



HAL
open science

Application de la RMN HRMAS en Cancérologie “Modèles métaboliques de classification des tumeurs cérébrales”

Gilles Erb

► **To cite this version:**

Gilles Erb. Application de la RMN HRMAS en Cancérologie “Modèles métaboliques de classification des tumeurs cérébrales”. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2008. Français. NNT: . tel-00441765

HAL Id: tel-00441765

<https://theses.hal.science/tel-00441765>

Submitted on 17 Dec 2009

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.

Application de la RMN HRMAS en Cancérologie

“Modèles métaboliques de classification des tumeurs cérébrales”

Soutenue publiquement le 15 avril 2008

- Directeur de thèse :** El Bayed, Karim, Maître de conférences des Universités, Université Louis Pasteur
- Co-directeur de thèse :** Namer, Izzie Jacques, Professeur des Universités/Praticien Hospitalier,
Hôpitaux universitaires de Strasbourg Université Louis Pasteur
- Rapporteurs externes :** Guittet, Eric, Directeur de recherche du CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette
Nuzillard, Jean-Marc, Directeur de recherche du CNRS, Laboratoire d'Isolément Structure Transformation et Synthèse de Substances Naturelles, REIMS
- Rapporteur interne :** Sibilial, Jean, Professeur, ULP EU 3432 Physiopathologie des arthrites, Service de Rhumatologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
Directeur de la Fédération de Recherche en Médecine
- Examineur :** Piatto, Martial, LC3, ULP/CNRS UMR 7177, Université Louis Pasteur, Strasbourg
Bruker Biospin 34 rue de l'industrie, F-67166 Wissembourg

REMERCIEMENTS

Je tiens, en ouverture de ce mémoire, à remercier chaleureusement M. Jean Sibilia, professeur de médecine, responsable du service de Rhumatologie aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg et directeur de la Fédération de Recherche en Médecine, M. Eric Guittet, directeur de recherche du CNRS à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif sur Yvette et M. Jean Marc Nuzillard, directeur de recherche du CNRS au laboratoire d'Isolement Structure Transformation et Synthèse de Substances Naturelles de Reims de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux.

Je remercie tout particulièrement mes deux directeurs de thèse, M. Karim Elbayed et M. Izzie Namer sans qui aucun de ces travaux n'aurait pu être possible. Merci de m'avoir permis d'entreprendre ce doctorat et de m'avoir guidé et accompagné pour mener à bien ces recherches.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont pu contribuer à ces travaux avec en premier lieu, M. Martial Piotto et M. Jésus Raya pour leur aide dans le domaine de RMN HRMAS. Je remercie Martial de nous avoir ouvert les portes de l'entreprise Bruker à Wissembourg et Jésus pour sa formation à la manipulation d'un spectromètre RMN HRMAS.

Viennent ensuite l'ensemble des équipes médicales sans qui aucun travail n'aurait été possible. Je remercie l'équipe du service d'anatomie pathologique, sous la direction du professeur Michel Mohr et du docteur Agnès Neuville, et plus particulière Mme Florence Ackermann, qui m'a ouvert ces portes tout au long de ces 3 dernières années, l'équipe du service de neurochirurgie sous la direction du professeur Daniel Maitrot et du professeur Pierre Kerhli qui nous ont donné accès à l'ensemble de pièces opératoires nécessaire à la réalisation de nos travaux, ainsi que les docteurs Alessio Imperiale et Cyril Blondet avec qui j'ai eu l'honneur de travailler.

Enfin je voudrais remercier les personnes que j'ai pu côtoyer dans les différents laboratoires où j'ai pu travailler, Lydia, Céline, Philippe, Arnaud, Barbara, Marc et Vérika, Svetlana, Sebastian et d'autres trop nombreux pour être tous cités. Merci pour votre accueil.

Merci aussi pour le soutien que m'ont apporté mes collègues de travail, Thérèse, Alexandre et Rose Marie, qui ont su faire preuve de patience pendant ces 3 ans.

Je voudrais aussi saluer les personnes qui ont relu cette thèse, à savoir, Michèle et Jean-Marie, Mum, Didier, Dorothée, Nathalie, Geoffrey ...

Enfin un grand merci à mes amis et ma famille qui ont toujours été là quand j'en avais besoin. Merci à mes parents, qui ont toujours tout fait pour nous. Merci Marie, parce que tu es là, simplement...

TABLE DES MATIERE

CHAPITRE I. INTRODUCTION

1.1. La métabolomique.	7
1.2. Etude des systèmes biologiques : de la RMN à la métabolomique.	13
1.2.1. Etude des systèmes biologiques par RMN.	13
1.2.1.1. La RMN <i>In vivo</i>	14
1.2.1.2. La RMN <i>In vitro</i>	17
1.2.1.3. La RMN <i>ex vivo</i>	25
A) Le Cerveau	27
B) La Prostate	31
C) Le Foie	33
D) Les Reins	36
E) Le Sein	38
F) Les autres organes	38
1.2.2. Du métabolisme à la métabolomique	39
1.2.2.1. Métabolomique, oncologie et autres applications cliniques	40
1.2.2.2. Métabolomique et pharmacologie.	42
1.3. Techniques de la métabolomique.	45
1.4. Objectifs de la thèse.	51

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

2.1. Les échantillons biologiques:	53
2.1.1. Arrêt du métabolisme et conservation.	56
2.1.2. Mise en forme de l'échantillon.	56
2.1.3. Optimisations et références.	58
2.1.4. Préparation des échantillons pour l'analyse par RMN HRMAS.	58
2.1.5. Stabilité métabolique du tissu lors de l'analyse RMN	59
2.2. Acquisition des profils métaboliques par RMN HRMAS	63
2.2.1. Introduction et principes de la RMN HRMAS	63
2.2.2. Théorie de la spectroscopie RMN haute résolution en rotation à l'angle magique	63
2.2.2.1. Les interactions	64
A) L'Hamiltonien de spin nucléaire : l'élargissement par effets de champ local	64
B) L'Hamiltonien de spin nucléaire : L'interaction dipôle-dipôle	65
I) Le couplage dipôle - dipôle pour une paire de spins	65
II) Moyenner les interactions par le mouvement.	66
C) L'Hamiltonien de spin et les hétérogénéités de susceptibilité isotrope.	67
I) Le champ magnétique macroscopique dans un milieu magnétique.	68
II) Le champ magnétique local microscopique et l'Hamiltonien de spin	69
D) Moyenne cohérente par rotation à l'angle magique	70
E) L'Hamiltonien moyen	70
I) La théorie de l'Hamiltonien moyen.	70

II) Interactions homogènes et hétérogènes :	71
F) L'effet du MAS sur le couplage dipolaire homonucléaire	72
2.2.3. Les expériences RMN HRMAS	73
2.2.3.1. La rotation des échantillons à l'angle magique	73
2.2.3.2. Les aspects pratiques des expériences RMN en conditions MAS	74
2.2.4. Les séquences d'impulsions classiques	74
2.2.4.1. Les séquences d'impulsions RMN 1D	76
A) La problématique de la suppression de l'eau en RMN HRMAS	76
I) Les séquences testées.	77
II) Résultats	81
B) Les techniques d'édition spectrale	85
I) Edition par Temps de Relaxation	85
II) Edition par diffusion	87
C) Acquisition des profils métaboliques	88
D) Résultats	89
2.2.4.2. Les séquences d'impulsions RMN 2D	91
A) Les séquences testées.	91
I) RMN HRMAS 2 dimensions homonucléaire	93
II) RMN HRMAS 2 dimensions hétéronucléaire	94
III) Acquisition RMN HRMAS 2 dimensions homonucléaire	94
IV) Acquisition RMN HRMAS 2 dimensions hétéronucléaire	95
B) Résultats	95
I) TOCSY	95
II) HSQC	96
II) HSQC	96
C) Identification métaboliques.	97
2.3. Statistiques	100
2.3.1. Prétraitement et Normalisation	101
2.3.1.1. Régions d'intérêts et exclusions	101
2.3.1.2. Echantillonnage.	102
2.3.1.3. La normalisation spectrale	104
2.3.1.4. Normalisation biologique.	104
2.3.1.5. Formalisme mathématique.	106
2.3.2. L'analyse Statistique	107
2.3.2.1. Le concept des biomarqueurs	107
2.3.2.2. Introduction aux statistiques de la métabolomique.	109
2.3.2.3. Analyse en composante principale	110
2.3.2.4. La régression aux moindres carrés partiels.	112
A) La régression linéaire simple	113
B) La régression sur les composantes principales	114
C) La régression aux moindres carrés partiels.	115
2.3.3. Quelle(s) technique(s) de CLASSIFICATION?	119
2.3.4. Comparaison PLS et PCA sur un cas réel.	121
2.3.5. Phases pratiques dans la construction d'un modèle prédictif.	125

CHAPITRE III. RESULTATS.

3.1. La métabolomique appliquée à l'étude des Tumeurs Cérébrales.	130
3.1.2. Problématique et objectifs.	132
3.1.3. Populations et données cliniques	133
3.1.4. Résultats : Les oligodendrogliomes	134
3.1.5. Conclusions : le modèle métabolique « hypoxie »	138
3.1.6. Elargissements aux glioblastomes et oligodendrogliomes intermédiaires	139
3.1.7. Elargissement à l'ensemble des tumeurs cérébrales.	143

3.1.7.1. Population.	143
3.1.7.4. Modèle métabolique d'hypoxie et autres types tumoraux.	144
A) Les tumeurs de bas grade : Astrocytomes Pilocytiques et tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique.	144
B) Meningiomes.	146
C) Tissu non tumoral.	147
3.1.7.3. Comparatif tissu non tumoral et tissu tumoral	147
3.1.7.2. Analyse globale.	150
3.1.8. Conclusions et Les limites actuelles de l'étude.	154
3.2. Etude du métabolome des Neuroblastomes.	155
3.2.1. Problématique et objectifs	155
3.2.1.1. La Classification anatomo-pathologique.	155
3.2.1.2 La Classification pronostique.	156
3.2.1.3. Objectifs de l'étude.	157
3.2.2. Populations et données cliniques.	158
3.3.3. Résultats : Comparatif tissu surrénal et neuroblastomes	161
3.3.4. Résultats : Comparaison données cliniques et données métaboliques.	165
3.3.5. Conclusions	168
3.3.5.1. Comparatif tissu surrénal et neuroblastomes	168
3.3.5.2 Conclusions : Comparaison données cliniques et données métaboliques.	169
3.3. Les Lymphomes : Signification métabolique de la fixation 18F-FDG pour la maladie de Hodgkin_	172
3.3.1. Problématique et objectifs	172
3.3.2. Populations et données cliniques	173
3.3.3. Résultats	174
3.3.4. Résultats secondaires	180
3.3.5. Lymphomes Hodgkiniens comparés au lymphomes non hodgkiniens	182
3.3.6. Conclusions	184

CHAPITRE IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

4.1. Rationnel du projet.	185
4.2. Résultats.	185
4.2. Méthodologie mise en œuvre : avantages et limites du projet	186
4.4. Perspectives.	189

