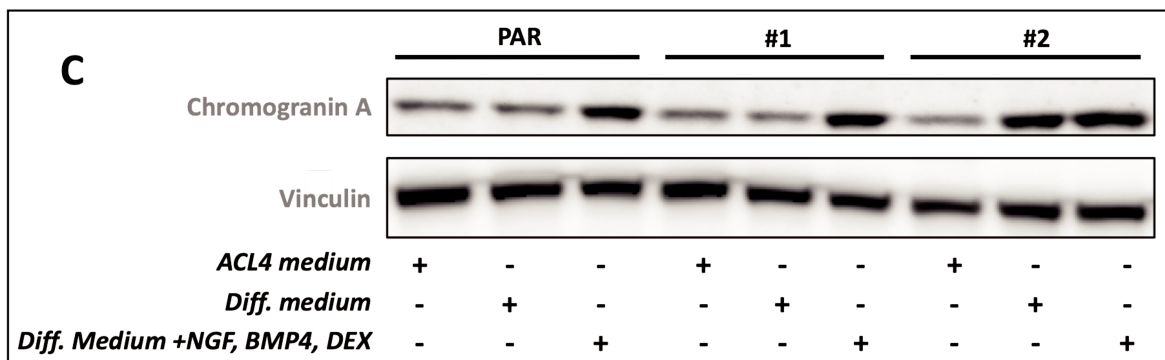
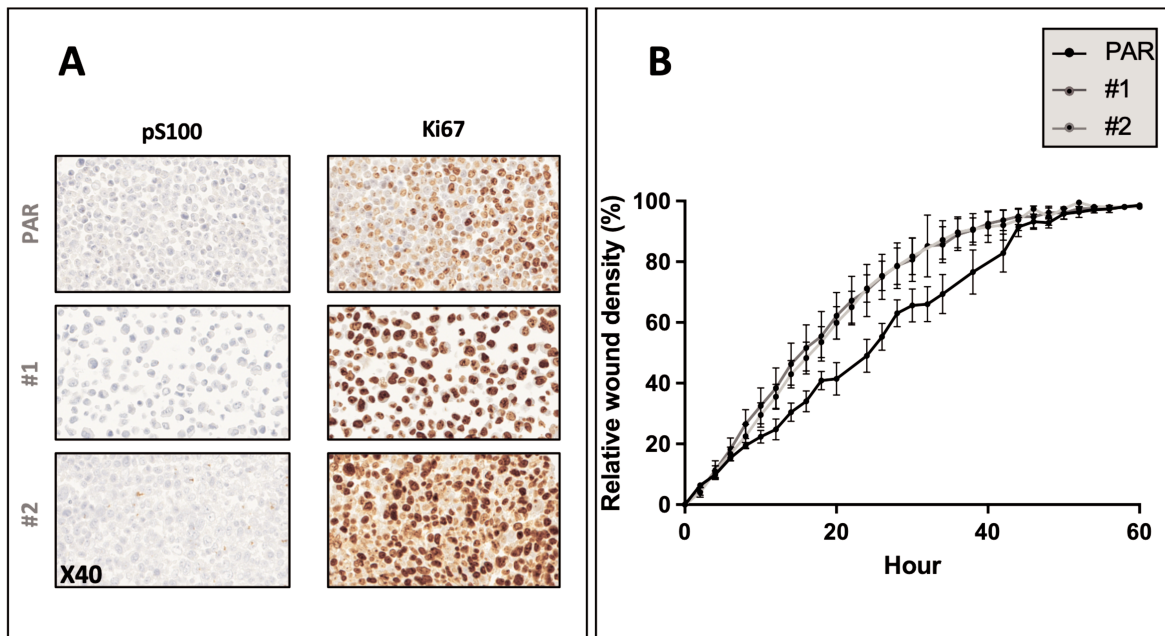


**Fig. 2: Characterization of SDHB expression on clones *SDHB* invalidated**

**A)** SDHB expression by western blot. Expression of HSC-70 corresponds to the control loading.

**B)** Extracellular succinate quantification. **C)** Intracellular succinate quantification.

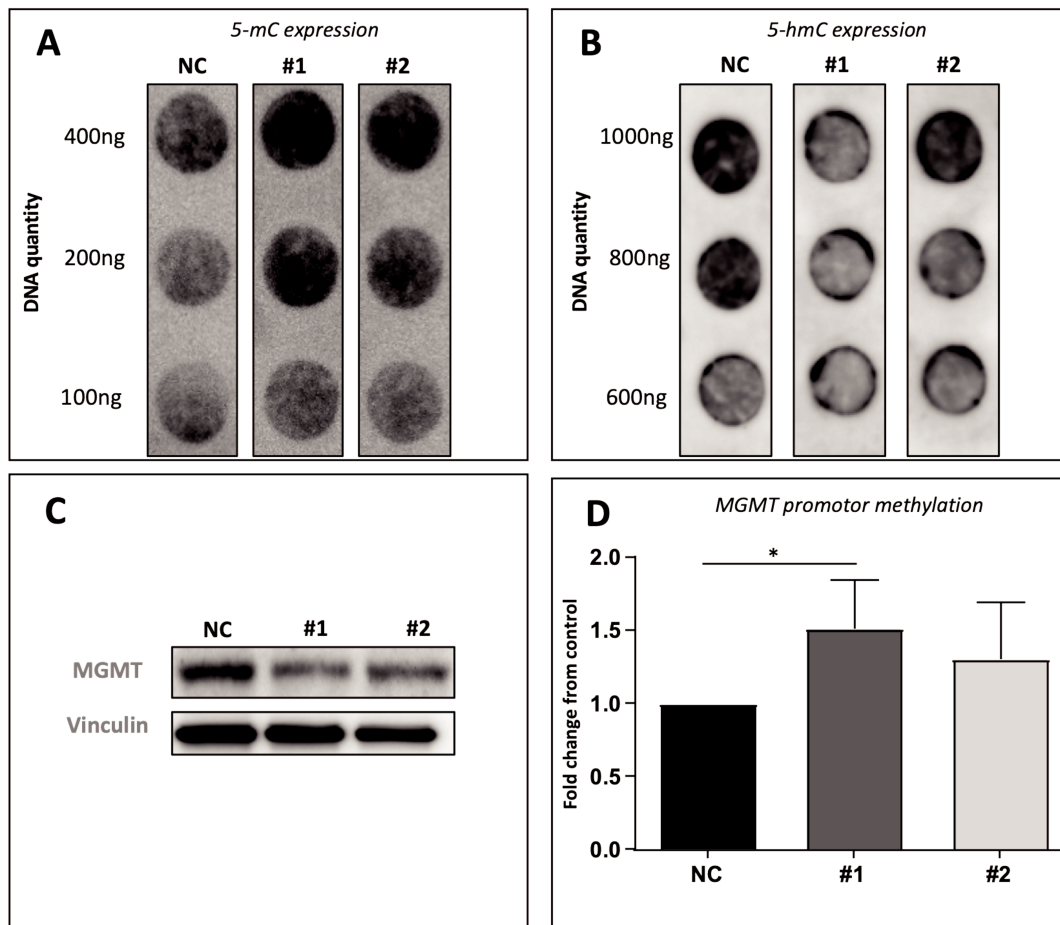
**NC:** Negative Control hPHEO1 cell line; **#1, #2:** clones *SDHB* invalidated.



**Fig. 3: Phenotypic characterization of clones *SDHB* invalidated**

**A)** Immunocytochemistry of pS100 and Ki67 markers. **B)** Migration scratch assay. Mean is represented at each time point  $\pm$  SEM. **C)** Chromogranin A expression by western blot. **D)** Catechol-O-methyltransferase (COMT) and Tyrosine hydroxylase (TH) expression by western blot.

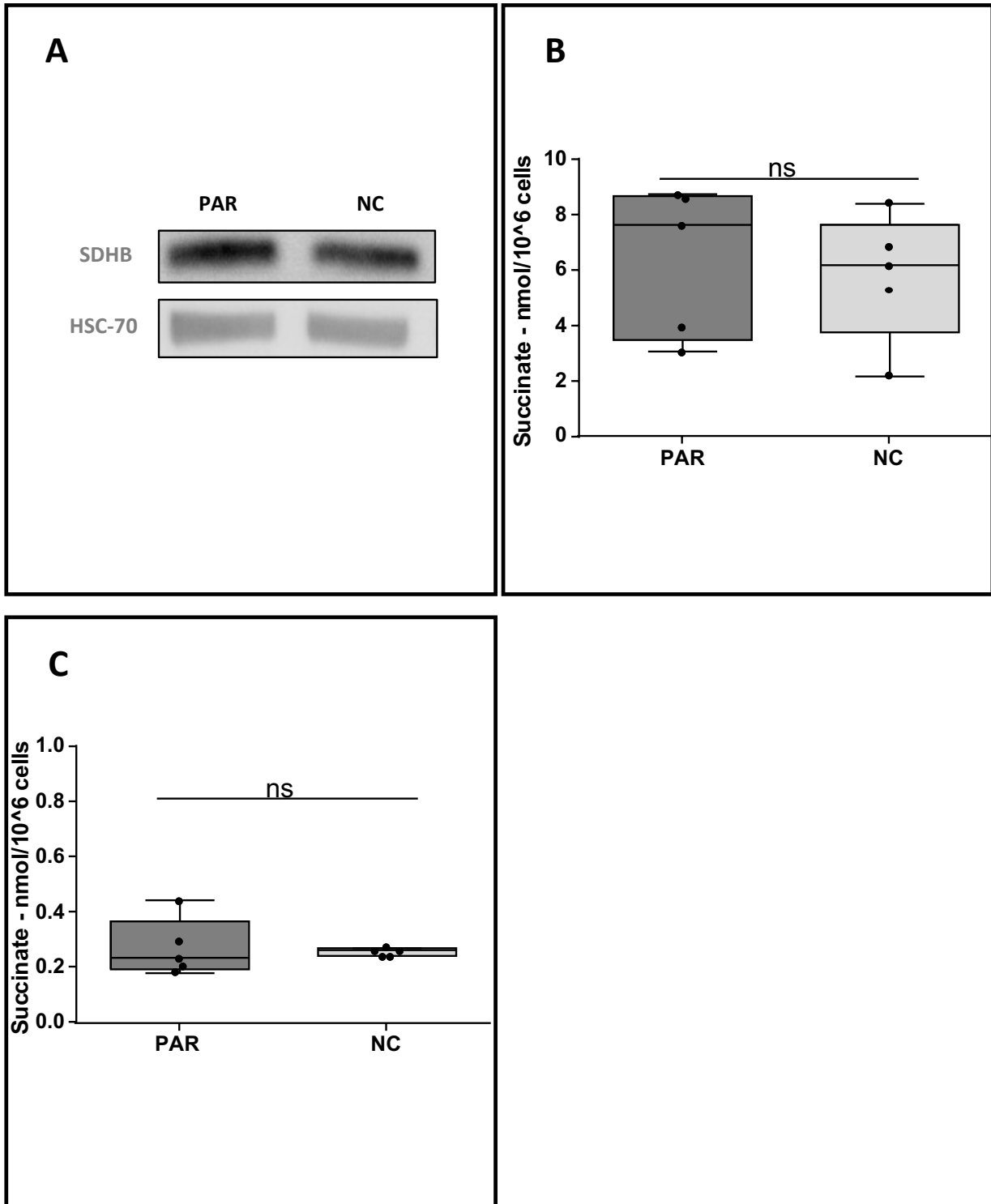
**PAR:** parental human pheochromocytoma cell line (hPHEO1); **#1, #2:** clones *SDHB* invalidated. Diff. Medium: Differentiation medium.



**Fig. 4: Methylation profile of clones *SDHB* invalidated**

**A)** 5-methylcytosine (5-mC) expression by dot-blot. **B)** 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) expression by dot-blot. **C)** MGMT expression by western blot. **D)** Methylation expression in the promoter of MGMT gene.

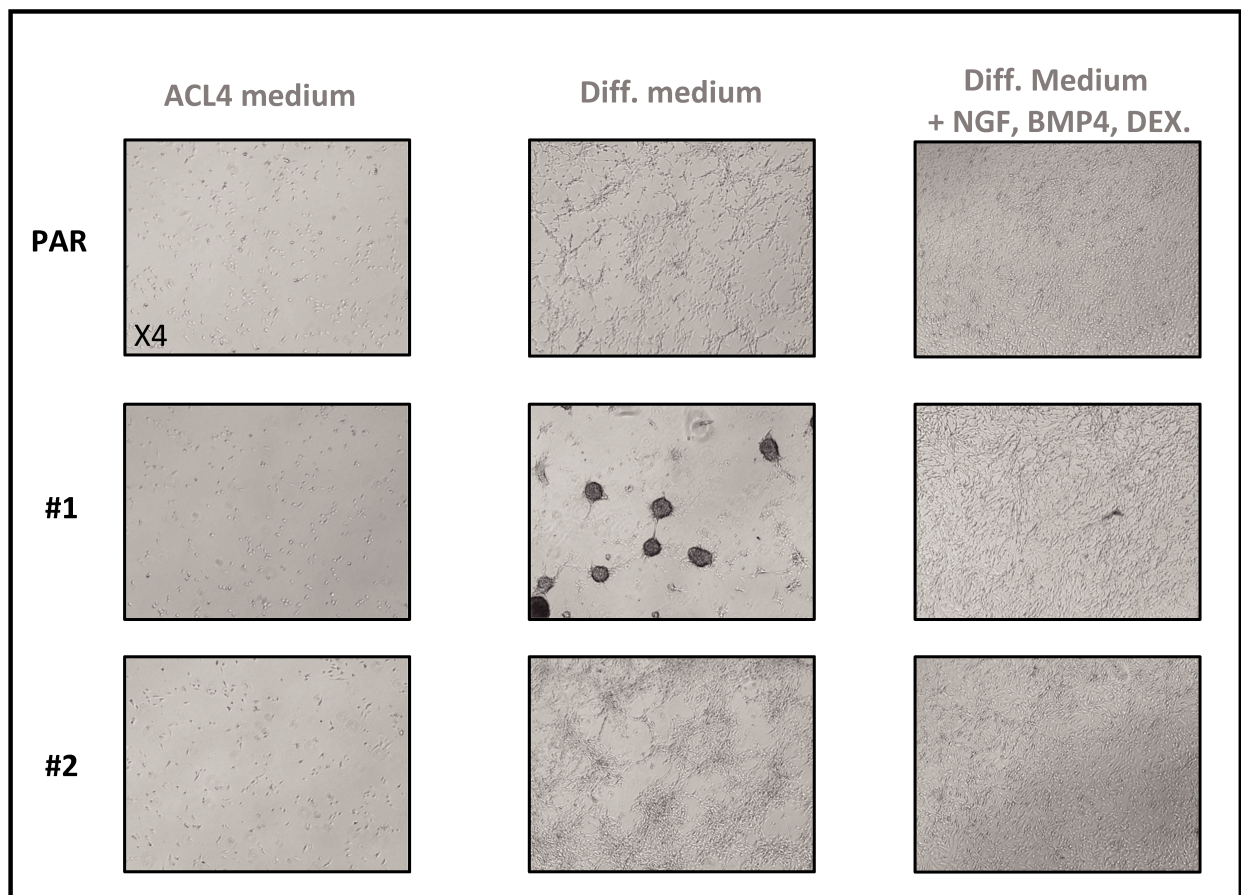
**NC:** Negative Control hPHEO1 cell line; **#1 & #2:** clones *SDHB* invalidated.



**Supplementary data 1: Comparison of SDHB expression on parental and negative control cell lines**

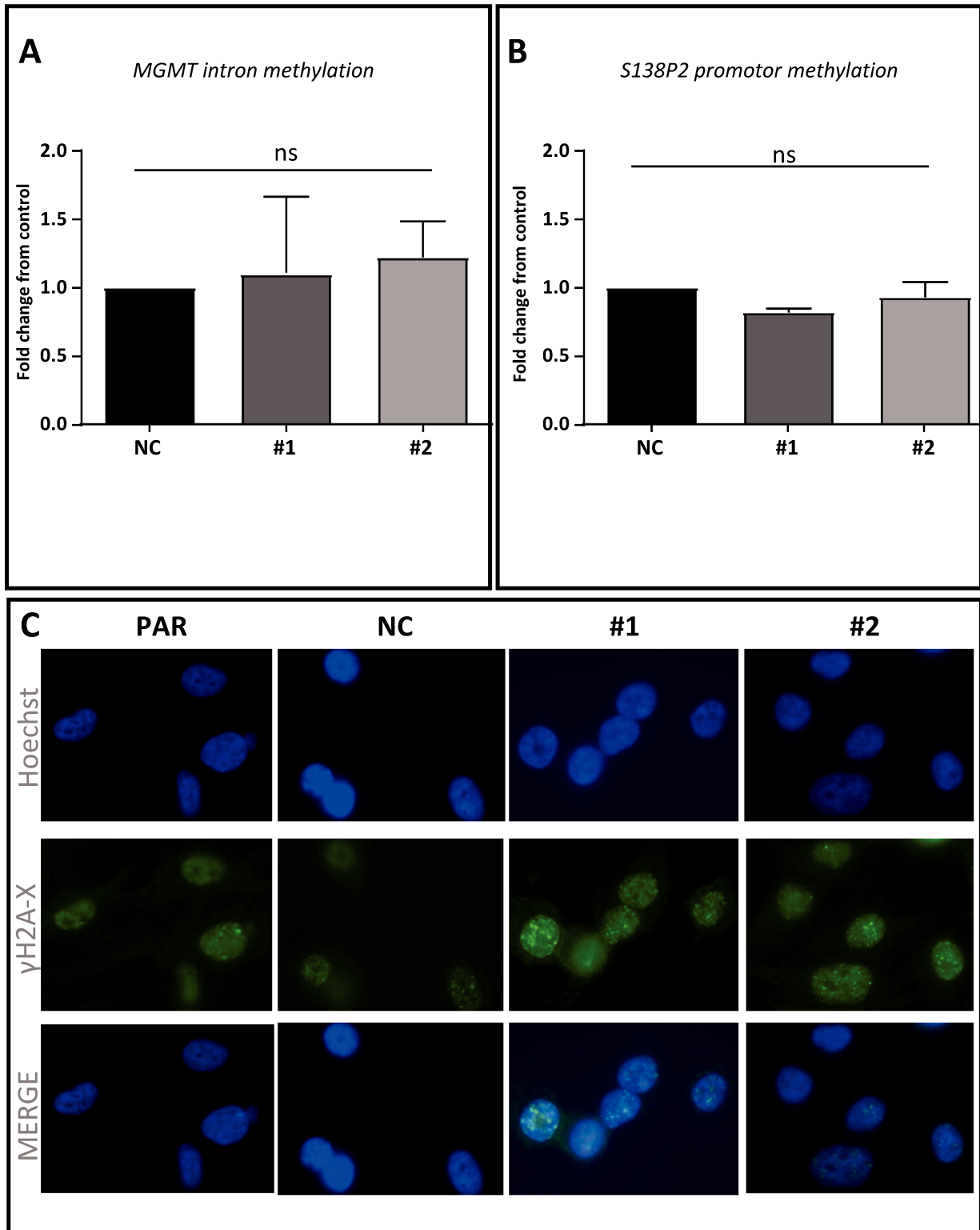
**A)** SDHB expression by western blot. **B)** Extracellular succinate quantification. **C)** Intracellular succinate quantification.

**PAR:** hPHEO1 parental cell line; **NC:** Negative Control hPHEO1 cell line. **ns** : no significant



**Supplementary data 2: Morphologic profile of clones SDHB invalidated and parental cell line**

Morphology of #1, #2 and PAR cell line under ACL4 medium, differentiation medium or differentiation medium +NGF, BMP4, DEX.; **DEX**: dexamethasone.



**Supplementary data 3: Methylation expression of negative control and clones *SDHB* invalidated**

**A)** Methylation expression in the intron of *MGMT* gene. **B)** Methylation expression in the promotor of *BCAT* gene. **C)**  $\gamma$ H2A-X and Hoechst Immunofluorescence.

**PAR:** Parental hPHEO1 cell line; **NC:** Negative control hPHEO1 cell line; **#1 & #2:** clones *SDHB* invalidated.

**ns :** no significant

### 3.1.3. Discussion de l'article et conclusions

A ce jour, nous avons développé les 2 premières lignées cellulaires de phéochromocytome humain présentant une invalidation stable du gène *SDHB* par CRISPR-Cas9. Pour cela, nous avons ciblé l'exon 2 du gène *SDHB*, dont les mutations ont été corrélées dans la littérature à une perte de fonction de la protéine, du fait que cet exon se situe à proximité des liaisons fer-soufre essentielles à l'activité enzymatique du complexe protéique SDH [271, 272]. Cette invalidation par CRISPR-Cas9 du gène *SDHB*, en ciblant l'exon 2, a déjà été réalisée avec succès dans un modèle cellulaire de cancer du côlon, et des résultats comparables ont été obtenus [268].

Parmi les 360 clones sélectionnés après transfection, 3 clones *SDHB* invalidé ont été obtenus. Dans le cadre de l'article présenté précédemment, le choix a été fait de ne décrire que 2 clones (#1 et #2). Nous pouvons toutefois noter que le troisième clone (#3), présente une inversion de l'exon 2 qui le rend non fonctionnel (diminution de l'expression protéique de SDHB associée à une augmentation significative des concentrations intracellulaires de succinate) (**Annexe 1**). Ce troisième clone a cependant été sélectionné avec le clone #1 pour l'étude métabolomique qui sera présenté dans le paragraphe 3.4.

En terme de caractérisation des deux clones (#1 et #2) *SDHB* invalidé décrits dans ce papier, leur **caryotypage** met en évidence la même délétion du chromosome 9 (Del9p) que la lignée parentale hPheo1 initialement développée par *Gayhee & al* [251]. La comparaison des clones #1 et #2 avec la lignée parentale montre que les clones restent stables au niveau de leur profil chromosomique et que l'application du CRISPR-Cas9 n'a pas entraîné de dérive du modèle cellulaire hPheo1. D'autre part, le **génotypage** réalisé par la méthode Sanger de l'exon 2 du gène *SDHB*, confirme le profil hétérozygote des clones #1 et #2 en comparaison à la lignée parentale. Aucune mutation homozygote n'a été obtenue, ce qui nous laisse penser qu'elle pourrait être létale pour la cellule dans notre modèle hPheo1 utilisé, notamment au stade p0, lorsqu'une seule cellule est isolée dans un puits sans communication possible avec d'autres cellules avoisinantes.

Au niveau protéique, l'**expression de SDHB** dans les clones #1 et #2 est diminuée d'environ 50% en comparaison à la lignée parentale, en cohérence avec la présence d'une mutation hétérozygote. Cependant, cette perte d'expression de la protéine SDHB est suffisante pour entraîner une augmentation significative des concentrations intra et extracellulaire du succinate dans les clones #1 et #2 en comparaison à la lignée cellulaire parentale.

La caractérisation phénotypique des clones *SDHB* invalidé a permis de mettre en évidence une absence d'expression de pS100 mais également une augmentation de l'expression de Ki67 en immunocytochimie

en comparaison à la lignée parentale, ce qui confirme le caractère **malin** et le profil **agressif** des clones *SDHB*<sup>+/−</sup> associés à un **potentiel métastatique** [201]. L'analyse de la migration des deux clones #1 et #2 en comparaison à la lignée contrôle négatif confirme leur caractère agressif, comme cela a été décrit chez les patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté [99, 120, 134]. D'autre part, une des caractéristiques des PPGL est la sécrétion de catécholamines. Comme cela a été précédemment démontré pour la lignée parentale hPheo1 [251], les clones #1 et #2 continuent de sécréter des catécholamines en présence d'un milieu de culture induisant la différenciation cellulaire [273]. Dans ces conditions, l'expression des marqueurs de sécrétion tels que la chromogranine A, la TH et COMT a été observée dans la lignée hPheo1 et les 2 clones *SDHB* invalidé.

Le succinate, accumulé par la perte de fonction de la SDH, est connu pour induire une hyperméthylation de l'ADN causée par l'inhibition de la PHD, traduisant une accumulation de la 5-méthylcytosine et une diminution de la 5-hydroxyméthylcytosine [255]. L'hyperméthylation de l'ADN est également causée par l'inhibition de la MGMT dans les PPGL *SDHB* muté, impliquée physiologiquement dans la réparation des dommages de l'ADN [235]. Dans ce travail, nous avons montré que les clones *SDHB* invalidé ont un profil hyperméthylé en lien avec une augmentation de l'expression de la 5-méthylcytosine et une diminution de l'expression de la 5-hydroxyméthylcytosine en comparaison à la lignée contrôle négatif. Par ailleurs, la perte d'expression de la MGMT a bien été confirmée dans les clones #1 et #2 associée à une augmentation de la méthylation du promoteur de la MGMT comme cela a été décrit dans la littérature [235]. Cependant, une augmentation des cassures de l'ADN dans les clones *SDHB* invalidé n'a pas été mise en évidence en comparaison à la lignée contrôle négatif, comme le montre le marquage  $\gamma$ H2A-X. Une hypothèse qui pourrait expliquer ce phénomène serait une augmentation de l'activité de la PARP et de son cofacteur NAD<sup>+</sup> comme cela a été décrit dans un modèle cellulaire de phéochromocytome *SDHB* invalidé par shARN [242]. En effet, la PARP est également impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN. L'augmentation de son activité pourrait être à l'origine de la compensation de la perte d'expression de la MGMT, ce qui expliquerait le fait que nos clones *SDHB* invalidé ne présenteraient pas une augmentation des cassures de l'ADN. Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence une déficience en HRR<sup>1</sup> dans des modèles cellulaires *SDHB* invalidé, permettant une sensibilisation de ces derniers aux inhibiteurs de PARP. Ce point pourrait également être étudié dans nos modèles, notamment par un immunomarquage de RAD51, recombinaise impliquée dans la réparation des lésions doubles brins de l'ADN.

---

<sup>1</sup> Homologous recombination repair



En conclusion, nous avons pu développer les premiers modèles cellulaires de phéochromocytome humain présentant une invalidation hétérozygote du gène *SDHB*. La caractérisation des deux clones obtenus *SDHB*<sup>+/-</sup> a été établie selon les suggestions de *Bayley et Devilee* (Tableau 5) et a permis de montrer que ces derniers partagent un certain nombre de critères décrits chez les patients atteints d'un phéochromocytome *SDHB* muté.

En perspective, ce modèle pourrait permettre d'étudier d'autres dérégulations induites par l'accumulation du succinate, telles que l'hypoxie ou encore les dérégulations de la chaîne de transport des électrons mais également l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par ailleurs, ces clones *SDHB*<sup>+/-</sup> pourront être xenogreffés sur un modèle de souris immunodéficiente afin d'accéder à un modèle plus proche de celui du patient, permettant d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses (saisine acceptée par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation ; N° 2019110715265336). Enfin, il serait intéressant d'invalider les autres sous-unités de la SDH (*SDHA*, *SDHC*, *SDHD* et *SDHAF2*) par délétion d'exons ou en introduisant une mutation spécifique retrouvée chez les patients atteints d'un cancer *SDH* muté. Il serait également pertinent d'induire la réexpression de la SDH dans nos modèles comme contrôle de l'impact de la perte d'expression génique de *SDHB* sur les mécanismes d'oncogenèse étudiés.

## 3.2. ÉVALUATION DE NOUVELLES THÉRAPIES DANS LES PPGL *SDH* MUTÉ

### 3.2.1. Principales cibles thérapeutiques

Les mutations des gènes codant pour la SDH entraînent une perte de fonction de cette enzyme mitochondriale ce qui a pour conséquence une diminution de la production de fumarate et une accumulation du succinate qui joue le rôle d'oncométabolite. Le succinate accumulé inhibe ainsi les **dioxygénases** dépendantes de l'**α-kétoglutarate** et du **fer** [274]. Les dérégulations induites de voies métaboliques et épigénétiques ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et ont conduit à l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées (Figure 22).

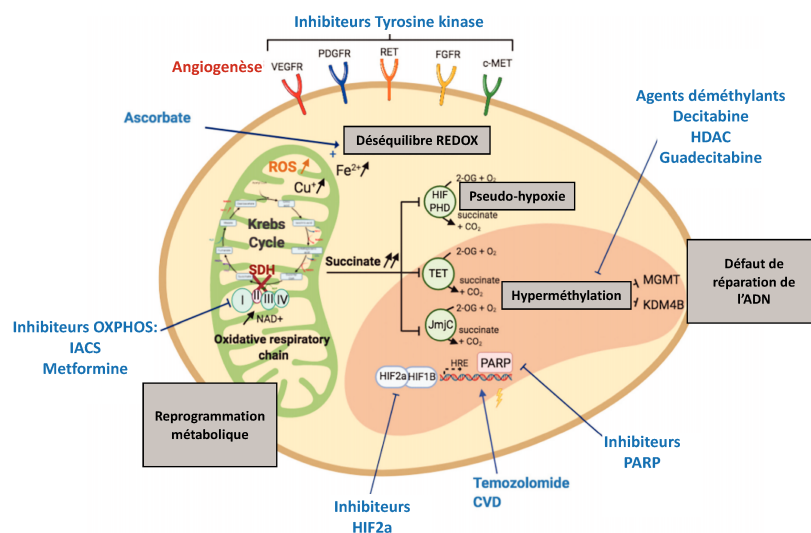


Figure 23 : Dérégulations des voies métaboliques et épigénétiques dans les cancers *SDH* muté (D'après Moog et al., 2020).

### 3.2.1.1. L'hypoxie

La régulation de la quantité d'oxygène disponible pour la cellule en condition d'**hypoxie**<sup>1</sup> est gérée par une dioxygénase dépendante de l' $\alpha$ -kétoglutarate : la **PHD**<sup>2</sup> (isoformes 1 à 3). En condition normoxique, la PHD convertit **HIF1 $\alpha$**  et **HIF2 $\alpha$**  en respectivement **HIF1 $\alpha$**  et **HIF2 $\alpha$  dihydroxylés**, reconnus par la protéine VHL qui entraîne leur ubiquitinylation et leur dégradation par le protéasome. Dans le cas des cancers *SDH* muté, le succinate accumulé inhibe les PHD ce qui a pour conséquence une accumulation des facteurs de l'hypoxie HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ , caractéristiques du **profil pseudo-hypoxique** des tumeurs [78]. Ce phénomène entraîne de nombreuses dérégulations dont l'**adaptation métabolique** en lien avec l'effet Warburg, la **prolifération**, le **maintien de la survie cellulaire**, des **modifications de la matrice extracellulaire** et l'**angiogenèse** [275]. De ce fait, cibler l'angiogenèse en utilisant des **inhibiteurs à activité tyrosine kinase** (ITK) ciblant le récepteur VEGFR, tel que le **Sunitinib**, est une option thérapeutique pertinente qui est en cours d'évaluation dans des essais cliniques (Clinicaltrials.gov : NCT01371201 et NCT00843037) [276]. Une autre option envisagée est l'utilisation d'**antagonistes de HIF2 $\alpha$**  qui empêchent la fixation de ce dernier au complexe ARNT/HIF $\beta$  bloquant son activité transcriptionnelle. L'un d'eux, le **PT2977** est notamment évalué dans une étude de phase I chez des patients présentant des tumeurs solides avancées dont l'un des patients est atteint d'un PPGL *SDHB* muté et dont la maladie est stable sous traitement à plus de 25 semaines associé à une chute des taux de normétanéphrine (Clinicaltrials.gov : NCT02974738) [277]. L'évaluation de l'efficacité de cette classe pharmacologique dans la prise en charge des tumeurs *SDH* muté reste à confirmer mais pourrait être prometteuse en combinaison avec d'autres traitements, tel que le Sunitinib, dans le cas des PPGL métastatiques.

### 3.2.1.2. L'hyperméthylation de l'ADN et des histones

Le succinate accumulé par la perte de fonction de la SDH inhibe deux autres dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -kétoglutarate : **TET** (Ten-eleven translocation) et les histones déméthylases spécifiques des lysines (**KDM**). TET convertit la **5-méthylcytosine** (5-mC) en **5-hydroxyméthylcytosine** (5-hmC) tandis que les **KDM** contenant des **domaines JmjC** sont quant à elles responsables de l'oxydation des groupes méthyles dans les chaînes latérales de la lysine des **histones H3** [278]. L'inhibition de ces dioxygénases a pour conséquence une hyperméthylation de l'ADN et des histones H3 [255, 279].

De ce fait, les agents déméthylants tels que la **5-Azacitidine** ou la **Décitabine**, qui sont des **inhibiteurs**

---

<sup>1</sup>Quantité insuffisante d'oxygène apportée par le sang aux organes et aux muscles

<sup>2</sup>Prolyl hydroxylase domain

de l'ADN méthyltransférase (DNMT) ont été envisagés en clinique. Récemment, un inhibiteur de DNMT de nouvelle génération, la **Guadecitabine**, est en cours d'évaluation dans un essai clinique de phase II incluant 9 patients dont 7 sont porteurs d'une mutation *SDH*. Cependant, l'essai clinique s'est terminé de manière anticipée du fait d'un faible taux d'inclusion de patients. Les résultats préliminaires sont pour le moment décevants et nécessiteraient d'être approfondis sur une cohorte de patients plus importante [280]. Enfin on peut noter que des **inhibiteurs de l'histone déacétylase** (HDAC) semblent augmenter la recapture du <sup>123</sup>I-MIBG dans un modèle murin de phéochromocytome métastatique présentant une invalidation *NF1* [281]. Cette stratégie pourra être également évaluée sur d'autres profils moléculaires de PPGL, tels que les mutations *SDH*.

### 3.2.1.3. Les mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN

En 2014, *Hadoux et al.*, ont montré une **inhibition** de la **MGMT** causée par une **hyperméthylation** de son **promoteur** chez des patients atteints d'un **PPGL *SDHB* muté** [235]. La MGMT est une protéine impliquée dans la réparation des dommages causés à l'ADN. Plus précisément, la MGMT a une action déméthylante en transformant la O<sup>6</sup>-méthylguanine en guanine. De ce fait, l'utilisation d'**agents alkylants**, tel que le **Témazolomide** qui méthyle l'ADN en position O<sup>6</sup> et N<sup>7</sup> de la guanine semblerait pertinente. Cliniquement, des patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté et traités par Témazolomide ont montré une meilleure survie sans progression (19,7 mois) que des patients atteints d'un PPGL sporadique et traités par Témazolomide également (2,9 mois) [235].

La **PARP<sup>1</sup>** est une enzyme impliquée dans la réparation des cassures simple brin de l'ADN et stabilise la réplication de l'ADN. Cette dernière semble être une nouvelle cible thérapeutique prometteuse. En effet, une étude menée sur un modèle cellulaire de phéochromocytome *SDHB* invalidé a montré une augmentation de l'activité du complexe I de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale associée à une augmentation de NAD<sup>+</sup> disponible, cofacteur de la PARP, permettant une augmentation de l'activité de cette dernière [242]. D'autre part, le succinate accumulé par l'inhibition de la SDH bloque la voie de réparation de l'ADN par recombinaison homologe en inhibant des KDM<sup>2</sup> (KDM4A et KDM4B), ce qui est un argument supplémentaire pour cibler l'inhibition de la PARP et/ou de son cofacteur NAD<sup>+</sup> [80, 282]. L'utilisation d'inhibiteurs de PARP, tel que l'**Olaparib** et le **Talazoparib**, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* montre une meilleure sensibilité en présence d'une mutation *SDH* que dans des modèles *SDH*-WT [282].

Enfin, la **Nicotinamide phosphoribosyltransférase** (NAMPT) transforme le nicotinamide en nicotinamide

---

<sup>1</sup> Poly(ADP-ribose) polymérase

<sup>2</sup> Lysine déméthylase

mononucléotide dans la voie de récupération du NAD<sup>+</sup> (NAD<sup>+</sup> salvage pathway). Des inhibiteurs de la NAMPT, tel que le **FK866** (Daporinad) semblent être efficaces dans des modèles *vitro* et *vivo* lorsqu'ils sont utilisés dans des cancers déficients en mécanismes de réparation de l'ADN [283]. Cette stratégie thérapeutique n'a jamais été étudiée dans les cancers *SDH* muté et son association avec le Témazolomide pourrait être prometteuse. Cette nouvelle observation ouvre la perspective de l'évaluation du FK866 seul ou combiné au Témazolomide dans la prise en charge des PPGL *SDH* muté.

#### 3.2.1.4. *Places des combinaisons de traitements*

La mise en place de **combinaisons de traitements** est une stratégie pertinente visant à augmenter l'efficacité et à diminuer les phénomènes de résistance, généralement observés avec les thérapies seules. Dans le cas des PPGL, la dérégulation concomitante de plusieurs voies de signalisation comme décrit précédemment, justifie la mise en place de traitements combinés comme stratégie thérapeutique prometteuse pour améliorer la survie globale des patients.

Des études précliniques et cliniques ont mis en évidence une synergie de certaines associations de traitements dans des modèles de PPGL. C'est notamment le cas de l'association du **Témazolomide** avec l'**Olaparib** dans un modèle murin de phéochromocytome *SDHB* invalidé [242]. Les résultats prometteurs obtenus sont en cours d'évaluation dans une étude de phase II (Clinicaltrials.gov : NCT04394858).

Une étude translationnelle incluant des lignées cellulaires *SDHB* invalidé (MPC/MTT) ainsi que des tumeurs primaires de patients atteints d'un PPGL +/- *NF1* muté a montré une synergie de la combinaison du **Témazolomide** avec un inhibiteur de PARP, le **Niraparib**, ainsi que du **Sunitinib** avec un inhibiteur de la voie mTOR (mTORC1/mTORC2), l'**Everolimus**. Cependant, la combinaison de traitement la plus prometteuse dans cette étude est l'association de l'**Everolimus** avec un **inhibiteur de la phosphoinositide 3-kinase** (PI3K), **BYL719**, qui a montré une diminution de la viabilité cellulaire associée à une répression de l'activation d'AKT induite par l'Everolimus seul [238]. La combinaison du **Sunitinib** avec la **Rapamycine** (inhibiteur de mTOR) chez un patient atteint d'un PPGL métastatique *SDHB* muté a par ailleurs permis d'obtenir une efficacité associée à une réponse partielle durable à 36 mois [237].

Ces études préliminaires sont prometteuses pour améliorer la prise en charge des patients d'un PPGL avancé et/ou métastatique et méritent d'être évaluées en clinique afin de confirmer que l'association de traitements n'induit pas une augmentation de la toxicité et que la combinaison est bénéfique au patient.

### 3.2.2. Évaluation préclinique de la combinaison Témzolomide/inhibiteurs de PARP et impact de l'inactivation du gène *SDHB*

Les dérégulations des voies de signalisation induites par les mutations *SDH* ont conduit à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et par conséquent de nouveaux traitements prometteurs. Nous avons sélectionné 5 drogues ayant démontré seule un intérêt et agissant sur ces voies : la 5-Azacytidine (agent déméthylant), le Sunitinib (inhibiteur à activité tyrosine kinase ciblant le récepteur VEGFR), le Témzolomide (agent alkylant), le Talazoparib (inhibiteur de PARP) et le FK866 (inhibiteur de la NAMPT). Leurs effets antiprolifératifs ont été évalués sur la lignée parentale hPheo1 (PAR), les 2 clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (#1 et #2), ainsi que le contrôle négatif de transfection (CN). Par la suite, les combinaisons de chaque traitement 2 à 2 ont permis de sélectionner 2 combinaisons synergiques, qui seront présentées dans la suite de ce travail : Témzolomide/Talazoparib et Témzolomide/FK866 selon la méthode de Chou-Talalay basée sur l'équation médiane-effet. L'indice de combinaison (IC) qui en résulte permet d'identifier un effet synergique, additif ou antagoniste de la combinaison [284].

La combinaison du Témzolomide avec les inhibiteurs de PARP semble être une stratégie prometteuse pour améliorer la prise en charge des PPGL métastatiques *SDHB* muté, pour lesquels la prise en charge actuelle reste limitée.

#### 3.2.2.1. Matériels et méthodes

- Culture cellulaire

Les lignées cellulaires parentale hPheo1 (lignée humaine de phéochromocytome), contrôle négatif (lignée cellulaire résistante à la puromycine et transfectée avec un vecteur vide du CRISPR-Cas9) et les clones #1 et #2 *SDHB*<sup>+/-</sup> ont été cultivés dans du milieu ACL4 contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio, les Ulis, France) et 1% d'antibiotiques Penicilline-Streptomycine (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, États-Unis), à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> [285].

- Traitements

L'Azacytidine, le Témzolomide, le FK866 (Sigma Aldrich, Missouri, États-Unis), le Sunitinib et le Talazoparib (Selleck chemicals, Texas, États-Unis) ont été stockés à -80°C aux concentrations respectives de 20 mM, 5 mM, 170 mM, 10 mM et 1 mM dans 100% de diméthylsulfoxyde (DMSO).

- Effets antiprolifératifs des traitements seuls

Pour chaque lignée cellulaire, 8000 cellules/150µL/puits ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (TPP, Trasadingen, Suisse). Après 24h, les cellules ont été traitées par une gamme de concentrations croissantes de chaque drogue seule : Azacytidine [0,25 – 120 µM] ; Sunitinib [0,125 – 40 µM] ; Témazolomide [16 – 4000 µM] ; Talazoparib [10 – 50 000 nM] et FK866 [1 – 50 nM]. L'effet antiprolifératif des différents traitements a été évalué à 72h après le début du traitement, par un test colorimétrique, le WST-1® (Roche, Bâle, Suisse). La lecture de l'absorbance à 450 nm a été réalisée sur le lecteur de plaque EnSpire multimode® (PerkinElmer, Massachussetts, États-Unis).

- Évaluation de l'effet antiprolifératif des traitements et de l'index de combinaison (IC)

Pour chaque lignée cellulaire, 8000 cellules/150µL/puits ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (TPP, Trasadingen, Suisse). Après 24h, les cellules ont été traitées par une gamme de concentrations croissantes de chaque drogue combinée selon un ratio constant : Témazolomide/Talazoparib [62 500/10 – 2 000 000/312,5 nM] et Témazolomide/FK866 [62 500/0,781 – 2 000 000/25 nM].

L'effet antiprolifératif des différents traitements a été évalué à 72h après le début du traitement par un test colorimétrique, le WST-1® (Roche, Bâle, Suisse). La lecture de l'absorbance à 450 nm a été réalisée sur le lecteur de plaque EnSpire multimode® (PerkinElmer, Massachussetts, États-Unis).

L'effet de la combinaison des traitements combinés face à chaque traitement seul a été évalué selon la méthode de Chou-Talalay grâce au logiciel CompuSyn®. L'index de combinaison (IC) calculé par l'algorithme du logiciel indique si la combinaison est synergique (IC<1), antagoniste (IC>1) ou additive (IC=1) à chaque concentration étudiée.