Abréviation	Signification	
ADN	Acide DéoxyriboNucléique	
ARN	Acide RiboNucléique	
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire	
SRM	spectroscopie RMN	
T	tesla	
GABA	acide γ -amino butyrique	
HRMAS	Haute Résolution en Rotation à l'Angle Magique	High Resolution Magic Angle Spinning
LCR	Liquide céphalo-rachidien	
PCA	acide perchlorique	Perchloric Acid
HPLC	chromatographie liquide haute performance	High Performance Liquid Chromatography
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill	
ACP	Analyse en composantes principales	
COMET	COnsortium sur la toxicologie de METabonomic	
GC	Chromatographie gazeuse	Gaz Chromatography
LC	Chromatographie liquide	Liquid Chromatography
MS	Spectroscopie de masse	Mass Spectroscopy
MALDI		Matrix Laser Desorption Ionisation
PLS	régression au moindre carré partielle	Partial Least Square regression
18F-FDG	Fluoro-désoxy-glucose	
SEEN		Selective Excitation to Empirically Null
PURGE		Presaturation Utilizing Relaxation Gradients and Echoes
CHES		CHEmical Shift Selective
NOESY		Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
WATERGATE		WATER suppression by Gradient Tailored Excitation
lb		line broadening
TOCSY		TOTAL Correlation Spectroscopy
HSQC		Heteronuclear Single Quantum Coherence
COSY		CORrélation Spectroscopy
MLEV		Malcolm Levitt's CPD sequence
DIPSI		Decoupling In the Presence of Scalar Interactions
INEPT		Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
ROE		Rotating Frame Overhauser Effect
HOHAHA		HOmonuclear Hartmann Hahn spectroscopy
GARP		Globally optimized Alternating phase Rectangular Pulses
AFC	Analyse Factorielle des Correspondances	
OLS		Ordinary Least Squares
PCR		Principal Components Regression
PRESS		PREDiction Sum of Square
NIPALS		Nonlinear Estimation by Iterative Partial Least Squares
PC	Composante principale	Principal Component
LOO		Leave One Out
HIF		Hypoxia-inducible factor
DNET		Dysembryoplastie Neuroepithelial Tumor
INPC		International neuroblastoma Pathologic Classification
123I-mIBG	23I-meta-iodobenzylguanidine	
SUV		Standardized Uptake Value

CHAPITRE I.

INTRODUCTION

L'évolution rapide des sciences du vivant au cours de la seconde moitié du 20^{ème} siècle est étroitement liée au développement d'un grand nombre d'outils d'analyse qui ont permis une détection de plus en plus fine des constituants des cellules vivantes et des organismes. Ainsi un grand nombre de mécanismes biologiques, comme la réplication des acides nucléiques, leur traduction, les différents mécanismes enzymatiques, les voies de transduction des signaux ou encore les voies du métabolisme, ont pu être étudiés. C'est en 1902 que la première relation entre un gène et un enzyme est établie par A. Garrod à partir d'une observation portant sur une anomalie métabolique humaine (Garrod, 1902). Cent ans plus tard, la génétique et la biochimie convergent vers une représentation du fonctionnement des systèmes vivants que l'on appelle la biologie des systèmes (systems biology). La définition des termes "biologie des systèmes" ou "biologie intégrative" n'est pas encore consensuelle et varie selon les disciplines et l'origine des chercheurs. La biologie des systèmes adopte une démarche itérative et intégrative en combinant des approches expérimentales et théoriques dans lesquelles les mathématiques jouent un rôle central (Kell, 2005). Un grand nombre d'articles de revue s'est attaché à décrire la complexité liée à la compréhension des systèmes biologiques (Kell, 2006; Selinger et al., 2003). Enfin, l'étude des perturbations liées aux pathologies connaît aujourd'hui un intérêt grandissant.

1.1. LA METABOLOMIQUE.

C'est dans cette optique de représentation et compréhension des systèmes biologiques complexes que s'intègrent ces nouveaux outils que l'on nomme aujourd'hui les « omiques » (Hicks, 2003). Les principaux omiques sont la génomique, la transcriptomique, la protéomique, et la métabolomique correspondant à la séquence allant de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) aux métabolites en passant respectivement par l'Acide RiboNucléique (ARN) et les protéines.

Cette séquence compose un circuit biologique ouvert pour le transfert de l'information, lequel se referme au niveau du métabolisme.

Permettant une analyse globale d'un système biologique, ces outils méthodologiques et techniques présentent la particularité d'être fortement interconnectés. Ils permettent de suivre l'évolution biologique de systèmes complexes en fonction d'interférences extérieures mais aussi dans des contextes pathologiques. De plus, ils présentent l'avantage de couvrir la quasi-totalité des échelles dimensionnelles, du moléculaire à l'organisme entier. Ces nouvelles démarches d'étude de la biologie des systèmes ont le plus souvent été initiées par des disciplines autres que la biologie (physique, chimie, informatique) et l'interprétation des masses de données accumulées nécessite aujourd'hui la mise en œuvre de nouvelles formes de raisonnement s'appuyant sur des développements mathématiques et algorithmiques modernes.

Première étape de la génomique fonctionnelle, la génétique a pour objectifs d'analyser la structure du génome, de séquencer les gènes et d'identifier leur fonction (bien que cette ultime étape soit principalement du ressort de la génomique). A l'issue du séquençage exhaustif du génome humain, une période dite "post-génomique" a débuté (Venter et al., 2001). L'information brute du séquençage des génomes devant être transformée en informations utiles aux biologistes, la post-génomique (ou génomique fonctionnelle) s'applique à étudier la régulation de l'expression des gènes à l'échelle d'une cellule, d'un organe ou d'un individu. L'application la plus importante de l'analyse du transcriptome, deuxième étape de la génomique fonctionnelle, est la mesure de l'expression des gènes. La transcription d'un gène en ARN est la première étape de la synthèse des protéines et des variations, dès cette étape, peuvent être responsables de changements morphologiques (développement) ou indiquer une réponse cellulaire à des perturbations environnementales. Dynamique, le transcriptome change en réponse à des perturbations ou lors d'événements cellulaires tels que la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Pour comprendre un gène, il est nécessaire de voir à quel niveau celui-ci est exprimé. L'analyse simultanée de milliers de gènes peut conduire aux mécanismes de régulation, permettant de mieux appréhender le fonctionnement cellulaire et les processus biochimiques mis en jeu. Les premières analyses du transcriptome avec les puces à ADN ont établi des catalogues de gènes exprimés dans des cellules ou des tissus. Ces études ont participé à la validation de la technologie par l'obtention de résultats conformes à ceux obtenus avec d'autres approches. Ces catalogues ont été comparés à partir des échantillons biologiques dans le but de détecter des gènes différentiellement exprimés. Ainsi, DeRisi et coll. ont comparé le profil d'expression d'une lignée cellulaire cancéreuse de mélanome avec le profil de la même lignée dont le phénotype cancéreux avait été annulé par l'introduction du chromosome 6 (DeRisi et al.,

1996). Ils ont ainsi pu identifier plusieurs gènes potentiellement responsables du caractère tumoral. Cependant, la limite majeure de ce type d'approche différentielle qui détecte des gènes d'expression modulée est qu'elle ne renseigne pas sur les raisons de cette modulation. Parallèlement, les principales limites techniques à la transcriptomique résident dans la disponibilité des clones des séquences appâts (sondes) déposées sur le support, dans la qualité de l'extraction des ARN des échantillons à analyser et dans la sensibilité de cette technique.

Le concept de protéomique est né d'un besoin croissant de caractériser la physiologie et la physiopathologie d'un organisme, d'un tissu ou d'une cellule à partir de leur expression protéique globale et s'inscrit dans l'ère de la post-génomique. En effet, les efforts importants entrepris pour séquencer de manière systématique de nombreux génomes apportent des quantités phénoménales d'informations qui ne peuvent pourtant pas, à elles seules, permettre de comprendre le fonctionnement d'un organisme. L'identification de protéines par une approche protéomique est également un moyen d'identifier de nouveaux gènes, en particulier pour les organismes dont le génome n'a pas été séquencé. C'est en 1995 que le terme « protéome » a été employé pour la première fois, afin de désigner le pendant protéique d'un génome (Wasinger et al., 1995). Le terme protéomique a, quant à lui, été utilisé pour la première fois dans la littérature en 1997, dans une étude dont le titre se traduit par : l'identification des protéines dans l'ère post-génomique : l'ascension rapide de la protéomique (James, 1997). Anderson et Anderson définissent l'analyse protéomique comme « l'utilisation de la quantification au niveau de la protéine comme mesure objective de l'expression génique caractérisant un processus biologique donné (processus physiologique ou pathologique, effets de médicaments ou de l'environnement) et comme moyen de décodage des mécanismes contrôlant cette expression » (Anderson and Anderson, 1998). Dans le domaine de la santé, la protéomique s'est rapidement imposée comme un outil puissant, permettant de répondre à de multiples problématiques. Les modèles d'études sont principalement la souris, le rat et l'homme. Celles-ci peuvent se faire à partir de fluides biologiques, tels que le plasma, le sérum ou le liquide cébrospinal dont les compositions protéiques peuvent varier selon le type de pathologies. Ainsi, des travaux réalisés sur le liquide spinal de patients atteints de démence ont permis d'identifier la chaîne gamma de la protéine Tau comme marqueur de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Lee and Harrington, 1997). L'identification de cette protéine, qui est normalement localisée dans le cerveau des sujets sains mais qui est dispersée dans le liquide cébrospinal des individus atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, a permis d'établir le premier test de diagnostic existant pour cette pathologie. Parallèlement aux travaux effectués sur des tumeurs, des études du protéome de diverses lignées cellulaires cancéreuses sont en

cours. Cette approche *in vitro* permet d'étudier plus facilement les variations de protéines sur plusieurs lignées de même origine, mais avec un potentiel métastatique différent (Osada et al., 1996), ou encore de tester la réponse des cellules à divers composés pharmacologiques pour évaluer l'efficacité d'un traitement (Myers et al., 1997). Un bel exemple de l'utilisation de l'analyse protéomique de lignées cellulaires de cancer du sein et d'échantillons de tumeurs mammaires a récemment été publié. Il a permis de montrer une forte diminution du niveau de la protéine chaperon 14-3-3 sigma dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales du sein, révélant ainsi son intérêt comme suppresseur de tumeur (Vercoutter-Edouart et al., 2001). Par comparaison avec les analyses du transcriptome, les études de protéomique ne permettent pas une étude aussi exhaustive dans un organisme ou une cellule. L'hétérogénéité chimique des protéines pose un réel problème de résolution des gels 2D, tout comme dans les différences de solubilité des protéines. La dynamique d'expression des protéines pouvant couvrir 6 ordres de grandeur fait que les protéines très fortement exprimées sont plus facilement détectables que les protéines faiblement exprimées ce qui induit un biais d'analyse.

Il apparaît donc qu'un seul génome peut conduire à différents protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de la différenciation, de la réponse à différents signaux biologiques ou physiques, de l'état physiopathologique. On estime ainsi que les quelque 30.000 gènes humains seraient à l'origine d'au moins 1.000.000 de protéines. Il devient alors difficile d'interpréter les résultats obtenus devant un tel flux de données. Les métabolites, produits finaux de l'expression des gènes, et donc des protéines, modulés par les effets environnementaux, sont eux beaucoup moins nombreux. D'après certaines estimations le nombre de métabolites de l'organisme humain serait d'environ 2.000. Toutefois, ce nombre est largement sous estimé si l'on tient compte de ce que l'on appelle les métabolites secondaires (Pearson, 2007; Wishart, 2007; Wishart et al., 2007). Néanmoins l'étude des métabolismes depuis de nombreuses années a permis d'établir des cartographies du métabolisme guidant l'interprétation des données métaboliques.

Ainsi, la métabolomique, définie comme l'analyse exhaustive du métabolome, concerne les produits issus des réactions métaboliques induites par les protéines dans une cellule, un tissu, un organe ou même un organisme. Le but général de la métabolomique, tel qu'il a été défini par le National Institutes of Health en 2003 est d'identifier, de mesurer et d'interpréter la concentration, l'activité et les flux complexes des métabolites endogènes dans les cellules, les tissus, et d'autres échantillons biologiques tels que le sang, l'urine, ou la salive.

L'étude « moderne » du métabolome et des profils métaboliques a pour origine des travaux datant du milieu des années 80 portant sur l'étude des végétaux (Fan et al., 1986). Ce

type d'études a permis d'estimer la composition biochimique totale des organismes étudiés, qu'ils soient végétaux ou animaux (Gidman et al., 2003; Glassbrook and Ryals, 2001). Conjointement à cette approche mettant en avant une étude globale du métabolome, que l'on pourrait rapprocher d'une cartographie du métabolisme d'un organisme, s'est développée une méthodologie basée sur l'étude d'empreintes métaboliques reposant sur l'analyse d'un grand nombre de métabolites au travers d'une série d'échantillons (Fiehn, 2002). Dans ce cas on ne s'intéresse pas à la quantification de chaque métabolite présent dans un système biologique complexe, mais on analyse la variabilité et/ou les modifications de ceux-ci par des méthodes statistiques. Cette approche permet de discriminer les différents sous-systèmes biologiques en mettant en exergue les observables qui expliquent leur variabilité (Fiehn et al., 2001).

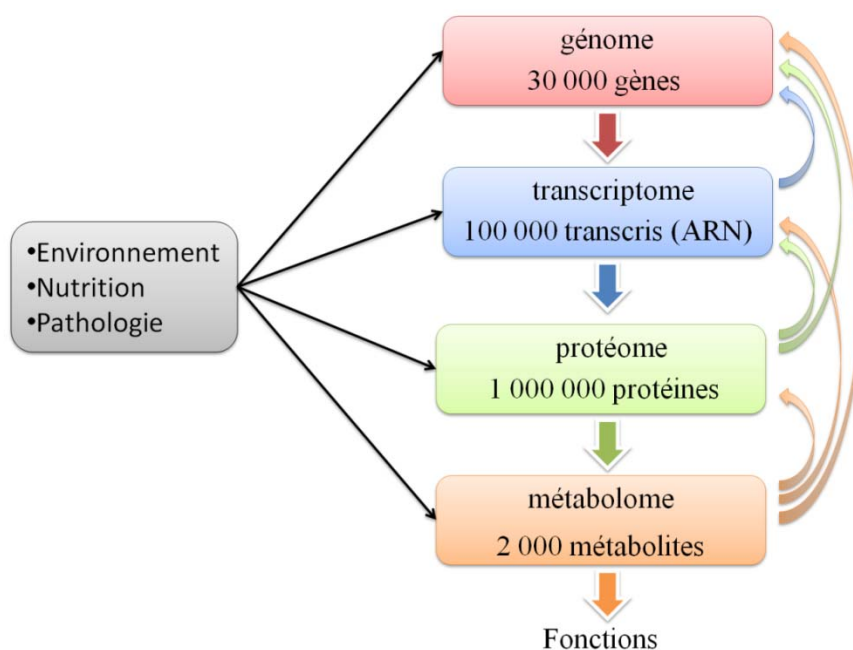


Figure 1 : Relation entre les différent omiques. Adapté de (Goodacre, 2005b)

Les termes « métabolome » et « métabolomique » sont des néologismes datant de la fin des années 90. Le « métabolome » a pour la première fois été utilisé dans la littérature par S.G. Oliver, M.K. Winson, D.B. Kell et F. Baganz (Oliver et al., 1998). C'est à J.K. Nicholson, J.C. Lindon et E. Holmes (Nicholson et al., 1999) qu'incombe la paternité du mot métabolomique. Sa définition officielle est : « **le profilage systématique des métabolites et des voies métaboliques dans les organismes entiers par l'étude des biofluides et des tissus.** » (Lindon et al., 2003a). Conjointement à la naissance du terme « métabolomique » on a vu apparaître le terme « métabonomique » qui est défini comme l'analyse quantitative des modifications du métabolisme général des organismes, résultant de perturbations d'origine pathologique, génétique, nutritionnelle, hormonale ou toxique (Nicholson et al., 2002). La frontière entre la

métabolomique et la métabonomique reste cependant floue. Jusqu'à maintenant, l'intérêt principal de l'analyse des métabolites portait sur la découverte de voies métaboliques fondamentales. Toutefois, au cours des dernières années, il est devenu évident qu'il y avait un besoin d'effectuer des études sur les réponses métaboliques d'un système biologique exposé à des perturbations environnementales, pathologiques et/ou génétiques et sur les variations phénotypiques qui en résultent afin de mieux comprendre les systèmes biologiques. Il est indispensable de comprendre la métabolomique comme un sous-ensemble des « omiques » car elle constitue le résultat d'une cascade d'événements régissant l'ensemble de la post-génomique. En effet, les métabolites explorés par la métabolomique sont l'étape finale, la résultante de l'effet des gènes et de celui de l'environnement. Ainsi grâce à la surveillance des variations métaboliques d'un système biologique, il devient possible de déterminer la fonction de gènes inconnus. La métabolomique présente également un fort potentiel applicatif dans des domaines tels que le diagnostic clinique (Griffin, 2003; Holmes et al., 2003; Lindon et al., 2004b; van der Greef, 2005), notamment lors du diagnostic des cancers (Griffin and Shockcor, 2004; Jordan and Cheng, 2007), le développement et le traitement pharmacologique (Nebert and Vesell, 2006). En effet, un « événement » tel qu'une pathologie ou une action extérieure (effet environnemental), quel que soit son point d'impact, quel que soit sa cible ou ses cibles, et qu'il produise des effets bénéfiques ou toxiques, a de fortes chances d'entraîner des modifications qualitatives ou quantitatives de métabolites que l'on pourra déceler par une exploration large et systématique.

1.2. ETUDE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES : DE LA RMN A LA METABOLOMIQUE.

1.2.1. ETUDE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES PAR RMN.

Dans le monde médical, tout comme dans celui de la recherche académique, l'étude du métabolisme par utilisation de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) s'est largement répandue au cours de ces 30 dernières années. Bien que permettant d'observer tous les noyaux possédant les propriétés magnétiques adéquates tels que l'azote 15 (^{15}N), le fluor 19 (^{19}F), le carbone 13 (^{13}C), etc., la spectroscopie RMN (SRM) repose majoritairement sur l'étude du noyau du proton (^1H) car celui-ci présente plusieurs caractéristiques le rendant particulièrement intéressant dans cette optique. Son abondance naturelle particulièrement élevée, 99.98%, son rapport gyromagnétique lui aussi très avantageux par rapport aux autres atomes observables par RMN et le fait que l'atome ^1H soit particulièrement abondant dans toutes molécules biologiques (au même titre que l'azote et le carbone) font de la SRM ^1H la technique RMN la plus employée pour l'étude du métabolisme. La spectroscopie RMN ^1H permet d'étudier certains aspects biochimiques des conditions normales et pathologiques en offrant la possibilité de mesurer *in vivo* la concentration de nombreux métabolites. La composition des métabolites humains est telle (présence d'atomes ^1H , ^{15}N , ^{13}C , etc..) qu'il n'existe sans doute pas de composé qui ne soit observable par RMN. Cependant les limites de détection de la RMN font qu'en réalité seule une infime partie de ceux-ci sont effectivement détectables aujourd'hui. On estime la limite de détection à environ 10^{-4} voir 10^{-6} molaire en *in vivo* grâce notamment à l'apparition des sondes cryogéniques et à l'augmentation des champs magnétiques utilisés. Celle-ci peut atteindre des valeurs inférieures au nano molaire lors d'expériences *in vitro* comme cela a été prouvé récemment ou des valeurs de limites de détection de 0.54 nano molaires ont été reportés (Grivet et al., 2003). On estime cependant que la limite réaliste pouvant être atteinte par les techniques actuelles, c'est-à-dire communément accessibles, est d'environ 1 micro molaire. Il apparaît avec cette estimation qu'un ensemble de 1000 métabolites soit détectable et que le métabolome en tant qu'observable par RMN doive se définir de la sorte.

On retrouve un certain nombre de métabolites communs à l'ensemble de l'organisme et d'autres que l'on pourrait qualifier de plus spécifiques assujettis à des organes ou des fluides biologiques spécifiques. De plus, on peut séparer les métabolites en deux groupes distincts, les métabolites endogènes qui sont naturellement présents dans l'organisme étudié, et les métabolites exogènes, issus du milieu extérieur. Il existe un certain nombre d'articles tentant de présenter une vue aussi exhaustive que possible de la composition métabolique (visible par

RMN, et donc compatible avec la définition du métabolome que nous avons posé ci-avant) d'un organe comme l'illustre par exemple V. Govindaraju en 2000 dans un article traitant spécifiquement des métabolites cérébraux observables par RMN ^1H et ^{13}C (Govindaraju et al., 2000). Nous verrons plus en avant dans ce chapitre d'autres exemples de bases de données métaboliques établies par RMN sur des organes spécifiques.

1.2.1.1. LA RMN *IN VIVO*

Les progrès techniques effectués depuis la première application de la spectroscopie RMN *in vivo* (Ross and Radda, 1983) font qu'aujourd'hui il est possible d'explorer un nombre important d'organes tels que le cœur, les reins, la prostate (Kurhanewicz et al., 2002) ou le cerveau (Ross and Michaelis, 1994) *in situ* et cela quasi en temps réel. *In vivo*, cette méthodologie est aujourd'hui souvent employée pour obtenir des informations métaboliques nécessaires au diagnostic clinique du patient dont on suspecte une lésion ou pour effectuer le suivi des patients traités (Howe et al., 1993; Howe and Opstad, 2003b; Kwock et al., 2006; Ross and Michaelis, 1994). Nombre d'applications de la spectroscopie RMN *in vivo* ont largement été décrites au travers de la littérature comme par exemple l'application de SRM à l'étude de la cancérologie développée par R.J. Gillies et D.L. Morse (Gillies and Morse, 2005) au travers d'un article de revue récent. Les domaines d'application dans le monde médical incluent bien évidemment l'étude des tumeurs cérébrales (Howe and Opstad, 2003b; Leclerc et al., 2002; Nelson, 2003). D'autres domaines d'applications existent indépendamment des perturbations cancéreuses avec par exemple l'analyse des désordres neurologiques telles que l'épilepsie (Hammen et al., 2007), l'étude des perturbations métaboliques liées au SIDA (Corr, 2006), ou encore la problématique liée à la maladie d'Alzheimer (Thompson et al., 2007) ou d'autres maladies neuro-dégénératives (Apostolova and Thompson, 2007) comme la maladie de Parkinson (Camicioli et al., 2007).