### 3.2.2.2. Résultats

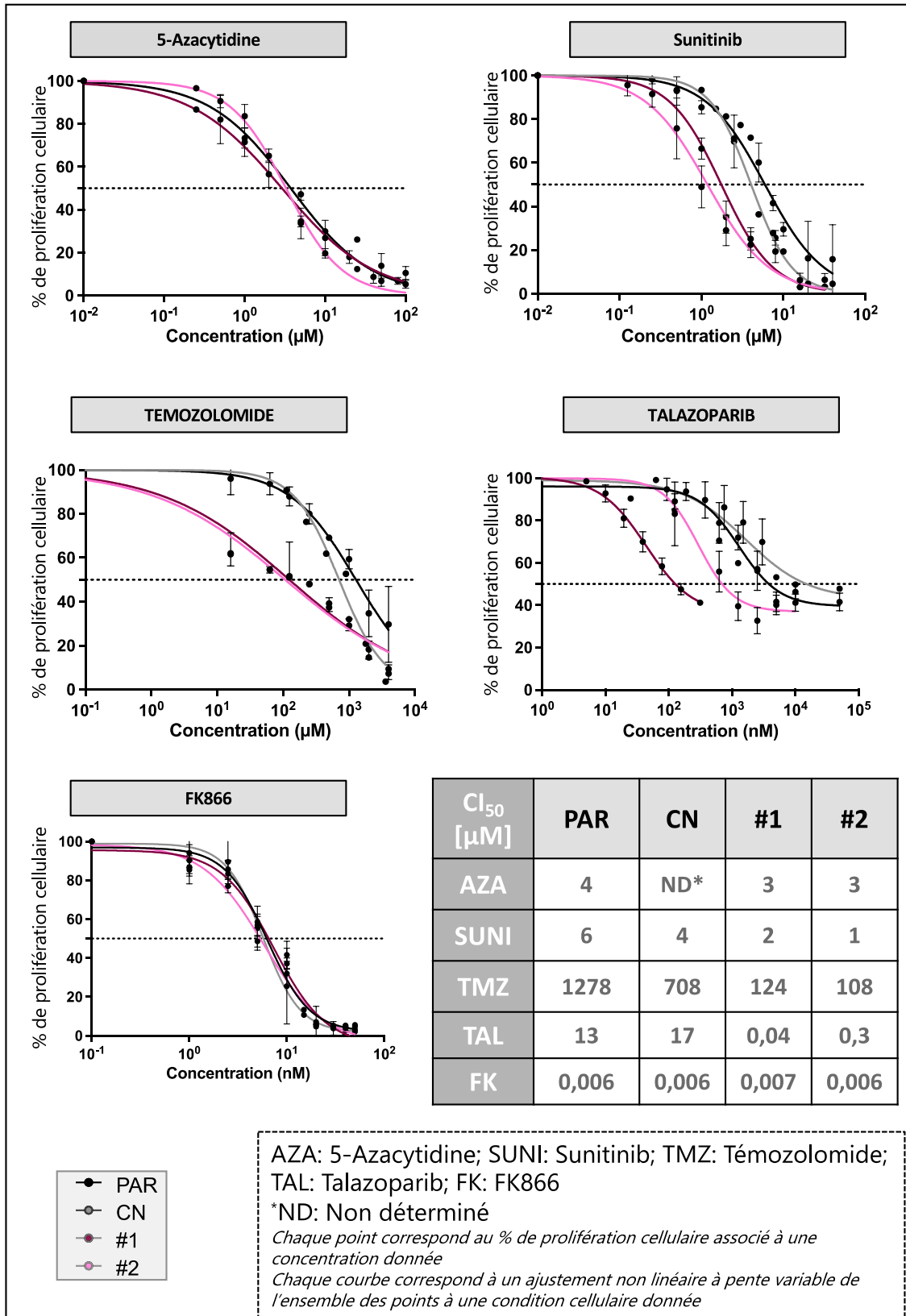
- Étude de l'effet antiprolifératif des traitements seuls

Les concentrations inhibitrices de 50% (CI<sub>50</sub>) de la 5-Azacytidine (AZA), du sunitinib (SUNI), du Témazolomide (TMZ), du Talazoparib (TAL) et du FK866 (FK) sont respectivement de 4 µM, 6 µM, 1278 µM, 13 µM et 0,006 µM pour la lignée parentale (PAR) (**Figure 23**). Les CI<sub>50</sub> du SUNI, du TMZ, du TAL et du FK sont respectivement et de 4 µM, 708 µM, 17 µM et 0,006 µM pour le contrôle négatif (CN) (**Figure 23**). Aucune différence n'a donc été observée entre les deux lignées contrôles, suggérant que la transfection du vecteur contenant le gène de résistance à la puromycine n'induit pas de modification de la sensibilité pharmacologique.

Les CI<sub>50</sub> de l'AZA et du FK sont respectivement de 3 µM et 0,007 µM pour le clone #1 et de 3 µM et 0,006 µM pour le clone #2 (**Figure 23**). Ce résultat nous permet de conclure au fait que l'inhibition de *SDHB* ne modifie pas la sensibilité à ces traitements. Cependant, on peut souligner que le FK866 semble être prometteur dans les phéochromocytomes, du fait de son efficacité associée à des CI<sub>50</sub> très faibles, de l'ordre du nanomolaire.

A contrario, une meilleure sensibilité a été mise en évidence avec le SUNI, le TMZ et le TAL, en présence d'une invalidation de *SDHB*. En effet, la CI<sub>50</sub> du SUNI dans les clones #1 et #2 est de respectivement 2 µM et 1 µM soit un gain de sensibilité d'un facteur 5 en comparaison aux lignées PAR et CN (**Figure 23**). Concernant le TMZ, la CI<sub>50</sub> dans les clones #1 et #2 est respectivement de 124 µM et 108 µM. Ainsi, un facteur 10 de sensibilité est observé en présence de l'inactivation du gène *SDHB* en comparaison aux lignées contrôles (**Figure 23**). Pour le TAL, la CI<sub>50</sub> des clones *SDHB*<sup>+/-</sup> est de 40 nM pour le clone #1 et 300 nM pour le clone #2. Ainsi, un facteur 15 de gain de sensibilité est observé en présence de l'inactivation du gène *SDHB* (**Figure 23**). Cependant, il est important de constater que le TAL n'entraîne pas de mortalité supérieure à 50% malgré des concentrations croissantes quelle que soit la lignée cellulaire, de ce fait, nous parlerons de CI<sub>50</sub> relative pour cette molécule.



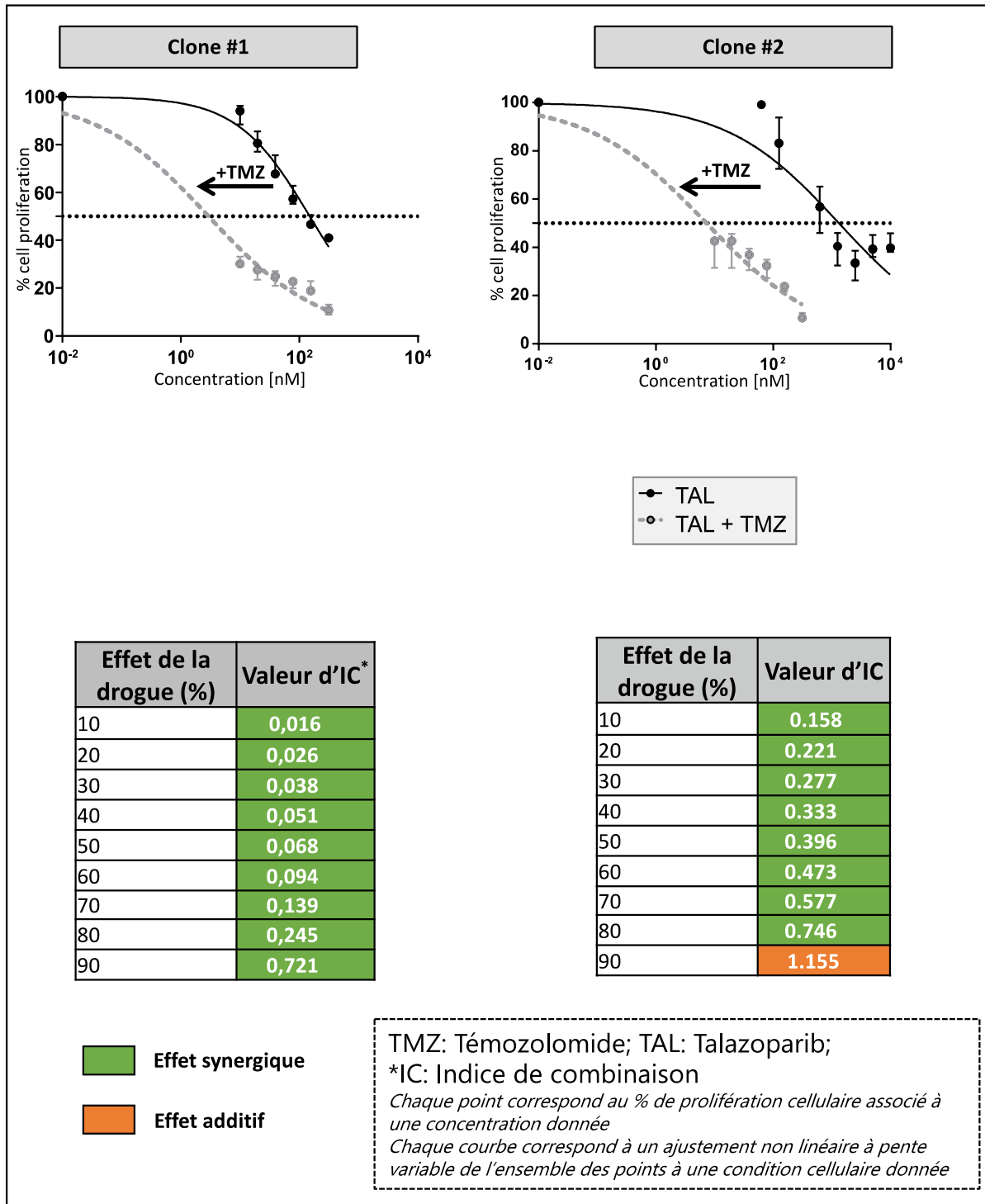


**Figure 1** : Évaluation de l'effet antiprolifératif de la 5-Azacytidine, du Sunitinib, du Témzolomide, du Talazoparib et du FK866 sur les lignées parentale (PAR), contrôle négatif (CN) et les clones  $SDHB^{+/-}$  (#1 et #2).

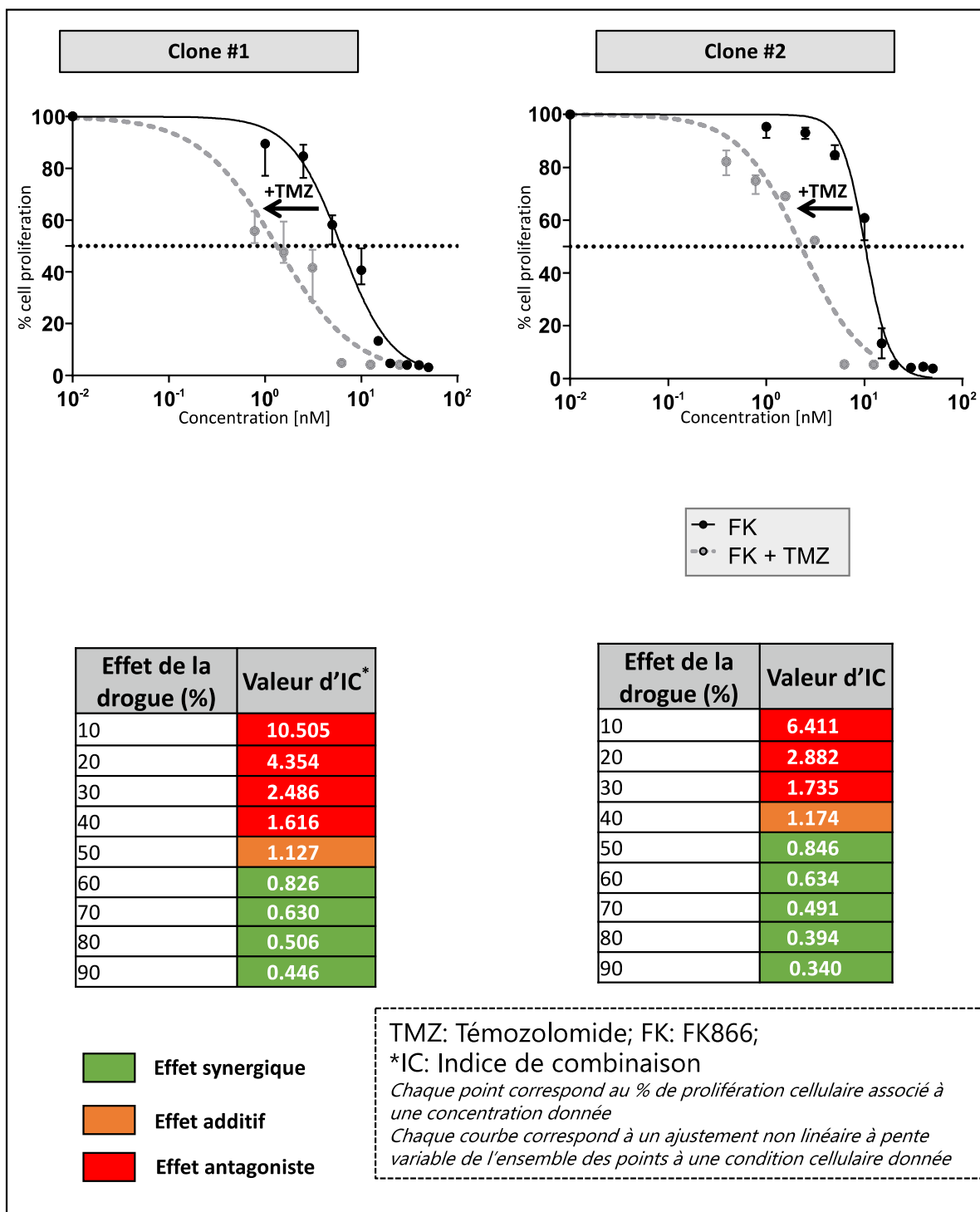
- Étude de l'effet antiprolifératif de traitements combinés et de leur index de combinaison (IC)

Dans le cadre de ce travail de thèse, toutes les combinaisons des traitements 2 à 2 ont été testées, mais seuls les résultats des combinaisons les plus prometteuses seront présentés. L'évaluation de la combinaison du TMZ avec le TAL a montré dans les deux clones *SDHB*<sup>+/-</sup> un effet antiprolifératif plus important en comparaison aux traitements seuls. L'index de combinaison (IC) du TMZ avec le TAL sur les clones *SDHB* invalidé montre un effet synergique sur l'ensemble de l'effet antiprolifératif de la combinaison (10-90% pour le clone #1 et 10-80% pour le clone #2) (**Figure 24**).

L'évaluation de la combinaison du TMZ avec le FK montre elle aussi une meilleure sensibilité dans les 2 clones *SDHB*<sup>+/-</sup> que les traitements seuls. Par ailleurs, l'IC est en faveur d'un effet antagoniste aux faibles concentrations (10-40% de l'effet antiprolifératif), d'un effet additif aux concentrations entraînant 50% d'effet antiprolifératif et d'un effet synergique aux concentrations entraînant plus de 50% d'effet antiprolifératif (**Figure 25**).



**Figure 2 :** Évaluation de la combinaison du Témzolomide et du Talazoparib sur les clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (#1 et #2).



**Figure 3 :** Évaluation de la combinaison du Témzolomide et du FK866 sur les clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (#1 et #2).

### 3.2.2.3. Discussion et perspectives

L'évaluation pharmacologique de 5 drogues seules (AZA ; SUNI ; TMZ ; TAL et FK) dans nos modèles cellulaires de phéochromocytome humain +/- *SDH* invalidé, a permis d'identifier les traitements dont l'efficacité était améliorée par l'inhibition de la SDH : le Sunitinib, le Témzolomide et le Talazoparib. En effet, si l'effet antiprolifératif de l'Azacytidine sur les deux clones #1 et #2 est associé à une  $CI_{50}$  de l'ordre du micromolaire, aucune amélioration de la sensibilité n'a pu être observée dans les clones *SDHB*<sup>+/-</sup> par rapport à la lignée PAR. De même, aucune modification de la sensibilité n'a été observée dans les clones #1 et #2 en comparaison aux lignées PAR et CN après évaluation du FK866. On peut cependant noter que les  $CI_{50}$  très basses du FK866 (~1 nM) sont en faveur d'un potentiel important de cet inhibiteur dans la prise en charge des PPGL. L'étude de l'effet antiprolifératif du Sunitinib, du Témzolomide et du Talazoparib a par contre montré que les clones *SDHB* invalidé présentaient une meilleure sensibilité que les lignées PAR et CN avec des facteurs de sensibilité allant de x5 à x15. Ce résultat va dans le sens des observations décrites chez des patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté et traités par TMZ [235].

Dans un deuxième temps, l'évaluation pharmacologique des combinaisons des drogues 2 à 2 a permis de mettre en évidence la synergie entre le Témzolomide et des inhibiteurs de PARP/NAD<sup>+</sup> (TMZ + TAL ; TMZ + FK), en présence et en absence d'invalidation de la SDH. En particulier, un effet synergique de la combinaison [TMZ + TAL] a été observé dans nos clones *SDHB*<sup>+/-</sup> à chaque pourcentage d'efficacité testé, tandis que la combinaison [TMZ + FK] ne l'a été qu'à partir de 50% de l'efficacité antiproliférative de la combinaison, ce qui suggère que celle-ci n'est synergique qu'à fortes concentrations. Cette synergie de l'association entre le Témzolomide et des inhibiteurs de PARP/NAD<sup>+</sup> a par ailleurs déjà été décrite dans la littérature, avec l'Olaparib, dans un modèle cellulaire de phéochromocytome *SDHB* invalidé [242]. Enfin, on peut souligner que l'efficacité de ces combinaisons a également été observée dans nos modèles cellulaires non *SDHB* muté (hPheo1 et CN, datas non présentées dans le manuscrit), ce qui renforce l'intérêt de ces combinaisons pour la prise en charge de tous les patients atteints d'un PPGL (sporadique et *SDH* muté).

En perspective, l'efficacité et les toxicités du TMZ, du FK et du TAL seuls et en combinaison seront évaluées sur des modèles *in vivo* de souris immunodéficientes xenogreffés avec les clones *SDHB* invalidé. Par ailleurs, l'étude du type de mort cellulaire induite par ces traitements pourra être réalisée afin de mieux caractériser leurs mécanismes d'action. D'autre part, l'impact des traitements sur les voies de signalisation dérégulées par l'invalidation *SDH* pourra être étudiée et devrait permettre notamment de savoir si les traitements sélectionnés sont capables de restaurer l'activité des dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -kéto-glutarate. Enfin, d'autres stratégies thérapeutiques ciblant en particulier le métabolisme cellulaire peuvent être envisagées. Plus précisément, afin de compenser les perturbations métaboliques induites par la perte de fonction de la SDH, les cellules cancéreuses *SDH* muté utilisent le **pyruvate**

extracellulaire et activent la pyruvate carboxylase afin de produire de l'**aspartate** qui servira de source pour synthétiser des **acides nucléiques** et des **acides aminés** [256]. Par ailleurs, il existe un maintien de l'**activité du complexe I**, de la **respiration mitochondriale** et de l'**oxydation du NADH** dans la **chaîne de transport des électrons** mitochondriale des cellules *SDHB* invalidé en comparaison aux cellules *SDHB*-WT [242, 286]. Ces résultats ouvrent la piste d'éventuelles cibles thérapeutiques intéressantes dans la prise en charge des PPGL *SDHB* muté. De ce fait, cibler la chaîne de transport des électrons par l'utilisation d'**inhibiteurs du complexe I**, tels que la metformine et l'IACS-010759 (en cours d'évaluation en phase I dans les tumeurs solides et les leucémies aiguës myéloïdes réfractaires) apparaît pertinent, car ces inhibiteurs induisent l'apoptose des cellules et ont un effet antiprolifératif [287, 288]. Une autre observation métabolique dans le contexte *SDH* invalidé, cependant encore controversée, est un déséquilibre du stress oxydatif associé à une possible augmentation de la production de ROS et de fer [289, 290]. Dans le cas où une production de ROS est observée, l'utilisation de l'**acide ascorbique** à forte dose induit un **excès de ROS** qui dérégule l'activité de TET et de HIF, ce qui a pour conséquence une diminution de la survie des cellules *SDHB* invalidé [290]. De ce fait, cibler le métabolisme des tumeurs *SDHB* muté semble être une stratégie prometteuse et pourrait être évaluée en combinaison avec d'autres thérapies ciblées afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté.

### 3.3. LE SUCCINATE : UN NOUVEAU BIOMARQUEUR DANS LE DIAGNOSTIC MUTATIONNEL ET LE SUIVI DES PATIENTS PPGL SDHB MUTÉ

#### 3.3.1. Introduction

##### 3.3.1.1. Place des biomarqueurs en cancérologie

Selon l'OMS, « un biomarqueur est une substance, une structure ou un processus qui peut être mesuré dans l'organisme, ainsi que ses produits et influencer ou prédire l'incidence d'un résultat ou d'une maladie » [291]. Les rôles d'un biomarqueur en cancérologie sont multiples : estimer le risque de développement de la maladie, diagnostiquer la présence d'un cancer et sa malignité, déterminer les aspects prédictifs et le pronostic d'un cancer à son diagnostic, surveiller l'évolution de la maladie et prédire la réponse ou la résistance à un traitement [292, 293].

Par ailleurs, le développement d'un biomarqueur de sa découverte à son application clinique fait intervenir de multiples étapes (Figure 26).

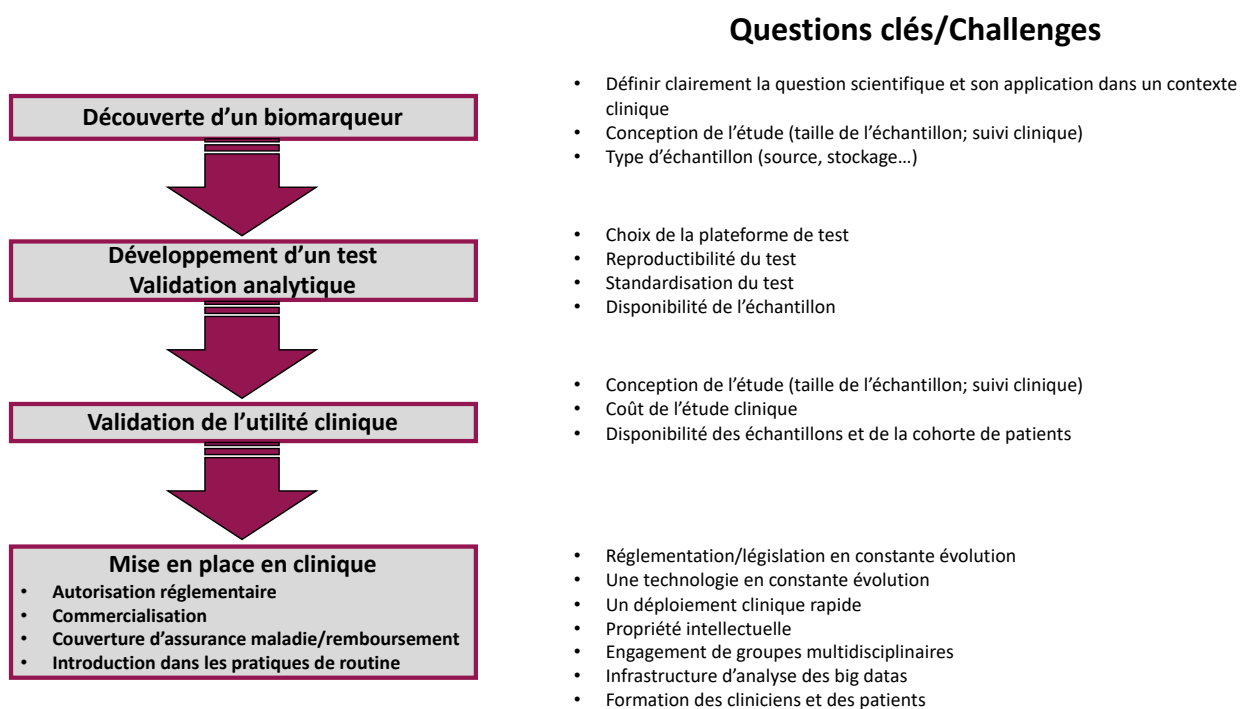


Figure 27 : Les différentes étapes de développement d'un biomarqueur (D'après Goossens et al., 2015).

L'objectif final de ce process est de disposer d'une technologie permettant d'évaluer le biomarqueur afin d'aider à la prise de décisions cliniques par le corps médical mais également pour améliorer la prise en charge des patients [294]. Cependant, le processus de développement d'un biomarqueur est long et comprend beaucoup d'étapes. Par ailleurs, le pourcentage de réussite est très faible (0,1%), ce qui questionne sur l'intérêt de nombreuses découvertes [295].

Schématiquement en cancérologie, le développement des biomarqueurs se fait via la **découverte d'altérations de la tumeur** et/ou de son **environnement**, grâce notamment aux nouvelles technologies à haut-débit : les « **-OMIQUES** ». Elles permettent d'identifier des différences d'expression géniques, protéiques, de transcrits ou encore métaboliques dans des modèles précliniques ou des cohortes de patients. L'application des -OMIQUES génère une très grande quantité de données et l'identification d'un biomarqueur doit être basée sur une question scientifique claire, répondant à une problématique clinique. D'autre part, la conception de l'étude doit être rigoureuse et le type d'échantillon choisi doit être adaptable à une utilisation en routine (stockage de l'échantillon, disponibilité...) [292].

Une fois le biomarqueur découvert, il est nécessaire de disposer d'une technique analytique permettant de détecter, et/ou de quantifier la molécule d'intérêt dans une matrice biologique disponible et adaptée à une **application clinique**. Le choix de la technique à développer et de la matrice biologique est essentiel pour que l'application en clinique soit facile, rapide, spécifique, peu invasive pour le patient et dépend de la nature de chaque biomarqueur. La méthode analytique devra être validée en respectant des recommandations établies par les autorités compétentes pour prouver que l'analyse du biomarqueur est précise, exacte, reproductible et standardisée.

Par la suite, l'évaluation du biomarqueur devra être réalisée dans des études cliniques prospectives ou rétrospectives afin de caractériser la performance et l'utilité du biomarqueur dans les conditions réelles d'utilisation [293].

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de nouveaux biomarqueurs, dont le succinate, via la mise en place d'une méthode de dosage adaptée à la pratique clinique et via l'évaluation du succinate sérique comme biomarqueur utile dans la prise en charge des patients atteints d'un PPGL *SDH* muté et des sujets sains porteurs d'une mutation *SDH*.



### 3.3.1.2. *Intérêt du succinate comme biomarqueur chez les porteurs de mutations SDHB*

Comme décrit dans les paragraphes précédents, les PPGL sont des tumeurs caractérisées par un fort déterminisme génétique comprenant 50% de mutations germinales [94]. Du fait de l'hérédité de ces mutations, les sujets apparentés sains porteurs d'une mutation germinale *SDH* doivent être surveillés car ils ont un risque de développer un PPGL [296]. De ce fait, l'identification précoce des mutations *SDH* est primordiale pour mettre en place une surveillance active chez ces sujets en diagnostiquant le plus tôt possible la survenue d'un PPGL et en anticipant le développement métastatique [297, 298]. Pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'un PPGL ainsi que de leurs apparentés mutés, le développement d'un biomarqueur sensible, spécifique et robuste est nécessaire [226, 299, 300]. Les mutations des gènes codant pour la SDH sont dites inhibitrices, entraînant une perte de fonction de l'enzyme et par conséquent une accumulation du **succinate** qui joue le rôle d'oncométabolite. La quantification sérique d'un autre oncométabolite du cycle de Krebs : le 2-hydroxyglutarate (2-HG) dans les cancers *IDH* muté et en particulier les leucémies aigües myéloïdes (LAM), a prouvé son intérêt pour le diagnostic moléculaire des mutations *IDH1* et *IDH2* et le suivi de la maladie [301, 302]. De ce fait, l'utilisation du succinate sérique comme biomarqueur dans les cancers *SDH* muté est rationnelle. Si les résultats de travaux menés dans des modèles précliniques et chez des patients atteints d'un PPGL (sporadique et *SDH* muté) sont prometteurs, une évaluation sur une large cohorte de patients est nécessaire avant d'envisager une utilisation en routine dans un laboratoire de biologie médicale [223, 303, 304]. Prérequis essentiel à cette étude, une méthode de dosage simple, robuste, sensible, exacte et précise, validée selon les recommandations de l'EMA, est nécessaire. Pour répondre à ce besoin, dans un premier temps nous nous sommes focalisés sur la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du succinate par chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS), Cette technologie, sensible et spécifique, a fait la preuve de son intérêt dans la quantification des métabolites du cycle de Krebs, en particulier le 2-HG [225, 305, 306].

### 3.3.2. Développement et validation analytique d'une méthode de dosage du succinate par UPLC-MS/MS

Cette partie fait l'objet d'un article scientifique, présenté ci-dessous, et sera discuté par la suite (paragraphe 3.3.2.2.).

*« Quantification of accumulated succinic acid, linked to Succinate Dehydrogenase (SDH) loss-of-function mutations, by a fully validated liquid tandem mass spectrometry method suitable for preclinical and clinical applications »*

Constance Lamy, Clémence Mansard, Louis Blondel, Lionel Mercier, Angelo Paci, Sophie Broutin. *Article soumis à Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*

Plusieurs méthodes de dosages du succinate ont été décrites dans la littérature (GC-MS/MS et LC-MS/MS) mais aucune d'entre elles n'ont été validées pour une utilisation adaptée au suivi clinique des patients *SDH* invalidé (gamme de concentration et méthodologie). Dans cet article, nous décrivons une méthode de dosage du succinate par UPLC-MS/MS, applicable dans 3 matrices biologiques (sérum, urine, milieu de culture) et adaptée à une activité de laboratoire de biologie médicale (validation EMA). Une utilisation d'un robot pour le traitement pré-analytique des échantillons a notamment été développée, pour répondre aux exigences de sécurité, de précision et de délais.

3.3.2.1. **Article 2:** «*Quantification of accumulated succinic acid, linked to Succinate Dehydrogenase (SDH) loss-of-function mutations, by a fully validated liquid tandem mass spectrometry method suitable for preclinical and clinical applications* »

## Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

### Quantification of succinic acid levels, linked to Succinate Dehydrogenase (SDH) dysfunctions, by an automated and fully validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method suitable for multi-matrix applications.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	JPBA-D-21-00385
<b>Article Type:</b>	Full length article
<b>Section/Category:</b>	New Methods
<b>Keywords:</b>	Biomarker, Succinate dehydrogenase dysfunctions, Liquid chromatography tandem mass spectrometry, Succinic acid, Endogenous compounds, Oncometabolite.
<b>Corresponding Author:</b>	Sophie Broutin, Pharm.D, Ph.D Gustave Roussy Institute: Gustave Roussy Villejuif, Île-de-France FRANCE
<b>First Author:</b>	Constance Lamy
<b>Order of Authors:</b>	Constance Lamy Clémence Mansard Louis Blondel Lionel Mercier Angelo Paci Sophie Broutin
<b>Abstract:</b>	<p>The hallmarks of cancer include metabolism with deregulating cellular energetics. Dysfunctions in succinate dehydrogenase (SDH) metabolic enzyme activity, leading to an abnormal accumulation of succinic acid has been described in solid tumors but also in inflammation and ischemia reperfusion injury. Succinic acid is a potential biomarker of SDH related pathologies for diagnostic, evaluation of treatment response and follow-up of the disease. We developed a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method allowing a rapid, accurate and precise quantification of succinic acid levels in clinical (serum, urine) and preclinical (cellular pellets, supernatants) samples. 13C4 succinic acid disodium salt was used as internal standard and added to samples before a solid phase extraction (SPE) on Phenomenex STRATATM-XL-A (200 mg – 3 mL) 33µm cartridges. This method is automated by a Freedom EVO® platform from TECAN and succinic acid is separated on a C18 column combined to a Xevo® TQ-S micro Waters mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) source. This biomedical analysis allows standard curves to be linear over the range 1.0 - 135.5 µM with <math>r^2</math> values &gt; 0.999 and low matrix effects (&lt;9.1 %). This method, which is validated according updated European Medicine Agency (EMA) guidelines, is accurate between-run (&lt;11.0 %) and within-run (&lt;7.8 %), precise between-run (&lt;14.4 CV %) and within-run (&lt;3.7 CV %), and is suitable for clinical and preclinical applications.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	Joseph CICCOLINI ciccolini.joseph@gmail.com Benoit BLANCHET benoit.blanchet@aphp.fr

SERVICE DE PHARMACOLOGIE

Pr A. Paci  
CHEF DE SERVICE  
Tél. : 33 (0) 1 42 11 47 30  
angelo.paci@gustaveroussy.fr

Dr S. Broutin  
Tél. : 33 (0) 1 42 11 40 57  
sophie.broutin@gustaveroussy.fr

Dr J. Delahousse  
Tél. : 01 42 11 61 92  
julia.delahousse@gustaveroussy.fr

B.Hamelin  
CADRE PLATEFORME  
BIOLOGIE MEDICALE  
Tél. : 33 (0) 1 42 11 62 76  
betty.hamelin@gustaveroussy.fr

TECHNICIENS  
C. Mansard  
Tél. : 33 (0) 1 42 11 40 44  
clemence.mansard@gustaveroussy.fr

C. Julieno  
Tél. : 33 (0) 1 42 11 40 44  
cynthia.julieno@gustaveroussy.fr

SECRETARIAT  
M. Chaîne  
Tél. : 33 (0) 1 42 11 40 41  
martine.chaine@gustaveroussy.fr

Fax : 33 (0) 1 42 11 44 01

Prof. Coral Barbas  
Editor

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Elsevier B.V.  
Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam  
The Netherlands

February 25, 2021

Dear Prof. Coral Barbas

I am writing to submit our manuscript entitled, "*Quantification of succinic acid levels, linked to Succinate Dehydrogenase (SDH) dysfunctions, by an automated and fully validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method suitable for multi-matrix applications.*" for consideration as a Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis full length research article. We have validated an automated LC-MS/MS method following the updated EMA guidelines, that is suitable for quantitative succinic acid measurements in clinical practice and preclinical studies.

Biomarkers, in particular in the oncologic field, are essentials and of major interest both for clinical management (diagnosis, prognostic, predictive values) and basic research (understanding molecular mechanisms of this disease, identify therapeutic targets, evaluate therapeutic strategies). We believe that our analytical method, allowing the quantification of a metabolic biomarker, will appeal to both academic and clinical readers who subscribe to Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Indeed, our work will allow your readers to implement a fully validated LC-MS/MS method allowing a quick, sensitive, robust, accurate and precise quantification of succinic acid in 3 different matrices (serum, urine and cell culture medium).

This manuscript is in line and expands on prior research conducted and published by F. Yin et al. in Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

*A double surrogate approach for the quantitation of 2-Hydroxyglutarate - An oncometabolite in human brain tumors via LC-MS/MS. F. Yin, J. Keller, D. Kraus, H. Mangus, F. Li, G. Liu. J Pharm Biomed Anal 2020 Feb 5;179:112916. doi: 10.1016/j.jpba.2019.112916.*

Each of the authors confirms that this manuscript has not been previously published and is not currently under consideration by any other journal. Additionally, all of the authors have approved the contents of this paper and have agreed to the Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis's submission policies.

Should you select our manuscript for peer review, we would like to suggest the following potential reviewers because they would have the requisite background to evaluate our findings and interpretation objectively.

- **Pr Joseph CICCOLINI**, PharmD, PhD : [ciccolini.joseph@gmail.com](mailto:ciccolini.joseph@gmail.com)

Professor of Pharmacokinetics, Clinical Pharmacologist (PU-PH)

SMARTc : Simulation & Modelling: Adaptive Response for Therapeutics in Cancer  
Center for Research on Cancer of Marseille : UMR Inserm 1068, CNRS UMR 7258,  
Aix Marseille Université U105, Institut Paoli Calmettes & APHM (France)

- **Dr Benoit Blanchet**, PharmD, PhD : [benoit.blanchet@aphp.fr](mailto:benoit.blanchet@aphp.fr)

Department of Pharmacokinetics and Pharmacochimistry, CERIA, CARPEM,  
Cochin University Hospital, AP-HP, Paris, France.

UMR8638 CNRS, Faculty of Pharmacy, University Paris Descartes (France)

To the best of our knowledge, none of the above-suggested persons have any conflict of interest, financial or otherwise.

Each named author has substantially contributed to conducting the underlying research. Additionally, to the best of our knowledge, the named authors have no conflict of interest, financial or otherwise.

Sincerely,  
Dr. Sophie Broutin, PharmD-PhD



Gustave Roussy  
Département de Biologie et Pathologie Médicales  
Service de pharmacologie  
114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France  
[sophie.broutin@gustaveroussy.fr](mailto:sophie.broutin@gustaveroussy.fr)  
Phone : +33142114057  
Fax: +33142114401

Additional Contact :

Constance Lamy  
Gustave Roussy  
Pavillon de Recherche 2  
INSERM U1030  
114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France  
[constance.lamy@gustaveroussy.fr](mailto:constance.lamy@gustaveroussy.fr)  
Phone : +33142114548  
Fax: +33142114401

**INSTITUT GUSTAVE ROUSSY**

114, rue Édouard-Vaillant - 94805 Villejuif Cedex - France - Tél : 01 42 11 42 11 - Fax : 01 42 11 53 00  
Centre de lutte contre le cancer autorisé à recevoir les dons et legs - ordonnance du 1<sup>er</sup> octobre 1945  
N° SIREN 775 74 11 01 CODE APE 8610Z CCP PARIS 709 26 Z

**Highlights**

A fully validated and automated LC-MS/MS method for quantification of succinic acid.

Succinic acid as a biomarker of *SDH* mutated cancers.

Analytical method suitable for clinical studies and preclinical applications.

**Abstract**

The hallmarks of cancer include metabolism with deregulating cellular energetics. Dysfunctions in succinate dehydrogenase (SDH) metabolic enzyme activity, leading to an abnormal accumulation of succinic acid has been described in solid tumors but also in inflammation and ischemia reperfusion injury. Succinic acid is a potential biomarker of *SDH* related pathologies for diagnostic, evaluation of treatment response and follow-up of the disease. We developed a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method allowing a rapid, accurate and precise quantification of succinic acid levels in clinical (serum, urine) and preclinical (cellular pellets, supernatants) samples.  $^{13}\text{C}_4$  succinic acid disodium salt was used as internal standard and added to samples before a solid phase extraction (SPE) on Phenomenex STRATA<sup>TM</sup>-XL-A (200 mg – 3 mL) 33 $\mu\text{m}$  cartridges. This method is automated by a Freedom EVO<sup>®</sup> platform from TECAN and succinic acid is separated on a C18 column combined to a Xevo<sup>®</sup> TQ-S micro Waters mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) source. This biomedical analysis allows standard curves to be linear over the range 1.0 - 135.5  $\mu\text{M}$  with  $r^2$  values > 0.999 and low matrix effects (<9.1 %). This method, which is validated according updated European Medicine Agency (EMA) guidelines, is accurate between-run (<11.0 %) and within-run (<7.8 %), precise between-run (<14.4 CV %) and within-run (<3.7 CV %), and is suitable for clinical and preclinical applications.

**KEYWORDS:**

Biomarker, Succinate dehydrogenase dysfunctions, Liquid chromatography tandem mass spectrometry, Succinic acid, Endogenous compounds, Oncometabolite.



1 Quantification of succinic acid levels, linked to Succinate Dehydrogenase (SDH) dysfunctions,  
2 by an automated and fully validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method  
3 suitable for multi-matrix applications.

4 Constance Lamy<sup>a,b</sup>, Clémence Mansard<sup>a</sup>, Louis Blondel<sup>a</sup>, Lionel Mercier<sup>a</sup>, Angelo Paci<sup>a,b,c</sup>,  
5 Sophie Broutin<sup>a,b\*</sup>

6 <sup>a</sup>Gustave Roussy, Service de pharmacologie, Département de biologie et pathologie  
7 médicales, F-94805, Villejuif, France

8 <sup>b</sup>Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, INSERM1030, Radiothérapie moléculaire et  
9 innovation thérapeutique, F-94805, Villejuif, France

10 <sup>c</sup>Service de pharmacocinétique, Faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay, F-92296,  
11 Châtenay-Malabry, France

12 \*Corresponding author at: Gustave Roussy, Service de pharmacologie, Département de  
13 biologie et pathologie médicales, F-94805, Villejuif, France

14 *E-mail address:* [sophie.broutin@gustaveroussy.fr](mailto:sophie.broutin@gustaveroussy.fr) (S. Broutin).

15

16 **Introduction**

17 In 2011, the “Hallmarks of Cancer” of Hanahan & Weinberg, describing the common properties  
18 of cancer cells have been updated. Metabolism, with deregulating cellular energetics, has been  
19 added as part of it [1]. Among metabolic pathways, the mitochondrial tricarboxylic acid cycle  
20 (TCA) is crucial in the function and fate of cells [2]. Dysfunctions in enzymes of the TCA have  
21 been associated with oncogenesis [3]. In this tumoral context, TCA intermediates, such as  
22 succinic acid and 2-hydroxyglutaric acid, act as oncometabolites, inhibiting 2-oxoglutarate  
23 dependent dioxygenases involved in many signalling pathways [4,5]. In particular, mutations  
24 in the Succinate Dehydrogenase (SDH) enzyme are associated with Pheochromocytomas and  
25 Paragangliomas (PPGL) (incidence of 20%) [6], GastroIntestinal Stromal Tumors (GIST)  
26 (incidence of 10%) [7] and renal cell carcinomas (incidence of 0.05% to 0.20%) [8].

27 SDH is a four subunit enzyme (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) which normally catalyses the  
28 oxidation of succinic acid into fumaric acid, coupled with flavine adenine dinucleotide (FADH<sub>2</sub>)  
29 production, and corresponds to the Complex II of the mitochondrial respiratory chain [9]. When  
30 mutated, SDH losses its function inducing an accumulation of succinic acid which plays a role  
31 of an oncometabolite [10,11]. However, the dysfunctions of SDH are not limited to cancers.  
32 Indeed, succinic acid plays an important role in inflammation and ischemia reperfusion injury  
33 [12,13]. Therefore, measurement of succinic acid levels could be useful for diagnostic  
34 purposes of *SDH* dysfunctions, to monitor therapeutic response in clinical practice and for  
35 preclinical investigations [14,15].