C'est en 1983 que Behar et coll. réalisent la première acquisition d'un spectre RMN *in vivo* en proton à l'aide d'un spectromètre 8.5 tesla (T) sur un cerveau de rat (Behar et al., 1983). Les résonances ainsi observées ont été attribuées par comparaison avec les résultats obtenus sur des extraits tissulaires à la phosphocréatine, créatine, phosphocholine, aspartate, glutamate, N-acétyl-aspartate, l'acide γ -amino butyrique (GABA), l'alanine et le lactate. Ainsi dans le même papier les auteurs ont pu démontrer, qu'en induisant une hypoxie chez l'animal, on observait une augmentation de la concentration du lactate au niveau cérébral mettant en évidence une « adaptation » des voies métaboliques classiques. La même équipe démontre l'année suivante

que des résultats similaires, bien que moins résolus spectralement, peuvent être obtenus à des champs magnétiques plus modestes, compatibles avec une utilisation clinique, ouvrant ainsi la voie à l'utilisation de cette technique chez l'homme dans un cadre clinique (Behar et al., 1984).

Les premiers rapports sur les applications cliniques de la SRM sur le cerveau humain sont apparus au milieu des années 80, mettant d'abord en jeu la spectrométrie localisée (Bottomley et al., 1985) puis quelques années plus tard les techniques d'imagerie spectroscopique (Moonen et al., 1992). Hanstock et son équipe (Hanstock et al., 1988) ont ainsi pu mettre en évidence la possibilité de mesurer sur des régions de volume limité les signaux associés à la choline, la créatine, le N-acétyl-aspartate, le glutamate combiné à la glutamine et au GABA et le lactate qui restent encore aujourd'hui les principaux métabolites observés *in vivo* compte tenu des champs magnétiques relativement modestes (classiquement 1.5T, bien que de plus en plus fréquemment 3T) utilisés. L'étude par SRM *in vivo* du cerveau, qui est aujourd'hui l'organe le plus exploré par cette technique, est facilitée par l'excellente homogénéité de champ qui peut être obtenue sur cet organe de sorte que même avec des champs magnétiques relativement faibles la résolution spectrale est suffisante pour l'étude des signaux RMN des principaux métabolites cérébraux. De plus, le cerveau humain normal produit peu de signal de lipides ce qui facilite la détection des résonances qui généralement se superposent les unes avec les autres. Il est néanmoins important de noter qu'il a été démontré que la détection de signaux RMN issus des lipides au niveau cérébral a une importance diagnostique dans certaines pathologies et indique généralement la présence d'une lésion (Podo, 1999).

Dans le cadre particulier de l'oncologie cérébrale, l'intérêt de la SRM ^1H dans le diagnostic différentiel des tumeurs est connu depuis plusieurs années et les études actuelles tendent à élargir ces indications (Galanaud et al., 2005). Il semble en effet exister des liens entre les anomalies SRM observées *in vivo* et la survie (Griffin and Kauppinen, 2007a; Howe and Opstad, 2003a; Kwock et al., 2006; Nelson, 2003; Preul et al., 1998; Shah et al., 2006). Des études ont par ailleurs montré que la SRM pourrait être employée comme marqueur d'efficacité des traitements, tel que le témozolomide administré pour traiter les cancers du cerveau et les mélanomes malins (Murphy et al., 2004). De plus il a été montré au travers de multiples études que la délimitation du volume tumoral pourrait être grandement améliorée par l'apport de la SRM (Leclerc et al., 2002; Nelson, 2003; Pirzkall et al., 2004). Un exemple probant de cette dernière assumption est apporté par Pirzkall et coll. (Pirzkall et al., 2001) dans une étude portant sur 34 patients souffrant de gliomes de haut grade, dans laquelle le volume moyen détecté par SRM est significativement plus important que celui détecté par les techniques d'imagerie classique, y compris avec prise de contraste au gadolinium. Ces résultats ont pu être confirmés

par une autre étude portant sur des tumeurs de plus bas grade (grade II) menée par la même équipe (Pirzkall et al., 2002). Enfin une troisième étude du même groupe menée en postopératoire démontre que les zones liées à un métabolisme anormal sont plus étendues que les régions repérées en préopératoire et retirées chirurgicalement et devenaient potentiellement des sites de rechute (Pirzkall et al., 2004). La caractérisation des tumeurs cérébrales est un des objectifs principaux de l'application de la SRM. Néanmoins le nombre limité de métabolites observables *in vivo* n'a pas, dans un premier temps, permis de différencier les sous-groupes tumoraux au travers de biomarqueurs spécifiques. L'apport de méthodes statistiques plus évoluées, complétées par l'acquisition de cartographies métaboliques, a permis d'éprouver les techniques de classification liées à la RMN *in vivo*. Dans un article de 1998, M.C. Preul (Preul et al., 1998) a, à l'aide des techniques citées précédemment et en se focalisant sur un ensemble de 6 métabolites (le groupement des composés lié à la choline, la créatine, le N-acétyl-aspartate, l'alanine, le lactate et les lipides), pu déterminer la classification histopathologique d'un groupe de tumeurs cérébrales sur la base de leur profil métabolique avec un taux de réussite important (104 tumeurs cérébrales classifiées correctement sur 105). Néanmoins dans une étude reposant sur une méthodologie parallèle, mettant en jeux des techniques statistiques similaires, les résultats obtenus par Tate et coll. démontrent que la différenciation entre certains sous-groupes tumoraux reste problématique (Tate et al., 2003). Bien que le taux de classification correct soit de 100% lors de comparaison binaire ne tenant pas compte des tumeurs astrocytaires, ce taux de réussite chute à environ 70% pour la différenciation entre les tumeurs astrocytaires de bas grade avec les tumeurs de type oligodendrocytaire. De même ce taux est à nouveau de 70% lorsque l'on cherche à différencier les tumeurs astrocytaires de haut grade et les métastases cérébrales. Plus récemment Huang et coll., bien qu'utilisant une technique statistique sensiblement différente basée sur une présélection statistique des variables d'importance par une technique bayésienne (MBVS pour multivariate bayesian variable selection) couplée à une analyse linéaire discriminante (LDA) obtient des résultats sensiblement équivalents. En effet, tentant de classer des astrocytomes bas grade (grade I et II) et des glioblastomes, les résultats obtenus oscillent entre 70 et 90% (Huang et al., 2003).

Bien que la spectroscopie RMN *in vivo* ait acquis le statut d'outil incontournable pour l'étude du métabolisme, les limitations inhérentes au manque de résolution et au seuil de détection ont conduit la communauté scientifique à, non seulement, poursuivre les travaux entrepris *in vitro* pour l'étude du métabolisme mais à accroître les efforts portés sur cette technique.

1.2.1.2. LA RMN *IN VITRO*

Dès 1977, soit une petite dizaine d'années avant les premiers travaux présentés *in vivo*, Ekstrand et coll. ont démontré la possibilité d'étudier le métabolisme par application de la RMN (Ekstrand et al., 1977). Dans cette étude, une suspension de globules rouges a été analysée par RMN liquide du proton afin d'étudier les temps de relaxation de métabolites tels que le lactate, pyruvate, alanine ou créatine. Le grand nombre d'informations accessibles pour une meilleure compréhension du métabolisme à l'aide de ce type d'études a immédiatement été appréhendé par la communauté scientifique. Ceci a naturellement conduit la RMN du proton effectuée sur les liquides biologiques tels que le sang, le sérum, le liquide céphalorachidien ou encore les urines à prendre un place prépondérante dans le domaine de la pharmacologie, la toxicologie ou l'étude des modifications pathologiques du métabolisme. L'étude *in vitro* suppose l'étude d'échantillons dont la forme et la composition est cohérente avec une étude sur des systèmes RMN classiques telles qu'ils sont utilisés en chimie. De ce postulat a découlé deux principales voies méthodologiques pour l'étude du métabolome en RMN *in vitro*, soit l'étude d'échantillons naturellement compatibles avec la technique, les fluides biologiques, soit l'étude d'échantillons « transformés » afin d'être rendu compatible tel que les extraits de tissus (Bell et al., 1989; Nicholson and Wilson, 1989).

« Les fluides sécrétés ou excrétés par un organisme vivant proposent une vision de son statut métabolique car sa composition est la conséquence du fonctionnement des cellules qui sont directement liées à sa fabrication. » C'est au travers de cette définition que J.C. Lindon, dans un article de revue datant de 1999, portant sur l'importance de l'étude des liquides biologiques par RMN pour l'étude du métabolome, introduit la notion biofluide (Lindon et al., 1999a). Les biofluides ont été introduits comme un vecteur simplifiant l'approche du métabolisme par l'observation de produits sécrétés par l'organisme (Fan, 1996). Leur nature (liquide) a permis l'emploi de techniques RMN liées à la chimie classique et a donné accès à des champs magnétiques bien plus intenses qu'en *in vivo* augmentant du coup la sensibilité (de l'ordre du nano molaire (Grivet et al., 2003)) et la résolution de la mesure. Néanmoins la variété de composition physico-chimique des liquides biologiques n'a pas rendu cette étape facile.

Les liquides biologiques que l'on peut rencontrer au travers des applications ayant fait l'objet de publications sont : l'urine (Bales et al., 1984; Foxall et al., 1995; Griffin et al., 2000; Holmes et al., 1994; Keun et al., 2002a; Le Moyec et al., 1993), la bile (Melendez et al., 2001; Paczkowska et al., 2003), le plasma sanguin (Bell et al., 1987; Foxall et al., 1993b; Foxall et al.,

1993c; Nicholson et al., 1995; Nicholson and Gartland, 1989), le sang (Nicholson et al., 1993), le liquide céphalorachidien (Holmes et al., 2006a; Koschorek et al., 1989; Sweatman et al., 1993), le lait (Bertram et al., 2007a; Hu et al., 2007), la salive (Silwood et al., 2002; Walsh et al., 2006), le liquide gastrique, pancréatique (Powell JJ et al., 1990), le liquide séminal (Tomlins et al., 1998b), le liquide amniotique (Graca et al., 2007; Nelson et al., 1987). Cet ensemble de liquides biologiques présente des caractères physico-chimiques et métaboliques très variés qui sont des éléments essentiels à prendre en compte lors de l'étude par RMN. Ceux-ci se résument principalement par la teneur en eau, en lipides (Ala-Korpela et al., 1993) et la complexité (le nombre de métabolites présents dans le liquide) qui guideront obligatoirement les choix techniques pour l'acquisition RMN. L'ensemble de ces données a été résumé dans un article de revue récent (Lindon et al., 1999b).

Il faut noter que, bien que les limites de détection soient largement plus importantes en *in vitro* qu'en *in vivo*, il reste impossible de détecter un certain nombre de substances biochimiques d'importance comme les hormones, les protéines, les acides nucléiques pour des raisons de sensibilité de la technique (seuil de détection trop élevé) ou de propriétés physico-chimiques de ces éléments. Néanmoins les données acquises *in vitro* sont grandement complexifiées par rapport aux données équivalentes issues de la RMN *in vivo* du fait, notamment, du nombre important de métabolites détectables présents dans les liquides biologiques. Cet accroissement du nombre d'informations, essentiel pour une meilleure interprétation du métabolisme (Pearson, 2007) nécessite l'utilisation de séquences RMN adaptées. L'un des avantages majeurs de la RMN sur les liquides biologiques est le peu de manipulations nécessaires avant les enregistrements. Cet avantage doit néanmoins faire face au fait que les biofluides peuvent être dépendants du métabolisme d'un organe donné (liquide céphalorachidien (LCR) pour le cerveau par exemple) et sujets aux phénomènes systémiques (Kell, 2004). L'analyse des biofluides n'est donc potentiellement pas aussi caractéristique d'un tissu que souhaité (Oldiges et al., 2007).