36 From an analytical point of view, different methods have been developed to quantify succinic  
37 acid. First, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) methods have been  
38 used to quantify succinic acid in human matrices (plasma, serum, urine) and mouse tumor  
39 tissue. Nevertheless, those methods are not very sensitive as numerous endogenous human  
40 urine and serum succinic acid concentrations reported were below the limit of quantification  
41 (<1 mg/L) [11, 16-18]. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-  
42 MS/MS) methods have also been reported to quantify TCA oncometabolites in human serums

43 and plasmas. If these more recent LC-MS/MS methods are faster and more sensitive than GC-  
44 MS methods, to our knowledge they were not validated in a *SDH* dysfunctional cohort. Moreover,  
45 none of these analytical methods are automated, that has the potential to reduce the risk of  
46 error and is particularly important for a use in clinical routine practice [19,20].

47 Here, we report the validation following EMA recommendations of an automated LC-MS/MS  
48 method allowing a quick, robust, sensitive, accurate and precise quantification of succinic acid  
49 in 3 matrices (serum, urine and cell culture medium), adapted for clinical practice and  
50 preclinical studies (supernatants and pellets).

## 51 **1. Material and methods**

### 52 *1.1. Chemicals and reagents*

53 Succinic acid (disodium salt) 98%, Succinic acid <sup>13</sup>C<sub>4</sub> atom and ammonium acetate were  
54 purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, United States). LC-MS/MS quality  
55 acetonitrile, methanol, water and formic acid were purchased from VWR (Radnor,  
56 Pennsylvania, USA). STRATA™ XL-A (200 mg - 3mL) SPE cartridges were obtained from  
57 Phenomenex (Torrance, California, United States) and Waters Acquity UPLC (700 μL) 96  
58 wells sample plates and polypropylene mat caps were obtained from Waters (Milford, MA,  
59 USA).

### 60 *1.2. Human samples and cell lines*

61 For the analytical validation, human serums (n=100; pool), human urines (n=3; pool) and ACL-  
62 4 cell culture medium were collected retrospectively.

63 For clinical applications, 20 serums (n=10 *SDH* wild-type, n=1 *SDHA*, n=5 *SDHB*, n=1 *SDHC*  
64 and n=3 *SDHD*) and 20 urines (n=10 *SDH* wild-type, n=1 *SDHA*, n=5 *SDHB*, n=4 *SDHD*) from  
65 PPGL patients were collected. In accordance with the General Data Protection Regulation  
66 (GDPR) all patients were informed of this analytical study and gave their consent to collect  
67 their biological fluids samples.

68 For preclinical applications, the hPHEO1 human pheochromocytoma cell line (*SDH* wild-type)  
69 and a stably *SDHB* invalidated clone from the hPHEO1 cell line were used [15;21]. Cells were  
70 cultured in an ACL-4 medium supplemented with foetal calf serum (10%) [22]. A total of 10  
71 cellular pellets (n=5 *SDH* wild-type; n=5 *SDHB* invalidated) and 10 ACL-4 supernatants (n=5  
72 *SDH* wild-type, n=5 *SDHB* invalidated) were collected.

73 Clinical (serum; urine) and preclinical (cell pellet; ACL-4 supernatant) matrices were stored at  
74 -20°C before analysis.

### 75 1.3. Instrumentation and analytical conditions

76 All analyses were performed on a Waters Acquity® UHPLC system (Waters, Milford, MA, USA)  
77 that included a binary solvent manager, a cooled auto-sampler and a column oven coupled  
78 with a Xevo® TQ-S micro (Waters, Milford, MA, USA). A BioZen peptide PS-C18 column (2.1  
79 x 150 mm, 1.6µm) from Phenomenex (Torrance, California, United States) was used. The  
80 column was maintained at 30°C. The mobile phases consisted of water, pH adjusted to 2.0  
81 with formic acid (mobile phase A) and methanol, pH adjusted to 2.0 with formic acid (mobile  
82 phase B). A programmed mobile-phase gradient was used at a flow rate of 0.25 mL/min. Initial  
83 conditions, 98% of mobile phase A and 2% of mobile phase B, were maintained for 3 min.  
84 Conditions were increased up to 95.2% of mobile phase A and 4.8% of mobile phase B and  
85 maintained from 3 min to 5 min. Then, proportion mobile phase B was increased up to 10% in  
86 0.1 min to clean up the column between each injection. These proportions (90/10, v/v phase  
87 A / phase B) were maintained from 5.1 min to 6.1 min. Finally, initial conditions were restored  
88 from 6.1 min to 7.2 min and maintained for 3.8 min to re-equilibrate the column. The final time  
89 was 11 min. A volume of 2.5 mL of needle wash solution (97/3, v/v – Water/Acetonitrile + 0.2%  
90 of formic acid) was used between each injection to prevent carryover. The plate containing  
91 samples was stored at +15°C during analysis. To keep the electrospray probe and sample  
92 cone free from accumulation of non-retained biological components, a 4 min solvent divert  
93 delay to waste was applied. At the end of the spectrometric acquisition, the column eluent was  
94 again diverted to waste. The Waters Xevo® TQ-S micro mass spectrometer was connected to

95 the Acquity<sup>®</sup> UHPLC system via an electrospray ionization (ESI) source. Acquisition was  
96 performed in the multiple reactions monitoring (MRM) mode. The selected precursor and  
97 product ions were generated together with the applied collision energy of 3 eV. Argon 99.999%  
98 (Air Liquide, Paris, France) was used as collision gas. The ion spray interface and mass  
99 parameters including parent and daughter  $m/z$ , cone and collision energy, were optimized for  
100 maximum sensitivity using MassLynx<sup>®</sup> software (version 4.1, Waters, Milford, MA, USA). Dwell  
101 was altered manually to obtain 20 points per peak for reliable quantification. The system control  
102 and data acquisition were performed using MassLynx<sup>®</sup> software.

103 *1.4. Calibration and quality control standards, samples and internal standard*  
104 *solutions*

105 Two separate and approximate but precise weightings of 2 mg of succinic acid (disodium salt)  
106 98% were prepared for calibration standards (STDs) and for the quality control samples (QCs),  
107 respectively. One approximate but precise weighting of 1 mg of succinic acid <sup>13</sup>C<sub>4</sub> was  
108 prepared for internal standard (IS). For each weighting, an adequate amount of water was  
109 added taking account of the purity of the powders and the conversion of salts in bases to obtain  
110 stock solutions at 2 mg/mL for STDs and QCs and 1 mg/mL for IS, all expressed as bases.  
111 The conversion factors were 0.7214 for succinic acid and 0.9578 for the IS. Two series of two  
112 combined working solutions (at 2 and 16 µg/mL) containing succinic acid were prepared in  
113 water for STDs and QCs, respectively. Working solutions were further diluted in water (v/v) to  
114 0, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL for the 9 STDs and 0.2, 0.4, 0.8, 2, 12 µg/mL for the 5  
115 QCs. Corresponding concentrations, expressed in µM, are 0, 1.0, 2.1, 4.2, 8.5, 13.6, 33.9,  
116 67.8, 135.4 µM for the STDs and 1.7, 3.4, 6.8, 20.3, 101.6 µM for the QCs. The IS working  
117 solution was prepared at 5 µg/mL in water.

118 *1.5. Sample extraction and preparation*

119 As pre-treatment before solid phase extraction (SPE), 50 µL of IS working solution were added  
120 to 200 µL of each STDs, QCs, patient serum and urine or cells (supernatant or pellet), and 2

121 mL of water, then mixed. The cell lysis was performed on pellet with 350  $\mu$ L of a methanol-  
122 water (MeOH : H<sub>2</sub>O, 80/20, v/v) solution at -80°C, keep in ice for 30min with regular mix by  
123 pulse-vortexing and centrifuge at 20,000g, 10min. The supernatant was recovered.

124 The strong anion exchange and mixed mode phase STRATA™ XL-A (200mg - 3mL) SPE  
125 cartridges were selected to maximize recovery, minimize matrix effects and for their lot-to-lot  
126 reproducibility. Each cartridge was conditioned with 2 mL of methanol and then equilibrated  
127 with 2 mL of water. Pre-treated samples were then loaded onto cartridges. Each of them was  
128 washed with 1 mL of 25 mM ammonium acetate solution and then 1 mL of methanol. Cartridges  
129 were then dried and analytes were eluted with 2 mL of methanol containing 5% of formic acid.  
130 This step is automated using the Freedom EVO® 150 robot (TECAN, Männedorf, Swiss)  
131 following the manufacturer's instructions. The eluate was evaporated to dryness in a Savant  
132 Speedvac® system SPD121P (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) at 80°C during 40 min.  
133 The dry residue was dissolved in 100  $\mu$ L of mixture (water: methanol, 98/2, v/v, pH= 2) and  
134 transferred into a 96-well plate and capped by the Freedom EVO® 150 robot. A volume of 10  
135  $\mu$ L was injected on the UHPLC column using the full loop mode.

## 136 1.6. Method validation

137 Validation procedure was conducted in accordance to the recently update EMA guideline [23]  
138 in order to evaluate the method for its suitability for routine analysis.

### 139 1.6.1. Linearity, precision and accuracy

140 Endogenous levels of succinic acid concentrations in serum, urine and preclinical matrix (ACL-  
141 4 cell culture medium) were assessed against a calibration curve in water. Nine calibration  
142 concentrations were used to build a calibration curve using least squares linear equation of  
143 response (peak area ratios of analytes to the IS) as a function of the concentrations of the  
144 STDs and applying a  $1/x^2$  weighting. A total of 4 curves, from independent runs over 4 days  
145 using freshly spiked samples and performed by 4 different operators, were obtained for the  
146 analytical validation. Calculated concentrations of the standards were acceptable when within

147 +/- 15% of the actual concentrations. Calculation of the limit of detection (LOD) was based on  
148 the standard deviation of the response ( $\delta$ ) and the slope (S). LOD was calculated as  $3.3 \delta/S$   
149 corresponding to  $3.3 \times S.D./b'$  (where  $b'$  is the mean of the slope from 4 calibrations). The  
150 lower limit of quantification (LLOQ) verification was assessed at 1.0  $\mu$ M in serum, urine and  
151 cell culture medium with an analyte signal at least 5 times greater than the blank sample signal  
152 and calculated concentrations were acceptable when within +/- 20% of actual concentrations,  
153 in accordance with EMA recommendations.

154 Precision and accuracy were assessed on quality control (QC) samples at 5 levels of  
155 concentrations, within-run (on one day, n=6) and between-run (six runs on six different days,  
156 n=6). Accuracy was measured as a deviation percentage of the nominal concentration while  
157 precision was expressed as the coefficient of variation (CV %) assessing the closeness of  
158 repeated measures. Deviations of up to +/- 15% (or +/- 20% for LLOQ), from the actual  
159 concentrations were considered as acceptable.

#### 160 *1.6.2. Matrix effects*

161 The matrix effects for the analyte and the IS were evaluated on six different replicates of human  
162 serum, three different replicates of human urine and three different lots of cell culture medium.  
163 For each matrix, the matrix factor (MF) was calculated by comparing the chromatographic peak  
164 areas of the corresponding matrix blank spiked after SPE extraction with low QC and high QC  
165 extracts (serum: 10 and 50  $\mu$ M, urine: 11.5 and 77  $\mu$ M and cell culture medium: 12 and 85  $\mu$ M)  
166 to peak areas of water spiked with the same concentrations. We then calculated the CV of the  
167 IS-normalized matrix effect obtained by the ratio of the MF of the analyte and the MF of the IS.  
168 Coefficients of variation lower than 15% were deemed acceptable.

#### 169 *1.6.3. Recovery*

170 Extraction yields were assessed by comparing the peak area obtained from each matrix (water,  
171 serum, urine and cell culture medium) samples extracts with the peak area from the  
172 corresponding unextracted matrix. Each matrix was spiked with low and high succinic acid

173 concentrations as described in the “matrix effect” section (n=6 assays per concentration for  
174 water and serum and n=3 assays per concentration for urine and cell culture medium).

#### 175 *1.6.4. Stability*

176 Succinic acid stability was assessed on low and high QC samples (water: 4 and 100 µM,  
177 serum: 8 and 80 µM, urine: 15 and 120 µM and cell culture medium: 10 and 90 µM) (at least  
178 n=4 replicates). The analyte was considered stable in the matrix when the percentage of  
179 deviation from nominal concentration was less than 15%.

##### 180 *1.6.4.1. Freeze and thaw stability*

181 QC samples were submitted to four freeze and thaw cycles. After each cycle, the samples  
182 were thawed at room temperature, analysed against a fresh calibration curve and then refrozen  
183 for at least 12 hours.

##### 184 *1.6.4.2. Short-term stability*

185 QC samples in the 4 different matrices were analysed immediately after preparation, left 24  
186 hours at room temperature and then reanalysed against a calibration curve from freshly spiked  
187 standards.

##### 188 *1.6.4.3. Frozen storage stability*

189 QC samples in the 4 different matrices were analysed against freshly spiked standards and  
190 stored frozen 5 months at -20°C. They were then reanalysed and compared with the freshly  
191 spiked QC samples.

##### 192 *1.6.4.4. Stability in the autosampler*

193 Stability at +15°C was evaluated during 24 hours in the autosampler (0 and 24 hours' time  
194 points). This study assessed the use in clinical conditions for patients' samples for which the  
195 analytical serie is reassessed if samples remain in the analytical system up to 24 hours.

196

197



198 *1.6.5. Dilution integrity*

199 Dilution integrity was assessed in human serum, human urine and cell culture medium. The  
200 blank matrix, either serum or urine or cell culture medium, was spiked with a succinic acid  
201 target concentration (serum: 79.6  $\mu\text{M}$ ; urine: 86.2  $\mu\text{M}$ ; cell culture medium: 82.6  $\mu\text{M}$ ). Then a  
202 one tenth dilution was applied. The dilution was assessed six times for each matrix.

203 *1.6.6. Carry over effects*

204 Carryover in the blank sample following the highest concentration standard (STD9=135.5  $\mu\text{M}$ )  
205 was assessed on ten runs. As recommended [23], signal should not be greater than 20% of  
206 the area of the LLOQ and 5% of the area of the IS.

207

208 **2. Results**

209 *2.1. Automation of sample extraction and preparation*

210 SPE has been automated using the Freedom EVO<sup>®</sup> 150 robot from TECAN, enabling to  
211 increase precision especially for lower concentrations (Table 1). Indeed, precision (CV%) at  
212 1.7  $\mu\text{M}$  from manual and automated SPE are 65.9% and 5.4%, respectively. Moreover, this  
213 technology is adapted to the use of 96-well plates allowing the quantification of succinic acid  
214 in large series.

215 *2.2. Optimization of LC-MS/MS conditions*

216 In the analytical conditions described previously, the retention time for succinic acid was 2.54  
217 min. The source operated in negative mode with a capillary voltage of 1.5 Kv and a cone  
218 voltage of 20 V. Source and desolvation temperatures were set at 150°C and 600°C  
219 respectively, and desolvation dry nitrogen flow was 900 L/h. The MRM transition used for  
220 succinic acid is 116.87 > 73.04. Selected IS transition is 121.07 > 76.11. Typical MRM  
221 chromatograms representing a blank, the succinic acid LLOQ at 1.0  $\mu\text{M}$ , a serum sample, a

222 from PPGL *SDHB* mutated patients, intracellular and extracellular concentrations from a *SDHB*  
223 invalidated hPHEO1 clone are presented in Fig. 1, A, B, C, D, E and F, respectively.

### 224 2.3. Validation study of the UHPLC-MS/MS method

#### 225 2.3.1. Linearity, precision and accuracy

226 The linear calibration curve was not forced to zero. For succinic acid quantification, a  
227 calibration function was determined by linear regression over 1.0 to 135.5  $\mu\text{M}$  with acceptable  
228 coefficient of determination  $r^2$  (Table 2a).

229 The mean correlation coefficient of the six calibration curves was  $r^2 = 0.9997$  (data not shown).  
230 The LOD and LLOQ values have been determined at 0.5  $\mu\text{M}$  and 1.0  $\mu\text{M}$ , respectively (Table  
231 2b).

232 The between-run precision (CV %) and accuracy (% deviation from nominal concentrations)  
233 were below 14.4% and 11.0%, respectively, for all the replicates of all the QCs. The within-run  
234 precision and accuracy were below 5.0% and 7.9%, respectively, for all the replicates of all the  
235 QCs (Table 3).

#### 236 2.3.2. Matrix effects

237 No significant matrix effect was observed for the succinic acid and its related IS. Matrix factors  
238 (MF) for both low and high QCs in all the tested matrices are presented in Table 4.A, 4.B and  
239 4.C. The CV% of the IS-normalised MF for low and high QC was below 9.1% and 5.1%,  
240 respectively.

#### 241 2.3.3. Recovery

242 The mean recovery level for succinic acid from low and high QCs prepared either in water or  
243 in human serum, human urine or cell culture medium were above 99.5%, 88.4%, 49.1% and  
244 79.7%, respectively. For the IS, the mean recovery levels were above 71.8% in water, above  
245 78.7% in human serum, above 42.5% in human urine and above 87.4% in cell culture medium  
246 (Table 5).

247 *2.3.4. Stability*

248 Stock solutions (all STDs and QCs aliquots for succinic acid and 847µM for IS) were stable at  
249 -20°C over time (up to 6 months) (data not shown).

250 QCs were stable over at least 4 freeze and thaw cycles, either prepared in water or human  
251 serum, human urine and cell culture medium. Moreover, they were stable over at least 24  
252 hours at room temperature and 5 months at -20°C. When reinjection is necessary, QCs are  
253 stable over at least 24 hours in the autosampler at +15°C (Table 6).

254 *2.3.5. Dilution integrity*

255 After a one tenth dilution of samples spiked with different concentrations of succinic acid in  
256 different matrix (serum, urine and cell culture medium), precision and accuracy were below  
257 3.8% for all the matrices (Table 7).

258 *2.3.6. Carry-over effect*

259 No carry-over effect was observed. The surface peak at the retention time of the analyte in the  
260 blank after the highest concentration standard was below quantification limit. Percentage of  
261 coefficient of variation (%CV) was below 0.005% (Table 8).

262 *2.4. Clinical and preclinical applications*

263 The method was suitable for quantitating succinic acid levels in serum and urine of PPGL  
264 patients, either sporadic (*SDH* wild-type) or *SDH* mutated. In our samples, the mean of succinic  
265 acid concentrations from PPGL patients (*SDH* mutated and sporadic) was 35.7 µM [min: 3.8 –  
266 max: 440.6] in serum and 62.1 µM [min: 7.9 – max: 260.5] in urine (Table 9).

267 For preclinical investigations we have been successful in quantitating succinic acid levels in  
268 cell pellets (succinic acid concentrations normalized on 1 million of cells) and supernatant of  
269 human pheochromocytoma cell lines +/- *SDHB* invalidated. The mean of measured succinic  
270 acid concentrations was 0.77 µM [min: 0.1 – max: 3.4] in the pellets and 31.9 µM [min: 3.6 –  
271 max: 70.3] in the supernatants (Table 9).

272

273 **3. Discussion and conclusion**

274 We have fully validated an automated LC-MS/MS method allowing a quick, sensitive, robust,  
275 accurate and precise quantification of succinic acid in 3 different matrices (serum, urine and  
276 cell culture medium). Several quantitative analytical methods have already been published but  
277 were either not enough sensitive (GC-MS) [11, 16-18] or not fully adapted for clinical practice  
278 [19,20]. Our method is totally adapted for this clinical use, in particular thanks to the automated  
279 SPE. Indeed, automation is key to reduce errors (pipetting, patient samples inversion), improve  
280 efficiency (increase precision, reduce low value added activities), and allows quantification of  
281 large series of samples [24]. More recently, an interesting proton nuclear magnetic resonance  
282 spectroscopy (<sup>1</sup>H-NMR) method has been described in several publications. It has been  
283 applied to study the metabolomic urine profile of *SDH* mutation carriers with or without tumors  
284 and results suggest that the quantification of urine succinic acid levels would permit to identify  
285 the development of PPGL disease among a tumor-free asymptomatic *SDH* population [25]. In  
286 2020, *Lussey-Lepoutre et al.* have used this non-invasive *in vivo* <sup>1</sup>H-MR technic to evaluate  
287 succinic acid levels in PPGL patients during MRI (magnetic resonance imaging). Results are  
288 of great interest and sustain the role of succinic acid as an oncobiomarker to identify *SDH*  
289 mutations in paragangliomas. Nevertheless, the <sup>1</sup>H-NMR method does not allow absolute  
290 quantification of succinic acid and the analysis time is long (~25 min), thus not adapted as a  
291 follow-up tool, contrary to our LC-MS/MS method [26].

292 The role of quantitated succinic acid is of interest and succinic acid serum levels have been  
293 recently evaluated as diagnostic biomarkers for *SDH* mutations and/or as predictive  
294 parameters for therapeutic monitoring of *SDH* mutated malignancies. Our group showed a  
295 significant increase of serum succinic acid levels in tumor free asymptomatic *SDHB* carriers in  
296 comparison to a healthy control group. Moreover, evaluation of serum succinic acid levels  
297 among PPGL patients to discriminate patients regarding their *SDH* mutational status is on  
298 progress. Our preliminary results also suggest, as illustrated in 3 case reports, the potential  
299 role of serum succinic acid levels as a biomarker of treatment response and follow-up [14].

300 PPGL are rare neuroendocrine tumors (<0,1 case per 100 000) and preclinical studies are  
301 essential to improve understanding of the molecular mechanisms of this disease and evaluate  
302 new therapeutic strategies. Our LC-MS/MS has been successfully used to quantify succinic  
303 acid in cellular pellets and cell supernatants of human cellular models (hPHEO1 and *SDHB*<sup>+/-</sup>  
304 invalidated clones). Similar results, as obtained in clinic, have been observed, underlying that  
305 our method is also a relevant tool for preclinical studies [15]. Finally, the interest of succinic  
306 acid quantification is not limited to cancer as it is also involved in inflammation and ischemia  
307 reperfusion injury [12,13].

308 To our knowledge, we have described for the first time, an automated LC-MS/MS method fully-  
309 validated following the updated EMA guidelines, and suitable for quantitative succinic acid  
310 measurements in clinical practice and preclinical studies.

311

#### 312 **Author contributions**

313 **Constance Lamy:** Conceptualization, Investigation, methodology, validation, writing original  
314 draft. **Clémence Mansard:** Methodology, validation, writing original draft. **Lionel Mercier:**  
315 Investigation, methodology, validation. **Louis Blondel:** Validation, reviewing draft. **Angelo**  
316 **Paci:** Conceptualization, Supervision, reviewing draft. **Sophie Broutin:** Conceptualization,  
317 Supervision, writing original draft, reviewing draft.

318

319

320 **References**

- 321 [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*. 144 (2011)  
322 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- 323 [2] I. Martínez-Reyes, N.S. Chandel, Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology  
324 and disease, *Nat Commun*. 11 (2020) 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>.
- 325 [3] M.R.H.A. Rasheed, G. Tarjan, Succinate Dehydrogenase Complex: An Updated Review,  
326 *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 142 (2018) 1564–1570.  
327 <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0285-RS>.
- 328 [4] N.M. Anderson, P. Mucka, J.G. Kern, H. Feng, The emerging role and targetability of the  
329 TCA cycle in cancer metabolism, *Protein Cell*. 9 (2018) 216–237.  
330 <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0451-1>.
- 331 [5] A. Morin, E. Letouzé, A.-P. Gimenez-Roqueplo, J. Favier, Oncometabolites-driven  
332 tumorigenesis: From genetics to targeted therapy: Oncometabolites-Driven Tumorigenesis,  
333 *Int. J. Cancer*. 135 (2014) 2237–2248. <https://doi.org/10.1002/ijc.29080>.
- 334 [6] A. Buffet, N. Burnichon, J. Favier, A.-P. Gimenez-Roqueplo, An overview of 20 years of  
335 genetic studies in pheochromocytoma and paraganglioma, *Best Practice & Research Clinical*  
336 *Endocrinology & Metabolism*. 34 (2020) 101416. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101416>.
- 337 [7] A. Ibrahim, S. Chopra, Succinate Dehydrogenase–Deficient Gastrointestinal Stromal  
338 Tumors, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 144 (2020) 655–660.  
339 <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0370-RS>.
- 340 [8] A.J. Gill, O. Hes, T. Papathomas, M. Šedivcová, P.H. Tan, A. Agaimy, P.A. Andresen, A.  
341 Kedziora, A. Clarkson, C.W. Toon, L. Sioson, N. Watson, A. Chou, J. Paik, R.J. Clifton-Bligh,  
342 B.G. Robinson, D.E. Benn, K. Hills, F. Maclean, N.D. Niemeijer, L. Vlatkovic, A. Hartmann,  
343 E.P.M. Corssmit, G.J.L.H. van Leenders, C. Przybycin, J.K. McKenney, C. Magi-Galluzzi, A.  
344 Yilmaz, D. Yu, K.D. Nicoll, J.L. Yong, M. Sibony, E. Yakirevich, S. Fleming, C.W. Chow, M.  
345 Miettinen, M. Michal, K. Trpkov, Succinate Dehydrogenase (SDH)-deficient Renal Carcinoma:  
346 A Morphologically Distinct Entity, *The American Journal of Surgical Pathology*. 38 (2014)  
347 1588–1602. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000292>.
- 348 [9] A.P. Aldera, D. Govender, Gene of the month: SDH, *J Clin Pathol*. 71 (2018) 95–97.  
349 <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204677>.
- 350 [10] S. Richter, M. Peitzsch, E. Rapizzi, J.W. Lenders, N. Qin, A.A. de Cubas, F. Schiavi, J.U.  
351 Rao, F. Beuschlein, M. Quinkler, H.J. Timmers, G. Opocher, M. Mannelli, K. Pacak, M.  
352 Robledo, G. Eisenhofer, Krebs Cycle Metabolite Profiling for Identification and Stratification of  
353 Pheochromocytomas/Paragangliomas due to Succinate Dehydrogenase Deficiency, *The*  
354 *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 99 (2014) 3903–3911.  
355 <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2151>.
- 356 [11] N. Lendvai, R. Pawlosky, P. Bullova, G. Eisenhofer, A. Patocs, R.L. Veech, K. Pacak,  
357 Succinate-to-Fumarate Ratio as a New Metabolic Marker to Detect the Presence of SDHB/D-  
358 related Paraganglioma: Initial Experimental and Ex Vivo Findings, *Endocrinology*. 155 (2014)  
359 27–32. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1549>.

- 360 [12] K.J. Harber, K.E. de Goede, S.G.S. Verberk, E. Meinster, H.E. de Vries, M. van Weeghel,  
361 M.P.J. de Winther, J. Van den Bossche, Succinate Is an Inflammation-Induced  
362 Immunoregulatory Metabolite in Macrophages, *Metabolites*. 10 (2020) 372.  
363 <https://doi.org/10.3390/metabo10090372>.
- 364 [13] V.R. Pell, E.T. Chouchani, C. Frezza, M.P. Murphy, T. Krieg, Succinate metabolism: a  
365 new therapeutic target for myocardial reperfusion injury, *Cardiovasc Res*. 111 (2016) 134–141.  
366 <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw100>.
- 367 [14] C. Lamy, H. Tissot, M. Faron, E. Baudin, S. Leboulleux, A. Paci, J. Hadoux, S. Broutin,  
368 1166MO Clinical evaluation of serum succinate levels as a new biomarker in SDH-related  
369 paragangliomas and pheochromocytomas, *Annals of Oncology*. 31 (2020) S773–S774.  
370 <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.1379>.
- 371 [15] C. Lamy, J. Hadoux, S. Durand, A. Alghuzlan, J. Riviere, D. Lefevre, A. Bongers, J.-Y.  
372 Scoazec, E. Baudin, A. Paci, S. Broutin, Abstract 2937: Preclinical evaluation of new  
373 therapeutic strategies on *SDHB* invalidated clones from human pheochromocytoma cells, in:  
374 Experimental and Molecular Therapeutics, American Association for Cancer Research, 2019:  
375 pp. 2937–2937. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-2937>.
- 376 [16] P. Jarsiah, J. Roehrich, M. Wyczynski, C. Hess, Phase I metabolites (organic acids) of  
377 gamma-hydroxybutyric acid–validated quantification using GC–MS and description of  
378 endogenous concentration ranges, *Drug Test Anal*. 12 (2020) 1135–1143.  
379 <https://doi.org/10.1002/dta.2820>.
- 380 [17] R.J. Pawlosky, Y. Kashiwaya, S. Srivastava, M.T. King, C. Crutchfield, N. Volkow, G.  
381 Kunos, T.-K. Li, R.L. Veech, Alterations in Brain Glucose Utilization Accompanying Elevations  
382 in Blood Ethanol and Acetate Concentrations in the Rat, *Alcoholism: Clinical and Experimental*  
383 *Research*. 34 (2010) 375–381. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01099.x>.
- 384 [18] J.A. Hobert, J.L. Mester, J. Moline, C. Eng, Elevated plasma succinate in PTEN, SDHB,  
385 and SDHD mutation–positive individuals, *Genet Med*. 14 (2012) 616–619.  
386 <https://doi.org/10.1038/gim.2011.63>.
- 387 [19] A. Klupczynska, S. Plewa, W. Dyszkiewicz, M. Kasprzyk, N. Sytek, Z.J. Kokot,  
388 Determination of low-molecular-weight organic acids in non-small cell lung cancer with a new  
389 liquid chromatography–tandem mass spectrometry method, *Journal of Pharmaceutical and*  
390 *Biomedical Analysis*. 129 (2016) 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.028>.
- 391 [20] R. Rathod, B. Gajera, K. Nazir, J. Wallenius, V. Velagapudi, Simultaneous Measurement  
392 of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates in Different Biological Matrices Using Liquid  
393 Chromatography–Tandem Mass Spectrometry; Quantitation and Comparison of TCA Cycle  
394 Intermediates in Human Serum, Plasma, Kasumi-1 Cell and Murine Liver Tissue, *Metabolites*.  
395 10 (2020) 103. <https://doi.org/10.3390/metabo10030103>.
- 396 [21] Ghayee, Hans K., Vikash J. Bhagwandin, Victor Stastny, Arielle Click, Liang-Hao Ding,  
397 Dario Mizrahi, and others, 'Progenitor Cell Line (HPheo1) Derived from a Human  
398 Pheochromocytoma Tumor', ed. by John P. Lydon, *PLoS ONE*, 8.6 (2013), e65624  
399 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065624>>
- 400 [22] A.F. Gazdar, H.K. Oie, Re: Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small

401 cell lung cancer in a serum-free defined medium, *Cancer Res.* 46 (1986) 6011–6012.

402 [23] European Medicines Agency, ICH M10 Bioanalytical method validation Guidelines (2019).  
403 [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-  
bioanalytical-method-validation-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-<br/>404 bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf).

405 [24] D.H. Tacker, J. Topardo, C. Mahaffey, P.L. Perrotta, Workflow Analysis Comparing  
406 Manual and Automated Specimen Processing for Mass Spectrometry–Based Vitamin D  
407 Testing, *Lab Med.* 45 (2014) 361–367. <https://doi.org/10.1309/LMZL47EN6KDODMXJ>.

408 [25] R.G. Martins, L.G. Gonçalves, N. Cunha, M.J. Bugalho, Metabolomic Urine Profile:  
409 Searching for New Biomarkers of SDHx-Associated Pheochromocytomas and  
410 Paragangliomas, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 104 (2019) 5467–5477.  
411 <https://doi.org/10.1210/jc.2019-01101>.

412 [26] C. Lussey-Lepoutre, A. Bellucci, N. Burnichon, L. Amar, A. Buffet, T. Drossart, S. Fontaine,  
413 O. Clement, P. Benit, P. Rustin, L. Groussin, T. Meatchi, A.-P. Gimenez-Roqueplo, B. Tavitian,  
414 J. Favier, Succinate detection using in vivo 1H-MR spectroscopy identifies germline and  
415 somatic SDHx mutations in paragangliomas, *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 47 (2020) 1510–  
416 1517. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04633-9>.

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435



436 Table 1: Comparison of succinic acid quantification using a manual or automated SPE (Solid  
 437 Phase Extraction)

438

Succinic acid Nominal concentration ( $\mu\text{M}$ )	<i>Manual method</i>			<i>Automated method</i>		
	Mean measured concentrations	Precision	Accuracy	Mean measured concentrations	Precision	Accuracy
	(n=4)	(CV %)	(%)	(n=4)	(CV %)	(%)
1.7	1.7	65.9	-0.1	1.6	5.4	5.3
3.4	3.3	14.1	3.3	3.4	2.2	-0.1
6.8	6.8	4.7	0.0	7.0	3.7	-2.8
20.3	20.6	3.3	-1.1	21.1	3.3	-4.0
101.6	106.2	5.2	-4.5	103.6	1.1	-1.9

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

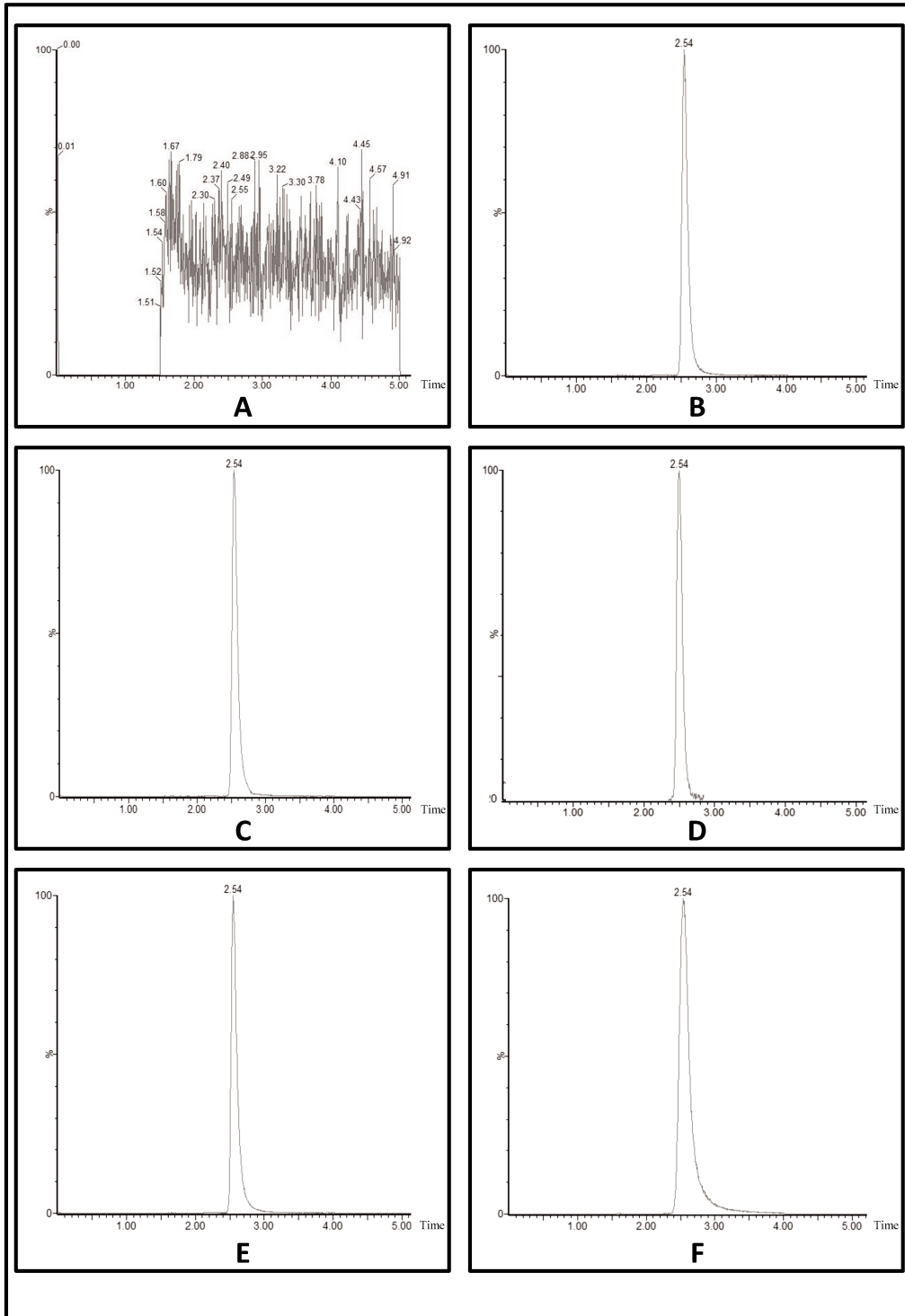
469

470

471

472

473 **Fig. 1** MRM chromatograms **(A)** Water blank; **(B)** LLOQ in water at 1.0  $\mu\text{M}$  succinic acid; **(C)**  
 1 474 Serum sample from a paraganglioma *SDHB* mutated patient; succinic acid: 17.7  $\mu\text{M}$ ; **(D)** Urine  
 2 475 sample from a paraganglioma *SDHB* mutated patient; succinic acid: 62.1  $\mu\text{M}$ ; **(E)** *SDHB*  
 3 476 invalidated hPHEO1 pellet; succinic acid: 0.36  $\mu\text{M}/1.10^6$  cells; **(F)** Cell culture medium from a  
 4 477 *SDHB* invalidated hPHEO1 clone; succinic acid: 5.8  $\mu\text{M}/1.10^6$  cells



478

61  
62  
63  
64  
65

481 Table 2: Linearity, accuracy and precision of the analytical method

482 Table 2a: Linearity of *succinic acid* calibration standards

Standard Nominal concentration ( $\mu\text{M}$ )	<i>Succinic acid</i>		
	Mean measured concentrations (n=6)	Precision (CV %)	Accuracy (%)
1.0	1.0	4.8	5.1
2.1	2.	3.9	0.2
4.2	4.3	4.9	-0.4
8.5	8.5	1.5	-0.6
13.6	14.0	2.5	-3.0
33.9	33.5	4.1	1.1
67.8	70.9	3.1	-4.7
135.5	134.1	2.2	1.1

Table 2b: LLOQ verification at 1.0  $\mu\text{M}$  (n=6)

<i>Succinic acid</i>	
Mean ( $\mu\text{M}$ )	0.9
Precision (CV %)	7.4
Accuracy (%)	5.1
Signal-noise ratio	>5

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497 Table 3: Precision and accuracy of the QCs samples in water, human serum & urine and in cell  
 498 culture medium (supernatant)

Between-run (n=6) <i>Succinic acid</i>					Within-run (n=6) <i>Succinic acid</i>				
		Mean Value ( $\mu\text{M}$ )	Precision (CV %)	Accuracy (%)			Mean Value ( $\mu\text{M}$ )	Precision (CV %)	Accuracy (%)
QCs in Water ( $\mu\text{M}$ )	QC <sub>1</sub> (1.7)	1.7	8.3	1.8	QC <sub>1</sub> (1.7)	1.6	2.3	7.0	
	QC <sub>2</sub> (3.4)	3.2	4.6	6.5	QC <sub>2</sub> (3.4)	3.3	5.0	1.7	
	QC <sub>3</sub> (6.8)	6.7	2.6	1.2	QC <sub>3</sub> (6.8)	6.4	2.0	6.2	
	QC <sub>4</sub> (20.3)	19.3	3.3	5.1	QC <sub>4</sub> (20.3)	19.7	1.2	3.2	
	QC <sub>5</sub> (101.6)	96.6	3.1	4.9	QC <sub>5</sub> (101.6)	93.6	2.1	7.9	
QCs in Serum ( $\mu\text{M}$ )	QC <sub>1</sub> (13.2)	13.9	5.2	-5.0	QC <sub>1</sub> (8.2)	8.3	2.3	-3.3	
	QC <sub>5</sub> (92.5)	93.9	1.4	-1.5	QC <sub>5</sub> (79.4)	79.6	1.3	0.5	
QCs in Urine ( $\mu\text{M}$ )	QC <sub>1</sub> (14.9)	16.3	14.4	-9.2	QC <sub>1</sub> (8.3)	8.3	0.9	-4.1	
	QC <sub>5</sub> (96.0)	96.0	11.5	11.0	QC <sub>5</sub> (85.9)	86.2	2.7	-7.8	
QCs in Supernatant ( $\mu\text{M}$ )	QC <sub>1</sub> (12.0)	12.0	1.5	0.0	QC <sub>1</sub> (8.2)	8.2	1.4	-2.5	
	QC <sub>5</sub> (83.8)	83.8	1.4	0.0	QC <sub>5</sub> (82.8)	82.6	0.9	-3.3	

499  
 500  
 501  
 502  
 503  
 504  
 505  
 506  
 507  
 508  
 509  
 510  
 511  
 512  
 513  
 514  
 515  
 516  
 517  
 518  
 519  
 520  
 521  
 522  
 523  
 524  
 525  
 526

527 Table 4: Matrix effect of serum, urine and cell supernatant

528

529 Table 4a: Matrix effect from six individual human serums

530

Blank matrix n=6	<i>Succinic acid</i> Low QC			<i>Succinic acid</i> High QC		
	MF	IS MF (5µg/mL)	IS-normalized MF	MF	IS MF (5µg/mL)	IS-normalized MF
1	0.7	1.0	0.7	0.9	1.2	0.8
2	1.0	1.1	0.9	0.9	1.1	0.8
3	0.9	1.0	0.9	1.1	1.3	0.9
4	0.8	0.9	0.9	1.1	1.2	0.9
5	0.8	1.0	0.8	1.0	1.2	0.9
6	1.0	1.1	0.9	1.2	1.3	0.9
Mean			0.9			0.9
CV %			9.1			5.1

531

532

Low QC: 10 µM. high QC: 50 µM. MF: Matrix factor. IS MF: internal standard matrix factor

533

534

535

536 Table 4b: Matrix effect from three individual human urines

537

Blank matrix n=3	<i>Succinic acid</i> Low QC			<i>Succinic acid</i> High QC		
	MF	IS MF (5µg/mL)	IS-normalized MF	MF	IS MF (5µg/mL)	IS-normalized MF
1	0.8	0.8	1.0	0.5	0.5	1.1
2	0.7	0.8	0.9	0.5	0.4	1.2
3	0.8	0.8	1.0	0.5	0.4	1.2
Mean			1.0			1.2
CV %			1.6			0.8

538

539

Low QC: 11.5 µM. high QC: 77 µM. MF: Matrix factor. IS MF: internal standard matrix factor

540

541

542 Table 4c: Matrix effect from three individual cell culture medium

543

Blank matrix n=3	<i>Succinic acid</i> Low QC			<i>Succinic acid</i> High QC		
	MF	IS MF (5µg/mL)	IS-normalized MF	MF	IS MF (5µg/mL)	IS-normalized MF
1	0.7	1.1	0.7	0.8	0.9	0.9
2	0.7	1.0	0.7	0.8	0.9	0.9
3	0.6	0.9	0.7	0.8	0.9	0.9
Mean			0.7			0.9
CV %			0.9			0.8

544

545

Low QC: 12 µM. high QC: 85 µM. MF: Matrix factor. IS MF: internal standard matrix factor

546

547

548

549

550

551 Table 5: SPE extraction recovery of *succinic acid* in human serum, urine and cell culture  
 552 medium  
 553

		Recovery succinic acid	Recovery IS (5 µg/mL)
		(%) (CV %)	(%) (CV %)
Water (n=6)	Low QC	100.7 (12.9)	76.7 (13.1)
	High QC	99.5 (7.2)	71.8 (7.6)
Human serum (n=6)	Low QC	88.4 (12.1)	78.7 (10.4)
	High QC	103.9 (10.9)	86.3 (8.9)
Human urine (n=3)	Low QC	77.7 (7.1)	81.3 (9.0)
	High QC	49.1 (8.4)	42.5 (7.4)
Cell culture medium (n=3)	Low QC	81.0 (3.1)	89.5 (2.1)
	High QC	79.7 (9.8)	87.4 (3.4)

554

555 Water: low QC: 10 µM, high QC: 50 µM

556 Serum: low QC: 10 µM, high QC: 50 µM

557 Urine: low QC: 11.5 µM, high QC: 77 µM

558 Medium: low QC: 32 µM, high QC: 85 µM

559

560

561 Table 6: Stability of *succinic acid* QCs samples in water, human serum & urine and cell culture  
 562 medium

	Freeze & Thaw stability (4 cycles)				Room temperature (24h)				Frozen storage stability (5 months at -20°C)				Autosampler stability (24h at 15°C)			
	Accuracy (%)				Accuracy (%)				Accuracy (%)				Accuracy (%)			
	Water	Serum	Urine	Cells	Water	Serum	Urine	Cells	Water	Serum	Urine	Cells	Water	Serum	Urine	Cells
Low QC (n=4)	-0.5	-3.3	-14.8	-10.7	-5.0	-10.5	-14.8	1.3	-6.6	-3.4	14.3	-14.1	-3.1	-0.0	4.2	2.4
High QC (n=4)	-3.8	-2.9	-11	-8.6	-3.7	-7.9	-7.6	10.6	-4.7	-10.9	1.8	-3.5	2.6	1.3	-6.5	3.2

563

564 Water: low QC: 4 µM, high QC: 100 µM

565 Serum: low QC: 8 µM, high QC: 80 µM

566 Urine: low QC: 15 µM, high QC: 120 µM

567 Medium: low QC: 10 µM, high QC: 90 µM

568

569

570

571

572  
573

Table 7: Dilution integrity in human serum, human urine and in cell culture medium (n=6)

	Human serum	Human urine	Cell culture medium
	Target 79.6 $\mu$ M	Target 86.2 $\mu$ M	Target 82.6 $\mu$ M
Mean values ( $\mu$ M)	82.7	83.3	82.0
Precision (CV %)	2.3	0.9	1.4
Accuracy (%)	-3.8	3.4	0.8

574

575 Dilution factor: 1/10

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595



596 Table 8: Carry-over of *succinic acid* in water (n=6)

		Carry-over <i>Succinic acid</i> area
High concentration	Mean	220404
Low concentration (n-1)	Mean	1374
Low concentration (n-3)	Mean	1363
% CV		<b>0.005</b>

597 High concentration: 135.5 µM

598 Low concentration: 1.0 µM

599 n-1: First injection

600 n-3: Third injection

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616 Table 9: Succinic acid concentrations in a pool of human serum, a pool of urine from PPGL  
 617 patients (*SDH* wild-type and *SDH* mutated) and human pheochromocytoma cell lines (hPHEO1  
 618 *SDH* wild-type and *SDHB* invalidated clone)

619

620

621

622

623

624

625

626

627

	Succinic acid concentrations (μM)
Serum (n=20)	<i>Mean</i> 35.7
	<i>[Min - Max]</i> [3.8 - 440.6]
Urine (n=20)	<i>Mean</i> 62.1
	<i>[Min - Max]</i> [7.9 - 260.5]
Cell pellet* (n=10)	<i>Mean</i> 0.77
	<i>[Min - Max]</i> [0.1 - 3.4]
Cell supernatant* (n=10)	<i>Mean</i> 31.9
	<i>[Min - Max]</i> [3.6 - 70.3]

628

\* Normalized on 1 million cell

629

630

**Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### 3.3.2.2. *Discussion de l'article et conclusions*

Nous avons validé une méthode de dosage du succinate par UPLC-MS/MS qui est simple, rapide, robuste, sensible, précise, exacte et applicable dans 3 matrices biologiques (sérum, urine et milieu de culture cellulaire). Contrairement aux autres méthodes analytiques précédemment développées, cette méthode de dosage est complètement adaptée à une activité clinique de routine, notamment lié au fait que toute la préparation pré-analytique est automatisée par l'utilisation du robot TECAN®. Cette automatisation permet notamment de réduire le risque d'erreurs (inversion de patients et pipetage), d'améliorer l'efficacité (augmentation de la précision et réduction d'étapes cumulées) et de quantifier une large série d'échantillons [307].

Récemment, une autre méthode de quantification du succinate par <sup>1</sup>H-RMN a été développée et utilisée dans différentes études chez des patients présentant des anomalies de la SDH. Notamment, le profil métabolomique dans l'urine de patients atteints d'un PPGL *SDH* muté et de leurs apparentés sains a permis de mettre en évidence une augmentation significative du succinate chez les patients atteints d'un PPGL *SDH* muté en comparaison aux apparentés sains *SDH* muté. Ce résultat renforce l'intérêt du succinate comme biomarqueur diagnostique de la survenue d'un PPGL lors du suivi d'une population saine *SDH* muté [226]. Cette même méthode couplée à de l'imagerie par IRM a montré que le succinate, détecté sous la forme d'un pic, est un potentiel biomarqueur diagnostique des mutations *SDH* chez des patients atteints d'un PPGL *SDH* muté [223]. Cependant, cette méthode ne permet pas de quantifier de façon absolue le succinate et le temps d'acquisition est relativement long (~25 min), ce qui n'est pas adapté pour le suivi des patients contrairement à un dosage sérique par UPLC-MS/MS.

En conclusion, la méthode de dosage du succinate par UPLC-MS/MS que nous avons développée respecte les recommandations de l'EMA et est adaptée pour une application clinique dans un environnement de laboratoire de biologie médicale, que nous discuterons dans le prochain paragraphe. Les anomalies de la SDH sont généralement associées aux cancers et plus particulièrement aux PPGL mais ne se limitent pas à cette pathologie. Les perspectives d'utilisation de cette méthode de dosage pourront être ouvertes à de nouvelles cohortes d'études chez des patients présentant des dysfonctions de la SDH telles que cela a pu être décrit dans d'autres types de cancers (cancer du rein, GIST...), dans les maladies inflammatoires et les lésions ischémiques-reperfusion.

### 3.3.3. Évaluation de l'utilité clinique du succinate sérique comme biomarqueur chez les patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté et leurs apparentés sains

Cette partie fait l'objet d'un article scientifique, présenté ci-dessous, et sera discuté par la suite (Paragraphe 3.3.3.2).

« *Succinate: a serum biomarker of SDHB mutated paragangliomas and pheochromocytomas* »

C. Lamy, H. Tissot, M. Faron, E. Baudin, L. Lamartina, C. Pradon, A. Al Ghuzlan, S. Leboulleux, J-L. Perfettini, A. Paci, J. Hadoux, S. Broutin. *Article soumis à Annals of Oncology.*

Les PPGL sont des tumeurs neuroendocrines rares pour lesquelles la mise en place d'études cliniques reste à ce jour difficile. De ce fait, nous avons recueilli de manière rétrospective des sérums de patients atteints d'un PPGL sporadique (*SDH* WT) ou *SDH* muté ainsi que de leurs apparentés sains porteurs d'une mutation germinale *SDH* (Institut de cancérologie Gustave Roussy [2014-2019]). Cette sérothèque correspond à la collection de 280 échantillons provenant de 105 individus. Dans cette étude, nous avons évalué le succinate sérique comme potentiel biomarqueur diagnostique de la présence d'une mutation *SDH* (patients atteints d'un PPGL et famille de patients avec une mutation germinale), mais également biomarqueur de l'extension de la maladie et de la réponse aux traitements.

3.3.3.1. **Article 3:** « *Succinate: a serum biomarker of SDHB mutated paragangliomas and pheochromocytomas* »



**Succinate: a serum biomarker of *SDHB* mutated paragangliomas and pheochromocytomas**

Journal:	<i>Annals of Oncology</i>
Manuscript ID	ANNONC-2021-0912
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	07-May-2021
Complete List of Authors:	<p>Lamy, Constance; Université Paris-Saclay, Inserm UMR1030, Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, F-94805, Villejuif, France; Gustave Roussy, Inserm UMR1030, Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, F-94805, Villejuif, France</p> <p>Tissot, Hubert; Gustave Roussy, Department of Nuclear Medicine</p> <p>Faron, Matthieu; Gustave Roussy, Paris-Saclay University, Department of Biostatistics and Epidemiology; Paris-Saclay University, Inserm, Oncostat U1018, labeled Ligue Contre le Cancer; Gustave Roussy, Department of Surgical Oncology</p> <p>BAUDIN, ERIC; Gustave Roussy, Department of Endocrine Oncology</p> <p>LAMARTINA, Livia; Gustave Roussy, Department of Endocrine Oncology</p> <p>Pradon, Caroline; Gustave Roussy, Department of Medical Biology and Pathology</p> <p>Alghuzlan, Abir; Gustave Roussy, Department of Medical Biology and Pathology; Gustave Roussy, Department of Endocrine Oncology</p> <p>Leboulleux, Sophie; Gustave Roussy, Department of Nuclear Medicine and Endocrine Tumors</p> <p>Perfettini, Jean-Luc; Université Paris-Saclay, Inserm UMR1030, Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation; University of the Pacific - San Francisco Campus, Department of Biomedical Sciences; Gustave Roussy, Inserm UMR1030, Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation</p> <p>Paci, Angelo; Gustave Roussy, Department of Medical Biology and Pathology; Paris-Saclay University, Inserm UMR1030, Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation; Université Paris-Saclay, Service of pharmacokinetic, Faculty of pharmacy</p> <p>Hadoux, Julien; Gustave Roussy, Department of Endocrine Oncology</p> <p>Broutin, Sophie; Gustave Roussy, Department of Medical Biology and Pathology; Université Paris-Saclay, Inserm UMR1030, Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, F-94805</p>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Keywords:	Pheochromocytoma, Paraganglioma, Succinate, Biomarker, Monitoring, SDH
Abstract:	<p>Background: Pheochromocytomas and Paragangliomas (PPGL) are rare neuroendocrine tumors that are frequently associated with succinate dehydrogenase (SDH) germline mutations. <i>SDHx</i> genes (A, B, C, and D) encode for a four subunits Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) enzyme that catalyzes the oxidation of succinate into fumarate. When mutated, SDH losses its function, thus leading to succinate accumulation. In this study, we evaluated serum succinate levels as a new metabolic biomarker in <i>SDHx</i> mutation carriers (PPGL patients and tumor-free familial asymptomatic cases).</p> <p>Patients and methods: Retrospective monocentric study of 88 PPGL patients (including 43 sporadic, 35 <i>SDHB</i> and 10 <i>SDHA/C/D</i>), 17 tumor-free familial asymptomatic carriers (13 <i>SDHB</i>, 4 <i>SDHC/D</i>), and 60 healthy controls. Clinical, biological and imaging ([<sup>18</sup>F] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography with standard computed tomography (18F-FDG-PET/CT) data were reviewed. Serum succinate levels (N=280) were quantified by an ultra-performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method and correlated to <i>SDHx</i> mutational status, disease extension and other biological biomarkers.</p> <p>Results: In this study, serum succinate levels &gt;7 μM allowed to identify tumor-free asymptomatic <i>SDHB</i> mutated cases compared to a healthy control group (100% specificity; 77% sensitivity). At PPGL diagnosis, <i>SDHB</i> mutated patients had a significantly increased succinate level (14 μM) compared to sporadic patients (8 μM) (P&lt;0.01). Extension of the metastatic disease (Tumor Lesion Glycolysis parameter) was correlated to serum succinate levels (r=0.81). In the <i>SDHB</i> group, patients displaying highest tumor burden showed significant increased succinate levels compared to the sporadic group (P&lt;0.0001).</p> <p>Conclusion: In this pilot study, we showed that serum succinate level is an oncometabolic biomarker that should be useful to identify <i>SDHB</i> mutated carriers (tumor-free asymptomatic cases; metastatic PPGL patients). Succinate levels are also a marker of metabolic tumor burden in patients with a metastatic PPGL and a potential marker of treatment response and follow-up.</p>



Original article

## Succinate: a serum biomarker of *SDHB* mutated paragangliomas and pheochromocytomas

**C. Lamy<sup>1,2</sup>, H. Tissot<sup>3</sup>, M. Faron<sup>4,5</sup>, E. Baudin<sup>6</sup>, L. Lamartina<sup>6</sup>, C. Pradon<sup>7</sup>, A. Al Ghuzlan<sup>7</sup>, S. Leboulleux<sup>3</sup>, J-L. Perfettini<sup>1,2,8</sup>, A. Paci<sup>1,7</sup>, J. Hadoux<sup>6</sup>, S. Broutin<sup>1,7\*</sup>**

<sup>1</sup>Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, Inserm UMR1030, Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, F-94805, Villejuif, France ; <sup>2</sup>Gustave Roussy, F-94805, Villejuif, France ; <sup>3</sup>Gustave Roussy, Department of Nuclear Medicine, F-94805, Villejuif, France ; <sup>4</sup>Université Paris-Saclay, UVSQ, Inserm, CESP, F-94805, VILLEJUIF France ; <sup>5</sup>Gustave Roussy, Department of digestive surgery, F-94805, Villejuif, France; <sup>6</sup>Gustave Roussy, Department of Endocrine Oncology, F-94805; Villejuif, France <sup>7</sup>Gustave Roussy, Department of Medical Biology and Pathology, F-94805, Villejuif, France ; <sup>8</sup>Department of Biomedical Sciences, University of the Pacific, Arthur A. Dugoni School of Dentistry, 155 Fifth Street, CA-94103, San Francisco USA.

\*Corresponding author:

Dr Sophie BROUTIN  
Department of Medical Biology and Pathology  
Gustave Roussy  
114 rue Edouard Vaillant, Villejuif, 94805, France  
+33142114057  
[sophie.broutin@gustaveroussy.fr](mailto:sophie.broutin@gustaveroussy.fr)

## Introduction

Pheochromocytomas and Paragangliomas (PPGL) are rare neuroendocrine tumors characterized by a strong genetic determinism. PPGL are the most frequently heritable tumors with more than 20 susceptibility genes identified, including more than 40% of germline mutations<sup>1,2</sup>. In particular, succinate dehydrogenase genes (*SDHx*), encoding for the four subunits (SDHA, SDHB, SDHC and SDHD) of the SDH are the most frequently mutated and account for almost 50% of PPGL germline mutations<sup>3</sup>. *SDHx* mutation tumor-free asymptomatic carriers have an increased risk to develop a PPGL at 60 years estimated around 22%, 43% and 25% for *SDHB*, *SDHD* and *SDHC* carriers, respectively<sup>4</sup>. In most cases, *SDHB* mutations predispose to the malignant form of PPGL (*i.e.* metastatic disease) with a median survival of 6.7-year after the diagnosis of metastases<sup>5-9</sup>. Early identification of *SDHx*-related carriers is therefore of prime importance to treat early-stage diseases, anticipating and potentially preventing the occurrence of a metastatic PPGL<sup>10,11</sup>. In addition, identification of a sensitive, specific and robust biomarker of follow-up remains an unmet need in this population<sup>12-14</sup>.

Currently, *SDHx* molecular diagnosis relies on immunohistochemistry (IHC) and/or whole-blood genotyping<sup>15</sup>. At pathological diagnosis, SDHB/SDHA IHC is performed on PPGL tumors, when available. It's a robust technic but disagreements in the interpretations may occur and IHC cannot be applied by definition to tumor-free family members<sup>16-20</sup>. Genetic status relies on Next-Generation Sequencing (NGS) considered as the gold-standard technic to detect *SDHx* mutations. NGS is used both for newly diagnosed PPGL patients and also for tumor-free family members of patients with an hereditary disease<sup>21,22</sup>. NGS is a sensitive and specific technic, however, delays to get results may be long and thus may not be totally adapted to clinical practice, in particular to potentially personalize therapeutic strategy and to reassure family members<sup>23</sup>. Diagnosis and follow-up of PPGL patients and tumor-free asymptomatic *SDHx*-related carriers also involve regular clinical evaluation, metanephrines quantification (which can be negative) and imaging, that constitute a significant burden in particular for healthy carriers<sup>24,25</sup>. Having a complementary serum biomarker would be thus of great interest to improve diagnosis and follow-up of PPGL patients and tumor free *SDHx* carriers.

SDH enzyme catalyzes the oxidation of succinate into fumarate in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. *SDHx* mutations are characterized by a loss-of-function leading to an accumulation of succinate in the cell, which acts as a TCA oncometabolite by inhibiting de the dioxygenases  $\alpha$ -ketoglutarate dependent<sup>3</sup>. Serum quantification of TCA oncometabolites, such as 2-hydroxyglutarate (2-HG) in isocitrate dehydrogenase (IDH) mutated cancers, has proven its interest for the molecular diagnosis and the follow-up of patients<sup>26,27</sup>.

In this study, we have evaluated the potential value of serum succinate levels as a surrogate biomarker for the detection of *SDHx* mutations in a large cohort of PPGL patients, tumor-free family members and healthy volunteers. We have also investigated its role as a biomarker of functional tumor burden, treatment response and follow-up in *SDHB* PPGL patients.

## Patients and Methods

### Study population and samples

Study population gathers PPGL patients ( $N=88$ ), and *SDHx*-related tumor-free familial carriers ( $N=17$ ) who were seen at Gustave Roussy between 2014 and 2019. Clinical exam, chromogranin A, metanephrine secretions and  $^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxyglucose-positron emission tomography with standard computed tomography ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT) were analyzed as previously described<sup>7</sup>. Tumor-free asymptomatic *SDHx*-related carriers were family members of PPGL patients with a germinal *SDHx* mutation and negative PET/CT and/or cervical and/or whole-body MRI (Magnetic Resonance Imagery). In accordance with the General Data Protection Regulation (GDPR) all patients were informed of this retrospective and observational study and gave their consent. Patients with thyroid cancer in complete remission (thyroglobulin < 0.2 ng/mL) were used as a control group ( $N=60$ ). Serum samples ( $N=340$ ) were collected retrospectively.

### Chromogranin A quantification

Chromogranin A (CGA) has been quantified using a Time-Resolved Amplified Cryptate Emission assay on a KRYPTOR compact PLUS (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; normal range < 100 ng/mL).

### Metanephrine quantification

Metanephrine, normetanephrine and 3-methoxytyramine urine levels have been quantified using a Metanephrines in Urine – HPLC<sup>®</sup> kit (Chromsystems, Gräfelfing, Germany; normal ranges: Metanephrine, 15-120 nmol/mmol of creatine; Normetanephrine, 40-275 nmol/mmol of creatine; 3-methoxytyramines, 20-190 nmol/mmol of creatine) on a liquid chromatography analytical system with electrochemical detection (LC-ECD).

### Succinate quantification

Serum samples were stored at -20°C before analysis. Succinate levels have been quantified using a fully validated ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method (UPLC-MS/MS), regarding EMA guidelines. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of succinic acid- $^{13}\text{C}_4$  (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), used as internal standard (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), were added to 200  $\mu\text{L}$  of serum before a Solid Phase Extraction using STRATA-X<sup>®</sup> devices (200 mg, 3 mL) (Phenomenex, Le Pecq, France). Samples were dry evaporated in a SpeedVac<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and succinate was quantified using a Xevo TQ-S Triple Quadrupole mass Spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The calibration curve was linear between 1.0  $\mu\text{M}$  and 135.5  $\mu\text{M}$ , with a 1.0  $\mu\text{M}$  lower limit of quantification.

### Metabolic volume analysis

Forty-five  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT from 32 metastatic PPGL patients of the study population (16 and 29  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT from 15 sporadic patients and 17 *SDHB* patients, respectively) were performed; 40  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT were acquired using a Discovery 690 (GE Healthcare) at Gustave Roussy, 60 minutes after injection of 3.5 MBq/kg  $^{18}\text{F}$ -FDG and 5  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT were outsourced, performed according to local imaging protocols. Following parameters were extracted using PET VCAR software on an Advantage Workstation (GE Healthcare, Chicago, IL, USA): SUVmax (Standardized Uptake Value), TMTV (Total Metabolic Tumor Volume) and TLG (Total Lesion Glycolysis). SUVmax was measured inside the whole body tumor volume. TMTV was defined as the sum of the metabolic tumor volume (MTV) of each lesion. TMTVs were measured setting a threshold of 40% of the SUVmax of each lesion. TLG was

defined as the sum of the glycolysis of each lesion and was calculated as SUVmean x MTV. The time between the imaging and the succinate quantification was up to one month.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism® (version 9.1, GraphPad Software, La Jolla, CA USA) and R-4.0® (The R Core Team, 2020, Vienna, Austria) softwares. Kruskal-Wallis tests were used to compare quantitative variables among subgroups. If several succinate serum concentrations were available for a patient, the mean of succinate quantifications has been used. At diagnosis, if several succinate serum values were available for a patient, the succinate value closest to the diagnosis has been selected. Receiver operating characteristics (ROC) curves were produced using Wilson/Brown method. Serum succinate cut-off values have been determined as the ones with the best Youden index. Correlations of succinate with CGA, TMTV, TLG and SUVmax were evaluated by Spearman's rank correlation coefficient; correlations of succinate with metanephrines, normetanephrines and 3-methoxytyramines were evaluated by Kendall's rank correlation coefficient; The difference in slopes was tested by a linear model allowing interaction between the subgroup and the (log-transformed) variables. *P* values are bilateral represented as follow: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, \*\*\*\**P*<0.0001.

## Results

### Population & samples

One hundred and five volunteers were included in this retrospective study, 57 males and 48 females, with a median age at diagnosis of 52 years (min: 13 – max: 76) (Table 1). Among them, 17 were tumor-free asymptomatic family members of PPGL patients, carrying an *SDHx* mutation (13 *SDHB*, 2 *SDHC*, 2 *SDHD*) and 88 PPGL patients. There were 58 paragangliomas (18 sporadic (SPO), 3 *SDHA*, 30 *SDHB*, 1 *SDHC*, 6 *SDHD*) and 30 pheochromocytomas (25 SPO, 5 *SDHB*). The primary site was either adrenal ( $N=30$ ), abdominal extra-adrenal ( $N=30$ ) or cervical ( $N=28$ ). Hormonal secretion was identified in 41 (47%) PPGL patients (metanephrines  $>2$  times normal range). According to disease staging, patients were classified as tumor-free asymptomatic carriers ( $N=17$ ), tumor-free after surgery ( $N=22$ ), localized disease ( $N=10$ ) or metastatic disease ( $N=56$ ). A total of 280 serum samples were collected between 2014 and 2019 with a mean of 2.5 samples per patient (min: 1 – max: 14). For PPGL patients, samples were obtained at diagnosis ( $N=129$ ), after surgery ( $N=3$ ) or under treatment (radiotherapy or chemotherapy;  $N=128$ ) (Table S1).

### Succinate levels in tumor-free asymptomatic familial *SDHx*-related carriers

We evaluated circulating succinate levels as a biomarker to detect *SDHx* carriers in tumor-free asymptomatic family members of PPGL patients diagnosed with a germline *SDHx* mutation. Succinate levels were significantly higher in the tumor-free asymptomatic *SDHx* group than in the control group ( $P < 0.0001$ ). This difference was stronger among the *SDHB* carriers ( $P < 0.0001$ ). Median succinate levels in *SDHx*, *SDHB* and control groups were 7  $\mu\text{M}$ , 9  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$ , respectively. In the *SDHC/D* group, succinate levels were also increased but this difference was not significant, possibly due to a smaller number of patients ( $N=5$ ) (Figure 1A).

A cut-off value of serum succinate levels  $\geq 7$   $\mu\text{M}$  would allow detecting most of the asymptomatic *SDHB* carriers while excluding all the control patients (85% sensitivity, 100% specificity) with an area under the curve (AUC) of 0.94 on the ROC curve ( $P < 0.0001$ ) (Figure 1B). Moreover, a cut-off value of serum succinate levels  $\geq 11$   $\mu\text{M}$  would allow identifying *SDHB*-related PPGL whatever the stage, from tumor-free asymptomatic *SDHB*-related carriers with 67% sensitivity and 85% specificity (ROC AUC 0.77,  $P = 0.001$ ) (Figure S1).

### Succinate levels in tumor-positive PPGL patients at diagnosis

We then evaluated succinate serum levels as a biomarker to detect *SDHx* carriers in PPGL patients at diagnosis whatever the stage. Succinate concentrations in the *SDHx* group were statistically higher than in the SPO group ( $P = 0.0078$ ). Subgroup analysis showed that this difference was only significant in the *SDHB* subgroup ( $P = 0.0029$ ), again possibly due to a smaller number of *SDHA/C/D* patients ( $N = 8$ ) (Figure 2). The median of succinate levels in the *SDHx*, *SDHB*, *SDHA/C/D* and SPO groups were 11  $\mu\text{M}$ , 14  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  and 8  $\mu\text{M}$ , respectively. Nevertheless, no cut-off value of succinate has been selected from the ROC curve in order to identify *SDHB* mutation carriers among PPGL patients, as associated sensitivity was considered too low ( $<65\%$ ) (data not shown). Interestingly we observed that at diagnosis, the *SDHB* group showed a large range of succinate concentrations (6-88  $\mu\text{M}$ ) with an elevated Standard Deviation (SD) up to 19, while in the SPO group, succinate values were more tightened up with a SD at 3 (Figure 2). We thus hypothesized and investigated the role of disease extension (localized vs metastatic disease as defined by MRI and  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT) on succinate levels.

### Impact of disease extension on succinate levels in *SDHB* PPGL patients

Succinate concentrations among *SDHB*-metastatic PPGL group were statistically higher than among *SDHB*-localized, SPO-localized and SPO-metastatic PPGL groups ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ , respectively),

and their median levels were 15  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$ , 9  $\mu\text{M}$  and 8  $\mu\text{M}$ , respectively. No statistical difference was observed between SPO-localized, SPO-metastatic and *SDHB*-localized groups. Moreover, a large range of succinate concentrations was only observed in the *SDHB*-metastatic PPGL group (8 – 307  $\mu\text{M}$ ) (Figure 3). The ROC curve comparing, among metastatic PPGL, SPO vs *SDHB* patients showed an elevated AUC (0.82,  $P < 0.0001$ ), and a cut-off value of serum succinate levels  $\geq 12 \mu\text{M}$  would allow discriminating the two groups with 75% sensitivity and 77% specificity (Figure 4D, grey line).

In order to stratify more precisely disease extension, we used Tumor Lesion Glycolysis (TLG) values, one of the  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT quantitative parameter. In 17 *SDHB* metastatic PPGL patients, 29 TLG values were available and stratified in quartiles (Q) (Figure 4A). The “low group” corresponds to  $[Q_1+Q_2]$  with TLG values  $< 1130\text{g}$ . The “middle group” corresponds to  $Q_3$  with TLG values between 1130g and 5140g. The “high group” corresponds to  $Q_4$  with TLG values  $> 5140\text{g}$ . In our population, due to a smaller number of metastatic SPO patients ( $N=16$ ), a unique group has been defined regarding the TLG parameter, with values ranging from 0 up to 8215 g (Figure 4B). Comparing serum succinate levels, we observed that all metastatic *SDHB* groups had significantly higher succinate levels compared to the SPO group (Kruskall-Wallis and Mann Withney tests). Moreover, in the *SDHB* groups, median succinate concentrations increased with disease extension defined with TLG values (low: 11  $\mu\text{M}$ ; middle: 29  $\mu\text{M}$ ; high: 61  $\mu\text{M}$ ) (Figure 4B). A Spearman correlation, with variables in logarithmic scale, between TLG values and succinate levels in metastatic *SDHB* PPGL group showed a strong and significant correlation ( $r=0.81$ ;  $P = 0.0002$ ) (Figure 4C). Focusing on the two highest *SDHB* metastatic groups (middle and high), AUC of the ROC curve increased up to a very high value (0.98;  $P < 0.0001$ ) and a cut-off value of succinate  $\geq 15 \mu\text{M}$  would allow to characterize the disease extension among a metastatic *SDHB* PPGL population (TLG  $> 1130 \text{g}$ ) with 100% sensitivity and 87% specificity (Figure 4D, black curve).

#### **Correlation of succinate concentrations with other biomarkers used in PPGL disease**

PPGL biomarkers were evaluated and compared to serum succinate levels, in the metastatic PPGL population (SPO and *SDHB*-related) using Spearman correlation tests.

Among  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT quantitative parameters, significant correlations have been identified between TLG, TMTV, SUVmax and succinate levels ( $r=0.72$ ;  $r=0.68$ ;  $r=0.61$  &  $P < 0.0001$ ;  $P < 0.0001$ ;  $P = 0.0002$ , respectively). No statistical difference has been shown between SPO and *SDHB* patients, excepted with TMTV values (Figure S2). A significant correlation has also been observed between CGA, a biomarker of tumoral burden and PPGL secretion, and succinate levels ( $r = 0.69$ ,  $P < 0.0001$ ). Again, no statistical difference has been identified between SPO and *SDHB* patients (Figure S3A). Exploratory analysis of metanephrines urine levels showed significant correlations between normetanephrine and succinate serum levels and between 3-methoxytyramine and succinate levels, both in *SDHB* patients (Kendall's tau =0.6,  $P < 0.0001$ ) but not in SPO patients (Kendall's tau =0.09,  $P = 0.4$ ; Kendall's tau =0.2;  $P = 0.2$ ). No correlation between metanephrine and succinate has been observed neither in *SDHB* (Kendall's tau=-0.01;  $P = 0.9$ ) nor in SPO patients (Kendall's tau= 0.02;  $P = 0.9$ ) (Figures S3B-D).

#### **Serum succinate levels in treatment response and follow-up of *SDHB*-related PPGL**

Potential role of serum succinate levels in treatment response and follow-up has been illustrated through three case reports of *SDHB*-related abdominal paragangliomas, all evaluated with metabolic response.

The first one is a male, 36 years old at diagnosis (Figure 5A). At baseline ( $T_0$ ), the patient displayed a highly metastatic disease associated with elevated TLG (7449 g), CGA ( $8.10^3 \text{ ng/mL}$ ) and succinate (34  $\mu\text{M}$ ) levels. Under temozolomide treatment ( $T_1$ ), the patient had a partial response, with a decrease of TLG, CGA and succinate values. The second evaluation under treatment ( $T_2$ ) and the third one without treatment ( $T_3$ ) showed a progressive disease, associated with increasing values of both TLG (1116–5036 g) and succinate (20–29  $\mu\text{M}$ ) while CGA levels remained

both stable and low ( $1.10^3$  ng/mL). Finally, the last evaluation ( $T_4$ ), confirmed the progressive disease, with more elevated TLG (10 448 g), succinate concentrations (54  $\mu$ M) and CGA ( $9.10^3$  ng/mL).

The second case report is a male, 57 years old at diagnosis (Figure 5B). At baseline ( $T_0$ ), the patient presented a highly metastatic disease associated with elevated TLG (5129 g), CGA ( $6.10^3$  ng/mL) and succinate (37  $\mu$ M) levels while being under treatment (alkylating agent + anti-rank). After 6 months, the disease progressed associated with an increase of TLG, CGA and succinate values. After treatment disruption ( $T_2$ ), TLG, CGA and succinate concentrations still went up but started to decrease after epigenetic treatment initiation ( $T_3$ ). To note that clinical evaluations at  $T_2$  and  $T_3$  reported a stable disease while TLG and succinate levels increased then decreased after epigenetic treatment.

The third case report is a female, 56 years old at diagnosis, with a non-secretory tumor. At baseline ( $T_0$ ), the patient presented a low metastatic extension with very low TLG (19 g), serum succinate (14  $\mu$ M) and negative CGA (28 ng/mL) levels. The first two evaluations in absence of treatment ( $T_1$  &  $T_2$ ) showed stable values of TLG, little decrease of succinate levels, associated with a progressive disease based on new tumoral lesions. After radiotherapy ( $T_3$ ), a partial response has been obtained, and was correlated with a decrease of TLG and succinate. Interestingly the succinate concentration at this time point (6  $\mu$ M) was below the cut-off value defined in the *SDHB* tumor-free asymptomatic carriers (7  $\mu$ M) (Figure 1) and would be thus in favor of a clinical response. The final evaluation of the patient ( $T_4$ ) is a metabolic complete response, associated with a null TLG value, a stable concentration of succinate. In this case report, CGA levels were all in the normal range (<100 ng/mL) and thus non relevant while succinate levels were informative.

## Discussion

This is the first large-scale study evaluating the role of serum succinate levels as a biomarker of *SDHB* mutated cancers, in one of the largest cohort gathering pheochromocytoma and paraganglioma (PPGL) patients, and tumor-free asymptomatic *SDHx*-related carriers (105 patients; 280 serum samples).

We have confirmed that succinate levels are significantly increased among *SDHB* carriers, both PPGL patients and tumor-free family members, but also correlate with metastatic tumor extent in *SDHB* patients. Our results support the clinical use of serum succinate levels as an onco-biomarker, from diagnosis to follow-up, in addition to the current standard of care.

Currently, *SDHx* molecular diagnosis relies on tumoral tissue immunohistochemistry (IHC) and/or whole blood genotyping<sup>15</sup>. If IHC is a robust technique, there are disagreements in the interpretation of several cases and obviously it requires tumoral tissue, thus it's not appropriated to tumor-free family members. Genotyping, that presents the advantage to identify the mutated *SDHx* subunit, is quite expensive and so far delayed are too long especially in metastatic PPGL patients. Complementary approaches to address the *SDHx* molecular status have been proposed, in particular in line with the elevated levels of succinate induced by the *SDHx* loss-of-function mutations<sup>28–30</sup>. In 2020, Lussey-Lepoutre *et al.* have used *in vivo* <sup>1</sup>H-MR spectroscopy to evaluate succinic acid levels in PPGL patients during MRI. Results are of great interest, showing that a pic of succinate could be identified to distinguish SPO from *SDHx*-related PPGL, and promoting the role of succinic acid as a relevant onco-biomarker. However, this interesting technic is not quantitative, is costly, prolonged (25 minutes per exam) and requires tumoral tissue. Quantification of circulating surrogate biomarkers is of major interest to monitor cancer patients as they are non-invasive, quantitative and easy to perform. In this study we have used a fully validated LC-MS/MS method that allows sensitive, specific, fast and cheap absolute quantification of serum succinate levels. Nowadays, this technology is pretty common in hospital laboratories and development of such methods is quite simple, thus enabling the large-scale use of this test in clinical practice.

Using this technology in a healthy population, we have shown that serum succinate levels could be useful to identify tumor-free asymptomatic *SDHB*-related carriers (cut-off value at 7  $\mu$ M; 77% sensitivity; 100% specificity). Moreover, our results suggest that monitoring serum succinate levels in this asymptomatic population would be of interest to detect the development of a PPGL (cut-off value  $\geq$  11  $\mu$ M; 67% sensitivity; 85% specificity). Currently the screening and follow-up of tumor-free *SDHx*-related carriers is based on measurement of blood pressure, symptoms evaluation, MRI or <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT (only for adults), genotyping and metanephrines quantification. Adding serum succinate quantification could improve this clinical management through succinate guided imaging monitoring in patients. This may also permit to reduce irradiating imagery of tumor-free asymptomatic carriers when succinate level is low. Further studies have to be set to confirm the place of succinate, to validate cut-off values and its role in the algorithm detection. In particular a follow-up in the pediatric population should be perform, as their monitoring will be on the long-term and has to be safe and sensitive<sup>24,25</sup>.

Among PPGL patients, we have shown that serum succinate levels may help to determine *SDHB* mutational status, as a rapid preliminary test prior to IHC and/or genotyping, in line with 2-HGA in *IDH* mutated AML<sup>26,27</sup>. Nevertheless succinate levels are more informative in the metastatic population ( $>12$   $\mu$ M; 75% sensitivity, 77% specificity) and our results suggest that serum succinate levels could be useful as a biomarker to characterize disease extension and to monitor patients in addition to current clinical practice guidelines<sup>31,32</sup>. Indeed, we showed a correlation between disease extension, evaluated using the quantitative TLG values from <sup>18</sup>F-FDG PET/CT imaging, and succinate levels. Moreover, our results suggest that succinate levels could reflect the tumor burden in *SDHB* PPGL patients ( $>15$   $\mu$ M; 100% sensitivity, 87% specificity). Interestingly, in line with this result, a preclinical study has shown that succinate stimulates the <sup>18</sup>F-FDG uptake in endothelial and tumor *SDHx* deficient cells<sup>33</sup>.



Among *SDHB*-related PPGL patients, we have illustrated through three case reports that serum succinate levels could be of major interest to monitor treatment response. Our results underline the potential role of serum succinate levels to be a sensitive and early biomarker to anticipate treatment response that could participate to improve clinical management of *SDHB* PPGL patients. Currently circulating biomarkers in PPGL are CGA and metanephrines when PPGL is secreting, with a limited usefulness for follow-up<sup>34</sup>. Adding a new quantitative biomarker, more sensitive, should improve patients' follow-up.

To conclude, the quantification of serum succinate levels is a simple, non-invasive, low cost and routinely adapted method. In addition to current standard of care, serum succinate levels could be a useful oncobiomarker both among *SDHB* PPGL patients and their asymptomatic family members. Our study supports the potential role of succinate monitoring to improve the diagnosis and the follow-up of *SDHB*-related carriers. Further large-scale studies should be performed to validate our results and confirm our proposed cut-off values, in particular in the healthy pediatric *SDHx* carriers and in PPGL patients involved in prospective clinical studies. Evaluation of succinate levels in *SDHA*, *SDHC* and *SDHD* carriers would also be of interest, as our preliminary results with limited patients, only showed trends and require larger cohorts. Finally, the prognostic value of succinate levels would be of interest and should be addressed.

### **Acknowledgements**

We thank the patients and their families for their participation. We also wish to acknowledge the contributions of other colleagues who participated in quantifying succinate levels (L. Mercier and C. Mansard), in the data collection (Dr L. Blondel) and in the serum samples collection (Service of Biochemistry, Gustave Roussy).

### **Funding**

This project has been funded by the GTE (Groupe des Tumeurs Endocrine).

### **Disclosure**

The authors have declared no conflicts of interest.