L'une des premières études mettant en jeu la RMN sur les biofluides date de 1979. Celle-ci se propose d'étudier du sérum sanguin afin de détecter la présence de cancer (Ohsaka et al., 1979). Comme nous l'avons abordé précédemment cette étude stipule un effet systémique de la présence de la pathologie et les résultats obtenus démontrent une augmentation du signal du lactate lié à la malignité de la tumeur. Néanmoins ces résultats prometteurs ont été mis à mal par la démonstration que l'accroissement de la concentration en lactate peut être liée à de multiples autres pathologies, et que, de plus, la détection du lactate avec le type d'échantillon (plasma sanguin) et le matériel employé (Spectromètre 100MHz) est difficile. Une étude datant

du milieu des années 80 portant sur la même problématique de Fossel et coll. (Fossel et al., 1986) a conduit un grand nombre de groupes de recherche à se lancer dans le domaine. La méthodologie mise en avant dans le cadre de ces travaux repose essentiellement sur l'étude des résonances liées aux lipides (0.8ppm et 1.2ppm) et plus particulièrement sur les ratios entre les deux signaux issus des lipides. Cependant la majorité de ces équipes (Herring et al., 1990; Hiltunen et al., 1992; Kriat et al., 1993) n'a pas été en mesure de reproduire les résultats obtenus par Fossel et ses collaborateurs qui mettaient en avant la possibilité de détecter la présence d'une tumeur au travers des profils métaboliques obtenus par spectroscopie RMN du plasma sanguin avec une sensibilité de 100% de manière analogue à l'étude de A. Ohsaka (Ohsaka et al., 1979). De plus, il a été clairement démontré que les perturbations observées peuvent être liées à d'autres facteurs, comme le régime alimentaire, l'âge, le sexe, le fait d'être enceinte (Bollard et al., 2005). Parallèlement à ces études focalisées sur la cancérologie, la RMN sur plasma sanguin a montré un intérêt pour l'évaluation précoce des phénomènes de rejet lors de transplantation cardiaque. Il apparaît néanmoins que les paramètres analysés dans ce type d'études (Eugene et al., 1991) sont grandement similaires à ceux rapportés par Fossel dans son étude datant de 1986. De surcroît, ce test n'est pas suffisamment spécifique, les critères de classification sélectionnés n'étant pas suffisamment discriminatoires. La problématique de la transplantation cardiaque a néanmoins fait l'objet d'autres études élargissant le champ d'investigation métabolique notamment aux glycoprotéines (Pont et al., 1991). Enfin d'autres pathologies ont fait l'objet d'analyse RMN du plasma tel que la malaria (Nishina et al., 1988), les diabètes (Hodavance et al., 2007; Roussel et al., 2007), des problèmes coronariens (Brindle et al., 2002), ou les problèmes rénaux et la dialyse (Bell et al., 1991; Holmes et al., 1990).

Un article du début des années 80 retrace les débuts de la RMN appliquée au sang et dérivés sanguins, se focalisant principalement sur l'étude des globules rouges (Rabenstein, 1984). Cet article fait suite notamment aux premiers travaux réalisés sur des cellules entières étudiées par RMN, tel qu'on le conçoit lors d'études sur le sang dans sa globalité (Brindle et al., 1979). Ce type d'approche a notamment trouvé des applications dans le suivi de traitements pharmacologiques (Kuchel et al., 1984). Néanmoins l'utilisation de techniques dites classiques pour l'analyse du sang dans sa globalité est obscurcie par l'abondance de signaux lipidiques et issus de macromolécules rendant l'interprétation délicate. Cette technique fait aujourd'hui place à l'utilisation de méthodologies plus adaptées telle que la RMN Haute Résolution en Rotation à l'Angle Magique (High Resolution Magic Angle Spinning – HRMAS) (Humpfer et al., 1997) dont nous reparlerons en détail par la suite.

Du fait de sa simplicité d'accès, l'urine est sans doute le biofluide le plus étudié par

RMN aujourd'hui. La composition de l'urine doit être directement corrélée avec la fonction du rein qui est un organe central dans les phénomènes de régulation d'homéostasie de l'organisme tout comme dans sa biochimie. En effet, le rein élimine par l'intermédiaire de l'urine les éléments non utiles à l'organisme. C'est pourquoi la composition physico-chimique (pH, viscosité, caractère ionique) de l'urine est complexe et fortement dépendante de l'environnement (et notamment de l'alimentation (Nicholson and Wilson, 1989; Walsh et al., 2006)), de l'espèce (animal, humain) voire même de l'âge (Williams et al., 2005). La complexité métabolique des spectres RMN acquis sur les échantillons d'urine est bien plus importante que pour le plasma sanguin. Des références font états de 5000 signaux RMN suffisamment résolus pour être interprétés acquis sur des échantillons d'urine à haut champ (800MHz) (Bertram et al., 2007b).

L'urine est un biofluide qui, compte tenu de sa grande variabilité liée à l'environnement, a souvent été employée dans des populations de patients néonataux dont l'hétérogénéité alimentaire peut être atténuée (Foxall et al., 1995). Ainsi les erreurs métaboliques innées chez les bébés ont fait l'objet de recherches par RMN de l'urine dont on pourra trouver une revue partielle dans un article de 1999 de J.C. Lindon (Lindon et al., 1999a).

De manière analogue à l'étude des transplantations cardiaques par RMN des produits sanguins, l'urine liée directement au rein a servi de biomarqueur pour l'étude des transplantations rénales. Dans une étude portant sur 33 cas de patients ayant subi une transplantation du rein, les profils métaboliques RMN d'urines de ces patients ont été analysés par comparaison avec l'évolution clinique constatée. Un certain nombre de marqueurs spécifiques ont pu être ainsi identifiés et reliés, soit à la réjection de l'organe, soit à des problèmes d'ischémie ou de nécrose du rein. Néanmoins ces marqueurs, pris individuellement, n'ont pu se montrer assez spécifiques pour différencier les états pathologiques (Foxall et al., 1993a). Dans une étude similaire, réalisée la même année, un ensemble de critères a été défini permettant de discriminer les états d'évolution post-chirurgical de la transplantation rénale (Le Moyec et al., 1993). Encore une fois, bien que statistiquement probant, le caractère insuffisamment spécifique de ceux-ci n'a pu permettre une utilisation en tant que diagnostic clinique.

De manière plus fondamentale, il a été démontré que les profils métaboliques obtenus sur l'urine peuvent être corrélés à des altérations spécifiques des organes (Holmes et al., 1998a) tels que le foie ou le rein, et même à des régions spécifiques de ces organes comme par exemple le cortex rénal (Gartland et al., 1991; Gartland et al., 1990). Au travers de ces études menées sur des rats des techniques analytiques plus évoluées sont employées afin d'évaluer les liens

existant entre la toxicité de certains produits, des altérations au niveau du foie ou des reins (dans le cortex ou au niveau médullaire), et un ensemble de métabolites (de 18 à 24 métabolites différents en fonction de l'étude considérée). Ces études sont les premières à avoir mis en jeu des techniques d'analyse statistique de ce type, que l'on nomme « pattern recognition » (Holmes et al., 1998b).

La caractérisation de la normalité pour l'utilisation de la RMN de l'urine humaine lors d'étude du métabolisme ou de processus pathologiques est une première (Holmes et al., 1994). Cette étape a cependant démontré que la variabilité métabolique est liée à de multiples facteurs, comme ceux abordés précédemment (espèce, âge, alimentation) mais aussi d'autres facteurs tels que le fait d'avoir effectué un exercice physique. Néanmoins l'emploi des techniques statistiques de pattern recognition a permis de discriminer de façon plus spécifique des patients ayant subi une transplantation du rein au cours de leur évolution post-chirurgicale. L'utilisation des techniques de pattern recognition de classification a permis de dégager un ensemble de métabolites discriminants lorsque ceux-ci sont considérés simultanément. Cette approche fait aujourd'hui l'unanimité lors d'études de spectres complexes afin de déterminer les métabolites (les fréquences de résonances) d'intérêt dans les problématiques de classification (Weckwerth and Morgenthal, 2005).

Le LCR est un autre fluide biologique communément étudié par RMN *in vitro*. Il présente des caractéristiques physico-chimiques et métaboliques le rendant fortement intéressant pour son analyse par RMN (peu variable quant à son pH (7.3 à 7.4), peu riche en macromolécules (excepté lors de perturbations pathologique), il est possible de concentrer sa composition métabolique) (Sweatman et al., 1993). Dans une étude datant de 1993, Sweatman et coll. (Sweatman et al., 1993) ont pu attribuer les résonances, associées à 46 métabolites, acquises à l'aide d'un spectromètre 600MHz. Son examen par RMN *in vitro* a été utilisé lors de protocoles portant sur le cancer (Koschorek et al., 1989), la méningite, des dégénérescences neurologiques (Hashimoto et al., 2005; Holmes et al., 2006b) ou encore la maladie de Creutzfeldt Jacob (Lee and Harrington, 1997). Plus récemment le profil métabolique du liquide céphalo-rachidien (LCR) a été corrélé avec succès avec l'évolution clinique (score de Glasgow, score de Hunt et Hess, score cognitif) de 16 patients souffrant d'hémorragie sub-arachnoïdienne (Dunne et al., 2005).

Comme nous avons pu le voir au travers des exemples ci-avant, la RMN appliquée à l'étude des liquides biologiques connaît un grand intérêt et donne lieu à un grand nombre de recherches. Néanmoins, nous avons aussi pu voir que les biofluides peuvent être dépendants des phénomènes systémiques (Lindon et al., 1999a) (liés à des modifications inhérentes à l'organisme dans son ensemble, plus particulièrement dans le cas de l'étude de produits

sanguins) et donc que leur analyse n'est peut être pas aussi caractéristique d'un tissu que souhaité (Kell, 2006). Ces éléments ont conduit les chercheurs à utiliser des techniques d'extraction des métabolites directement au sein des tissus afin de se focaliser plus spécifiquement sur le métabolisme d'un organe.

Conjointement à l'étude des biofluides « naturels » l'étude par RMN *in vitro* du métabolisme a mis en jeu l'utilisation d'extraits tissulaires. Cette technique (ou ces techniques compte tenu du nombre de méthodologies d'extractions existantes) s'est avérée d'un grand intérêt pour s'affranchir d'éventuels effets systémiques liés à l'analyse des liquides biologiques. De plus, l'extraction de tissus souvent utilisée pour la préparation des échantillons des études *in vitro*, permet d'observer les concentrations totales des métabolites (Peeling and Sutherland, 1993), ceci parce que certains compartiments sub-cellulaires contenant les composés ne sont pas visibles en RMN *in vivo* du fait de leur mobilité réduite. Ceci implique que dans les études *in vitro* les concentrations des métabolites peuvent être plus importantes que celles mesurées en *in vivo* (Holowenko et al., 1992).

Dans une étude prospective du métabolisme cérébral réalisée par S. Cerdan au milieu des années 80, un ensemble de 14 métabolites sont identifiés à partir d'extraits tissulaires réalisés par extraction avec acide perchlorique (PCA) sur des cerveaux de rat (Cerdan et al., 1985). Cette étude se proposait d'étudier la maturation cérébrale et a permis de mettre en évidence des modifications métaboliques associées au myo-inositol, N-acétyl-aspartate, la taurine, le GABA et le glutamate. Utilisant une méthodologie d'extraction similaire, employée sur des lymphocytes, neutrophiles et érythrocytes, Sze et coll. (Sze and Jardetzky, 1990) ont pu détecter 53 métabolites et même quantifier 34 d'entre eux, incluant des acides aminés, des nucléotides, des acides organiques et des sucres. De plus, des modifications métaboliques ont pu être corrélées avec la prolifération lymphocytaire, permettant d'établir des hypothèses métaboliques quant aux processus biochimiques sous-jacents. Ces travaux ont alors fait école et Gribbestad et coll. ont ainsi pu mettre en évidence des modifications métaboliques liées à la présence de carcinomes dans les extraits de tissus de seins (Gribbestad et al., 1994), et ainsi établir une vision du métabolisme tumoral particulier des carcinomes. Poursuivant ces premiers travaux Kaplan et coll. ont ainsi étudié les liens existants entre le métabolome du cancer du sein acquis par RMN *in vitro* et la réponse au traitement thérapeutique mettant en évidence une corrélation négative entre l'augmentation de la concentration en lactate et créatine et la réponse au traitement (Kaplan et al., 1990).

A la même période une étude prospective met en évidence les modifications métaboliques liées à des pathologies musculaires (Arus et al., 1984). Les auteurs mettent en

avant la faible quantité de tissu nécessaire (de l'ordre de 300mg) et le peu de temps nécessaire à l'obtention des résultats conduisant à conclure quant à l'attractivité de la technique RMN pour l'étude des pathologies musculaires.

Au début des années 90 la réponse métabolique du foie soumis à divers traitements tels que la diète ou l'administration chronique d'éthanol sera étudiée (Ling and Brauer, 1991). Révélant un certain nombre de métabolites habituellement non détectables, dont la concentration semble liée aux différents traitements appliqués, ainsi que la modification de concentration de métabolites naturellement détectables, les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence les fortes interactions existantes entre la glycolyse, le cycle de Krebs et le métabolisme des acides gras. Burri et ses collaborateurs publient en 1990 un article traitant de la maturation métabolique du cerveau de rat étudié par RMN sur des extraits tissulaires. Dans ces travaux, les auteurs ont mis en correspondance les résultats obtenus par RMN *in vitro* et ceux obtenus lors d'une analyse de chromatographie liquide haute performance (HPLC) et montrent ainsi une très bonne concordance des techniques bien que pour certains métabolites tels que le glutamate, la glutamine et l'alanine par exemple la concentration mesurée par RMN soit inférieure à celle estimée par HPLC (Burri et al., 1990). Visant à étudier le processus métabolique lié à la prolifération lymphocytaire, Sze et son équipe ont mené une étude dont les résultats publiés en 1990 font état de l'apport de la RMN des extraits à cette problématique (Sze and Jardetzky, 1990). Les auteurs ont ainsi pu suivre les modifications métaboliques liées à l'induction d'un phénomène de prolifération sur un ensemble de 53 métabolites identifiés, notant une modification de concentration intracellulaire en lactate, taurine, inositol ainsi que des nucléotides.

Des études *in vitro* faites à partir d'extraits de tumeurs ont été réalisées dans le but de trouver des caractéristiques spectrales spécifiques aux différents types de tumeurs ce qui permettrait d'améliorer l'identification des néoplasmes *in vivo* (Czernicki et al., 2000; Gribbestad et al., 1994; Sutton et al., 1994). Peeling et coll., en 1992 (Peeling and Sutherland, 1992) se proposent d'analyser des extraits de tissus issus de tumeurs cérébrales et de comparer les profils métaboliques à du tissu sain obtenu après opération de patients épileptiques. Les résultats de cette étude mettent en évidence une perturbation du métabolisme du glucose lié au processus tumoral avec une notable diminution de la concentration relative d'un certain nombre de métabolites tels que la créatine, le succinate, le glutamate, l'aspartate ou la glutamine et une augmentation de la concentration relative d'autres métabolites comme la glycine et l'alanine. Les auteurs ont aussi pu mettre en évidence des différences métaboliques entre méningiomes et astrocytomes (concentration relative en créatine ou en myo inositol). Ainsi, en raison de la plus

grande résolution spectrale atteinte par utilisation de la *RMN in vitro*, la complexité implicite de la résonance de la choline autour de 3.2 ppm dans les tumeurs a été déterminée comme dérivant non seulement de la choline libre mais également de la glycérophosphocholine, de la phosphocholine, de la taurine, myo inositol et la phosphoethanolamine (Remy et al., 1994). La concentration des composés liés à tCho (choline libre + la glycérophosphocholine + la phosphocholine), en *in vivo* a été établie comme étant importante dans les tumeurs, comparée à celle des tissus sains en raison du nombre important de cellules. Cependant, Rémy et coll. n'ont trouvé aucune différence significative dans leur étude, qui fut réalisée par l'utilisation des méthodes *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* pour un modèle de gliome C6 de rat (Remy et al., 1994). Ceci concorde avec les résultats d'autres travaux publiés (Peeling and Sutherland, 1992; Usenius, 1994). Rémy et coll. n'ont noté qu'une augmentation de la concentration de taurine à l'intérieur des gliomes, qui les conduit à la conclusion suivante, un accroissement des concentrations de taurine et de phosphoethanolamine peut être responsable des changements observés dans la région des 3.2ppm sur les spectres *in vivo*.

En dépit des avantages des études *in vitro* il existe des inconvénients concernant principalement les procédures d'extractions. Par exemple, la méthode d'extraction la plus largement utilisée, l'extraction PCA, retire en grande partie les lipides (Ala-Korpela et al., 1996) et les protéines des échantillons, même si ceux-ci jouent un rôle important dans le métabolisme cellulaire normal et sont connus pour contribuer aux signaux des métabolites liés à la choline observés *in vivo* (Peeling and Sutherland, 1992). De plus, les procédures d'extractions libèrent également des métabolites de différents compartiments cellulaires qui ne sont pas détectables en *in vivo*. Ceci implique naturellement que les études *in vitro* peuvent faire apparaître certains métabolites non visibles dans les études *in vivo* et donc compliquer la mise en correspondance des résultats de différentes études.

L'hétérogénéité des différentes procédures d'extractions peut également causer certaines difficultés. Ainsi au travers des articles de J.E. Le Belle et de C.Y. Lin datant respectivement de 2002 et 2007, il a été démontré qu'avec l'emploi de différentes méthodes d'extraction, des quantités variables de métabolites sont détectées à partir des mêmes tissus (Le Belle et al., 2002; Lin et al., 2007) ceci conduisant à une comparaison peu évidente entre les différentes études pourtant basées s

ur l'étude par RMN d'extraits tissulaires. De plus, les résultats extraits de ces publications démontrent clairement l'intérêt du choix adéquat de la procédure d'extraction en fonction de l'objectif recherché et/ou du type de tissu étudié. Ainsi l'utilisation de la procédure $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ sera plus adéquate qu'une procédure faisant appel à PCA pour l'étude des

tissus riches en lipides tels que le foie ou le cerveau. La nécessité du choix de la procédure d'extraction peut néanmoins s'avérer problématique dans le cadre d'études de tissus peu caractérisés *a priori* ou dont la modification métabolique étudiée est elle-même peu caractérisée (études prospectives).

Enfin l'un des problèmes essentiels soulevé par les procédures d'extraction métabolique est la quantité relativement importante de matériau nécessaire. Dans son article de 2007, C.Y. Lin donne une masse minimale de 50 mg de tissu pour la réalisation d'extractions exploitables avec l'utilisation de séquences RMN plus spécifique comme la J-Résolue (J-RES). Bien que cette masse ne soit pas excessivement importante, l'hétérogénéité des tissus, qui plus est, pathologique, nécessite souvent l'emploi de faible quantité pour être réellement caractéristique. Par ailleurs, il apparaît au travers de la littérature que la masse de tissu employée soit bien souvent largement supérieure, oscillant entre 300mg et plusieurs grammes.

1.2.1.3. LA RMN EX VIVO

La SRM *ex vivo* correspond à l'analyse RMN d'un tissu biologique dans son intégralité de façon externe à l'organisme dans son ensemble. Définie de la sorte, cette technique trouve ses premières applications avec les travaux de C.E. Mountford datant de la fin des années 70 et du début des années 80 (Mountford et al., 1982; Mountford et al., 1986; Mountford et al., 1984). Dans ces travaux les auteurs appliquent directement les techniques issues de la RMN des liquides sur le tissu biologique amenant une perte importante de résolution due au caractère pseudo-solide de l'échantillon. Ces problèmes seront résolus avec l'application de la technique de rotation à l'angle magique que nous aborderons dans la suite de ce paragraphe. Néanmoins les résultats obtenus par application directe de la RMN liquide sur du tissu biologique sont prometteurs. Ainsi en 1982, Mountford et coll., appliquant cette méthodologie à l'étude d'un modèle animal induisant une prolifération des cellules T (Lymphocytes T) au niveau du thymus dans la phase précoce du développement pathologique, les auteurs ont pu mettre en évidence une modification biochimique des cellules, et cela de manière plus précoce qu'avec les techniques classiques telles que la cytologie ou l'histologie (Mountford et al., 1982).

Parallèlement à cela une étude sur un modèle animal mené par Ramshaw et coll. (Ramshaw et al., 1983) a permis de confirmer le potentiel de la RMN du ^1H comme outil d'étude du cancer. Celle-ci met en évidence une différence métabolique entre les cellules tumorales, potentiellement métastasantes ou non, corrélée linéairement avec le ratio cholestérol/phospholipide, ou la présence d'une résonance particulière non déterminée à

l'époque, présentant un temps de relaxation important et un déplacement chimique à 1.3ppm. Ces résultats seront à nouveau démontrés par Mountford et coll. (Mountford et al., 1984).

C.E. Mountford, au travers d'un article publié en 2004 (Mountford et al., 2004), présente un grand nombre d'études menées par application de la RMN des liquides à l'étude de tissus biologiques tels que la prostate, le foie, la thyroïde, l'œsophage, les tumeurs cérébrales, les ovaires. Cependant l'utilisation d'une technique non adaptée au système étudié limite grandement la résolution spectrale et ainsi la quantité d'informations conduisant principalement les auteurs à se focaliser sur les métabolites les moins affectés par la perte de résolution. Ainsi, par exemple, dans une étude de Delikatny et coll. publiée en 1993 visant à étudier du tissu utérin pour déterminer le stade de malignité du tissu, les auteurs se concentrent principalement sur les composantes lipidiques des spectres, la résolution spectrale ne permettant pas d'identifier avec certitude les autres résonances (Delikatny et al., 1993).