## References

1. Buffet A, Burnichon N, Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P. An overview of 20 years of genetic studies in pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020; 34(2):101416.
2. Favier J, Amar L, Gimenez-Roqueplo A-P. Paraganglioma and phaeochromocytoma: from genetics to personalized medicine. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015; 11(2):101–111.
3. Castro-Vega LJ, Lepoutre-Lussey C, Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J. Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective. *Oncogene* 2016; 35(9):1080–1089.
4. Andrews KA, Ascher DB, Pires DEV et al. Tumour risks and genotype–phenotype correlations associated with germline variants in succinate dehydrogenase subunit genes *SDHB*, *SDHC* and *SDHD*. *J. Med. Genet.* 2018; 55(6):384–394.
5. Turkova H, Prodanov T, Maly M et al. CHARACTERISTICS AND OUTCOMES OF METASTATIC SDHB AND SPORADIC PHEOCHROMOCYTOMA/PARAGANGLIOMA: AN NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH STUDY. *Endocr. Pract.* 2016; 22(3):302–314.
6. Crona J, Lamarca A, Ghosal S et al. Genotype–phenotype correlations in pheochromocytoma and paraganglioma: a systematic review and individual patient meta-analysis. *Endocr. Relat. Cancer* 2019; 26(5):539–550.
7. Hescot S, Curras-Freixes M, Deutschbein T et al. Prognosis of Malignant Pheochromocytoma and Paraganglioma (MAPP-Prono Study): A European Network for the Study of Adrenal Tumors Retrospective Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; 104(6):2367–2374.
8. Lenders JWM, Kerstens MN, Amar L et al. Genetics, diagnosis, management and future directions of research of phaeochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on endocrine hypertension of the European society of hypertension. *J. Hypertens.* 2020. doi:10.1097/HJH.0000000000002438.
9. Ilanchezhian M, Jha A, Pacak K, Del Rivero J. Emerging Treatments for Advanced/Metastatic Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2020; 21(11):85.
10. Heesterman BL, Bayley JP, Tops CM et al. High prevalence of occult paragangliomas in asymptomatic carriers of SDHD and SDHB gene mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21(4):469–470.
11. Saie C, Buffet A, Abeillon J et al. Screening of a large cohort of asymptomatic *SDHx* mutation carriers in routine practice. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020:dgaa888.
12. Amar L, Fassnacht M, Gimenez-Roqueplo A-P et al. Long-term Postoperative Follow-up in Patients with Apparently Benign Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Horm. Metab. Res.* 2012; 44(05):385–389.
13. Martins RG, Gonçalves LG, Cunha N, Bugalho MJ. Metabolomic Urine Profile: Searching for New Biomarkers of SDHx-Associated Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; 104(11):5467–5477.
14. Dwight T, Kim E, Novos T, Clifton-Bligh RJ. Metabolomics in the Diagnosis of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Horm. Metab. Res.* 2019; 51(07):443–450.
15. Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G et al. Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(6):1915–1942.
16. Antonio K, Valdez MMN, Mercado-Asis L et al. Pheochromocytoma/paraganglioma: recent updates in genetics, biochemistry, immunohistochemistry, metabolomics, imaging and therapeutic options. *Gland Surg.* 2020; 9(1):105–123.
17. Wallace PW, Conrad C, Brückmann S et al. Metabolomics, machine learning and immunohistochemistry to predict succinate dehydrogenase mutational status in phaeochromocytomas and paragangliomas. *J. Pathol.* 2020:path.5472.
18. Oudijk L, Gaal J, de Krijger RR. The Role of Immunohistochemistry and Molecular Analysis of Succinate Dehydrogenase in the Diagnosis of Endocrine and Non-Endocrine Tumors and Related Syndromes. *Endocr. Pathol.* 2019; 30(1):64–73.
19. Santi R, Rapizzi E, Canu L et al. Potential Pitfalls of SDH Immunohistochemical Detection in Paragangliomas and Phaeochromocytomas Harboring Germline SDHx Gene Mutation. *Anticancer Res.* 2017; 37(2):805–812.
20. Udager AM, Magers MJ, Goerke DM et al. The utility of SDHB and FH immunohistochemistry in patients evaluated for hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndromes. *Hum. Pathol.* 2018; 71:47–54.
21. Currás-Freixes M, Piñero-Yañez E, Montero-Conde C et al. PheoSeq. *J. Mol. Diagn.* 2017; 19(4):575–588.
22. Ben Aim L, Pigny P, Castro-Vega LJ et al. Targeted next-generation sequencing detects rare genetic events in pheochromocytoma and paraganglioma. *J. Med. Genet.* 2019; 56(8):513–520.
23. Martins RG, Carvalho IP. Pheochromocytoma and paraganglioma genetic testing: Psychological impact. *Health Psychol.* 2020; 39(10):934–943.
24. Tufton N, Sahdev A, Akker SA. Radiological Surveillance Screening in Asymptomatic Succinate Dehydrogenase Mutation Carriers. *J. Endocr. Soc.* 2017; 1(7):897–907.
25. Lepoutre-Lussey C, Caramella C, Bidault F et al. Screening in asymptomatic SDHx mutation carriers: added value of 18F-FDG PET/CT at initial diagnosis and 1-year follow-up. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2015; 42(6):868–876.
26. Janin M, Mylonas E, Saada V et al. Serum 2-Hydroxyglutarate Production in *IDH1* - and *IDH2* -Mutated De Novo Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32(4):297–305.
27. Willekens C, Renneville A, Broutin S et al. Mutational profiling of isolated myeloid sarcomas and utility of serum 2HG as biomarker of IDH1/2 mutations. *Leukemia* 2018; 32(9):2008–2081.
28. Richter S, Peitzsch M, Rapizzi E et al. Krebs Cycle Metabolite Profiling for Identification and Stratification of Pheochromocytomas/Paragangliomas due to Succinate Dehydrogenase Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(10):3903–3911.
29. Lendvai N, Pawlosky R, Bullova P 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.
30. Lussey-Lepoutre C, Bellucci A, Burnichon N et al. Succinate detection using in vivo 1H-MR spectroscopy identifies germline and somatic SDHx mutations in paragangliomas. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2020; 47(6):1510–

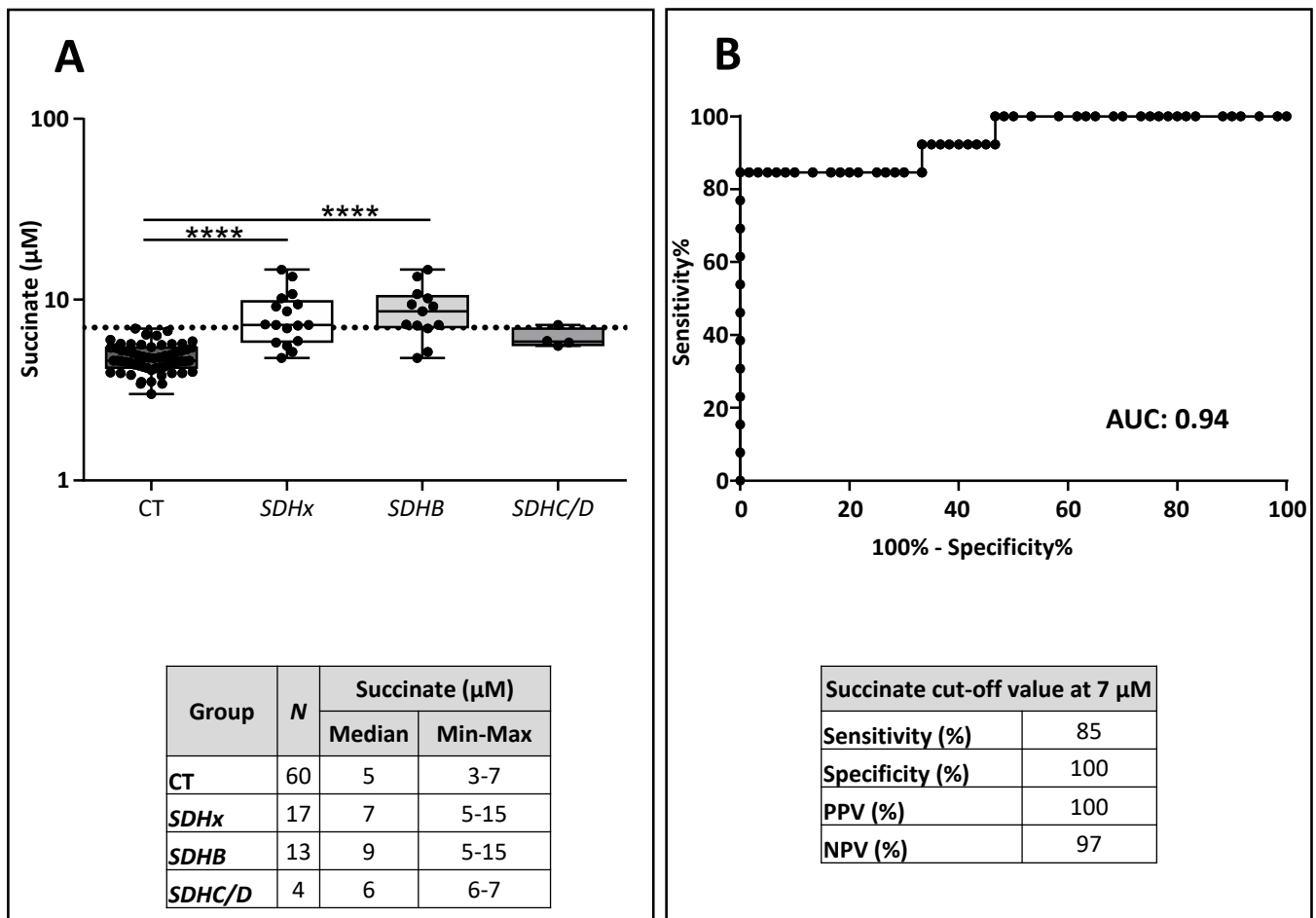
1517.

31. Fassnacht M, Assie G, Baudin E et al. Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2020; 31(11):1476–1490.
32. Plouin PF, Amar L, Dekkers OM et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a pheochromocytoma or a paraganglioma. *Eur. J. Endocrinol.* 2016; 174(5):G1–G10.
33. Garrigue P, Bodin-Hullin A, Balasse L et al. The Evolving Role of Succinate in Tumor Metabolism: An <sup>18</sup>F-FDG–Based Study. *J. Nucl. Med.* 2017; 58(11):1749–1755.
34. Baudin E, Bidart JM, Bachelot A et al. Impact of chromogranin A measurement in the work-up of neuroendocrine tumors. *Ann. Oncol.* 2001; 12:S79–S82.

**Table 1. Population characteristics**

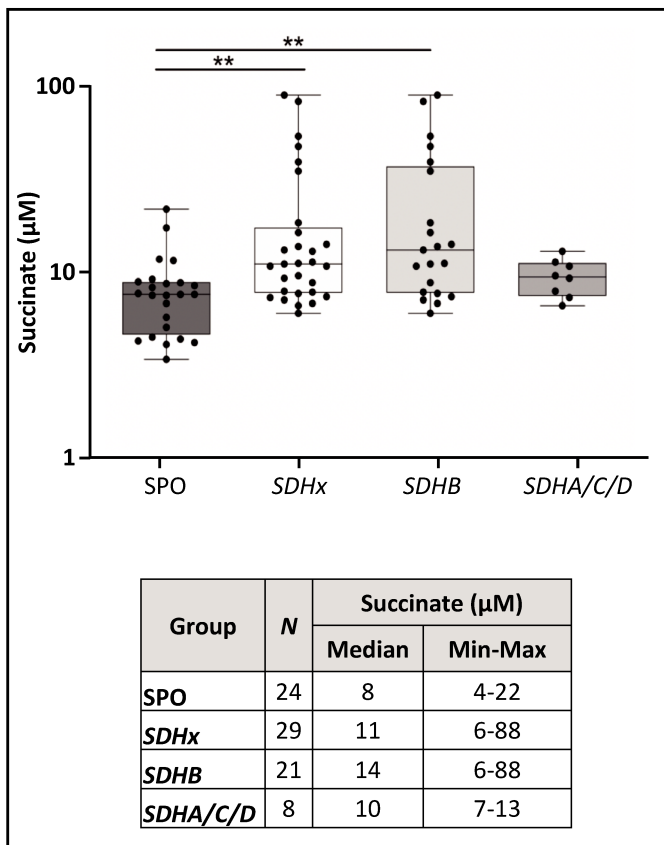
<b>Population</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Total	105	
<b>Age (y)</b>		
Median (range)	52 (13-76)	
<b>Sex</b>		
Male	57	(54)
Female	48	(46)
<b>Pathology &amp; genetic status</b>		
<b>Tumor free asymptomatic carrier</b>	<b>17</b>	<b>(16)</b>
<i>SDHB</i>	13	(76)
<i>SDHC</i>	2	(12)
<i>SDHD</i>	2	(12)
<b>Paraganglioma</b>	<b>58</b>	<b>(55)</b>
<i>SPO</i>	18	(31)
<i>SDHA</i>	3	(5)
<i>SDHB</i>	30	(52)
<i>SDHC</i>	1	(2)
<i>SDHD</i>	6	(10)
<b>Pheochromocytoma</b>	<b>30</b>	<b>(29)</b>
<i>SPO</i>	25	(83)
<i>SDHB</i>	5	(17)
<b>Primary site</b>		
Abdominal extra-adrenal	30	(34)
Cervical	28	(32)
Adrenal	30	(34)
<b>*Hormonal secretion</b>		
Yes	41	(47)
No	47	(53)
<b>Disease extension at succinate evaluation</b>		
Tumor-free asymptomatic carriers	17	(16)
Tumor-free after surgery	22	(21)
Localized disease	10	(10)
Metastatic disease	56	(53)

**\*Positive hormonal secretion:** Greater than at least 2 times the normal range



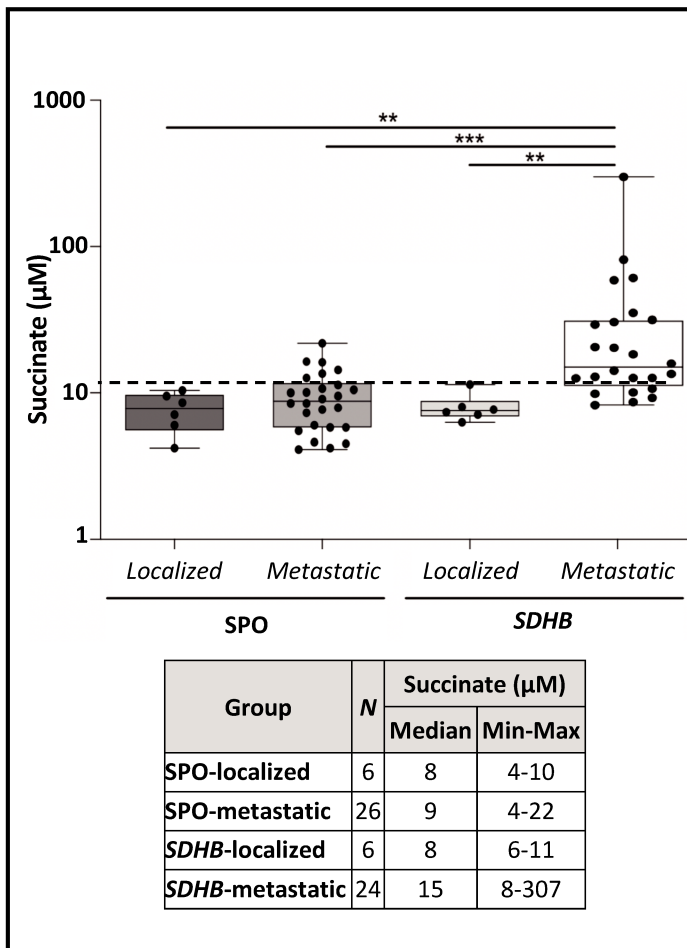
**Figure 1. Serum succinate levels in tumor-free population according to *SDHx* mutational status.**

(A) Comparison of serum succinate concentrations between a control group (CT) corresponding to people without disease and *SDHx* wild-type, and asymptomatic *SDHx* mutated carriers. *SDHx*: *SDHB/C/D*. N, number of individuals. If several samples available per patient, the mean of succinate concentrations has been calculated first. Cut-off value at 7  $\mu\text{M}$  has been represented (dotted line). Median values are represented with min-to-max standard deviations; Kruskal-Wallis tests; \*\*\*\* $P < 0.0001$ . (B) ROC curve comparing serum succinate levels in CT vs *SDHB* mutated asymptomatic population. Wilson/Brown test,  $P < 0.0001$ . PPV : Positive Predictive Value; NPV : Negative Predictive Value. AUC: Area Under the Curve.



**Figure 2. Succinate serum levels in PPGL patients at diagnosis according to *SDHx* mutational status.**

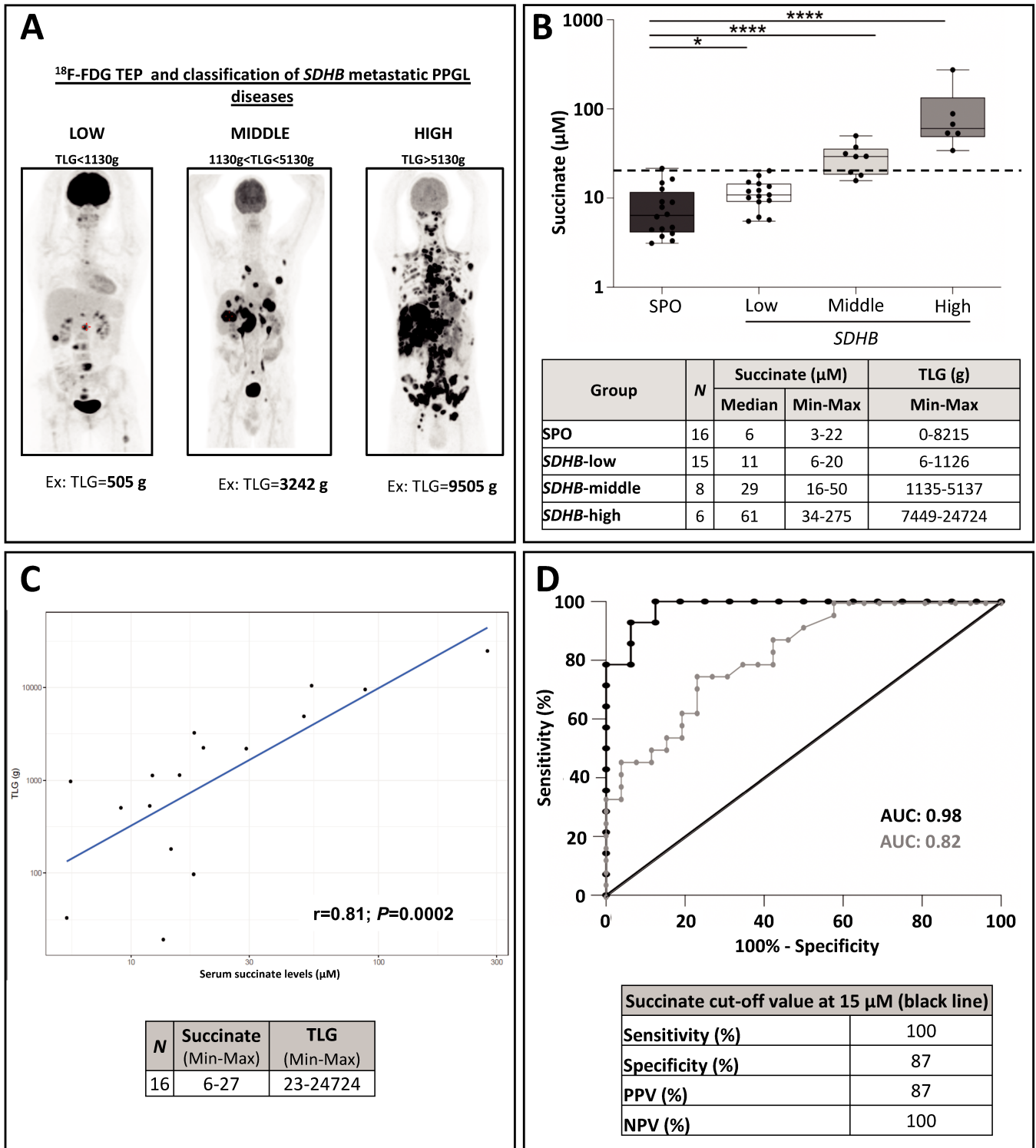
Comparison of serum succinate concentrations between sporadic (SPO) and *SDHx* mutated PPGL patients. *SDHx*: *SDHA/B/C/D*. *N*, number of patients. If several samples available per patient, the serum sample closest to the diagnosis has been selected. Median values are represented with min-to-max standard deviations; Kruskal-Wallis tests;  $^{**}P < 0.01$ .



**Figure 3. Succinate serum levels in PPGL patients according to disease extension.**

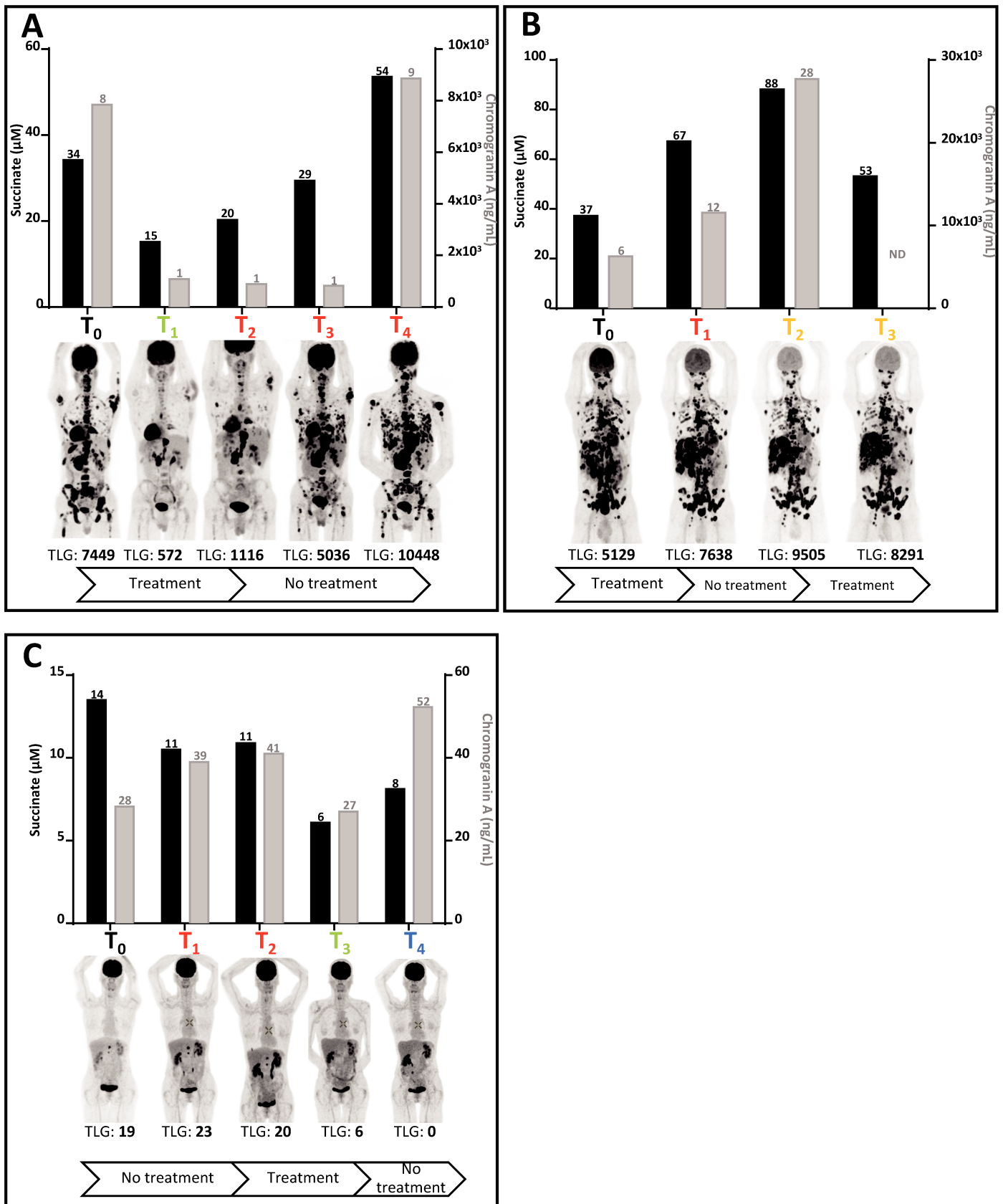
Comparison of serum succinate concentrations between sporadic (SPO) and *SDHB* PPGL patients, regarding disease extension (localized or metastatic disease). *N*, number of patients. If several samples available per patient, the mean of succinate concentrations has been calculated first. A cut-off value at 12 µM has been represented (dotted line). Median values are represented with min-to-max standard deviations; Kruskal-Wallis tests; \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001





**Figure 4. Succinate serum levels in metastatic PPGL patients : evaluation of Total Lesion Glycolysis (TLG) quantification**

(A) Examples of <sup>18</sup>F-FDG PET imagings, classified in Low, Middle and High TLG groups. (B) Comparison of serum succinate concentrations between sporadic (SPO) and *SDHB* PPGL patients, classified according to their Total Lesion Glycolysis (TLG) values. *SDHB* low group : first and second quartiles (TLG < 1130 g); *SDHB* middle : third quartile (1130 g < TLG < 5140 g); *SDHB* high group: fourth quartile (TLG > 5140 g). A cut-off value at 15 µM is represented (dotted line). Median values are represented with min-to-max standard deviations; Mann-Whitney test, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . (C) Correlation of succinate with TLG in *SDHB* metastatic PPGL patients. Spearman correlation test.  $r = 0.81$ ,  $P = 0.0002$  (D) ROC curves comparing either SPO metastatic vs *SDHB* metastatic PPGL (grey curve) or SPO PPGL vs [Middle&High] *SDHB*-related PPGL (black curve). Wilson/Brown test.  $P < 0.0001$ . PPV : Positive Predictive Value; NPV : Negative Predictive Value AUC: Area Under the Curve.



**Figure 5. Succinate serum levels evolution under treatment: 3 case reports.**

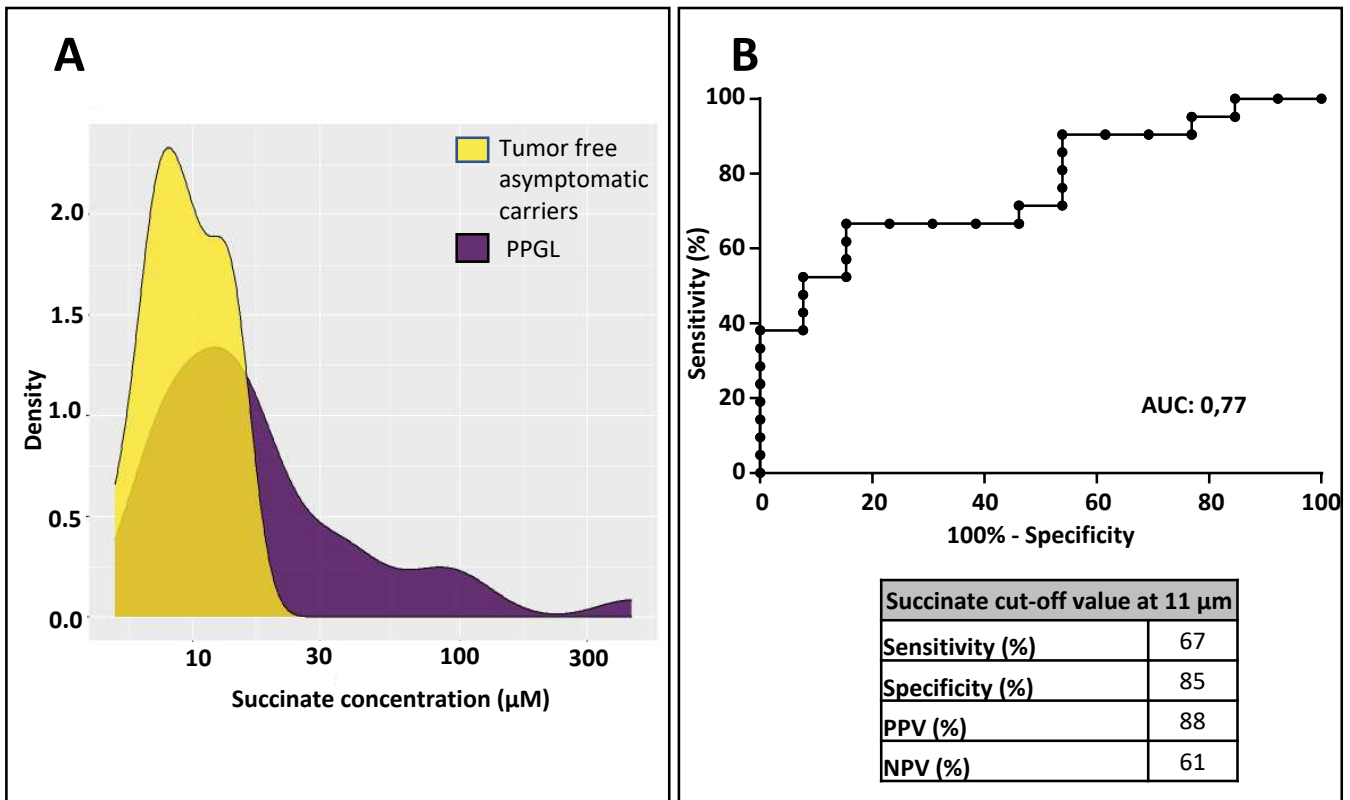
Succinate serum levels (black) are compared to serum chromogranin A concentrations (grey), <sup>18</sup>F- FDG PET imagings and corresponding TLG (Tumor Lesion Glycolysis; cm<sup>3</sup>) quantifications at different time points. Patients have a metastatic paraganglioma or pheochromocytoma with a *SDHB* mutation. T: Time (Red: Progressive disease, orange: stable disease, green: partial response, blue: complete response); ND: Not Determined. Treatments: chemotherapy or radiotherapy.

**Supplementary Table S1. Samples characteristics**

<b>Samples</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Total	280	
Mean of samples number per patient	2,5	
<b>Pathology &amp; genetic status</b>		
<b>Tumor-free asymptomatic carrier</b>	20	(7)
<i>SDHB</i>	16	(80)
<i>SDHC</i>	2	(10)
<i>SDHD</i>	2	(10)
<b>PPGL</b>	260	(93)
SPO	134	(52)
<i>SDHA</i>	3	(1)
<i>SDHB</i>	106	(41)
<i>SDHC</i>	3	(1)
<i>SDHD</i>	14	(5)
<b>Chromogranin A</b>		
Quantification	244	(87)
No determined	36	(13)
<b>Metanephrines</b>		
Quantification	98	(35)
No determined	182	(65)
<b>Complete remission</b>		
SPO	24	(77)
<i>SDHA</i>	1	(3)
<i>SDHB</i>	6	(20)
<b>*At diagnosis</b>		
SPO	77	(59)
<i>SDHA</i>	3	(2)
<i>SDHB</i>	41	(31)
<i>SDHC</i>	1	(1)
<i>SDHD</i>	9	(7)
<b>Under treatment</b>		
<b>SPO</b>	<b>57</b>	<b>(44)</b>
**Surgery	1	
Radiotherapy	7	
Chemotherapy	88	
Sunitinib	21	
<b><i>SDHB</i></b>	<b>65</b>	<b>(50)</b>
Surgery	2	
Radiotherapy	22	
Chemotherapy	92	
Sunitinib	13	
<b><i>SDHC</i></b>	<b>2</b>	<b>(2)</b>
Chemotherapy	4	
<b><i>SDHD</i></b>	<b>5</b>	<b>(4)</b>
Chemotherapy	9	
Sunitinib	1	

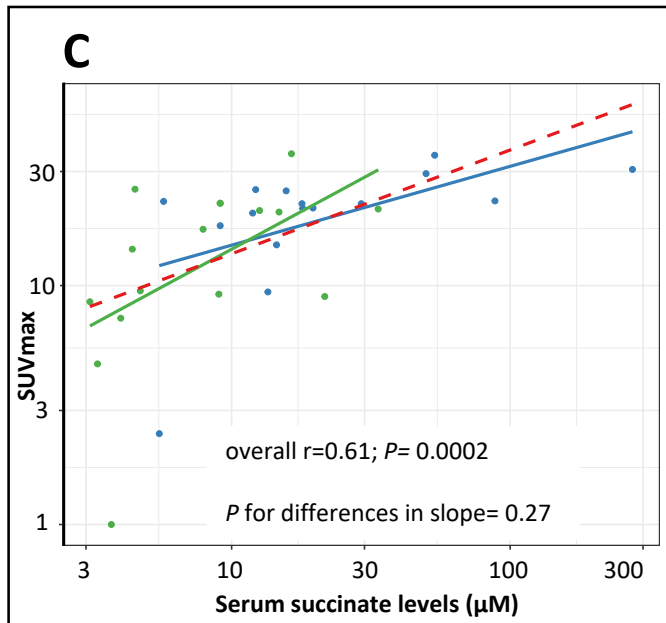
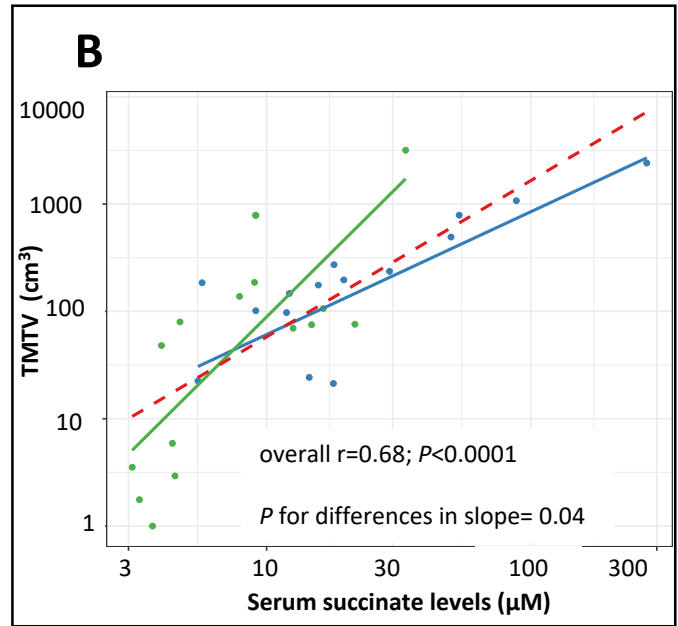
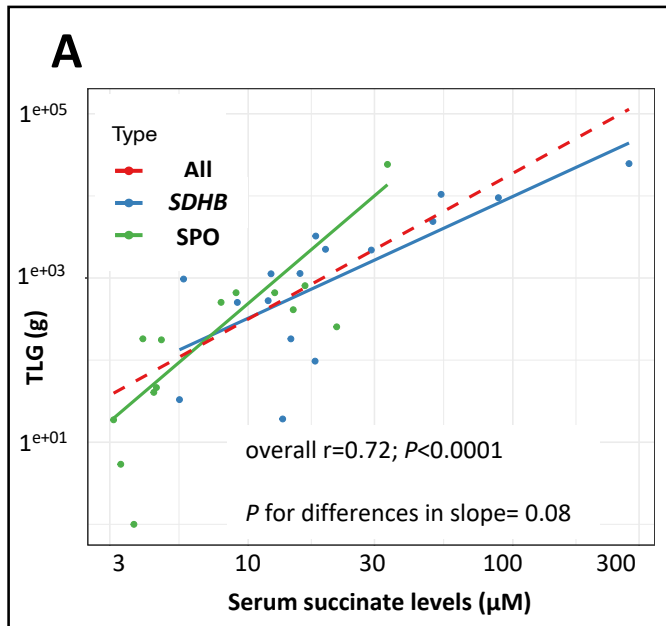
**\*Considered at diagnosis:** Initial diagnosis or relapse after a complete remission or minimum 3 months after the end of the treatment (surgery, radiotherapy or chemotherapy)

**\*\*Surgery:** Sample within 3 months after surgery



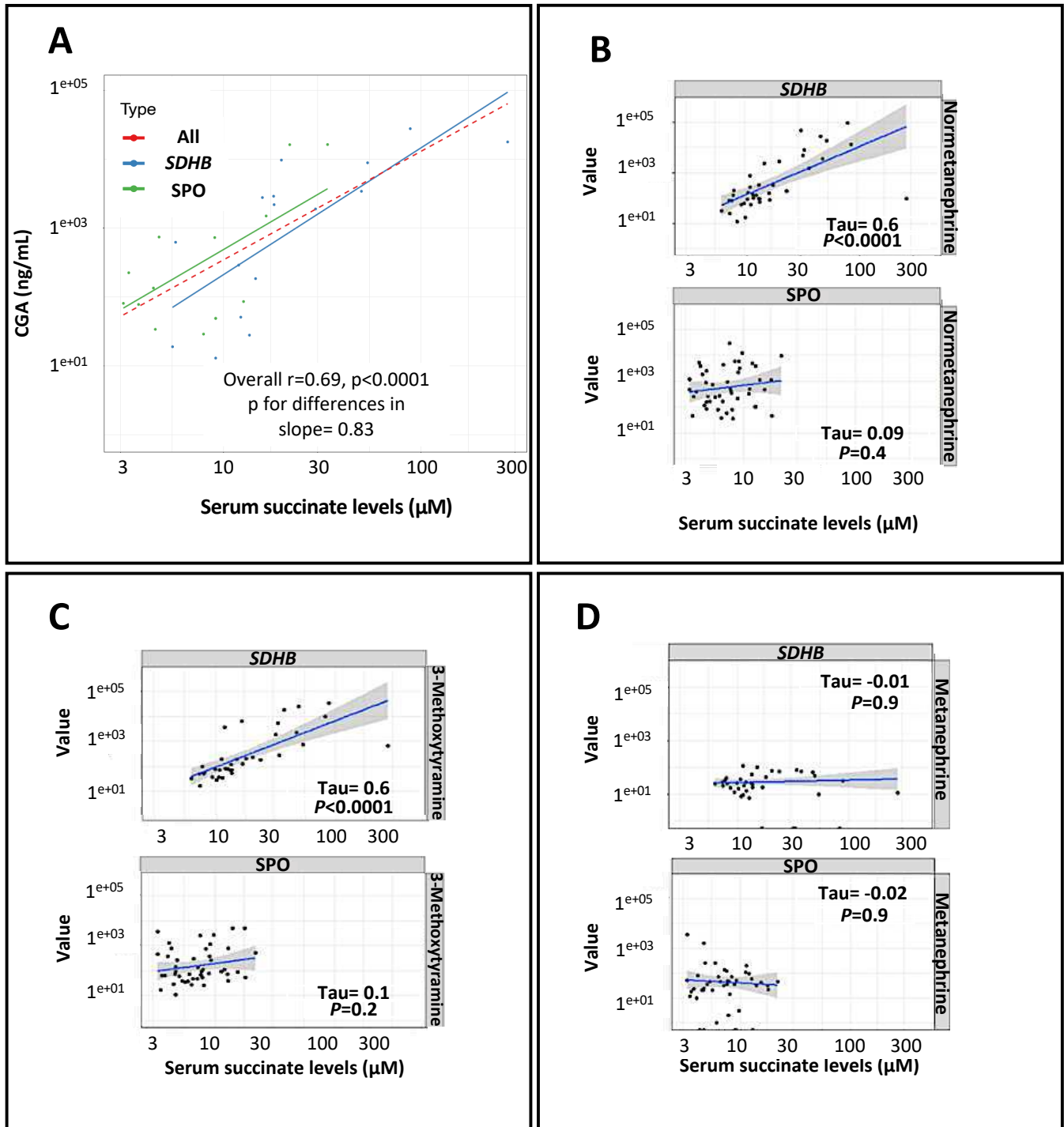
**Supplementary Figure S1. Succinate serum levels in *SDHB* tumor-free asymptomatic carriers vs *SDHB* PPGL patients.**

(A) Distribution of succinate serum levels *SDHB* mutated patients between asymptomatic group and PPGL group. (B) ROC curve comparing *SDHB* tumor-free asymptomatic carriers vs *SDHB* PPGL patients. Wilson/Brown test,  $P = 0.001$ . PPV : Positive Predictive Value; NPV : Negative Predictive Value. AUC : Area Under the Curve.



**Supplementary Figure S2. Correlation of succinate serum levels with TLG, TMTV and SUVmax levels in metastatic PPGL patients (SPO vs SDHB mutated)**

(A) Spearman correlation of succinate concentrations with Tumor Lesion Glycolysis (TLG) in metastatic PPGL patients. Variables are in logarithmic scale and the slope difference is a linear model on log-transformed variables. (B) Spearman correlation of succinate concentrations with Total Metabolic Tumor Volume (TMTV) in metastatic PPGL patients. Variables are in logarithmic scale and the slope difference is a linear model on log-transformed variables. (C) Spearman correlation of succinate concentrations with Standardized Uptake Value (SUVmax) in metastatic PPGL patients. Variables are in logarithmic scale and the slope difference is a linear model on log-transformed variables.



**Supplementary Figure S3. Correlation of succinate serum levels with chromogranin A and catecholamines metabolites in PPGL patients (SPO vs SDHB mutated)**

(A) Spearman correlation of succinate concentrations with chromogranin A in metastatic PPGL patients. Variables are in logarithmic scale and the slope difference is a linear model on log-transformed variables. (B) Kendall correlation of succinate concentrations with normetanephrines levels in PPGL patients. Variables are in logarithmic scale and the slope difference is a linear model on log-transformed variables. Tau: Tau of Kendall. (C) Kendall correlation of succinate concentrations with 3-methoxytyramine levels in PPGL patients. Variables are in logarithmic scale and the slope difference is a linear model on log-transformed variables. Tau: Tau of Kendall. (D) Kendall correlation of succinate concentrations with metanephrine levels in PPGL patients. Variables are in logarithmic scale and the slope difference is a linear model on log-transformed variables. Tau: Tau of Kendall .

### 3.3.3.2. *Discussion de l'article et conclusions*

Dans ce travail, nous avons évalué l'intérêt du succinate sérique comme potentiel biomarqueur dans l'une des plus grandes cohortes de patients atteints d'un PPGL *SDH* muté et de leurs apparentés sains (105 patients et 280 échantillons sériques).

Parmi les porteurs sains, nous avons montré une augmentation significative des taux de succinate sérique et plus particulièrement chez les porteurs de mutations *SDHB* en comparaison à un groupe contrôle de patients en rémission complète d'un cancer de la thyroïde. Une valeur seuil de 7  $\mu$ M permettrait de diagnostiquer les porteurs de mutations *SDHB* parmi une population saine avec une sensibilité et une spécificité respective, de 85% et de 100%.

La même observation a été faite chez des patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté en comparaison à des patients atteints d'un PPGL sporadique (*SDH-WT*). Cependant, du fait d'une grande dispersion de nos données, il n'a pas été possible de proposer une valeur seuil avec une sensibilité et une spécificité suffisante. D'autre part, nous pouvons noter une légère augmentation des taux de succinate chez les patients atteints d'un PPGL sporadique en comparaison au groupe contrôle non malade et non muté. Bien que non significative, cette hausse interroge. Une hypothèse que nous proposons est le rôle de l'inflammation présente chez les patients atteints de cancers qui pourrait modifier les taux circulants de succinate. En effet, nous avons montré que dans notre cohorte, les patients atteints d'un PPGL sporadique avec des taux de succinate élevés avaient des taux également élevés de protéine C réactive (CRP), marqueur de l'inflammation couramment utilisé en clinique (datas non présentées dans ce manuscrit).

Une légère augmentation des taux sériques de succinate a également été observée dans notre étude chez les sujets porteurs d'une mutation *SDHA*, *SDHC* ou *SDHD* (malades et sujets sains). Cependant, celle-ci n'est pas significative, très certainement en lien avec un nombre de cas trop faible, et mériterait l'inclusion d'un plus grand nombre de ces patients.

Parmi les patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté, nous avons montré que les taux de succinate sérique étaient corrélés à l'extension de la maladie. Par ailleurs, une valeur seuil de 12  $\mu$ M permettrait d'identifier dans une population de patients atteints d'un PPGL, ceux qui sont métastatiques et *SDHB* muté avec une sensibilité et une spécificité respectivement, de 75% et 77%. L'impact de l'extension de la maladie a été plus spécifiquement caractérisé via l'activité métabolique des PPGL (TEP  $^{18}$ F-FDG). Ainsi, parmi les patients atteints d'un PPGL métastatique *SDHB* muté, une corrélation forte a été mise en évidence entre

les taux sériques de succinate et 3 paramètres de mesure utilisés en TEP  $^{18}\text{F}$ -FDG : le TLG<sup>1</sup>, le TMTV<sup>2</sup> et le SUVmax<sup>3</sup>. Plus particulièrement, le classement des valeurs de TLG en 3 groupes : faiblement, moyennement et fortement métastatique a permis de montrer une augmentation significative des taux de succinate sérique dans les groupes de patients dont la maladie est la plus avancée. Cela suggère que le succinate pourrait être un biomarqueur de l'extension de la maladie en complément de l'imagerie fonctionnelle notamment la TEP  $^{18}\text{F}$ -FDG. De ce fait, une quantification régulière du succinate sérique chez ces patients permettrait, en complément de l'imagerie et des autres bilans clinicobiologiques, de suivre l'évolution de la maladie. Une valeur seuil de 15  $\mu\text{M}$  permettrait notamment d'identifier les patients atteints d'une maladie moyennement et fortement métastatique *SDHB* muté parmi tous les patients atteints d'un PPGL métastatique *SDHB* muté avec une sensibilité et une spécificité respective, de 100% et de 87%. Enfin, à travers l'illustration de 3 cas cliniques, nous avons montré le potentiel du succinate comme biomarqueur précoce de la réponse aux traitements, qui reste à confirmer.

En conclusion, ce travail a permis de montrer que le succinate sérique est un potentiel biomarqueur :

- diagnostique des mutations *SDHB* chez des patients atteints d'un PPGL et leurs apparentés sains. En outre, il serait un outil complémentaire à l'IHC et au génotypage ;
- de suivi de la maladie en permettant l'évaluation de l'extension de cette dernière en complément de l'imagerie ;
- de réponse aux traitements permettant aux cliniciens d'adapter la prise en charge des patients si nécessaire.

En perspective, les résultats obtenus devront être confirmés dans une cohorte indépendante de patients atteints d'un PPGL avant une intégration du dosage du succinate dans la pratique clinique en tant que biomarqueur validé et éventuellement remboursé par la collectivité.