Les progrès techniques vont progressivement conduire les chercheurs à privilégier la technique de RMN HRMAS. C'est donc en 1997 que L.L. Cheng et ses collaborateurs (Cheng et al., 1997) sont les premiers à appliquer la technique RMN HRMAS au tissu cérébral humain, afin d'étudier le lien entre histopathologie et la spectroscopie RMN. Cette étude, pionnière dans le domaine, fait suite à une publication des mêmes auteurs démontrant la possibilité d'employer cette technique sur du tissu cérébral (Cheng et al., 1996). La technique HRMAS permet d'étudier par RMN des composés mobiles se trouvant à l'intérieur d'échantillons fortement inhomogènes. Le fait de travailler à l'angle magique permet de moyenniser à zéro les fortes inhomogénéités présentes dans ces échantillons et d'obtenir des spectres dont la qualité approche celle des spectres liquides haute résolution (Andrew and Newing, 1958). Ceci permet l'utilisation directe du tissu biologique afin de limiter les possibles erreurs liées aux procédures d'extraction (Le Belle et al., 2002). Les techniques hautes résolutions de spectroscopie par RMN ont démontré leur potentiel dans l'étude du métabolisme normal ou pathologique ce qui a conduit les différentes équipes à privilégier la méthodologie RMN HRMAS. Par ailleurs, cette technique présente les avantages de sa plus grande sensibilité, de la plus faible quantité de matériel nécessaire, de limiter les biais liés à la manipulation de l'échantillon et surtout de donner accès à l'ensemble des métabolites et macromolécules présents dans l'échantillon initial. L'édition privilégiée de métabolites ou des lipides et macromolécules se fera sans modification de l'échantillon mais lors du choix des paramètres d'acquisitions expérimentaux.

L'utilisation des techniques de RMN HRMAS s'est par la suite largement répandue (Griffin et al., 2000; Reo, 2002) pour l'analyse du tissu issu de multiples organes tels que la prostate (Burns et al., 2004; Burns et al., 2005; Cheng et al., 2001; Wu et al., 2003), le foie

(Bollard et al., 2000; Duarte et al., 2005; Rooney et al., 2003; van Ginneken et al., 2007; Waters et al., 2000; Wu et al., 2006), les reins (Griffin et al., 2000; Huhn et al., 2004; Wang et al., 2006), le cœur (Griffin et al., 2001), l'utérus (Lyng et al., 2007; Maurel et al., 1992; Sitter et al., 2004b; Stanley, 2002), l'œil (Fris et al., 2006; Tessem et al., 2006a; Tessem et al., 2006b), le sein (Bathen et al., 2007; Celda et al., 2006; Sitter et al., 2006; Sitter et al., 2002), les muscles (Lucas et al., 2005) ou encore les tissus du système nerveux central (Cheng et al., 2000a; Cheng et al., 1998a; Cheng et al., 1997; Griffin et al., 2002; Griffin and Corcoran, 2005; Ratai et al., 2005; Tsang et al., 2005).

A) LE CERVEAU

La RMN HRMAS sur le tissu cérébral est la première utilisation de la technique à l'étude du tissu humain. C'est l'équipe de L.L. Cheng qui en 1997 (Cheng et al., 1997) se propose d'étudier les liens existants entre la neuropathologie et le métabolisme sur un ensemble de 15 échantillons de patients souffrant de la maladie de Pick¹. Afin de valider la technique RMN HRMAS les auteurs ont étudié le tissu cérébral en employant la technique RMN HRMAS nouvellement disponible en parallèle avec les techniques de RMN sur extraction (MeOH / CHCl₃). Ces résultats ont enfin été corrélés avec les résultats de neuropathologie obtenus sur l'autre hémisphère cérébral. De façon intéressante les auteurs ont pu mettre en évidence un certain nombre de différences entre les spectres acquis *in vitro* et *ex vivo* : celles-ci se résument principalement en une sous-estimation de la concentration en N-acétyl-aspartate et en choline (ensemble des composés liés à la choline) lors de l'emploi des procédures d'extraction. Enfin une corrélation positive a pu être établie entre la perte neuronale établie par anatomo-pathologie et la concentration en N-acétyl-aspartate. Suite à cette première étude les mêmes auteurs se proposent en 1998 d'étudier du tissu tumoral (Cheng et al., 1998a). Un ensemble de 19 patients souffrants de 5 types de tumeurs du système nerveux central a été étudiés par HRMAS et anatomie pathologique afin de déterminer des corrélations entre l'état métabolique et la classification établie. A nouveau un contrôle de la procédure HRMAS est réalisé à l'aide d'un second enregistrement RMN réalisé à partir d'extraits tissulaires (extraction PCA). En accord avec leur étude précédente, bien que la méthode d'extraction choisie pour la comparaison soit différente, la concentration en choline est à nouveau sensiblement différente entre la RMN « classique » et la RMN HRMAS. Les résultats HRMAS ont pu être mis à profit afin d'établir des

¹ *Variété de démence sénile rapidement évolutive (détérioration intellectuelle) survenant précocement et se caractérisant par une atrophie (diminution de volume) cérébrale très importante, touchant essentiellement les lobes frontaux (situés en avant) et temporaux (sur les côtés et légèrement au-dessus) du cerveau.*

listes de métabolites dont les concentrations sont statistiquement différentes entre les types tumoraux. Un ensemble important de métabolites voit leurs concentrations significativement modifiées entre le tissu sain et pathologique (lactate, inositol, créatine, glycine, phosphocholine, choline, glutamine, glutamate, N-acétyl-aspartate, lipides) et il existe de la même manière un certain nombre de métabolites dont la concentration est statistiquement différente entre les sous-groupes tumoraux. Ainsi les auteurs ont pu mettre en évidence l'intérêt de l'étude du métabolisme par HRMAS afin de caractériser les différents sous-groupes tumoraux sans pour autant donner des critères métaboliques de classification. L.L. Cheng et son équipe poursuivent leurs travaux et publient en 2000 un nouvel article mettant en jeu la HRMAS pour l'étude de l'hétérogénéité des tumeurs cérébrales et plus particulièrement des glioblastomes (Cheng et al., 2000a). Visant à mettre en évidence la variabilité métabolique interne des tumeurs, cette étude repose sur l'analyse d'un cas dont 4 échantillons distincts vont être analysés par HRMAS et anatomie pathologique. Les micro-hétérogénéités observées lors de l'étude anatomo-pathologique sont importantes et celles-ci sont corroborées par l'apport de l'analyse RMN HRMAS. Ainsi des corrélations positives ont pu être mises en évidence entre le degré de nécroses observées et les concentrations en lipides ou en lactate ou la concentration en choline, phosphocholine et la cellularité de l'échantillon. Entre temps, en 1999, Barton et coll. se proposent de mettre en rapport les résultats obtenus par RMN HRMAS avec les résultats de la spectroscopie RMN *in vivo* (Barton et al., 1999). Un groupe de 5 patients (3 astrocytomes à différents grades, 1 glioblastome et 1 méningiome) va ainsi être examiné à l'aide des deux procédures et les résultats vont être mis en adéquation. Les résultats montrent clairement que les spectres obtenus *ex vivo* par HRMAS sont très proches des spectres obtenus *in vivo* compte tenu de la perte en résolution. Cependant un certain nombre d'informations sont perdues ou tout du moins diluées lors d'acquisition RMN *in vivo*. Ainsi les signaux issus des lipides et autres macromolécules, ayant des temps de relaxation T2 courts seront moins visible *in vivo*. De plus la perte en résolution peu conduire à de mauvaises interprétations comme dans le cas illustré par le méningiome de cette étude, présentant une raie sur le spectre *in vivo* à 3.0ppm imputé à tort à la créatine car celle-ci est absente lors de la réalisation du spectre *ex vivo*, ce pic étant la résultante d'un ensemble de multiplets non attribué observé par RMN HRMAS.

En 2002, L. L. Cheng publie de nouveaux travaux portant cette fois-ci sur l'étude d'une maladie neuro-dégénérative, la maladie d'Alzheimer (Cheng et al., 2002). La méthodologie employée est similaire à celle employée par la même équipe dans leurs précédents travaux exposés ci-avant. Un ensemble de 7 sujets, 3 malades et 4 témoins sera analysé conjointement par deux procédures, la RMN HRMAS d'un côté pour l'étude du métabolisme, et un comptage

neuronal stéréologique afin de mesurer la quantité de neurones au mm³ présents dans le tissu étudié. Les résultats sont conformes à leur première observation en démontrant une corrélation positive entre la densité neuronale et la concentration en N-acétyl-aspartate, cependant cette mesure ne permet pas de différencier les sujets sains des sujets souffrants de la maladie d'Alzheimer. Les auteurs montrent néanmoins que l'utilisation de ratios de concentrations métaboliques, issus de la mesure HRMAS tel que N-acétyl-aspartate/créatine est quant à elle significative. De manière plus détaillée les auteurs démontrent à l'aide des mesures HRMAS que les différents composés du groupement choline observables en *in vivo* sont eux aussi perturbés par la pathologie (statistiquement significative), sans que cela ne soit observable sur le groupement complet prouvant ainsi l'intérêt de l'exploration *ex vivo* de cette pathologie. J.L. Griffin et ses collaborateurs présentent la même année des travaux proposant de différencier par leur métabolisme différentes lignées cellulaires présentes dans le cerveau humain (neurone, astrocyte et progéniteur O-2A) (Griffin et al., 2002). Outre les différences métaboliques notables identifiées par les auteurs, la faisabilité et le caractère non destructif de la méthode sont démontrés clairement. Les observations ainsi faites ont permis l'élaboration d'hypothèses quant au lien existant entre le spectre observé *in vivo* et les métabolites composant les tissus observés, avec par exemple une hypothèse de surestimation de la concentration en N-acétyl-aspartate mesuré *in vivo* du fait de la présence d'autres composés que le N-acétyl-aspartate dans les lignées cellulaires autre que les neurones présentant des fréquences de résonances similaires.

Ces travaux prometteurs encouragent d'autres équipes à utiliser la RMN HRMAS pour l'étude du métabolisme cérébrale lié à d'autres pathologies. Ainsi, B. Sitter et coll. appliquent cette méthodologie à l'étude de la « neuronal ceroid lipofuscinoses » (NCL) (Sitter et al., 2004a). Cette maladie est une maladie héréditaire récessive et est la cause la plus commune d'encéphalopathie de l'enfant à issue fatale. Deux types pathologiques vont ainsi être comparés, ceux présentant un NCL de type infantile (9 cas) et ceux avec une NCL juvénile (5 cas) par opposition à des cas contrôles sains (9 cas). Les résultats publiés montrent une concordance entre les mesures *in vivo* et *ex vivo* effectuées, permettant de différencier les cas de NCL infantile des cas contrôles, sans pour autant réussir à différencier statistiquement les cas de NCL juvénile des cas sains.

Toujours en 2004, E. Ratai de l'équipe de L.L. Cheng publie des résultats portant sur l'influence métabolique de virus immuno-déficient simian (modèle animal du SIDA) au niveau du tissu cérébral (Ratai et al., 2005). Dans cette étude le virus est inoculé à des macaques et le tissu cérébral (cortex frontal et putamen) prélevé après 11 jours (2 cas) et 2 mois (1 cas) pour l'étude métabolique. Conformément à la procédure mise en place dans ce groupe de recherche les

enregistrements seront réalisés simultanément par RMN HRMAS et sur des extraits tissulaires (extraction méthanol : chloroforme permettant de conserver les composantes lipidiques des échantillons) par RMN liquide. Les résultats obtenus en comparant les techniques HRMAS et *in vitro* montrent encore une fois un bon accord entre les concentrations obtenues, variant en fonction du métabolite observé, avec néanmoins des différences notables et non négligeables pour certains métabolites d'intérêt tel que le groupement de la choline (choline/créatine), le N-acétyl-aspartate (N-acétyl-aspartate/créatine) ou le myo inositol (myo inositol/créatine).