---

<sup>1</sup> *Tumor lesion glycolysis*

<sup>2</sup> *Total metabolic tumor volume*

<sup>3</sup> *Standardized uptake value*

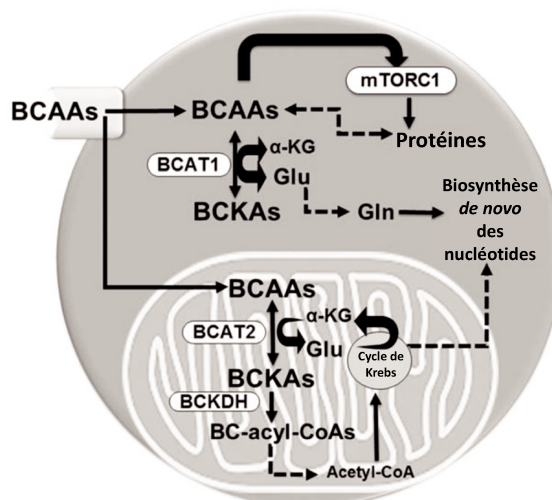


### 3.4. ÉTUDE DE MÉTABOLOMIQUE ET DÉCOUVERTE DE NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES

#### 3.4.1. Introduction

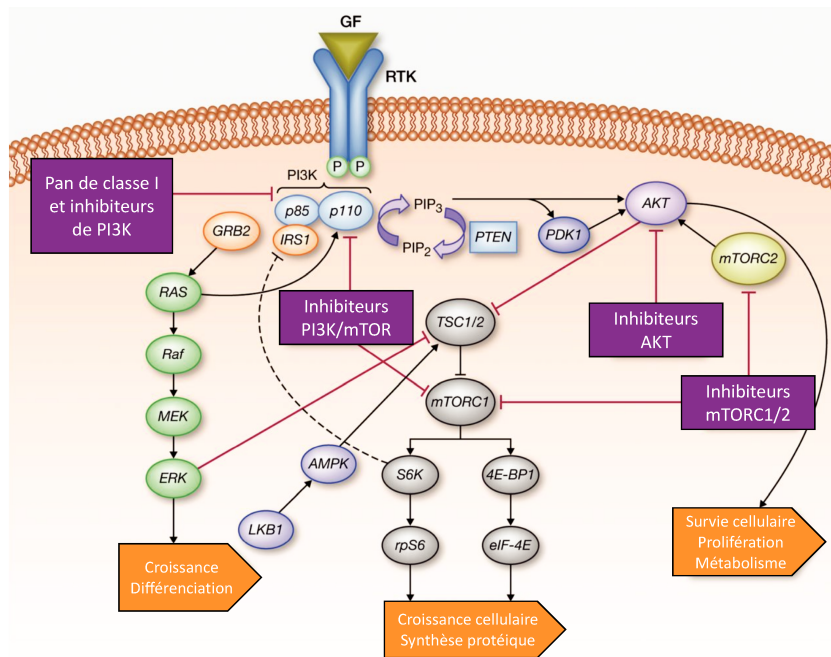
Les études de métabolomique permettent l'analyse simultanée de l'expression de nombreux métabolites. La comparaison des profils obtenus dans différentes conditions est utilisée pour identifier des métabolites et des voies métaboliques dérégulés. Ces études génèrent un grand nombre de données, souvent semi-quantitatives, dont l'analyse reste complexe. Dans ce travail de thèse, un focus a été réalisé sur les métabolites du cycle Krebs et des voies métaboliques associées. En particulier, nous nous sommes intéressés à la biosynthèse des acides aminés, une voie métabolique essentielle dans la survie des cellules cancéreuses.

L'isoleucine, la leucine et la valine sont des **acides aminés branchés** (BCAA) qui peuvent être utilisés pour la synthèse des protéines ou alors oxydés pour produire de l'énergie par les cellules tumorales [308]. Récemment, il a été montré que les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de ces BCAAs sont dérégulées dans un certain nombre de cancers (glioblastome, cancers du rein, cancers du sein...). Il s'agit des **aminotransférases branchées de type 1** (BCAT1) et de **type 2** (BCAT2) qui sont respectivement cytosolique et mitochondriale et qui font partie de la famille des dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -kétoglutarate [308]. Les enzymes BCAT1 et BCAT2 convertissent de manière réversible les BCAAs en **acides  $\alpha$ -kétoglutarate branchés** (BCKAs) en produisant du glutamate à partir d' $\alpha$ -kétoglutarate (**Figure 27**). Plus particulièrement, les enzymes BCAT vont transformer la leucine, l'isoleucine et la valine (BCAAs) en respectivement  $\alpha$ -kétoisocaproate ( $\alpha$ KIC),  $\alpha$ -kétob- $\beta$ -méthylvalérate ( $\alpha$ KMV) et  $\alpha$ -kétisovalérate ( $\alpha$ KIV) (BCKAs).



**Figure 28** : Activité de BCAT et implication des BCAAs et BCKAs dans le métabolisme du cancer (D'après Ananieva et Wilkinson, 2018).

Parmi les deux isoformes de BCAT, il semblerait que **BCAT1** soit principalement impliquée dans la croissance tumorale et serait un potentiel marqueur pronostique dans le cancer [309, 310]. En effet, il a été montré que l'expression de BCAT1 était inhibée dans les glioblastomes *IDH1* muté en lien avec une hyperméthylation de son promoteur et plus généralement augmentée dans d'autres types de cancers [311–313]. Dans les cancers, les BCAAs et BCKAs produits par l'activité dérégulée de BCAT, peuvent activer d'autres voies de signalisation. Plus particulièrement, les BCKAs synthétisés par BCAT1 cytosolique, sont accompagnés de la production de glutamate. Ce dernier peut être par la suite transformé en glutamine pour permettre la biosynthèse *de novo* de nucléotides (**Figure 27**). Parallèlement, les BCKAs produits par BCAT2 mitochondriale, vont être par la suite transformés en acétyl-CoA par le complexe de l' $\alpha$ -kétoglutarate déshydrogénase branché (BCKDH) pour alimenter le cycle de Krebs (**Figure 27**). A l'inverse, la leucine produite peut jouer le rôle d'agoniste en allant activer la voie mTOR et en agissant plus particulièrement sur le complexe mTORC1 (**Figure 27, Figure 28**) [314]. Ce phénomène a notamment été observé dans différents types de cancers présentant une dérégulation de l'activité BCAT1 [308, 309, 313]. Ces observations ont permis de mettre en évidence l'activation de la voie mTOR principalement impliquée dans la **croissance**, la **prolifération**, la **différenciation** et la **survie cellulaire** mais également dans la **synthèse protéique** et le **métabolisme cellulaire** (**Figure 28**).



**Figure 29** : Illustration de la voie mTOR et stratégies thérapeutiques associées (D'après *Dienstmann et al., 2014*).

La dérégulation de l'activité de BCAT1, et par conséquent la production accrue de BCAAs et BCKAs, ont permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans la voie mTOR d'une part et dans les voies métaboliques altérées d'autre part. Les dérégulations de BCAT1, observées dans les cancers *IDH* muté, pourraient être également présentes dans le cas des cancers *SDH* muté, permettant ainsi d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### **3.4.2. Perte d'expression de BCAT1 dans les PPGL *SDHB* muté : identification de nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques potentiels**

Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé deux études de métabolomique : une préclinique (clones *SDHB* invalidé vs lignée parentale *SDHB* WT) et une clinique (patients *SDHB* muté et leur famille vs patients sporadiques et un groupe contrôle). Au total, 133 métabolites ont été analysés par GC-MRM conduisant à l'identification de métabolites dérégulés en présence d'une invalidation de *SDHB*, en particulier les BCAAs et les BCKAs. Cette étude devrait permettre de mieux comprendre les modifications métaboliques des cancers *SDH* muté et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques associées.

### 3.4.2.1. Matériels et méthodes

- Échantillons cellulaires

La lignée cellulaire parentale hPheo1 (lignée humaine de phéochromocytome), le contrôle négatif (lignée cellulaire résistante à la puromycine et transfectée avec un vecteur vide du CRISPR-Cas9) et les clones #1 et #3 *SDHB* invalidé par la technologie du CRISPR-Cas9 (cf. Paragraphe 3.1.3), ont été cultivés dans du milieu ACL4 contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio, les Ulis, France) et 1% d'antibiotiques Penicilline-Streptomycine (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, États-Unis), à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> [272]. La lignée parentale et les 2 clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (#1 et #3) ont été étudiés en absence et en présence de traitements (Azacytidine, Sunitinib, Témazolomide, FK866 et Talazoparib ; à la CI<sub>50</sub> pendant 72h). Le milieu intracellulaire a été recueilli après une lyse chimique (Méthanol : eau – 90 :10) et conservé à -80°C avant analyse. Quatre réplicats par condition ont été réalisés.

- Échantillons cliniques

Des sérums de patients ont été collectés rétrospectivement et conservés à -20°C avant analyse. Ils peuvent être classés en 4 groupes :

- Groupe contrôle *SDH*-WT et sans maladie (10 volontaires et 10 échantillons sériques)
- Groupe *SDHB* muté sans maladie correspondant à la famille des patients atteints d'un PPGL (13 volontaires et 13 échantillons sériques)
- Groupe de patients atteints d'un PPGL sporadique (41 patients) prélevés au diagnostic (72 échantillons) et en cours de traitements (53 échantillons)
- Groupe de patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté (34 patients) prélevés au diagnostic (36 échantillons) et en cours de traitements (56 échantillons).

- Analyse métabolomique

Un total de 133 métabolites a été analysés en GC-MRM<sup>1</sup> (quantification relative) dans les échantillons cellulaires et les sérums de patients (**Annexe 2** et **Annexe 3**). La partie analytique a été réalisée en collaboration avec la plateforme de métabolomique de l'Institut de cancérologie Gustave Roussy (**Sylvère Durand**). Au niveau cellulaire, l'aire du pic obtenue pour chaque métabolite a été normalisée

---

<sup>1</sup> *Gaz Chromatography – Multiple Reaction Monitoring*

par le nombre de cellules. L'analyse des données obtenues a été réalisée en collaboration avec le **Dr Rodrigue Rossignol** (U1217, Université de Bordeaux).

- Expression protéique par Western Blot

L'expression protéique de BCAT1, BCAT2, p70S6 kinase totale et sa forme phosphorylée, 4EBP1 totale et sa forme phosphorylée, AKT totale et sa forme phosphorylée a été étudiée dans l'ensemble des modèles cellulaires. En pratique, après 3 lavages du culot cellulaire au PBS<sup>1</sup> (ThermoFisher, Massachusetts, États-Unis), l'extraction protéique a été effectuée par l'ajout de 200 µL de solution RIPA 1X (Cell Signaling technology, Massachusetts, États-Unis) contenant des anti-protéases et anti-phosphatases (Sigma Aldrich, Missouri, États-Unis), dans de la glace pendant 30min, en vortexant régulièrement. La concentration protéique a été déterminée par une méthode de dosage Bradford (ThermoFisher, Massachusetts, États-Unis). Globalement, 30 µg de protéines pour l'exploration de la voie mTOR et 10 µg pour les autres protéines étudiées ont été chauffées à 95°C pendant 10min dans du tampon NuPAGE LDS sample buffer 1X contenant un agent réducteur, le NuPAGE Reducing agent 1X (ThermoFisher, Massachusetts, États-Unis). La séparation des protéines a été réalisée sur un gel SDS-Page 10% ou 12% (ThermoFisher, Massachusetts, États-Unis) dans un tampon NuPAGE MOPS SDS running buffer 1X (ThermoFisher, Massachusetts, États-Unis) à 150V, pendant 1h30min. Le transfert des protéines a été par la suite effectué sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm (ThermoFisher, Massachusetts, États-Unis) dans une solution contenant du Tris-Glycine 1X + 20% d'éthanol (Euromedex, Souffelweyersheim, France) à 100V, pendant 2h à 4°C. Les protéines ont été saturées dans une solution de PBS 1X + 0,1% de Tween 20 (PBS-T) contenant 5% de lait, pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires référencés en **Annexe 4**. Par la suite, les membranes ont été lavées 6 fois au PBS-T 1X et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la horseradish peroxydase (HRP) pendant 1h à température ambiante. Après 6 lavages au PBS-T 1X, les protéines ont été révélées en utilisant de l'ECL Prime (GE Healthcare, Illinois, États-Unis) et le système ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Illinois, États-Unis).

---

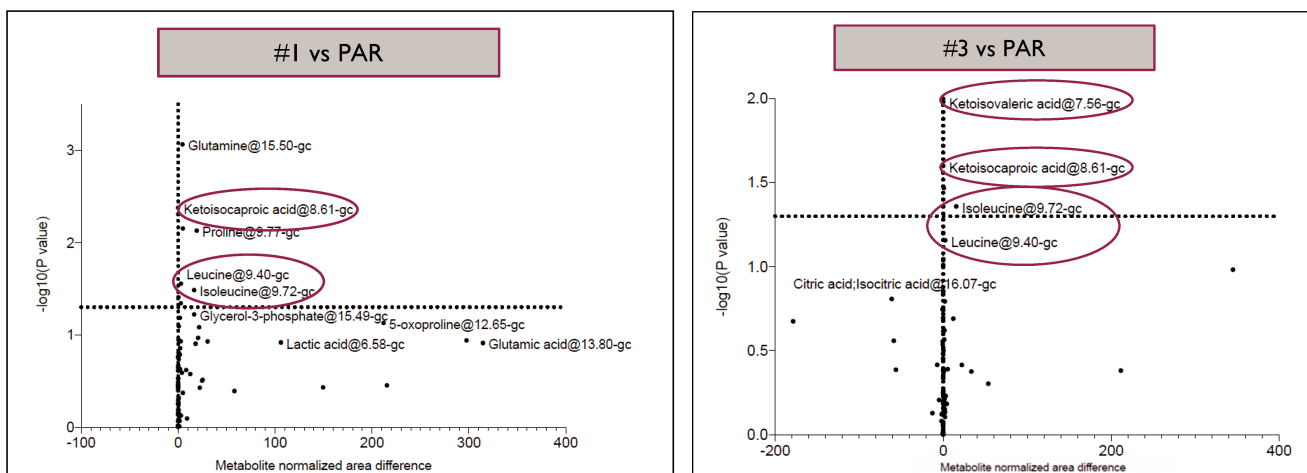
<sup>1</sup> Phosphate buffer saline

### 3.4.2.2. Résultats

L'analyse métabolomique est actuellement en cours d'étude et dans le cadre de ce manuscrit de thèse, seuls des résultats préliminaires obtenus sur les échantillons cellulaires seront présentés.

- Résultats précliniques de l'analyse métabolomique en absence de traitement

L'analyse métabolomique comparant les deux clones *SDHB* invalidé (#1 et #3) avec la lignée parentale hPheo1 (PAR) a permis d'identifier des dérégulations de certains métabolites en absence de traitement. Plus précisément, une augmentation significative de la leucine, l'isoleucine (BCAAs) et de l' $\alpha$ -kétoisovalérate et de l' $\alpha$ -kétoisocaproate (BCKAAs) a été observée dans les clones #1 et #3. Par ailleurs, une augmentation significative de la glutamine et de la proline a également été mise en évidence dans le clone #1 en accord avec le fait que ces deux métabolites soient connus pour être essentiels au métabolisme de la cellule cancéreuse (Figure 29).

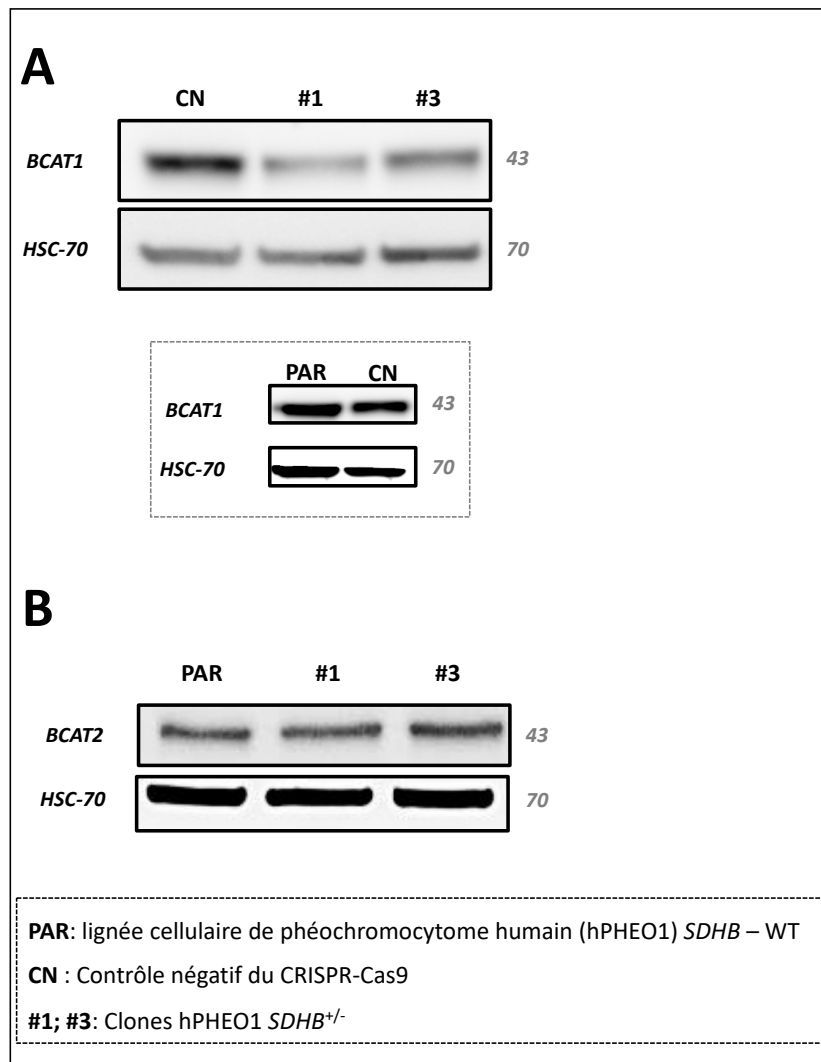


**Figure 30** : Représentation de différences métabolomiques identifiées entre les clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (#1 et #3) et la lignée parentale hPheo1 (PAR) à l'état basal. *Abscisses* : différence des aires normalisées des métabolites entre chaque clone *SDHB*<sup>+/-</sup> et la lignée hPheo1. Ligne verticale : représentation d'une différence nulle, identifiant les métabolites augmentés (à droite de l'axe) ou diminués (à gauche de l'axe) dans les clones *SDHB*<sup>+/-</sup>. *Ordonnées* : significativité de chaque différence d'aire. Ligne horizontale : seuil de significativité fixé à la valeur 1,3. Plus la valeur est élevée, plus la significativité est grande.

- Expression protéique des isoformes BCAT1 et BCAT2 dans les clones  $SDHB^{+/-}$

Par western-blot, nous avons montré que l'expression protéique de l'isoforme cytosolique de l'enzyme BCAT (BCAT1), était diminuée dans les clones #1 et #3 en comparaison à la lignée CN. Par ailleurs, aucune différence d'expression n'a été observée entre les lignées contrôles (CN et PAR) (Figure 30A).

L'expression protéique de l'isoforme mitochondriale de l'enzyme BCAT (BCAT2), ne montre pas quant à elle de différence entre les clones #1 et #3 et la lignée PAR (Figure 30B).



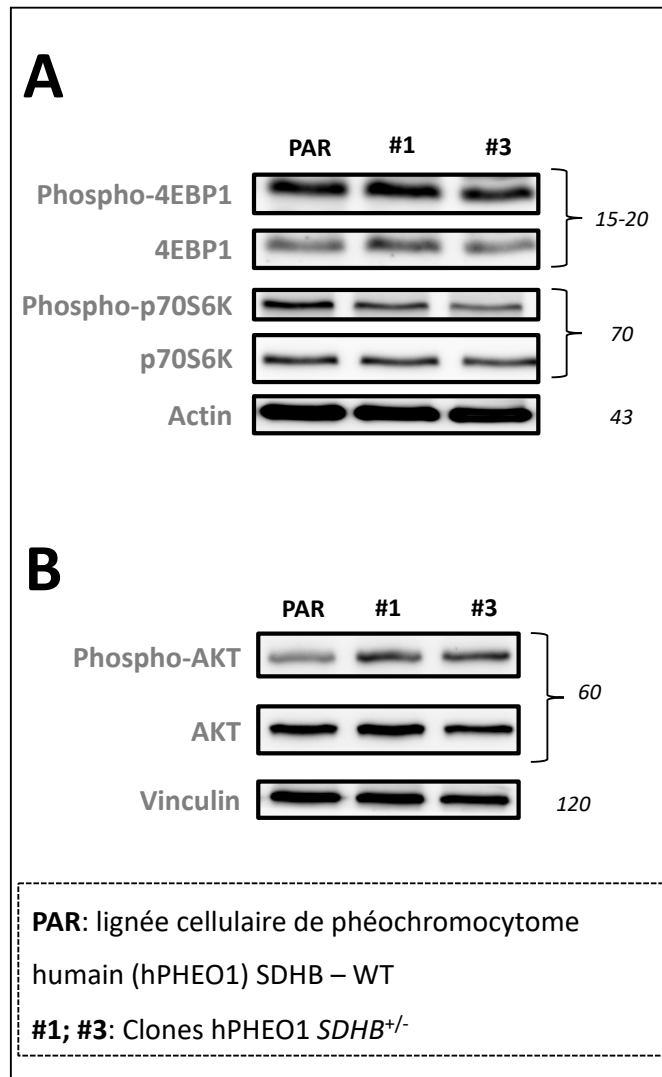
**Figure 31** : Expression protéique des isoformes de BCAT (BCAT1 et BCAT2) dans les clones  $SDHB^{+/-}$  (#1 et #3), dans la lignée contrôle négatif du CRISPR-Cas9 (CN) et dans la lignée parentale de phéochromocytome humain hPheo1 (PAR).

- Expression protéique de l'isoforme BCAT1
- Expression protéique de l'isoforme BCAT2



- Expression protéique des facteurs impliqués dans l'activation de la voie mTOR

L'impact de l'inactivation de *SDHB* sur la voie mTOR a été étudié via l'expression de 2 facteurs associés au complexe mTORC1 : p70S6 kinase et 4EBP1 et un facteur associé au complexe mTORC2 : AKT. Une diminution du ratio des signaux de la forme phosphorylée et de la forme totale de la p70S6 kinase a été observée tandis que ce même ratio semble stable concernant la 4EBP1 dans les clones #1 et #3 en comparaison à la lignée PAR (**Figure 31A**). Par ailleurs, une augmentation du ratio des signaux de la forme phosphorylée et de la forme totale de la protéine AKT a été observée dans les clones #1 et #3 en comparaison à la lignée PAR (**Figure 31B**).



**Figure 32 :** Expression protéique des complexes impliqués dans l'activation de la voie mTOR dans les clones *SDHB*<sup>+/-</sup> et dans la lignée parentale de phéochromocytome humain hPheo1 (PAR).

- A.** Expression de facteurs impliqués dans le complexe mTORC1
- B.** Expression de facteurs impliqués dans le complexe mTORC2

### 3.4.3. Discussion et perspectives

Les premiers résultats de l'analyse métabolomique préclinique comparant les clones *SDHB*<sup>-/-</sup> à la lignée parentale hPheo1 (*SDHB* WT), ont mis en évidence une augmentation des métabolites BCAAs et BCKAs en cas d'inactivation du gène *SDHB*. De ce fait, le rôle de l'enzyme BCAT qui transforme de manière réversible les BCAAs en BCKAs, nous semblait être intéressant à analyser. De manière assez surprenante, l'expression protéique de l'isoforme cytosolique BCAT1 est diminuée dans les deux clones *SDHB* invalidés en comparaison au CN et à la lignée PAR. Il est couramment observé que les anomalies de la BCAT1 soient associées à une augmentation de l'activité de cette dernière qui choisit préférentiellement de catalyser la transformation des BCKAs en BCAAs [311–313]. Cependant, le constat fait dans notre étude, permet d'expliquer que les BCAAs et BCKAs soient anormalement accumulés par la perte d'expression de BCAT1.

Cependant, cette diminution d'expression n'a pas été confirmée pour l'isoforme mitochondriale BCAT2, en cohérence avec les observations faites dans d'autres types de cancers [309, 310].

D'autre part, il a été montré que la leucine produite par la dérégulation de BCAT1 pourrait être à l'origine de l'activation du complexe mTORC1 de la voie mTOR [314]. Dans nos modèles, une augmentation de la phosphorylation d'AKT a été observée dans les clones #1 et #3 en comparaison à la lignée PAR. Comme illustré dans la **figure 27**, la phosphorylation d'AKT sur la Ser473 (forme active) est induite par le complexe mTORC2 ce qui pourrait être le reflet d'une activation de ce dernier. La voie de signalisation impliquant le facteur AKT a notamment un rôle dans la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaire. Son activation pourrait expliquer les phénomènes compensatoires développés par les cellules cancéreuses *SDHB* muté afin de maintenir leur survie [315]. En parallèle, une diminution de l'expression de la forme phosphorylée de p70S6 kinase dans les clones #1 et #3, en comparaison à la lignée parentale pourrait être le reflet d'une diminution de l'activité du complexe mTORC1. En effet, le facteur p70S6 kinase, activé par mTORC1, peut générer un rétrocontrôle négatif de PI3K, un des facteurs d'activation d'AKT. A ce stade de notre étude, nous pouvons suggérer une hypothèse qui sera à confirmer par la suite : la diminution de l'expression de la forme phosphorylée et active de p70S6K bloquerait ce rétrocontrôle négatif et par conséquent favoriserait l'activation d'AKT et de sa cascade de signalisation.

Plusieurs points restent à étudier pour compléter cette partie de l'analyse. Premièrement, la perte d'expression de BCAT1 doit être confirmée et les mécanismes impliqués dans ce phénomène doivent être étudiés. Deux hypothèses peuvent être discutées : BCAT étant une dioxygénase dépendante de l' $\alpha$ -kétoglutarate, le succinate, accumulé dans les cellules *SDH* muté, inhiberait ces dernières, ce qui serait à l'origine de la perte d'activité de BCAT1. Cependant, la perte d'expression protéique de BCAT1 pourrait également être la conséquence d'un mécanisme épigénétique, notamment lié à une hyperméthylation

de son promoteur comme cela a été décrit dans les glioblastomes *IDH1* muté [311].

Les BCKAs sont capables de produire de l'acétyl-CoA par le complexe BCKDH, métabolite essentiel au bon fonctionnement du cycle de Krebs (**Figure 27**) [308]. Une des perspectives de ce travail serait de confirmer l'implication des BCKAs dans le maintien de l'activité du cycle de Krebs altérée par la présence de mutations *SDH*. Si leur implication est confirmée, le complexe BCKDH pourrait être une nouvelle cible thérapeutique intéressante à étudier pour bloquer cette voie de compensation métabolique.

Concernant les BCAAs produits, le rôle des complexes mTORC1 et mTORC2 restent à préciser dans les modèles *SDHB* invalidé. L'activation de la voie mTOR par l'accumulation de la leucine n'a encore jamais décrite dans les cancers *SDH* muté et pourrait être une nouvelle cible thérapeutique prometteuse. De façon plus générale, inhiber la voie PI3K/AKT/mTOR semble pertinent via l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de PI3K (ex : Alpelisib), d'AKT (ex : Capivasertib) et/ou de mTOR. Enfin, on peut noter que dans la littérature, il a été reporté un effet synergique de la combinaison de l'Everolimus (inhibiteur de mTORC1/mTORC2) avec l'Alpelisib dans une lignée cellulaire de phéochromocytome *SDHB*<sup>-/-</sup>, ce qui est cohérent avec une activation de la voie PI3K/AKT/mTOR [238].

L'analyse métabolomique clinique, actuellement en cours, pourrait permettre de confirmer les résultats obtenus dans l'étude préclinique. Les différents niveaux de BCAAs et BCKAs observés dans les différents groupes de patients (PPGL *SDHB* muté et leurs apparentés sains), pourraient permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs dans la prise en charge des maladies *SDH* invalidé.

Enfin, l'analyse comparative des profils métabolomiques précliniques, en absence et en présence des traitements, ciblée sur l'évolution des taux de BCAAs et BCKAs, devrait permettre d'évaluer le potentiel de ces derniers comme biomarqueur de réponse en cas de corrélation entre leur diminution et la mortalité cellulaire.

*In fine*, l'aboutissement de ce travail devrait permettre d'identifier :

- de nouveaux métabolites et enzymes dérégulés dans les PPGL *SDHB* muté,
- de nouveaux biomarqueurs potentiels,
- de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux traitements prometteurs pour améliorer à terme la prise en charge des patients atteints d'un PPGL métastatique *SDHB* muté.

---

# 4. Conclusions et perspectives

---

Les connaissances autour de la biologie des tumeurs ont considérablement été enrichies ces dernières années, avec l'identification de propriétés communes partagées par les cellules cancéreuses, notamment la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire [10, 20]. Physiologiquement, l'apport d'énergie à la cellule se fait par la respiration aérobie qui se déroule en 3 phases : la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons par phosphorylation oxydative [13]. L'effet Warburg décrit dans les cancers, a mis en évidence la capacité des cellules à produire de la fermentation lactique en condition d'aérobie par augmentation de leur activité glycolytique [41]. Ces phénomènes peuvent être par ailleurs associés à des mutations de gènes impliqués dans des voies métaboliques et impliqués dans la tumorigenèse. Plus particulièrement, des mutations des gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs ont été associées à la survenue des cancers [43].

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux mutations des gènes codant pour la succinate déshydrogénase (SDH). La SDH est une protéine mitochondriale qui a une double fonction : en tant que complexe II de la chaîne de transport des électrons, elle participe à la transformation du cofacteur FADH<sub>2</sub> en molécule d'ATP et en tant qu'enzyme du cycle de Krebs, elle catalyse l'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs [74]. Des mutations inactivatrices touchant les gènes codant pour les différentes sous-unités de la SDH (SDHA, SDHB, SDHC et SDHD) ont notamment été associées à certains cancers : 0,05 à 0,2% des cancers du rein, 3% des cancers du sein, 10% des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) et plus fréquemment, ~20% des phéochromocytomes et paragangliomes (PPGL) [56–59]. Les PPGL sont des tumeurs neuroendocrines rares caractérisées par un très fort déterminisme génétique dont 40% de mutations germinales et 30 à 40% de mutations somatiques [94]. En particulier, les mutations *SDH* représentent 50% des mutations germinales impliquant une majorité de mutations *SDHB* [94]. Par ailleurs, la présence de mutations *SDHB* chez des patients atteints d'un PPGL, prédispose au développement de métastases avec une survie médiane de 6,7 ans au diagnostic de métastases [99, 134]. Les mutations *SDH* entraînent une perte de fonction de l'enzyme, ce qui a pour conséquence l'accumulation du succinate qui joue le rôle d'oncométabolite en inhibant les dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -kétooglutarate. L'inhibition de ces dernières entraîne, entre autres, le développement de l'hypoxie et l'hyperméthylation de l'ADN et des histones, classant les PPGL *SDH* muté dans le cluster dit « *pseudo-hypoxique* » [78, 120, 255]. Les dérégulations induites par les mutations *SDH* dans les PPGL ont ainsi permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, du fait de la rareté de la pathologie, le développement d'études cliniques est difficile et la mise en place d'études précliniques et translationnelles est devenue fondamentale.

Dans ce contexte, ce projet de thèse a porté sur « *l'impact des mutations SDH sur la réponse antitumorale et l'identification de nouveaux biomarqueurs* », dont 4 volets distincts ont été explorés.

Le **premier** a consisté en le **développement de modèles précliniques pertinents** mimant les processus d'oncogenèse décrits chez les patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté. Comme décrit dans le paragraphe 3.1.1., il existe plusieurs modèles de PPGL d'origine humaine et animale mais également des modèles présentant une invalidation stable de la SDH dans d'autres modèles que les PPGL. Cependant, il n'existe à ce jour aucun modèle cellulaire de phéochromocytome humain présentant une invalidation stable du gène *SDHB*, c'est pourquoi l'un des objectifs de ce travail de thèse a été d'invalider le gène *SDHB* par la technologie du CRISPR-Cas9 dans la seule lignée humaine de phéochromocytome disponible, la lignée hPheo1 [251]. La caractérisation de deux clones *SDHB*<sup>+/-</sup> obtenus a permis de valider un certain nombre de critères de la maladie chez les patients : une augmentation des concentrations de succinate, un profil plus agressif en lien avec une augmentation de l'expression du Ki67 et du profil de migration et une hyperméthylation de l'ADN liée à une inhibition de TET et de la MGMT. La caractérisation de ces nouveaux modèles pourra être complétée en étudiant notamment le profil pseudo-hypoxique (régulation des facteurs HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ , angiogenèse...), l'augmentation de l'activité du complexe I de la chaîne de transports des électrons, les dérégulations de l'activité métabolique par la technologie du Seahorse® mais également la déficience de la recombinaison homologe [80, 242, 282].

Il apparaît nécessaire, en perspective, de xénotransplanter ces cellules *SDHB* invalidé sur des modèles murins immunodéficients afin d'évaluer la capacité de ces lignées à développer une forme métastatique de la maladie. Le développement tumoral *in vivo* devrait également être associé à un développement de l'angiogenèse en lien avec le profil pseudo-hypoxique observé chez les patients, qui devra être caractérisé. Par ailleurs, l'étude du micro-environnement tumoral paraît très intéressante pour explorer les mécanismes tumoraux associés aux PPGL *SDHB* muté mais également pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Plus particulièrement, le succinate semblerait être associé à la reprogrammation des macrophages [316]. Il a été décrit que des dysfonctions de la SDH permettant l'oxydation du succinate et la production de ROS favorisent le développement de macrophages pro-inflammatoires ayant une activité antitumorale. A l'inverse, une inhibition de la SDH ne permettant plus l'oxydation du succinate et par conséquent entraînant une diminution de la production de ROS est plutôt en faveur d'une reprogrammation des macrophages dits anti-inflammatoires [87, 317]. La reprogrammation des macrophages dans un contexte de PPGL *SDHB* muté n'a, à notre connaissance, jamais été décrite dans la littérature. Le développement d'un modèle *in vivo* permettrait d'étudier le rôle des macrophages et peut être à terme d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques bénéfiques pour les patients.

Chaque modèle préclinique développé présente des points limitants. Dans notre cas, un point majeur

concerne le type d'inactivation du gène *SDHB*. Nous n'avons obtenu que des clones présentant une mutation hétérozygote du gène *SDHB*. En clinique, les mutations *SDHB* chez les porteurs sains sont hétérozygotes mais une perte d'hétérozygotie (LOH) entraînant une perte totale de la fonction de la SDH est alors observée lors de la tumorigenèse chez des patients développant un PPGL. Afin d'améliorer notre modèle, il est envisageable de transfecter nos clones *SDHB*<sup>+/-</sup> avec le pool d'ARN guide ciblant l'exon 2 du gène *SDHB* afin d'obtenir une mutation homozygote plus proche de ce qui est observé en clinique. Par ailleurs, d'autres modalités d'utilisation du CRISPR-Cas9 pourront être envisagées, comme la réexpression du gène *SDHB* dans un modèle dit de « *rescue* » ou bien encore l'inactivation des autres sous-unités de la SDH.

Enfin, la mise en place de modèles PDX de PPGL *SDHB* muté pourrait être très pertinente car plus représentatifs des formes cliniques de la maladie développées chez les patients. Grâce aux suggestions de Powers *et al.*, il serait préférable d'utiliser un modèle de souris immunodéficiente de type NSG et de sélectionner des tumeurs de patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté métastatique et opérable afin d'optimiser les chances de prise de greffe qui peut être faible et très longue [261].

Le deuxième objectif a consisté en l'étude de l'impact des mutations *SDHB* sur la réponse antitumorale de stratégies thérapeutiques seules et combinées. Nos clones *SDHB*<sup>+/-</sup> semblent présenter de nombreuses caractéristiques communes à la maladie développée chez les patients. C'est donc grâce à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques liées à l'inactivation de *SDHB* et l'augmentation consécutive du succinate décrites dans la littérature, que nous avons décidé d'évaluer les effets antiprolifératifs de l'Azacytidine (agent déméthylant), du Sunitinib (inhibiteur du VEGFR), du Témazolomide (agent alkylant), du Talazoparib et du FK866 (inhibiteurs de PARP/NAD<sup>+</sup>) [235, 236, 242, 255, 289]. Nous avons ainsi montré une meilleure sensibilité des clones *SDHB*<sup>+/-</sup> au Sunitinib, au Témazolomide et au Talazoparib en comparaison aux lignées parentales et contrôle négatif du CRISPR-Cas9. Ces résultats confirment les observations faites par Hadoux *et al.* chez des patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté qui avaient une survie sans progression supérieure à celle de patients atteints d'un PPGL sporadique, tous traités par Témazolomide [235]. En revanche, la meilleure sensibilité du Témazolomide et du Talazoparib que nous avons décrite dans nos modèles *SDHB*<sup>+/-</sup> n'a cependant pas été observée par Pang *et al.*, qui évaluaient l'efficacité du Témazolomide avec un autre inhibiteur de PARP, l'Olaparib, dans le modèle cellulaire MTT *SDHB* invalidé par shARN [242]. Une hypothèse peut expliquer ces différences : le modèle cellulaire *SDHB* déficient de Pang *et al.*, montre une activité accrue du complexe I de la chaîne de transport des électrons permettant une augmentation de la disponibilité du cofacteur NADH pour le maintien de l'activité dérégulée de la PARP. Sulkowski *et al.*, ont quant à eux mis en évidence les dérégulations de la PARP dans des modèles *SDH*, *IDH* et *FH* déficients associées à

un autre mécanisme [80, 282]. Les oncométabolites accumulés par les dérégulations des enzymes du cycle de Krebs (respectivement le 2-hydroxyglutarate, le succinate et le fumarate) inhibent les déméthylases KDM4A et KDM4B, faisant partie de la famille des JMJD2<sup>1</sup> codant pour les domaines JmjC impliquées dans la régulation de l'hyperméthylation des histones [318]. L'inhibition de KDM4A et KDM4B serait à l'origine de l'hyperméthylation des histones 3 lysine 9 (H3K9) au niveau des loci entourant les cassures de l'ADN, masquant un signal local de triméthylation H3K9, qui est essentiel à la réparation homologue de l'ADN et empêcherait également le recrutement de facteurs impliqués dans la réparation homologue [80]. Ces résultats permettraient d'expliquer la suppression de la recombinaison homologue induite par l'accumulation d'oncométabolites du cycle de Krebs.

En perspective, il serait intéressant d'étudier dans nos modèles cellulaires si l'activité du complexe I de la chaîne de transport des électrons est augmentée en utilisant par exemple la technologie du Seahorse<sup>®</sup> et/ou s'il existe une suppression de la recombinaison homologue par un immunomarquage RAD51 permettant d'expliquer la sensibilité de nos clones *SDHB*<sup>-/-</sup> aux inhibiteurs de PARP afin de confirmer les résultats précédemment décrits par les auteurs.

Par ailleurs, nous avons pu confirmer la synergie de la combinaison du Témazolomide avec les inhibiteurs de PARP dans nos modèles *SDHB*<sup>-/-</sup>, comme cela a été précédemment montré par *Pang et al.*, [242]. Il serait donc intéressant d'évaluer l'efficacité de ces traitements, seuls et combinés, sur des modèles murins xéno greffés par les clones *SDHB*<sup>-/-</sup>. Ces études pharmacologiques permettraient de confirmer l'efficacité observée *in vitro* mais également d'évaluer les possibles toxicités induites par la combinaison de traitements, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie, uniquement réalisables sur des modèles *vivo*. Les résultats obtenus à l'issue de ces expérimentations pourraient permettre de renforcer le rationnel de combiner le Témazolomide avec les inhibiteurs de PARP chez des patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté.

La prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un PPGL devrait dans les prochaines années se tourner de plus en plus vers une prise en charge dite de « médecine personnalisée » en lien avec le fort déterminisme génétique des PPGL.

Par ailleurs, le mécanisme d'action des traitements seuls et combinés reste à étudier dans nos modèles *vitro* puis *vivo*. Une étude visant à explorer le type de mort cellulaire induit par l'application des drogues seules et combinées est en cours. Les résultats obtenus devraient permettre de compléter la compréhension de la réponse aux traitements. Il est également intéressant de comprendre si les traitements seuls et combinés sont capables de restaurer les voies altérées par la présence des mutations *SDH* (régulation de l'hypoxie, profil de méthylation, réparation de l'ADN...). La combinaison de traitements ciblant différentes voies dérégulées pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de la réponse

---

<sup>1</sup>Jumonji Domain 2



aux traitements, en diminuant le risque de résistance à ces derniers, souvent observée avec les drogues seules.

Enfin, l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques pourra également être envisagée. C'est notamment le cas des immunothérapies du type inhibiteurs de checkpoint immunitaires, qui ont permis d'améliorer considérablement la survie globale de patients atteints de cancer. Pour cela, l'étude de l'expression des marqueurs de l'immunité tel que PDL1<sup>1</sup> pourra être réalisée dans nos modèles précliniques de phéochromocytome *SDHB* invalidé mais également dans les tissus de patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté afin de caractériser le profil immunologique de ces tumeurs et d'évaluer de nouveaux traitements prometteurs de type anti-PD1, comme cela est déjà le cas dans le cadre d'études cliniques chez des patients atteints de tumeurs rares dont les PPGL (ClinicalTrials.gov : NCT02834013 et NCT02721732).

Le **troisième** objectif a consisté en **l'évaluation du succinate sérique comme nouveau biomarqueur** diagnostique des mutations *SDH*, d'extension de la maladie et de réponse au traitement chez des patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté ainsi que leurs apparentés sains. L'intérêt de ce biomarqueur a d'ores et déjà été suggéré dans différents modèles et avec différentes technologies mais n'a pas encore une place dans la pratique clinique [223, 226, 304]. Dans un premier temps, le développement et la validation d'une méthode de dosage du succinate par UPLC-MS/MS respectant les recommandations européennes (EMA) en terme de validation des méthodes analytiques, a été essentiel pour répondre aux exigences cliniques [319]. Notre méthode analytique est rapide, robuste, sensible, précise et exacte associée à un faible risque d'erreur du fait de l'automatisation de sa préparation pré-analytique, ce qui n'avait jamais été fait jusqu'à présent pour ce biomarqueur. En outre, cette méthode est adaptée à la quantification quotidienne d'un grand nombre d'échantillons en routine et peut se faire dans différentes matrices biologiques, telles que le sérum ou l'urine mais également dans le milieu de culture et les culots cellulaires pour des études précliniques.

Comme perspective, il serait intéressant d'accréditer cette méthode de dosage, selon les recommandations du COFRAC<sup>2</sup>, comité reconnu, entre autres, pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé cette méthode de dosage par UPLC-MS/MS pour étudier l'intérêt du succinate sérique comme nouveau biomarqueur diagnostique des mutations *SDH*, de suivi de la maladie et réponse aux traitements chez les patients atteints d'un PPGL *SDH* muté ainsi que chez leurs apparentés sains. Le diagnostic des mutations *SDH* repose actuellement sur l'IHC et/ou le

---

<sup>1</sup> *Programmed death-ligand 1*

<sup>2</sup> *Comité français d'accréditation*

génotypage. L'IHC est une méthode robuste mais non adaptée aux sujets sains sans tumeur, tandis que le génotypage est la technique de référence bien que le délai de rendu des résultats puisse être long dans certains cas [220, 320]. De ce fait, nous proposons le dosage du succinate pour aider au diagnostic des mutations *SDH* comme outil complémentaire à l'IHC et au génotypage. Nous avons montré que le dosage sérique du succinate est une méthode simple, rapide et adaptée à la fois aux patients atteints d'un PPGL et les sujets apparentés dans un contexte de maladie germinale.

Concernant le suivi des patients atteints d'un PPGL *SDH* muté et des sujets sains porteur d'une mutation *SDH*, il repose actuellement sur l'imagerie, les symptômes cliniques et la quantification des taux circulants des métanéphrines et de la chromogranine A [321, 322]. L'exposition des personnes non malades à des rayonnements ionisants n'est pas recommandée notamment dans la population pédiatrique et peut être également une charge importante pour les malades. D'autre part, la quantification des métanéphrines n'est possible que chez les patients ayant une maladie dite fonctionnelle. Enfin, ces marqueurs biologiques (métanéphrines et chromogranine A) ne sont pas prédictifs de la survenue d'un PPGL dans une population saine. Dans notre étude, nous avons montré une augmentation significative des taux sériques de succinate chez les sujets porteurs sains de mutations *SDHB* en comparaison à un groupe contrôle sain *SDH-WT* et une valeur seuil de succinate (7  $\mu$ M) a été proposée afin de pouvoir diagnostiquer la présence d'une mutation *SDHB* parmi une population non malade. Par ailleurs, le suivi régulier des taux de succinate sérique chez ces patients devrait être initié afin d'évaluer le succinate comme biomarqueur diagnostique de la survenue de la maladie.

Chez les patients atteints d'un PPGL, une augmentation significative des taux de succinate sérique chez les porteurs d'une mutation *SDHB* a été démontrée en comparaison aux formes sporadiques.

Par ailleurs, nous avons observé une augmentation non significative des taux de succinate chez les patients atteints d'un PPGL sporadique (*SDH-WT*) en comparaison au groupe contrôle sain non muté. Nous avons montré que les taux de CRP<sup>1</sup>, biomarqueur de l'inflammation, étaient significativement augmentés chez les patients sporadiques en comparaison au groupe contrôle. Cette observation est à rapprocher du rôle du succinate décrit dans l'inflammation avec la reprogrammation des macrophages pro-inflammatoires [87].

Par la suite, nous avons montré que l'extension de la maladie était corrélée au taux de succinate. Plus particulièrement, une augmentation significative des taux de succinate a été observée chez des patients atteints d'un PPGL métastatique *SDHB* muté en comparaison aux patients atteints d'un PPGL localisé (SPO et *SDHB*) et métastatique sporadique. Cette observation a été confirmée en montrant une corrélation des taux de succinate sérique avec les paramètres de mesure de la TEP <sup>18</sup>F-FDG : le TLG, le

---

<sup>1</sup>Protéine C réactive

TMTV et le SUVmax. En effet, les taux de succinate étaient les plus élevés chez les patients présentant un PPGL *SDHB* muté à des stades avancés, définis par des valeurs élevées de TLG notamment. Ce résultat est intéressant car le dosage régulier du succinate dans cette population pourrait être le reflet de l'extension de la maladie en complément de l'imagerie qui pourrait éventuellement être réalisée moins fréquemment.

On peut noter qu'en terme d'examen d'imagerie, les recommandations actuelles préconisent d'utiliser l'imagerie [<sup>68</sup>Ga]SSA en première ligne dans le cas des patients atteints d'un PPGL métastatique et/ou *SDH* muté, imagerie qui n'était pas disponible dans notre étude rétrospective [323]. De ce fait, il serait également intéressant de confirmer la corrélation des taux sériques de succinate avec l'extension de la maladie observée avec ce type de traceur. Dans ce cas, le succinate pourrait être un potentiel biomarqueur de réponse dite métabolique car plusieurs traceurs utilisés en pratique clinique appartiennent à la classe d'imagerie fonctionnelle. L'utilisation d'imageries radiologiques dites conventionnelles, telles que l'IRM ou la tomodensitométrie est également courante chez les patients atteints d'un PPGL *SDH* muté ainsi que leurs apparentés. La corrélation des taux de succinate sérique avec l'extension de la maladie observée avec ce type d'imagerie serait également intéressante à étudier afin d'évaluer le succinate comme potentiel biomarqueur de réponse suivant les critères RECIST<sup>1</sup>.

Nous avons également montré dans notre cohorte, que les taux de succinate sérique chez les patients atteints d'un PPGL étaient également corrélés aux concentrations de chromogranine A sérique et de métanéphrines urinaires (normétanéphrines et 3-méthoxytyramine). En revanche, l'illustration de 3 cas cliniques tend à montrer que le succinate serait un marqueur biologique plus précoce que la chromogranine A. Ces cas cliniques ont par ailleurs illustré le potentiel du succinate comme biomarqueur précoce de réponse aux traitements, les évolutions des concentrations de succinate étant corrélées, voire anticipant, la réponse métabolique.

L'ensemble de ces résultats, bien que prometteurs, devront être confirmés dans une cohorte indépendante de patients où chaque échantillon aura pu être collecté de façon prospective au diagnostic puis sous traitement, comme par exemple dans le cadre de la première étude clinique de phase II menée dans les PPGL, l'étude FIRSTMAPPP (Dr Éric Baudin, Gustave Roussy).

Au final, nos résultats sont en faveur d'une utilisation des taux sériques de succinate comme biomarqueur diagnostique de la présence de mutations *SDH*, de suivi de la maladie et de réponse aux traitements permettant potentiellement d'améliorer considérablement la prise en charge des patients atteints d'un PPGL *SDH* muté en adaptant plus précocement la stratégie thérapeutique.

Bien qu'une légère augmentation des taux de succinate ait été observée dans les populations *SDHA/C/D* mutées (patients et sujets sains), le faible effectif de nos cohortes n'a pas permis de conclure sur l'intérêt

---

<sup>1</sup> *Response evaluation criteria in solid tumors*

du dosage du succinate sérique dans la prise en charge de ces profils mutationnels. Une étude complémentaire, portant sur un recueil de sérums plus important devrait être menée, très certainement dans un contexte collaboratif entre plusieurs centres du fait de la rareté de ce profil moléculaire de la maladie.

Comme perspective, il peut être envisagé d'évaluer le succinate sérique comme biomarqueur dans des contextes pathologiques différents impliquant des anomalies de la SDH. Le rôle du succinate sérique pourrait ainsi être évalué dans d'autres types de cancers (cancer du rein, cancers du sein et les tumeurs stromales gastro-intestinales) *SDH* muté. Par ailleurs, le succinate pourrait être un biomarqueur prédictif de la reprogrammation des macrophages pro ou anti-inflammatoires dans le cas des maladies inflammatoires ou dans les maladies présentant de l'inflammation comme les cancers [316]. D'autre part, le succinate joue également un rôle dans le cas des lésions ischémiques – reperfusion [324]. Les cardiopathies ischémiques étant la première cause de décès dans le monde, le dosage du succinate pourrait être utile dans l'étude des mécanismes impliqués dans cette pathologie et éventuellement dans la prévention de la survenue de lésions ischémiques [325].

Le **quatrième** et dernier objectif a consisté en **l'étude des dérégulations métaboliques induites par les mutations *SDHB***. Pour ce faire, nous avons réalisé 2 études de métabolomique : l'une préclinique et l'autre clinique, afin de mieux comprendre l'impact des mutations *SDHB* sur le métabolisme énergétique cellulaire. En nous basant dans un premier temps sur les résultats obtenus dans les clones *SDHB*<sup>+/-</sup> en comparaison à la lignée hPheo1 *SDHB*-WT, nous avons identifié parmi les 133 métabolites étudiés une augmentation de la leucine, de l'isoleucine (BCAAs) et de l' $\alpha$ -kétoisocaproate et de l' $\alpha$ -kétoisovalérate (BCKAs) dans les clones *SDHB*<sup>+/-</sup>. La découverte de ces métabolites dérégulés nous a amenés à l'étude des isoformes de l'enzyme BCAT, responsable de la transformation réversible des BCAAs et BCKAs. La perte d'expression de BCAT1 mise en évidence dans les clones *SDHB*<sup>+/-</sup> permet d'expliquer l'accumulation à la fois des BCAAs et des BCKAs. D'autres types de cancers présentent des anomalies de BCAT1, mais il est alors généralement décrit que les cellules cancéreuses sont associées à une augmentation de l'expression de BCAT1 qui convertit alors les BCKAs en BCAAs, irréversiblement [312]. Cependant, la perte d'expression de BCAT1 que nous avons observée a également été décrite dans un modèle de glioblastome *IDH1* muté, en lien avec une hyperméthylation de son promoteur [311].

Par ailleurs, il est décrit dans la littérature que la leucine accumulée est responsable de l'activation de la voie mTOR, impliquée dans la prolifération, le métabolisme et la survie cellulaire [314]. Dans ce travail de thèse, nous avons pu montrer que les clones *SDHB*<sup>+/-</sup> présentaient également une activation du complexe mTORC2, avec notamment une augmentation de la phosphorylation d'AKT (Ser473) induite par le complexe mTORC2 et une probable diminution de la phosphorylation de p70S6 kinase induite par

le complexe mTORC1.

Les perspectives de ce volet métabolomique sont multiples, et nous proposons dans un premier temps d'identifier les causes de la perte d'expression de BCAT1 en réponse à l'inhibition de *SDHB*. L'hyperméthylation du promoteur de BCAT1 devra ainsi être étudiée ainsi que l'impact du succinate sur cette dioxygénase dépendante de l' $\alpha$ -kétooglutarate, nouvellement décrite dans les cancers *SDH* muté. Par ailleurs, la déplétion de la leucine dans le milieu de culture cellulaire pourra être également testée afin de confirmer le rôle de ce métabolite dans l'activation des complexes mTORC1/mTORC2. Dans un second temps, si cette activation est confirmée, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité d'inhibiteurs de PI3K, de mTORC1/mTORC2 ou d'AKT. Pour rappel, la combinaison d'un inhibiteur de mTORC1/mTORC2 (Everolimus) avec un inhibiteur de PI3 kinase (BYL719, Alpelisib) a montré une diminution de la viabilité cellulaire associée à une répression de l'activation d'AKT dans les modèles cellulaires MTT et MPC *SDHB* invalidé [238]. Par ailleurs, le rôle des BCKAs dans les dérégulations métaboliques induites par l'inhibition de SDH devra également être exploré. Une hypothèse proposée est que ces derniers produisent de l'acétyl-CoA par le complexe BCKDH, métabolite essentiel au maintien de l'activité du cycle de Krebs. La déplétion en BCKAs pourra alors être réalisée pour étudier si l'activité métabolique de la cellule cancéreuse est ralentie. L'accumulation des BCAAs et BCKAs devra également être validée sur des tissus tumoraux de patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté par spectrométrie de masse, afin de confirmer les résultats obtenus sur les modèles cellulaires *SDHB*<sup>+/-</sup>.

Une analyse métabolomique préclinique en présence de traitements a également été menée et les résultats sont en cours d'analyse. Celle-ci pourrait permettre d'évaluer si l'effet antiprolifératif induit par les traitements est lié à la restauration de voies métaboliques dérégulées telles que la voie mTOR mais également lié au niveau d'expression de BCAT1 et des métabolites BCAAs/BCKAs.

Par la suite, l'analyse des résultats de l'étude métabolomique sur des échantillons issus de patients devrait permettre de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus dans nos modèles précliniques. Si les résultats précliniques et cliniques sont corrélés, il serait alors intéressant d'étudier l'intérêt plus spécifique des BCAAs et BCKAs sériques comme potentiels biomarqueurs métaboliques, complémentaires au succinate, chez des sujets *SDHB* muté. Pour cela, une méthode de dosage, par exemple en LC-MS/MS, devra être développée afin d'obtenir une quantification absolue de ces métabolites et étudier leur intérêt en clinique [326, 327].

Enfin, le rôle de BCAT1 pourra également être étudié dans la reprogrammation des macrophages. Il a notamment été proposé que l'inhibition de BCAT1 régulerait la reprogrammation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire [328]. Le rôle du succinate et de BCAT1 dans la reprogrammation des macrophages dans un contexte tumoral *SDH* muté, pourra être étudié afin de comprendre la modulation de l'immunité tumorale et d'identifier à terme de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses pour la prise en charge des cancers *SDH* muté.

En conclusion, ces résultats ont permis des avancées dans les quatre domaines explorés dans ce travail de thèse :

- le développement de nouveaux modèles précliniques de phéochromocytome humain présentant une invalidation stable de *SDHB*, permettant d'étudier les mécanismes d'oncogenèse impliqués dans le développement des PPGL et d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements prometteurs ;
- l'identification de stratégies thérapeutiques seules et combinées pertinentes qui pourront à terme bénéficier aux patients atteints d'un PPGL *SDHB* muté ;
- la confirmation de l'intérêt du succinate sérique comme biomarqueur diagnostique des mutations *SDH*, de suivi de la maladie et de réponse aux traitements chez les patients atteints d'un PPGL *SDH* muté et leurs apparentés sains ;
- l'identification de nouvelles voies métaboliques dérégulées, permettant la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et l'identification de traitements prometteurs associés.

Ces avancées font l'objet de la rédaction de 5 articles scientifiques (soumis ou en rédaction). La publication de ces travaux de thèse devrait contribuer à compléter les connaissances des cancers *SDH* muté et à initier de nouveaux projets de recherche pertinents qui pourront, nous l'espérons, améliorer la prise en charge de patients atteints d'un cancer *SDH* muté, encore limitée à ce jour, selon une stratégie personnalisée, ciblée sur le profil moléculaire.

---

---

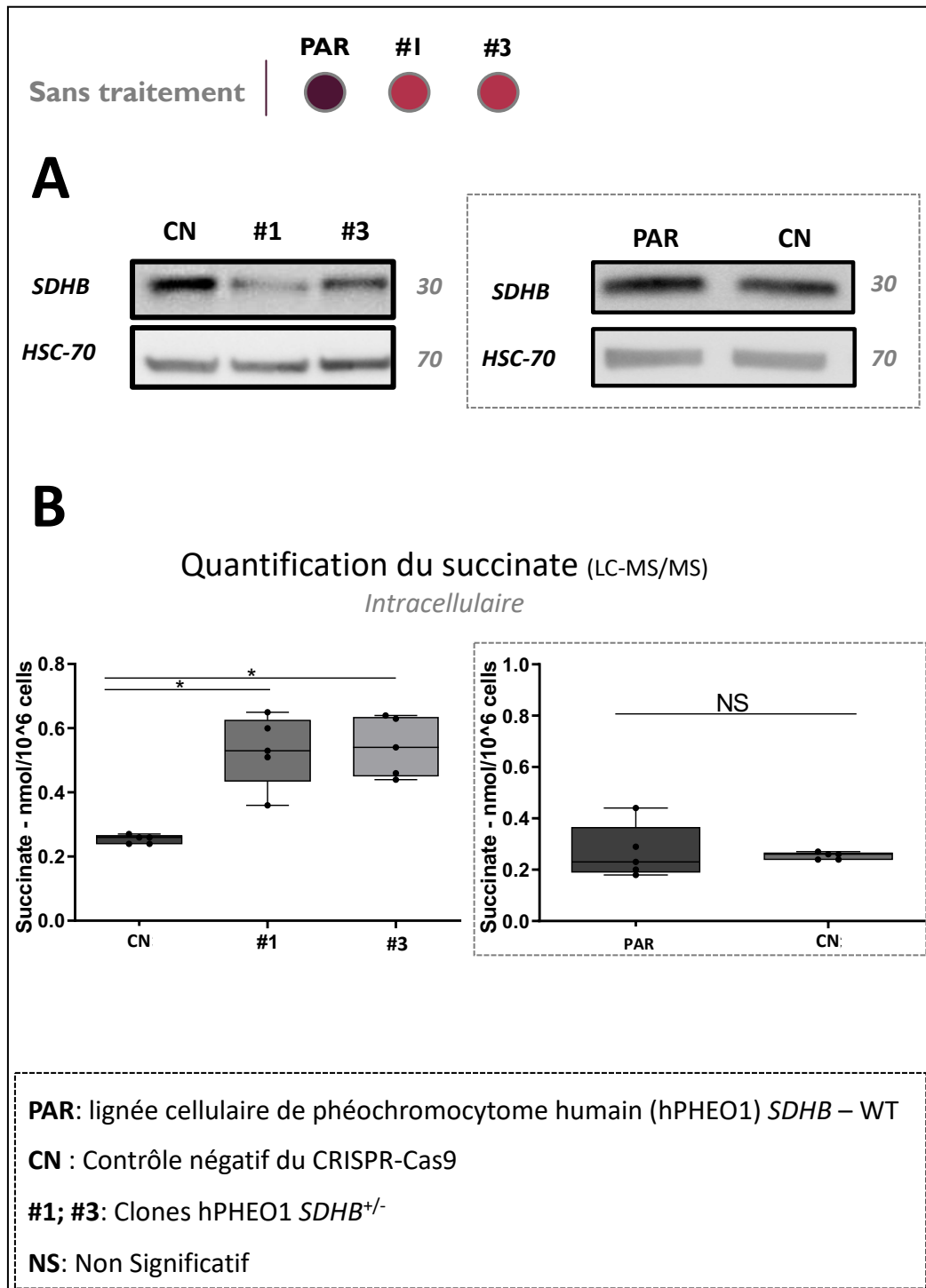
# 5. Annexes

---

---

**Annexe 1** : Caractérisation fonctionnelle de la lignée parentale hPheo1 (PAR), du contrôle négatif du CRISPR-Cas9 (CN) et des deux clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (#1 et #3)

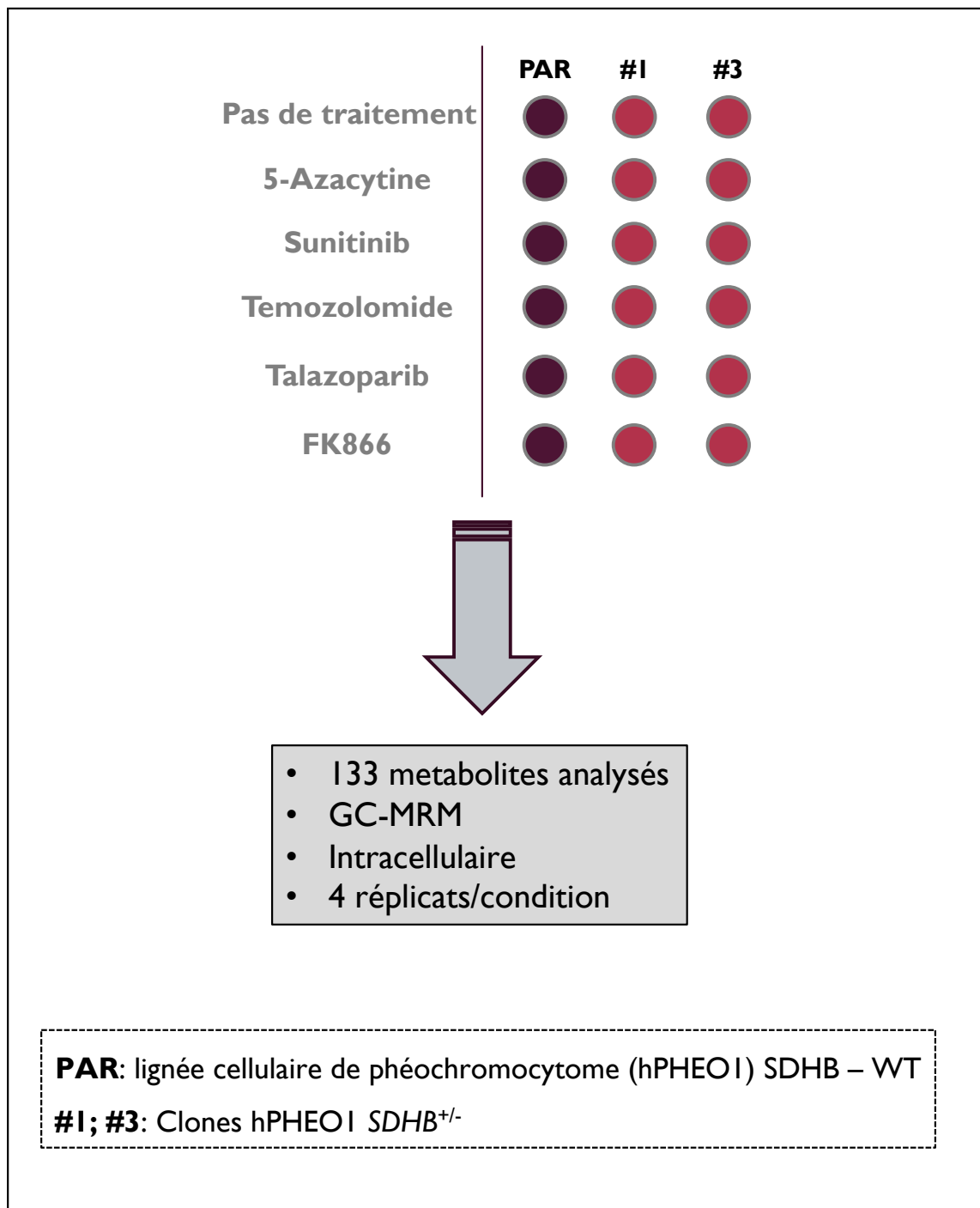
- A. Expression protéique de SDHB par western blot
- B. Quantification du succinate intracellulaire par LC-MS/MS

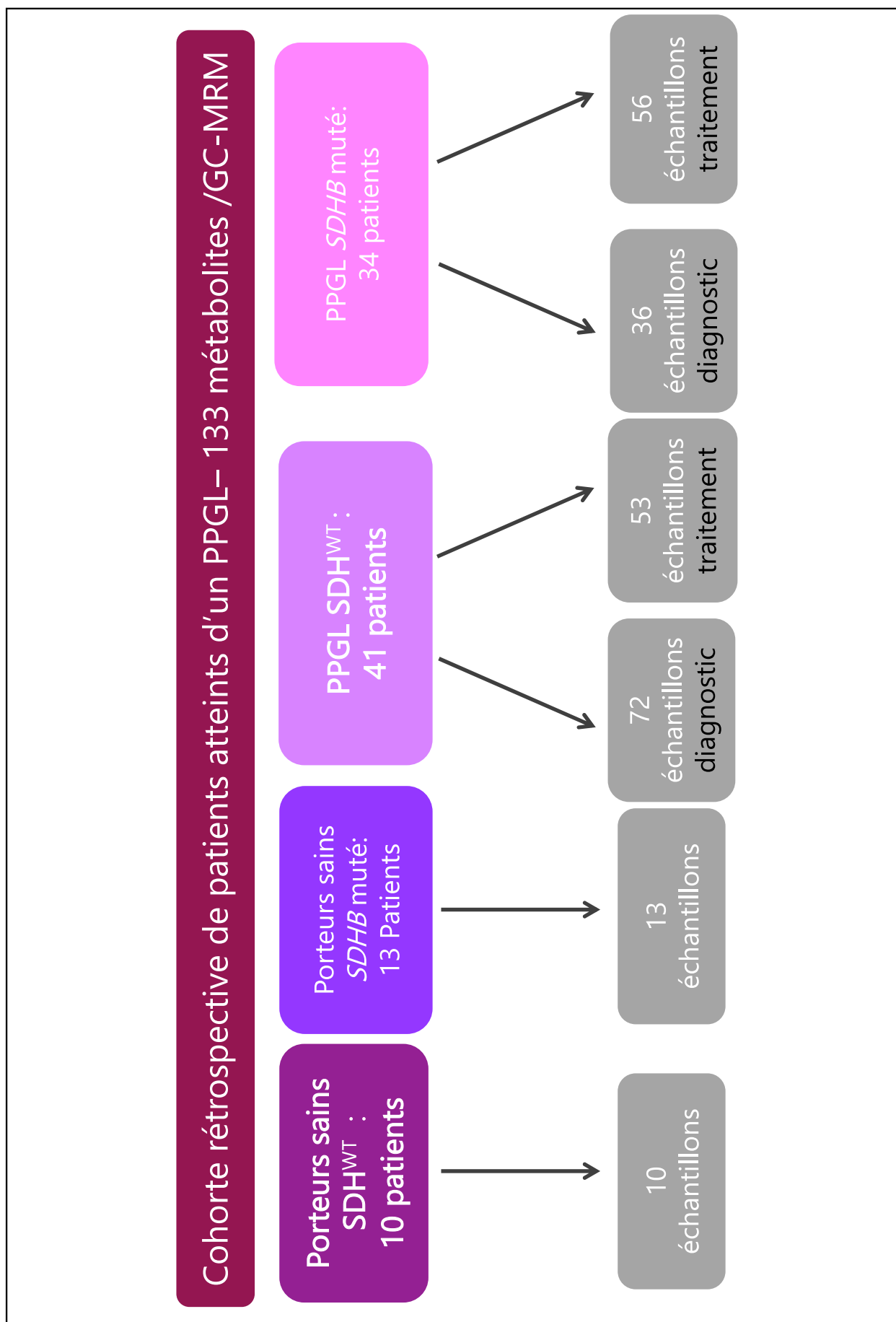




Annexe 2 : Design de l'étude métabolomique préclinique en GC-MRM

Lignée parentale hPheo1 *SDHB* WT (PAR), clones *SDHB*<sup>+/-</sup> (#1 et #3)





**Annexe 4** : Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés

<b>Protéine ciblée</b>	<b>Hôte</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Référence</b>	<b>Dilution</b>
HSC-70	Souris	Santacruz Biotechnology	sc-7298	1/1000
Vinculine	Souris	Sigma Aldrich	V9131	1/1000
Actine	Souris	Abcam	ab49900	1/10 000
SDHB	Souris	Thermofisher	459230	1/1000
BCAT1	Souris	Origene	TA504360	1/1000
BCAT2	Lapin	Thermofisher	PA5-21549	1/1000
Phospho-AKT (Ser473)	Lapin	Cell Signalling	4058S	1/1000
AKT	Lapin	Cell Signalling	9272S	1/1000
Phospho-4EBP1	Lapin	Cell Signalling	9459	1/1000
4EBP1	Lapin	Cell Signalling	9452	1/1000
Phospho-p70S6 kinase	Lapin	Cell Signalling	9234	1/1000
p70S6 kinase	Lapin	Cell Signalling	2708	1/1000

---

# 6. Bibliographie

---

1. OMS | Cancer. [<http://www.who.int/topics/cancer/fr/>].
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. WORLD CANCER REPORT: cancer research for cancer development, Place of publication not identified: IARC, 2020.
3. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 2016; 388(10053):1659–1724.
4. Cancer-OMS. [<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>].
5. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2003. [<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2003/summary/>].
6. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016. [<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/summary/>].
7. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018. [<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/summary/>].
8. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019. [<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/summary/>].
9. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100(1):57–70.
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144(5):646–674.
11. Guo R, Gu J, Wu M, Yang M. Amazing structure of respirasome: unveiling the secrets of cell respiration. *Protein Cell* 2016; 7(12):854–865.
12. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*, 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2008.
13. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Stryer L. *Biochemistry*, 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2002.
14. Pelicano H, Martin DS, Xu R-H, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25(34):4633–4646.
15. Chaudhry R, Varacallo M. *Biochemistry, Glycolysis*. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
16. Raimundo N, Baysal BE, Shadel GS. Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends Mol. Med.* 2011; 17(11):641–649.
17. Jochmanova I, Pacak K. Pheochromocytoma: The First Metabolic Endocrine Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22(20):5001–5011.
18. Bender DA. TRICARBOXYLIC ACID CYCLE. *Encycl. Food Sci. Nutr.*, Elsevier, 2003:5851–5856.
19. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2016; 2(5):e1600200.
20. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016; 23(1):27–47.
21. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 1927; 8(6):519–530.
22. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956; 123(3191):309–314.
23. Eagle H. THE MINIMUM VITAMIN REQUIREMENTS OF THE L AND HELA CELLS IN TISSUE CULTURE, THE PRODUCTION OF SPECIFIC VITAMIN DEFICIENCIES, AND THEIR CURE. *J. Exp. Med.* 1955; 102(5):595–600.
24. Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. Cytokine Stimulation Promotes Glucose Uptake via Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Regulation of Glut1 Activity and Trafficking. *Mol. Biol. Cell* 2007; 18(4):1437–1446.
25. Wang R, Dillon CP, Shi LZ et al. The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity* 2011; 35(6):871–882.
26. Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* 2013; 497(7451):633–637.
27. Krajcovic M, Krishna S, Akkari L et al. mTOR regulates phagosome and entotic vacuole fission. *Mol. Biol. Cell* 2013; 24(23):3736–3745.
28. Stolzing A, Grune T. Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *FASEB J.* 2004; 18(6):743–745.
29. Kamphorst JJ, Cross JR, Fan J et al. Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013; 110(22):8882–8887.
30. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21(3):309–322.
31. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007; 109(9):3812–3819.
32. Goetze K. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int. J. Oncol.* 2011. doi:10.3892/ijo.2011.1055.
33. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 2006; 107(5):2013–2021.
34. Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014; 513(7519):559–563.
35. Végran F, Boidot R, Michiels C et al. Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF-κB/IL-8 Pathway that Drives Tumor Angiogenesis. *Cancer Res.* 2011; 71(7):2550–2560.
36. Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B. Lactate Stimulates Fibroblast Expression of Hyaluronan and CD44: The Warburg Effect Revisited. *Exp. Cell Res.* 2002; 276(1):24–31.
37. Rothberg JM, Bailey KM, Wojtkowiak JW et al. Acid-Mediated Tumor Proteolysis: Contribution of Cysteine Cathepsins. *Neoplasia* 2013; 15(10):1125–IN9.
38. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahn F et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2011; 478(7368):197–203.
39. Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM et al. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* 2015; 162(3):552–563.

40. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 104(49):19345–19350.
41. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 2011; 11(5):325–337.
42. Puyraimond-Zemmour D, Vignot S. Le métabolisme de la cellule tumorale : l'effet Warburg. *Oncologie* 2013; 15(9):435–440.
43. Gaude E, Frezza C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab.* 2014; 2(1):10.
44. Schlichtholz B, Turyn J, Goyke E et al. Enhanced Citrate Synthase Activity in Human Pancreatic Cancer. *Pancreas* 2005; 30(2):99–104.
45. Simonnet H. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23(5):759–768.
46. Lin C-C, Cheng T-L, Tsai W-H et al. Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy. *Sci. Rep.* 2012; 2(1):785.
47. Singh KK, Desouki MM, Franklin RB, Costello LC. Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues. *Mol. Cancer* 2006; 5:14.
48. Ternette N, Yang M, Laroyia M et al. Inhibition of Mitochondrial Aconitase by Succination in Fumarate Hydratase Deficiency. *Cell Rep.* 2013; 3(3):689–700.
49. Wang P, Mai C, Wei Y et al. Decreased expression of the mitochondrial metabolic enzyme aconitase (ACO2) is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 2013; 30(2):552.
50. Sjöblom T, Jones S, Wood LD et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314(5797):268–274.
51. Kang MR, Kim MS, Oh JE et al. Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int. J. Cancer* 2009; 125(2):353–355.
52. Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321(5897):1807–1812.
53. Yan H, Parsons DW, Jin G et al. *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(8):765–773.
54. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(11):1058–1066.
55. Borger DR, Goyal L, Yau T et al. Circulating oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a potential surrogate biomarker in patients with isocitrate dehydrogenase-mutant intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2014; 20(7):1884–1890.
56. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000; 287(5454):848–851.
57. Ricketts C, Woodward ER, Killick P et al. Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2008; 100(17):1260–1262.
58. Janeway KA, Kim SY, Lodish M et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108(1):314–318.
59. Kim S, Kim DH, Jung W-H, Koo JS. Succinate dehydrogenase expression in breast cancer. *SpringerPlus* 2013; 2(1):299.
60. Tomlinson IPM, Alam NA, Rowan AJ et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat. Genet.* 2002; 30(4):406–410.
61. Castro-Vega LJ, Buffet A, De Cubas AA et al. Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum. Mol. Genet.* 2014; 23(9):2440–2446.
62. Sudarshan S, Shanmugasundaram K, Naylor SL et al. Reduced Expression of Fumarate Hydratase in Clear Cell Renal Cancer Mediates HIF-2 $\alpha$  Accumulation and Promotes Migration and Invasion. *PLoS ONE* 2011; 6(6):e21037.
63. Fieuw A, Kumps C, Schramm A et al. Identification of a novel recurrent 1q42.2-1qter deletion in high risk MYCN single copy 11q deleted neuroblastomas. *Int. J. Cancer* 2012; 130(11):2599–2606.
64. Khalil AA, James P. Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling. *Cancer Sci.* 2007; 98(2):201–213.
65. Moreadith RW, Lehninger AL. The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)<sup>+</sup>-dependent malic enzyme. *J. Biol. Chem.* 1984; 259(10):6215–6221.
66. Ren J-G, Seth P, Everett P et al. Induction of erythroid differentiation in human erythroleukemia cells by depletion of malic enzyme 2. *PloS One* 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012520.
67. Her YF, Maher LJ. Succinate Dehydrogenase Loss in Familial Paraganglioma: Biochemistry, Genetics, and Epigenetics. *Int. J. Endocrinol.* 2015; 2015:1–14.
68. Pawlu C, Bausch B, Neumann HPH. Mutations of the SDHB and SDHD genes. *Fam. Cancer* 2005; 4(1):49–54.
69. Elbehti-Green A, Au HC, Mascarello JT et al. Characterization of the human SDHC gene encoding one of the integral membrane proteins of succinate-quinone oxidoreductase in mitochondria. *Gene* 1998; 213(1–2):133–140.
70. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 2010; 10(4):393–401.
71. Yankovskaya V. Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science* 2003; 299(5607):700–704.
72. Sun F, Huo X, Zhai Y et al. Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell* 2005; 121(7):1043–1057.

73. Silkin Y, Oyedotun KS, Lemire BD. The role of Sdh4p Tyr-89 in ubiquinone reduction by the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2007; 1767(2):143–150.
74. Aldera AP, Govender D. Gene of the month: SDH. *J. Clin. Pathol.* 2018; 71(2):95–97.
75. Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G et al. SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat. Genet.* 2009; 41(6):654–656.
76. Hao H-X, Khalimonchuk O, Schraders M et al. SDH5, a Gene Required for Flavination of Succinate Dehydrogenase, Is Mutated in Paraganglioma. *Science* 2009; 325(5944):1139–1142.
77. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2016; 1857(8):1086–1101.
78. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005; 7(1):77–85.
79. Letouzé E, Martinelli C, Lorient C et al. SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell* 2013; 23(6):739–752.
80. Sulkowski PL, Oeck S, Dow J et al. Oncometabolites suppress DNA repair by disrupting local chromatin signalling. *Nature* 2020; 582(7813):586–591.
81. Hoekstra AS, Bayley J-P. The role of complex II in disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2013; 1827(5):543–551.
82. Parfait B, Chretien D, Rötig A et al. Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Hum. Genet.* 2000; 106(2):236–243.
83. Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B et al. Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene. *Ann. Neurol.* 2000; 48(3):330–335.
84. Levitas A, Muhammad E, Harel G et al. Familial neonatal isolated cardiomyopathy caused by a mutation in the flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 2010; 18(10):1160–1165.
85. Ni Y, Zbuk KM, Sadler T et al. Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; 83(2):261–268.
86. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014; 515(7527):431–435.
87. Mills EL, Kelly B, Logan A et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* 2016; 167(2):457–470.e13.
88. Gill AJ, Hes O, Papatomas T et al. Succinate Dehydrogenase (SDH)-deficient Renal Carcinoma: A Morphologically Distinct Entity A Clinicopathologic Series of 36 Tumors From 27 Patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 2014; 38(12):1588–1602.
89. Ibrahim A, Chopra S. Succinate Dehydrogenase-Deficient Gastrointestinal Stromal Tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2020; 144(5):655–660.
90. Xekouki P, Pacak K, Almeida M et al. Succinate Dehydrogenase (SDH) D Subunit (SDHD) Inactivation in a Growth-Hormone-Producing Pituitary Tumor: A New Association for SDH? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97(3):E357–E366.
91. Schimke RN, Collins DL, Stolle CA. Paraganglioma, neuroblastoma, and a SDHB mutation: Resolution of a 30-year-old mystery. *Am. J. Med. Genet. A.* 2010:n/a-n/a.
92. Grogan RH, Pacak K, Pasche L et al. Bilateral Adrenal Medullary Hyperplasia Associated With an *SDHB* Mutation. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(8):e200–e202.
93. Galera-Ruiz H, Gonzalez-Campora R, Rey-Barrera M et al. W43X SDHD mutation in sporadic head and neck paraganglioma. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2008; 30(2):119–123.
94. Castro-Vega LJ, Lepoutre-Lussey C, Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J. Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective. *Oncogene* 2016; 35(9):1080–1089.
95. Buffet A, Burnichon N, Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P. An overview of 20 years of genetic studies in pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020; 34(2):101416.
96. WHO classification of tumours of endocrine organs, 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017.
97. Anderson GH, Blakeman N, Streeten DH. The effect of age on prevalence of secondary forms of hypertension in 4429 consecutively referred patients. *J. Hypertens.* 1994; 12(5):609–615.
98. Arton M, Juan CS, Avruskin TW. Pheochromocytoma: clinical observations from a Brooklyn tertiary hospital. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* 2000; 6(3):249–252.
99. Lenders JWM, Kerstens MN, Amar L et al. Genetics, diagnosis, management and future directions of research of phaeochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension. *J. Hypertens.* 2020; 38(8):1443–1456.
100. Omura M, Saito J, Yamaguchi K et al. Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 2004; 27(3):193–202.
101. Sinclair AM, Isles CG, Brown I et al. Secondary hypertension in a blood pressure clinic. *Arch. Intern. Med.* 1987; 147(7):1289–1293.
102. Stenström G, Svärdsudd K. Pheochromocytoma in Sweden 1958–1981. An analysis of the National Cancer Registry Data. *Acta Med. Scand.* 1986; 220(3):225–232.
103. Beard CM, Sheps SG, Kurland LT et al. Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin. Proc.* 1983; 58(12):802–804.
104. Baysal BE. Hereditary paraganglioma targets diverse paraganglia. *J. Med. Genet.* 2002; 39(9):617–622.

105. Manger WM. An overview of pheochromocytoma: history, current concepts, vagaries, and diagnostic challenges. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1073:1–20.
106. Ciftci AO, Tanyel FC, Senocak ME, Büyükpamukçu N. Pheochromocytoma in children. *J. Pediatr. Surg.* 2001; 36(3):447–452.
107. McNeil AR, Blok BH, Koelmeyer TD et al. Pheochromocytomas discovered during coronial autopsies in Sydney, Melbourne and Auckland. *Aust. N. Z. J. Med.* 2000; 30(6):648–652.
108. Lo CY, Lam KY, Wat MS, Lam KS. Adrenal pheochromocytoma remains a frequently overlooked diagnosis. *Am. J. Surg.* 2000; 179(3):212–215.
109. Bronner-Fraser M, Fraser SE. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 1988; 335(6186):161–164.
110. Bronner ME, LeDouarin NM. Development and evolution of the neural crest: An overview. *Dev. Biol.* 2012; 366(1):2–9.
111. Adams MS, Bronner-Fraser M. Review: The Role of Neural Crest Cells in the Endocrine System. *Endocr. Pathol.* 2009; 20(2):92–100.
112. Burnichon N, Rohmer V, Amar L et al. The succinate dehydrogenase genetic testing in a large prospective series of patients with paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94(8):2817–2827.
113. Henry JP, Botton D, Sagne C et al. Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *J. Exp. Biol.* 1994; 196:251–262.
114. Schulz C, Eisenhofer G, Lehnert H. Principles of Catecholamine Biosynthesis, Metabolism and Release. In Lehnert H (ed): *Front. Horm. Res.*, Basel: KARGER, 2003; 31:1–25.
115. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol. Rev.* 2004; 56(3):331–349.
116. Berends, Eisenhofer, Fishbein et al. Intricacies of the Molecular Machinery of Catecholamine Biosynthesis and Secretion by Chromaffin Cells of the Normal Adrenal Medulla and in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancers* 2019; 11(8):1121.
117. Favier J, Amar L, Gimenez-Roqueplo A-P. Paraganglioma and pheochromocytoma: from genetics to personalized medicine. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015; 11(2):101–111.
118. Dahia PLM. Pheochromocytomas and Paragangliomas, Genetically Diverse and Minimalist, All at Once! *Cancer Cell* 2017; 31(2):159–161.
119. Cascón A, Remacha L, Calsina B, Robledo M. Pheochromocytomas and Paragangliomas: Bypassing Cellular Respiration. *Cancers* 2019; 11(5):683.
120. Crona J, Lamarca A, Ghosal S et al. Genotype–phenotype correlations in pheochromocytoma and paraganglioma: a systematic review and individual patient meta-analysis. *Endocr. Relat. Cancer* 2019; 26(5):539–550.
121. Brito JP, Asi N, Bancos I et al. Testing for germline mutations in sporadic pheochromocytoma/paraganglioma: a systematic review. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2015; 82(3):338–345.
122. Crona J, Taïeb D, Pacak K. New Perspectives on Pheochromocytoma and Paraganglioma: Toward a Molecular Classification. *Endocr. Rev.* 2017; 38(6):489–515.
123. Fishbein L, Leshchiner I, Walter V et al. Comprehensive Molecular Characterization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancer Cell* 2017; 31(2):181–193.
124. Antonio K, Valdez MMN, Mercado-Asis L et al. Pheochromocytoma/paraganglioma: recent updates in genetics, biochemistry, immunohistochemistry, metabolomics, imaging and therapeutic options. *Gland Surg.* 2020; 9(1):105–123.
125. Currás-Freixes M, Piñeiro-Yañez E, Montero-Conde C et al. PheoSeq: A Targeted Next-Generation Sequencing Assay for Pheochromocytoma and Paraganglioma Diagnostics. *J. Mol. Diagn. JMD* 2017; 19(4):575–588.
126. Ben Aim L, Pigny P, Castro-Vega LJ et al. Targeted next-generation sequencing detects rare genetic events in pheochromocytoma and paraganglioma. *J. Med. Genet.* 2019; 56(8):513–520.
127. Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int. J. Cancer* 2014; 135(10):2237–2248.
128. Burnichon N, Mazzella J-M, Drui D et al. Risk assessment of maternally inherited SDHD paraganglioma and pheochromocytoma. *J. Med. Genet.* 2017; 54(2):125–133.
129. Neumann HPH, Bausch B, McWhinney SR et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346(19):1459–1466.
130. Benn DE, Gimenez-Roqueplo A-P, Reilly JR et al. Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91(3):827–836.
131. Amar L, Bertherat J, Baudin E et al. Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2005; 23(34):8812–8818.
132. Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J, Rustin P et al. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res.* 2003; 63(17):5615–5621.
133. Buffet A, Ben Aim L, Leboulleux S et al. Positive Impact of Genetic Test on the Management and Outcome of Patients With Paraganglioma and/or Pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; 104(4):1109–1118.
134. Hescot S, Currás-Freixes M, Deutschbein T et al. Prognosis of Malignant Pheochromocytoma and Paraganglioma (MAPP-Prone Study): A European Network for the Study of Adrenal Tumors Retrospective Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; 104(6):2367–2374.
135. van der Tuin K, Mensenkamp AR, Tops CMJ et al. Clinical Aspects of SDHA-Related Pheochromocytoma and Paraganglioma: A Nationwide Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018; 103(2):438–445.
136. Kunst HPM, Rutten MH, de Mönink J-P et al. SDHAF2 (PGL2-SDH5) and hereditary head and neck paraganglioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2011; 17(2):247–254.



137. Bausch B, Schiavi F, Ni Y et al. Clinical Characterization of the Pheochromocytoma and Paraganglioma Susceptibility Genes *SDHA*, *TMEM127*, *MAX*, and *SDHAF2* for Gene-Informed Prevention. *JAMA Oncol.* 2017; 3(9):1204.
138. Zhuang Z, Yang C, Lorenzo F et al. Somatic *HIF2A* Gain-of-Function Mutations in Paraganglioma with Polycythemia. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(10):922–930.
139. Buffet A, Smati S, Mansuy L et al. Mosaicism in HIF2A-related polycythemia-paraganglioma syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(2):E369–373.
140. Comino-Méndez I, de Cubas AA, Bernal C et al. Tumoral EPAS1 (HIF2A) mutations explain sporadic pheochromocytoma and paraganglioma in the absence of erythrocytosis. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22(11):2169–2176.
141. Vaidya A, Flores SK, Cheng Z-M et al. EPAS1 Mutations and Paragangliomas in Cyanotic Congenital Heart Disease. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(13):1259–1261.
142. Ladroue C, Carcenac R, Leporrier M et al. PHD2 mutation and congenital erythrocytosis with paraganglioma. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359(25):2685–2692.
143. Yang C, Zhuang Z, Flidner SMJ et al. Germ-line PHD1 and PHD2 mutations detected in patients with pheochromocytoma/paraganglioma-polycythemia. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 2015; 93(1):93–104.
144. Képénékian L, Mognetti T, Lifante J-C et al. Interest of systematic screening of pheochromocytoma in patients with neurofibromatosis type 1. *Eur. J. Endocrinol.* 2016; 175(4):335–344.
145. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86(12):5658–5671.
146. Yao L, Schiavi F, Cascon A et al. Spectrum and prevalence of FP/TMEM127 gene mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *JAMA* 2010; 304(23):2611–2619.
147. Toledo SPA, Lourenço DM, Sekiya T et al. Penetrance and clinical features of pheochromocytoma in a six-generation family carrying a germline TMEM127 mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; 100(2):E308–318.
148. Castro-Vega LJ, Letouzé E, Burnichon N et al. Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nat. Commun.* 2015; 6(1):6044.
149. Crona J, Delgado Verdugo A, Maharjan R et al. Somatic Mutations in H-RAS in Sporadic Pheochromocytoma and Paraganglioma Identified by Exome Sequencing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98(7):E1266–E1271.
150. Oudijk L, de Krijger RR, Rapa I et al. H-RAS Mutations Are Restricted to Sporadic Pheochromocytomas Lacking Specific Clinical or Pathological Features: Data From a Multi-Institutional Series. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(7):E1376–E1380.
151. Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat. Genet.* 2011; 43(7):663–667.
152. Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000; 16:653–699.
153. Burnichon N, Cascón A, Schiavi F et al. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2012; 18(10):2828–2837.
154. Pang Y, Gupta G, Yang C et al. A novel splicing site IRP1 somatic mutation in a patient with pheochromocytoma and JAK2V617F positive polycythemia vera: a case report. *BMC Cancer* 2018; 18(1):286.
155. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW. Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  expression in iron deficiency. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007; 14(5):420–426.
156. Wilkinson N, Pantopoulos K. IRP1 regulates erythropoiesis and systemic iron homeostasis by controlling HIF2 $\alpha$  mRNA translation. *Blood* 2013; 122(9):1658–1668.
157. Cascón A, Comino-Méndez I, Currás-Freixes M et al. Whole-exome sequencing identifies MDH2 as a new familial paraganglioma gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015. doi:10.1093/jnci/djv053.
158. Calsina B, Currás-Freixes M, Buffet A et al. Role of MDH2 pathogenic variant in pheochromocytoma and paraganglioma patients. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 2018; 20(12):1652–1662.
159. Remacha L, Comino-Méndez I, Richter S et al. Targeted Exome Sequencing of Krebs Cycle Genes Reveals Candidate Cancer-Predisposing Mutations in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2017; 23(20):6315–6324.
160. Buffet A, Morin A, Castro-Vega L-J et al. Germline Mutations in the Mitochondrial 2-Oxoglutarate/Malate Carrier SLC25A11 Gene Confer a Predisposition to Metastatic Paragangliomas. *Cancer Res.* 2018; 78(8):1914–1922.
161. Remacha L, Pirman D, Mahoney CE et al. Recurrent Germline DLST Mutations in Individuals with Multiple Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Am. J. Hum. Genet.* 2019; 104(4):651–664.
162. Toledo RA, Qin Y, Cheng Z-M et al. Recurrent Mutations of Chromatin-Remodeling Genes and Kinase Receptors in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2016; 22(9):2301–2310.
163. Remacha L, Currás-Freixes M, Torres-Ruiz R et al. Gain-of-function mutations in DNMT3A in patients with paraganglioma. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 2018; 20(12):1644–1651.
164. Schlisio S, Kenchappa RS, Vredeveld LCW et al. The kinesin KIF1B $\beta$  acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev.* 2008; 22(7):884–893.
165. Welander J, Andreasson A, Juhlin CC et al. Rare germline mutations identified by targeted next-generation sequencing of susceptibility genes in pheochromocytoma and paraganglioma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(7):E1352–1360.
166. Plouin PF, Degoulet P, Tugayé A et al. [Screening for phaeochromocytoma : in which hypertensive patients? A semiological study of 2585 patients, including 11 with phaeochromocytoma (author's transl)]. *Nouv. Presse Med.* 1981; 10(11):869–872.
167. Amar L, Eisenhofer G. Diagnosing phaeochromocytoma/paraganglioma in a patient presenting with critical illness: biochemistry versus imaging. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2015; 83(3):298–302.

168. Beilan JA, Lawton A, Hajdenberg J, Rosser CJ. Pheochromocytoma of the urinary bladder: a systematic review of the contemporary literature. *BMC Urol.* 2013; 13(1):22.
169. Suárez C, Rodrigo JP, Bödeker CC et al. Jugular and vagal paragangliomas: Systematic study of management with surgery and radiotherapy. *Head Neck* 2013; 35(8):1195–1204.
170. Benn DE, Robinson BG, Clifton-Bligh RJ. 15 YEARS OF PARAGANGLIOMA: Clinical manifestations of paraganglioma syndromes types 1-5. *Endocr. Relat. Cancer* 2015; 22(4):T91-103.
171. Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G et al. Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(6):1915–1942.
172. Fassnacht M, Assie G, Baudin E et al. Adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2020; 31(11):1476–1490.
173. Taïeb D, Visvikis D, Hicks RJ, Pacak K. Molecular Imaging in the Era of Precision Medicine: Paraganglioma as a Template for Understanding Multiple Levels of Analysis. *J. Nucl. Med.* 2020; 61(5):646–648.
174. Taïeb D, Pacak K. Genetic Determinants of Pheochromocytoma and Paraganglioma Imaging Phenotypes. *J. Nucl. Med.* 2020; 61(5):643–645.
175. Taïeb D, Hicks RJ, Hindié E et al. European Association of Nuclear Medicine Practice Guideline/Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Procedure Standard 2019 for radionuclide imaging of pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2019; 46(10):2112–2137.
176. King KS, Chen CC, Alexopoulos DK et al. Functional Imaging of *SDHx*-Related Head and Neck Paragangliomas: Comparison of <sup>18</sup>F-Fluorodihydroxyphenylalanine, <sup>18</sup>F-Fluorodopamine, <sup>18</sup>F-Fluoro-2-Deoxy- D -Glucose PET, <sup>123</sup>I-Metaiodobenzylguanidine Scintigraphy, and <sup>111</sup>In-Pentetreotide Scintigraphy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96(9):2779–2785.
177. Ilias I, Chen CC, Carrasquillo JA et al. Comparison of 6-18F-Fluorodopamine PET with 123I-Metaiodobenzylguanidine and 111In-Pentetreotide Scintigraphy in Localization of Nonmetastatic and Metastatic Pheochromocytoma. *J. Nucl. Med.* 2008; 49(10):1613–1619.
178. Koopmans KP, Jager PL, Kema IP et al. 111In-Octreotide Is Superior to 123I-Metaiodobenzylguanidine for Scintigraphic Detection of Head and Neck Paragangliomas. *J. Nucl. Med.* 2008; 49(8):1232–1237.
179. Wild D, Mäcke HR, Waser B et al. 68Ga-DOTANOC: a first compound for PET imaging with high affinity for somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2005; 32(6):724–724.
180. Hofman MS, Lau WFE, Hicks RJ. Somatostatin Receptor Imaging with <sup>68</sup>Ga DOTATATE PET/CT: Clinical Utility, Normal Patterns, Pearls, and Pitfalls in Interpretation. *RadioGraphics* 2015; 35(2):500–516.
181. Kroiss A, Shulkin BL, Uprimny C et al. 68Ga-DOTATOC PET/CT provides accurate tumour extent in patients with extraadrenal paraganglioma compared to 123I-MIBG SPECT/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2015; 42(1):33–41.
182. Treglia G, Cocciolillo F, de Waure C et al. Diagnostic performance of 18F-dihydroxyphenylalanine positron emission tomography in patients with paraganglioma: a meta-analysis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2012; 39(7):1144–1153.
183. Hoegerle S, Ghanem N, Althoefer C et al. 18F-DOPA positron emission tomography for the detection of glomus tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2003; 30(5):689–694.
184. Imani F, Agopian VG, Auerbach MS et al. 18F-FDOPA PET and PET/CT Accurately Localize Pheochromocytomas. *J. Nucl. Med.* 2009; 50(4):513–519.
185. Garrigue P, Bodin-Hullin A, Balasse L et al. The Evolving Role of Succinate in Tumor Metabolism: An <sup>18</sup>F-FDG–Based Study. *J. Nucl. Med.* 2017; 58(11):1749–1755.
186. Taïeb D, Pacak K. New Insights into the Nuclear Imaging Phenotypes of Cluster 1 Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Trends Endocrinol. Metab.* 2017; 28(11):807–817.
187. de Jong WH, Graham KS, van der Molen JC et al. Plasma Free Metanephrine Measurement Using Automated Online Solid-Phase Extraction HPLC–Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 2007; 53(9):1684–1693.
188. Eisenhofer G, Peitzsch M, McWhinney BC. Impact of LC-MS/MS on the laboratory diagnosis of catecholamine-producing tumors. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016; 84:106–116.
189. Boyle JG, Davidson DF, Pery CG, Connell JMC. Comparison of Diagnostic Accuracy of Urinary Free Metanephrines, Vanillyl Mandelic Acid, and Catecholamines and Plasma Catecholamines for Diagnosis of Pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92(12):4602–4608.
190. Eisenhofer G, Prejbisz A, Peitzsch M et al. Biochemical Diagnosis of Chromaffin Cell Tumors in Patients at High and Low Risk of Disease: Plasma versus Urinary Free or Deconjugated O-Methylated Catecholamine Metabolites. *Clin. Chem.* 2018; 64(11):1646–1656.
191. Chen Y, Xiao H, Zhou X et al. Accuracy of Plasma Free Metanephrines in the Diagnosis of Pheochromocytoma and Paraganglioma: a Systematic Review and Meta-analysis. *Endocr. Pract.* 2017; 23(10):1169–1177.
192. Eisenhofer G, Peitzsch M, Kaden D et al. Reference intervals for LC-MS/MS measurements of plasma free, urinary free and urinary acid-hydrolyzed deconjugated normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine. *Clin. Chim. Acta* 2019; 490:46–54.
193. Därr R, Lenders J, Stange K et al. Die Diagnose des Phäochromozytoms und Paraganglioms. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* 2013; 138(03):76–81.
194. Marotta V, Zatelli MC, Sciammarella C et al. Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame. *Endocr. Relat. Cancer* 2018; 25(1):R11–R29.
195. Andersen KF, Altaf R, Krarup-Hansen A et al. Malignant pheochromocytomas and paragangliomas – The importance of a multidisciplinary approach. *Cancer Treat. Rev.* 2011; 37(2):111–119.
196. Yang X, Yang Y, Li Z et al. Diagnostic Value of Circulating Chromogranin A for Neuroendocrine Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 2015; 10(4):e0124884.

197. Bilek R, Safarik L, Ciprova V et al. Chromogranin A, a member of neuroendocrine secretory proteins as a selective marker for laboratory diagnosis of pheochromocytoma. *Physiol. Res.* 2008; 57 Suppl 1:S171-179.
198. d'Herbomez M, Gouze V, Huglo D et al. Chromogranin A assay and (131)I-MIBG scintigraphy for diagnosis and follow-up of pheochromocytoma. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 2001; 42(7):993-997.
199. Bilek, Vlček, Šafařík et al. Chromogranin A in the Laboratory Diagnosis of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancers* 2019; 11(4):586.
200. Bilek R, Zelinka T, Vlček P et al. Radioimmunoassay of Chromogranin A and Free Metanephrines in Diagnosis of Pheochromocytoma. *Physiol. Res.* 2017:S397-S408.
201. de Wailly P, Oragano L, Radé F et al. Malignant pheochromocytoma: new malignancy criteria. *Langenbecks Arch. Surg.* 2012; 397(2):239-246.
202. Thompson LDR. Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score (PASS) to Separate Benign From Malignant Neoplasms: A Clinicopathologic and Immunophenotypic Study of 100 Cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 2002; 26(5):551-566.
203. Kimura N, Takekoshi K, Naruse M. Risk Stratification on Pheochromocytoma and Paraganglioma from Laboratory and Clinical Medicine. *J. Clin. Med.* 2018; 7(9):242.
204. Nastos C, Yiallourou A, Kotsis T et al. Immunohistochemical expression patterns of S100, synaptophysin, chromogranin A and neuron specific enolase in predicting malignant behaviour in paragangliomas. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* 2018; 23(5):1540-1545.
205. Feng N, Zhang W-Y, Wu X-T. Clinicopathological analysis of paraganglioma with literature review. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(24):3003.
206. Johnson TL, Zarbo RJ, Lloyd RV, Crissman JD. Paragangliomas of the head and neck: immunohistochemical neuroendocrine and intermediate filament typing. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 1988; 1(3):216-223.
207. Dermawan JK, Mukhopadhyay S, Shah AA. Frequency and extent of cytokeratin expression in paraganglioma: an immunohistochemical study of 60 cases from 5 anatomic sites and review of the literature. *Hum. Pathol.* 2019; 93:16-22.
208. Strong VE, Kennedy T, Al-Ahmadie H et al. Prognostic indicators of malignancy in adrenal pheochromocytomas: clinical, histopathologic, and cell cycle/apoptosis gene expression analysis. *Surgery* 2008; 143(6):759-768.
209. Unger P, Hoffman K, Pertsemlidis D et al. S100 protein-positive sustentacular cells in malignant and locally aggressive adrenal pheochromocytomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1991; 115(5):484-487.
210. Achilles E, Padberg B-C, Holl K et al. Immunocytochemistry of paragangliomas?value of staining for S-100 protein and glial fibrillary acid protein in diagnosis and prognosis. *Histopathology* 1991; 18(5):453-458.
211. Gill AJ. Succinate dehydrogenase (SDH) and mitochondrial driven neoplasia. *Pathology (Phila.)* 2012; 44(4):285-292.
212. Korpershoek E, Favier J, Gaal J et al. SDHA immunohistochemistry detects germline SDHA gene mutations in apparently sporadic paragangliomas and pheochromocytomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96(9):E1472-1476.
213. Oudijk L, Gaal J, de Krijger RR. The Role of Immunohistochemistry and Molecular Analysis of Succinate Dehydrogenase in the Diagnosis of Endocrine and Non-Endocrine Tumors and Related Syndromes. *Endocr. Pathol.* 2019; 30(1):64-73.
214. Udager AM, Magers MJ, Goerke DM et al. The utility of SDHB and FH immunohistochemistry in patients evaluated for hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndromes. *Hum. Pathol.* 2018; 71:47-54.
215. Santi R, Rapizzi E, Canu L et al. Potential Pitfalls of SDH Immunohistochemical Detection in Paragangliomas and Pheochromocytomas Harboring Germline SDHx Gene Mutation. *Anticancer Res.* 2017; 37(2):805-812.
216. Gill AJ. Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient neoplasia. *Histopathology* 2018; 72(1):106-116.
217. Menara M, Oudijk L, Badoual C et al. SDHD Immunohistochemistry: A New Tool to Validate *SDHx* Mutations in Pheochromocytoma/Paraganglioma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; 100(2):E287-E291.
218. Currás-Freixes M, Inglada-Pérez L, Mancikova V et al. Recommendations for somatic and germline genetic testing of single pheochromocytoma and paraganglioma based on findings from a series of 329 patients. *J. Med. Genet.* 2015; 52(10):647-656.
219. Liu L, Li Y, Li S et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012; 2012:1-11.
220. The NGS in PPGL (NGSnPPGL) Study Group, Toledo RA, Burnichon N et al. Consensus Statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary phaeochromocytomas and paragangliomas. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2017; 13(4):233-247.
221. Toledo RA, Dahia PLM. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary pheochromocytoma and paraganglioma syndromes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2015; 22(3):169-179.
222. Wong MY, Andrews KA, Challis BG et al. Clinical Practice Guidance: Surveillance for phaeochromocytoma and paraganglioma in paediatric succinate dehydrogenase gene mutation carriers. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2019; 90(4):499-505.
223. Lussey-Lepoutre C, Bellucci A, Burnichon N et al. Succinate detection using in vivo 1H-MR spectroscopy identifies germline and somatic SDHx mutations in paragangliomas. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2020; 47(6):1510-1517.
224. Wallace PW, Conrad C, Brückmann S et al. Metabolomics, machine learning and immunohistochemistry to predict succinate dehydrogenase mutational status in phaeochromocytomas and paragangliomas. *J. Pathol.* 2020; 251(4):378-387.
225. Rathod R, Gajera B, Nazir K et al. Simultaneous Measurement of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates in Different Biological Matrices Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry; Quantitation and Comparison of TCA Cycle Intermediates in Human Serum, Plasma, Kasumi-1 Cell and Murine Liver Tissue. *Metabolites* 2020; 10(3):103.
226. Martins RG, Gonçalves LG, Cunha N, Bugalho MJ. Metabolomic Urine Profile: Searching for New Biomarkers of SDHx-Associated Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019; 104(11):5467-5477.

227. Stefanidis D, Goldfarb M, Kercher KW et al. SAGES guidelines for minimally invasive treatment of adrenal pathology. *Surg. Endosc.* 2013; 27(11):3960–3980.
228. Vorselaars WMCM, Postma EL, Mirallie E et al. Hemodynamic instability during surgery for pheochromocytoma: comparing the transperitoneal and retroperitoneal approach in a multicenter analysis of 341 patients. *Surgery* 2018; 163(1):176–182.
229. Huang H, Abraham J, Hung E 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):2020–2028.
230. Fishbein L, Ben-Maimon S, Keefe S et al. SDHB mutation carriers with malignant pheochromocytoma respond better to CVD. *Endocr. Relat. Cancer* 2017; 24(8):L51–L55.
231. Gonias S, Goldsby R, Matthay KK et al. Phase II study of high-dose [131I]metaiodobenzylguanidine therapy for patients with metastatic pheochromocytoma and paraganglioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2009; 27(25):4162–4168.
232. Yadav MP, Ballal S, Bal C. Concomitant 177Lu-DOTATATE and capecitabine therapy in malignant paragangliomas. *EJNMMI Res.* 2019; 9(1):13.
233. Vyakaranam AR, Crona J, Norlén O et al. Favorable Outcome in Patients with Pheochromocytoma and Paraganglioma Treated with 177Lu-DOTATATE. *Cancers* 2019; 11(7):909.
234. Makis W, McCann K, McEwan AJB, Sawyer MB. Palliation of Extensive Metastatic Bone Disease With 223Ra-Dichloride  $\alpha$ -Particle Therapy in a Patient With Malignant Hereditary Paraganglioma-Pheochromocytoma Syndrome With SDHB Mutation. *Clin. Nucl. Med.* 2016; 41(2):144–147.
235. Hadoux J, Favier J, Scoazec J-Y et al. *SDHB* mutations are associated with response to temozolomide in patients with metastatic pheochromocytoma or paraganglioma: Temozolomide for Malignant Pheochromocytoma/Paraganglioma. *Int. J. Cancer* 2014; 135(11):2711–2720.
236. O’Kane GM, Ezzat S, Joshua AM et al. A phase 2 trial of sunitinib in patients with progressive paraganglioma or pheochromocytoma: the SNIPP trial. *Br. J. Cancer* 2019; 120(12):1113–1119.
237. Ayala-Ramirez M, Chougnet CN, Habra MA et al. Treatment with Sunitinib for Patients with Progressive Metastatic Pheochromocytomas and Sympathetic Paragangliomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97(11):4040–4050.
238. Fankhauser M, Bechmann N, Lauseker M et al. Synergistic Highly Potent Targeted Drug Combinations in Different Pheochromocytoma Models Including Human Tumor Cultures. *Endocrinology* 2019; 160(11):2600–2617.
239. Oh D-Y, Kim T-W, Park YS et al. Phase 2 study of everolimus monotherapy in patients with nonfunctioning neuroendocrine tumors or pheochromocytomas/paragangliomas: Everolimus in Neuroendocrine Tumors. *Cancer* 2012; 118(24):6162–6170.
240. Caisova V, Li L, Gupta G et al. The Significant Reduction or Complete Eradication of Subcutaneous and Metastatic Lesions in a Pheochromocytoma Mouse Model after Immunotherapy Using Mannan-BAM, TLR Ligands, and Anti-CD40. *Cancers* 2019; 11(5):654.
241. Baudin E, Habra MA, Deschamps F et al. THERAPY OF ENDOCRINE DISEASE: Treatment of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur. J. Endocrinol.* 2014; 171(3):R111–R122.
242. Pang Y, Lu Y, Caisova V et al. Targeting NAD<sup>+</sup>/PARP DNA Repair Pathway as a Novel Therapeutic Approach to SDHB-Mutated Cluster I Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2018; 24(14):3423–3432.
243. Bayley J-P, Devilee P. Advances in paraganglioma–pheochromocytoma cell lines and xenografts. *Endocr. Relat. Cancer* 2020; 27(12):R433–R450.
244. Martinelli S, Maggi M, Rapizzi E. Pheochromocytoma/paraganglioma preclinical models: which to use and why? *Endocr. Connect.* 2020; 9(12):R251–R260.
245. Lussey-Lepoutre C, Buffet A, Morin A et al. Rodent models of pheochromocytoma, parallels in rodent and human tumorigenesis. *Cell Tissue Res.* 2018; 372(2):379–392.
246. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1976; 73(7):2424–2428.
247. Stuschke M, Budach V, Stüben G et al. Heterogeneity in the fractionation sensitivities of human tumor cell lines: Studies in a three-dimensional model system. *Int. J. Radiat. Oncol.* 1995; 32(2):395–408.
248. Florio R, De Lellis L, di Giacomo V et al. Effects of PPAR $\alpha$  inhibition in head and neck paraganglioma cells. *PLOS ONE* 2017; 12(6):e0178995.
249. Pfragner R, Behmel A, Smith DP et al. First continuous human pheochromocytoma cell line: KNA. Biological, cytogenetic and molecular characterization of KNA cells. *J. Neurocytol.* 1998; 27(3):175–186.
250. Venihaki M, Ain K, Dermitzaki E et al. KAT45, a Noradrenergic Human Pheochromocytoma Cell Line Producing Corticotropin-Releasing Hormone\*. *Endocrinology* 1998; 139(2):713–722.
251. Ghayee HK, Bhagwandin VJ, Stastny V et al. Progenitor Cell Line (hPheo1) Derived from a Human Pheochromocytoma Tumor. *PLoS ONE* 2013; 8(6):e65624.
252. Jacks T, Shih TS, Schmitt EM et al. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat. Genet.* 1994; 7(3):353–361.
253. Powers JF, Evinger MJ, Tsokas P et al. Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice. *Cell Tissue Res.* 2000; 302(3):309–320.
254. Martiniova L, Lai EW, Elkahlon AG et al. Characterization of an animal model of aggressive metastatic pheochromocytoma linked to a specific gene signature. *Clin. Exp. Metastasis* 2009; 26(3):239–250.

255. Letouzé E, Martinelli C, Lorient C et al. SDH Mutations Establish a Hypermethylator Phenotype in Paraganglioma. *Cancer Cell* 2013; 23(6):739–752.
256. Lussey-Lepoutre C, Hollinshead KER, Ludwig C et al. Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism. *Nat. Commun.* 2015; 6(1):8784.
257. Moog S, Goncalves J, Menara M et al. Reprogrammation de la matrice extra-cellulaire dans les phéochromocytomes et paragangliomes SDHB-dépendants. *Ann. Endocrinol.* 2020; 81(4):172.
258. Díaz-Castro B, Pintado CO, García-Flores P et al. Differential impairment of catecholaminergic cell maturation and survival by genetic mitochondrial complex II dysfunction. *Mol. Cell. Biol.* 2012; 32(16):3347–3357.
259. Powers JF, Cochran B, Baleja JD et al. A xenograft and cell line model of SDH-deficient pheochromocytoma derived from Sdhb+/- rats. *Endocr. Relat. Cancer* 2020; 27(6):337–354.
260. Budach W, Budach V, Stuschke M et al. The TCD50 and regrowth delay assay in human tumor xenografts: Differences and implications. *Int. J. Radiat. Oncol.* 1993; 25(2):259–268.
261. Powers JF, Pacak K, Tischler AS. Pathology of Human Pheochromocytoma and Paraganglioma Xenografts in NSG Mice. *Endocr. Pathol.* 2017; 28(1):2–6.
262. Verginelli F, Perconti S, Vespa S et al. Paragangliomas arise through an autonomous vasculo-angio-neurogenic program inhibited by imatinib. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2018; 135(5):779–798.
263. Powers JF, Cochran B, Baleja JD et al. A unique model for SDH-deficient GIST: an endocrine-related cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2018; 25(11):943–954.
264. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 2012; 337(6096):816–821.
265. Tremblay JP. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *médecine/sciences* 2015; 31(11):1014–1022.
266. Dona M, Waaijers S, Richter S et al. Loss of sdhb in zebrafish larvae recapitulates human paraganglioma characteristics. *Endocr. Relat. Cancer* 2021; 28(1):65–77.
267. Lepoutre-Lussey C, Thibault C, Buffet A et al. From Nf1 to Sdhb knockout: Successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016; 421:40–48.
268. Kitazawa S, Ebara S, Ando A et al. Succinate dehydrogenase B-deficient cancer cells are highly sensitive to bromodomain and extra-terminal inhibitors. *Oncotarget* 2017; 8(17):28922–28938.
269. Røslund GV, Dyrstad SE, Tusubira D et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is associated with attenuation of succinate dehydrogenase (SDH) in breast cancer through reduced expression of SDHC. *Cancer Metab.* 2019; 7:6.
270. Bezawork-Geleta A, Dong L, Rohlena J, Neuzil J. The Assembly Factor SDHAF2 Is Dispensable for Flavination of the Catalytic Subunit of Mitochondrial Complex II in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(41):21414–21420.
271. Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J, Rustin P et al. Functional Consequences of a *SDHB* Gene Mutation in an Apparently Sporadic Pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87(10):4771–4774.
272. Saxena N, Maio N, Crooks DR et al. SDHB-Deficient Cancers: The Role of Mutations That Impair Iron Sulfur Cluster Delivery. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016; 108(1):d1v287.
273. Chung K-F, Sicard F, Vukicevic V et al. Isolation of Neural Crest Derived Chromaffin Progenitors from Adult Adrenal Medulla. *Stem Cells* 2009; 27(10):2602–2613.
274. Moog S, Lussey-Lepoutre C, Favier J. Epigenetic and metabolic reprogramming of SDH-deficient paragangliomas. *Endocr. Relat. Cancer* 2020; 27(12):R451–R463.
275. Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P. Pheochromocytomas: The (pseudo)-hypoxia hypothesis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 24(6):957–968.
276. Jimenez C, Fazeli S, Román-Gonzalez A. Antiangiogenic therapies for pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr. Relat. Cancer* 2020; 27(7):R239–R254.
277. Papadopoulos KP, Jonasch E, Zojwalla NJ et al. A first-in-human phase 1 dose-escalation trial of the oral HIF-2α inhibitor PT2977 in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2018; 36(15\_suppl):2508–2508.
278. Agger K, Christensen J, Cloos PA, Helin K. The emerging functions of histone demethylases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2008; 18(2):159–168.
279. Cervera AM, Bayley J-P, Devilee P, McCreath KJ. Inhibition of succinate dehydrogenase dysregulates histone modification in mammalian cells. *Mol. Cancer* 2009; 8(1):89.
280. Wedekind MF, Del Rivero J, Arnaldez FI et al. A phase II trial of the DNA methyl transferase inhibitor, SGI-110 (Guadecitabine), in children and adults with SDH-deficient GIST, pheochromocytoma, and paraganglioma, and HLRCC-associated kidney cancer. *J. Clin. Oncol.* 2020; 38(15\_suppl):11540–11540.
281. Martiniova L, Perera SM, Brouwers FM et al. Increased uptake of [123I]meta-iodobenzylguanidine, [18F]fluorodopamine, and [3H]norepinephrine in mouse pheochromocytoma cells and tumors after treatment with the histone deacetylase inhibitors. *Endocr. Relat. Cancer* 2011; 18(1):143–157.
282. Sulkowski PL, Sundaram RK, Oeck S et al. Krebs-cycle-deficient hereditary cancer syndromes are defined by defects in homologous-recombination DNA repair. *Nat. Genet.* 2018; 50(8):1086–1092.
283. Touat M, Sourisseau T, Dorvault N et al. DNA repair deficiency sensitizes lung cancer cells to NAD<sup>+</sup> biosynthesis blockade. *J. Clin. Invest.* 2018; 128(4):1671–1687.
284. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010; 70(2):440–446.
285. Gazdar AF, Oie HK. Re: Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium. *Cancer Res.* 1986; 46(11):6011–6012.

286. Klučková K, Thakker A, Vettore L et al. Succinate dehydrogenase deficiency in a chromaffin cell model retains metabolic fitness through the maintenance of mitochondrial NADH oxidoreductase function. *FASEB J.* 2020; 34(1):303–315.
287. Molina JR, Sun Y, Protopopova M et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat. Med.* 2018; 24(7):1036–1046.
288. Thakur S, Daley B, Klubo-Gwiedzinska J. The role of an anti-diabetic drug metformin in the treatment of endocrine tumors. *J. Mol. Endocrinol.* 2019; 63(2):R17–R35.
289. Selak MA, Durán RV, Gottlieb E. Redox stress is not essential for the pseudo-hypoxic phenotype of succinate dehydrogenase deficient cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2006; 1757(5–6):567–572.
290. Liu Y, Pang Y, Zhu B et al. Therapeutic Targeting of *SDHB*-Mutated Pheochromocytoma/Paranglioma with Pharmacologic Ascorbic Acid. *Clin. Cancer Res.* 2020; 26(14):3868–3880.
291. Biomarkers in risk assessment: validity and validation, Geneva: World Health Organization, 2001.
292. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.* 2012; 6(2):140–146.
293. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl. Cancer Res.* 2015; 4(3):256–269.
294. Parkinson DR, McCormack RT, Keating SM et al. Evidence of Clinical Utility: An Unmet Need in Molecular Diagnostics for Patients with Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20(6):1428–1444.
295. Poste G. Bring on the biomarkers. *Nature* 2011; 469(7329):156–157.
296. Andrews KA, Ascher DB, Pires DEV et al. Tumour risks and genotype–phenotype correlations associated with germline variants in succinate dehydrogenase subunit genes *SDHB*, *SDHC* and *SDHD*. *J. Med. Genet.* 2018; 55(6):384–394.
297. Heesterman BL, Bayley JP, Tops CM et al. High prevalence of occult paragangliomas in asymptomatic carriers of *SDHD* and *SDHB* gene mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21(4):469–470.
298. Saie C, Buffet A, Abeillon J et al. Screening of a large cohort of asymptomatic *SDHx* mutation carriers in routine practice. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020:dga888.
299. Amar L, Fassnacht M, Gimenez-Roqueplo A-P et al. Long-term Postoperative Follow-up in Patients with Apparently Benign Pheochromocytoma and Paranglioma. *Horm. Metab. Res.* 2012; 44(05):385–389.
300. Dwight T, Kim E, Novos T, Clifton-Bligh RJ. Metabolomics in the Diagnosis of Pheochromocytoma and Paranglioma. *Horm. Metab. Res.* 2019; 51(07):443–450.
301. Janin M, Mylonas E, Saada V et al. Serum 2-Hydroxyglutarate Production in *IDH1* - and *IDH2* -Mutated De Novo Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32(4):297–305.
302. Willekens C, Renneville A, Broutin S et al. Mutational profiling of isolated myeloid sarcomas and utility of serum 2HG as biomarker of *IDH1/2* mutations. *Leukemia* 2018; 32(9):2008–2081.
303. Richter S, Peitzsch M, Rapizzi E et al. Krebs Cycle Metabolite Profiling for Identification and Stratification of Pheochromocytomas/Parangliomas due to Succinate Dehydrogenase Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(10):3903–3911.
304. Lendvai N, Pawlosky R, Bullova P et al. Succinate-to-Fumarate Ratio as a New Metabolic Marker to Detect the Presence of *SDHB/D*- related Paranglioma: Initial Experimental and Ex Vivo Findings. *Endocrinology* 2014; 155(1):27–32.
305. Klupczynska A, Plewa S, Dyszkiewicz W et al. Determination of low-molecular-weight organic acids in non-small cell lung cancer with a new liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016; 129:299–309.
306. Poinson V, Mercier L, Nakabayashi K et al. Quantitation of isocitrate dehydrogenase (IDH)-induced D and L enantiomers of 2-hydroxyglutaric acid in biological fluids by a fully validated liquid tandem mass spectrometry method, suitable for clinical applications. *J. Chromatogr. B* 2016; 1022:290–297.
307. Tacker DH, Topardo J, Mahaffey C, Perrotta PL. Workflow Analysis Comparing Manual and Automated Specimen Processing for Mass Spectrometry–Based Vitamin D Testing. *Lab. Med.* 2014; 45(4):361–367.
308. Ananieva EA, Wilkinson AC. Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2018; 21(1):64–70.
309. Hattori A, Tsunoda M, Konuma T et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature* 2017; 545(7655):500–504.
310. Zheng Y-H, Hu W-J, Chen B-C et al. *BCAT1*, a key prognostic predictor of hepatocellular carcinoma, promotes cell proliferation and induces chemoresistance to cisplatin. *Liver Int.* 2016; 36(12):1836–1847.
311. Tönjes M, Barbus S, Park YJ et al. *BCAT1* promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type *IDH1*. *Nat. Med.* 2013; 19(7):901–908.
312. Wang Z-Q, Faddaoui A, Bachvarova M et al. *BCAT1* expression associates with ovarian cancer progression: possible implications in altered disease metabolism. *Oncotarget* 2015; 6(31):31522–31543.
313. Zhang L, Han J. Branched-chain amino acid transaminase 1 (*BCAT1*) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 486(2):224–231.
314. Ananieva EA, Powell JD, Hutson SM. Leucine Metabolism in T Cell Activation: mTOR Signaling and Beyond. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 2016; 7(4):798S–805S.
315. Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J. Picking the Point of Inhibition: A Comparative Review of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 2014; 13(5):1021–1031.
316. Harber KJ, de Goede KE, Verberk SGS et al. Succinate Is an Inflammation-Induced Immunoregulatory Metabolite in Macrophages. *Metabolites* 2020; 10(9):372.
317. Mills E, O'Neill LAJ. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* 2014; 24(5):313–320.

318. Guerra-Calderas L, González-Barríos R, Herrera LA et al. The role of the histone demethylase KDM4A in cancer. *Cancer Genet.* 2015; 208(5):215–224.
319. European Medicines Agency, ICH M10 Bioanalytical method validation Guidelines (2019). .
320. Antonio K, Valdez MMN, Mercado-Asis L et al. Pheochromocytoma/paraganglioma: recent updates in genetics, biochemistry, immunohistochemistry, metabolomics, imaging and therapeutic options. *Gland Surg.* 2020; 9(1):105–123.
321. Lepoutre-Lussey C, Caramella C, Bidault F et al. Screening in asymptomatic SDHx mutation carriers: added value of 18F-FDG PET/CT at initial diagnosis and 1-year follow-up. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2015; 42(6):868–876.
322. Tufton N, Sahdev A, Akker SA. Radiological Surveillance Screening in Asymptomatic Succinate Dehydrogenase Mutation Carriers. *J. Endocr. Soc.* 2017; 1(7):897–907.
323. Taïeb D, Hicks RJ, Hindié E et al. European Association of Nuclear Medicine Practice Guideline/Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Procedure Standard 2019 for radionuclide imaging of phaeochromocytoma and paraganglioma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2019; 46(10):2112–2137.
324. Pell VR, Chouchani ET, Frezza C et al. Succinate metabolism: a new therapeutic target for myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2016; 111(2):134–141.
325. Les 10 principales causes de mortalité. [<https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>].
326. Le TT, Shafaei A, Genoni A et al. Development and validation of a simple LC-MS/MS method for the simultaneous quantitative determination of trimethylamine-N-oxide and branched chain amino acids in human serum. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019; 411(5):1019–1028.
327. Jaochico A, Sangaraju D, Shahidi-Latham SK. A rapid derivatization based LC-MS/MS method for quantitation of short chain fatty acids in human plasma and urine. *Bioanalysis* 2019; 11(8):741–753.
328. Papatthanassiu AE, Ko J-H, Imprialou M et al. BCAT1 controls metabolic reprogramming in activated human macrophages and is associated with inflammatory diseases. *Nat. Commun.* 2017; 8(1):16040.

**Titre :** Impact des mutations *SDH* sur la réponse antitumorale et identification de nouveaux biomarqueurs

**Mots clés :** cancer, paragangliome, SDH, CRISPR-Cas9, métabolisme, succinate, oncobiomarqueur

**Résumé :** Les phéochromocytomes et les paragangliomes (PPGL) sont des tumeurs neuroendocrines très rares (<2 cas/1 000 000) caractérisées par la prévalence élevée de mutations germinales, dont celles touchant les sous-unités A à D de la succinate déshydrogénase (SDH). Les mutations *SDHB* sont associées à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un PPGL, pour lesquels la prise en charge thérapeutique reste à ce jour limitée. La SDH est une enzyme du cycle de Krebs, qui transforme le succinate en fumarate. Les mutations *SDH* entraînent une perte de fonction de l'enzyme, se traduisant par une accumulation du succinate. Ce dernier est un oncométabolite qui inhibe les dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -kétoglutarate. Les altérations des voies de signalisation, induites par l'accumulation de succinate, ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Les PPGL étant

des cancers très rares, le développement d'essais cliniques est complexe et l'apport des études précliniques/translotionnelles est primordial. Dans ce contexte, mon travail de thèse a porté sur **1-** l'établissement et la caractérisation de nouveaux modèles cellulaires de PPGL *SDHB* invalidé de façon stable (CRISPR-Cas9) **2-** l'évaluation de nouveaux traitements (seuls/combinés) **3-** l'étude du succinate sérique comme oncobiomarqueur des PPGL (diagnostic des mutations *SDH*, suivi de la maladie, réponse au traitement) **4-** l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques par une approche métabolomique. A terme, les résultats obtenus dans ce travail de thèse devraient permettre d'améliorer les connaissances des cancers *SDH* muté, de proposer de nouveaux traitements prometteurs et d'introduire de nouveaux biomarqueurs pour améliorer la prise en charge des patients.

**Title :** Impact of *SDH* mutations on antitumoral response and identification of new biomarkers

**Keywords :** cancer, paraganglioma, SDH, CRISPR-Cas9, metabolism, succinate, biomarker

**Abstract :** Pheochromocytomas and paragangliomas (PPGL) are very rare neuroendocrine tumors (<2 cases/1,000,000) characterized by the high prevalence of germline mutations, including those affecting succinate dehydrogenase (SDH) subunits genes (A, B, C and D). *SDHB* mutations are associated with a poor prognosis among PPGL patients, whose treatments are limited. SDH is a TCA enzyme, which converts succinate into fumarate. *SDH* mutations lead to a loss of function of the enzyme, and thus an accumulation of succinate. Succinate is an oncometabolite inhibiting  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. Alterations in several signaling pathways, induced by succinate accumulation, have allowed identification of potential new therapeutic targets. Since PPGL are

very rare cancers, set up of clinical trials is complex and the development of preclinical/translational studies is crucial. In this context, my work aimed to: **1-** establish and characterize new cellular models of stable invalidated *SDHB* PPGL (CRISPR-Cas9) **2-** evaluate new treatments (alone/combined) **3-** study serum succinate levels as an oncobiomarker of PPGL (diagnosis of *SDH* mutations, disease monitoring, treatment response) **4-** identify new therapeutic targets by a metabolomic approach. Finally, the results obtained in this thesis work should allow to improve the knowledge of *SDH* mutated cancers, to propose new promising treatments and new biomarkers to improve the clinical management of patients.