L'étude des tumeurs cérébrales, en particulier des gliomes va donner lieu à une série d'articles entre 2004 et 2006 portant, soit sur l'étude de tumeurs humaines (Martinez-Bisbal et al., 2004), soit sur des modèles animaux (Griffin et al., 2006; Valonen et al., 2005). L'étude de l'équipe espagnole publiée en 2004 repose sur l'étude du métabolome lié aux gliomes de haut grade, des glioblastomes. Une série de 10 cas seront ainsi étudiés par HRMAS proton et ^{13}C , une base de données sera établie regroupant l'ensemble des métabolites observés (129 résonances attribuées à 37 métabolites) et une comparaison sera menée entre les acquisitions HRMAS et RMN liquide réalisée sur des extraits tissulaires par acide perchlorique. Les résultats obtenus tendent à prouver, bien que la population étudiée soit réduite, que les caractéristiques métaboliques sont corrélées à la nature de la tumeur (récidive ou primaire). En effet les auteurs notent une plus grande similarité des profils métaboliques entre les glioblastomes primaires d'une part, et les récurrences d'autre part. Les deux autres études portant sur les modèles animaux sont l'œuvre de la même équipe de chercheurs de l'université de Kuopio en Finlande en collaboration avec l'université de Cambridge, l'Imperial Collège de Londres et l'université de Manchester en Angleterre. Dans un premier temps, en 2005, c'est l'influence d'un traitement (HSVtk-GCV) induisant une mort cellulaire programmée au travers de l'apoptose dans les gliomes. L'effet de ce traitement sera suivi par HRMAS en se focalisant sur les signaux des métabolites liés à la choline conformément aux observations préliminaires de Podo (Podo, 1999) et Meisamy (Meisamy et al., 2004). Dans cette étude, un ensemble de 26 rats (6 contrôles et 20 traités) sera étudié par RMN HRMAS et 13 rats (3 contrôles et 10 traités) par histopathologie. Les signaux issus des composés liés à la choline (tCho) mais aussi la taurine et le myo inositol et la phosphoethanolamine présentant tous des raies de résonance dans la même gamme de fréquence (3.2ppm) sont déconvolués et les concentrations des métabolites mesurées relativement à la concentration en créatine déterminée à partir des mesures effectuées sur les extraits cellulaires. Les résultats obtenus démontrent clairement que le phénomène d'apoptose peut être suivi par mesure *ex vivo* des composés nommés ci-avant. Néanmoins celle-ci ne peut se faire dans la phase précoce de l'apoptose lors d'observation *in vivo* en raison l'abondance de

métabolites contribuant au signal RMN à 3.2ppm. Suite à cette première étude la même équipe a étudié les connexions existant entre l'histologie, les données de transcriptomique, et les observations métaboliques acquises par HRMAS. L'apoptose induite est étudiée après 0, 4 et 8 jours de traitement sur un groupe de 9 rats. L'influence de l'apoptose sur les spectres RMN est principalement localisée sur les signaux des lipides (0.9, 1.3, 2.2, 2.8 et 5.4ppm). Par ailleurs, il a clairement été mis en évidence un lien entre les résultats obtenus par transcriptomique et RMN HRMAS conduisant les auteurs à préconiser l'utilisation de la HRMAS comme outils d'investigation des processus apoptotiques.

En parallèle de ces études sur les gliomes, la HRMAS a été employée pour l'analyse d'un autre type de tumeurs cérébrales, des méningiomes (Tugnoli et al., 2006b). Un groupe de 6 méningiomes y est étudié et les données métaboliques obtenues comparées aux données de RMN *in vivo*. Un ensemble de 46 métabolites y sera identifié et les fréquences de résonances associées relevées. Les données acquises ont permis de mettre en évidence un profil métabolique particulier associé aux méningiomes mais aussi une variabilité biochimique, principalement liée aux macromolécules et lipides, que l'on peut corrélérer à la variabilité morphologique de ces tumeurs. Enfin la correspondance relevée entre les données *in vivo* et *ex vivo* permet une meilleure interprétation des données *in vivo*.

Pour finir, deux études portant sur l'étude du tissu cérébral sain ont été réalisées conjointement par les équipes de l'Imperial College de Londres et de l'université de Cambridge. Dans leur article, Tsang et coll. démontrent la possibilité de différencier des régions anatomiques sur les uniques critères métaboliques obtenus par spectrométrie RMN HRMAS en s'appuyant sur des techniques de pattern recognition. Parallèlement à cela J.L. Griffin démontre la possibilité d'observer le métabolisme cérébral intermédiaire à l'aide de la spectroscopie RMN HRMAS du ^{13}C . Cette étude est particulièrement intéressante car elle démontre la faisabilité de la méthode en abondance naturelle avec l'apport des technologies de sonde cryogénique. La possibilité de réaliser des acquisitions en ^{13}C en abondance naturelle a pu être démontrée à champ plus faible (300MHz) en augmentant la quantité de matériel utilisé et le temps d'acquisition (2h) (Yang et al., 2006). Néanmoins les observations de cinétique métabolique observées par Griffin à 3°C sont telles qu'une acquisition sur 2h semble peu adéquate à la réalisation d'une acquisition en ^{13}C (Griffin and Corcoran, 2005).

B) LA PROSTATE

La prostate est l'un des organes les plus étudiés par spectroscopie RMN HRMAS. La

première application de la HRMAS sur la prostate est l'œuvre de A. Tomlins et de l'équipe de J.K. Nicholson en 1998 (Tomlins et al., 1998a). Les auteurs, au travers de cette étude préliminaire sur un groupe de 12 patients souffrant d'hyperplasie bénigne ou de carcinome prostatique démontrent le potentiel de la spectroscopie RMN HRMAS pour l'obtention d'informations biochimiques typiquement caractéristiques des processus tumoraux telles que la composition en lipides des tissus. De plus, les auteurs font état d'une plus grande similarité entre les spectres *ex vivo* et les spectres RMN *in vivo* facilitant ainsi leur interprétation. Cette première approche a, par la suite, donné lieu à une dizaine d'articles présentés ci-après mettant en œuvre la RMN HRMAS et le tissu issu de biopsies de prostate.

L'équipe de L.L. Cheng, première équipe à avoir appliqué la spectroscopie RMN HRMAS à l'étude des tissus (Cheng et al., 1996), s'est elle aussi intéressée à l'étude de la prostate pour la détermination de la concentration en spermine au sein de cet organe dans l'optique d'évaluation de progression du cancer. Les principales modifications métaboliques entre le tissu prostatique sain et tumoral reposent sur la présence de citrate et de spermine dans le tissu sain, et l'augmentation de la présence de lipides dans les tissus pathologiques. C'est ainsi que les auteurs démontrent un lien clair entre la concentration en spermine et citrate et le nombre de cellules épithéliales normales.

Parallèlement à cela, l'augmentation du nombre d'études HRMAS sur les tissus biologiques a conduit cette même équipe de chercheurs à étudier les problèmes techniques liées à l'emploi de la RMN HRMAS et dans un premier temps à analyser les effets de la congélation sur le métabolome observé (Wu et al., 2003). Cette étude a donné lieu à une nouvelle publication réalisée en 2007 afin de déterminer les modifications induites par une congélation prolongée (Jordan et al., 2007). Les résultats obtenus dans le cadre de ces deux études montrent que la congélation à très basse température (-80°C) modifie très légèrement la concentration absolue des métabolites et que celle-ci n'est pas ou peu modifiée par une congélation prolongée. De plus, l'utilisation de ratio de concentration réduit cette variabilité et les auteurs concluent que cette dégradation peut être tenue comme négligeable. De la même manière cette équipe a présenté des résultats mettant en jeu la spectroscopie HRMAS sur du tissu prostatique dans l'optique de réduire la possible dégradation « physique » en réduisant la vitesse de rotation du rotor (Taylor et al., 2003).

Conjointement au développement méthodologique (Burns et al., 2005) cette même équipe poursuit ses travaux visant à étudier les corrélations existantes en histopathologie et les profils métaboliques acquis par HRMAS sur un groupe de patients plus étendu que dans leur publication datant de 2001. Cette nouvelle étude (Burns et al., 2004) qui repose sur l'analyse

métabolique d'un groupe de 29 patients confirme le lien existant entre la progression pathologique du cancer de la prostate et les modifications métaboliques relevées. Enfin une dernière publication de la même équipe datant de 2005 valide les premiers résultats en élargissant la population à 82 patients permettant l'analyse de 199 échantillons provenant de différentes zones de la prostate. Dans cette étude les auteurs ont cherché à déterminer les corrélations existantes entre les différents profils métaboliques issus des enregistrements HRMAS et les données histologiques mais aussi les données issues du suivi clinique des patients. Les conclusions apportées par leurs premières publications sont ainsi confortées et complétées en abordant la problématique de comparaison avec du tissu sain comme contrôle. De plus, cette dernière étude s'applique à expliciter l'importance de corrélater les résultats HRMAS avec le devenir clinique des patients afin de donner une portée clinique à ces observations.

Une troisième équipe de chercheurs de l'université de San Francisco a elle aussi appliqué la méthodologie HRMAS pour l'étude du métabolisme prostatique. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de deux publications de Swanson et coll. en 2003 (Swanson et al., 2003) et 2006 (Swanson et al., 2006). Dans leur étude de 2006 les auteurs exposent la méthodologie préconisée pour l'étude par HRMAS de tissu prostatique. Des techniques de préparation, d'acquisition et de quantification sont présentées. Les conditions d'acquisition, en particulier la température y sont également étudiées en mesurant la dégradation métabolique induite par la durée de mesure. Les mesures effectuées à 1°C ne montrent pas de modification notable. Précédemment, dans leur étude de 2003, les auteurs ont étudié l'hétérogénéité du tissu tumoral prostatique en utilisant des techniques d'imagerie spectroscopique *in vivo* pour la présélection des échantillons analysés par HRMAS. Les observations faites par les auteurs démontrent que bien que la procédure d'échantillonnage de tissu soit optimisée, il subsiste une hétérogénéité métabolique mesurée par HRMAS qui complique l'interprétation clinique des données métaboliques. Néanmoins l'intérêt d'un certain nombre de nouveaux marqueurs métaboliques ont pu être établis tels que la taurine, les polyamines, le myo inositol et scyllo inositol pour l'étude du cancer de la prostate.

C) LE FOIE

Waters et coll. ont, dans leur publication datée de 2000, étudié les méthodes d'optimisation de préparation des échantillons à partir de biopsies rénales et de foie de rats (Waters et al., 2000). Démontrant dans un premier temps l'intérêt de l'emploi des inserts limitant les volumes d'analyses mais surtout augmentant la symétrie de la distribution de

l'échantillon par rapport au volume d'analyse des rotors MAS et donc l'homogénéité du champ magnétique principal (*cf. chapitre II*), les auteurs ont étudié les évolutions métaboliques des tissus dues aux différents protocoles d'études envisagés. Mettant en évidence une augmentation reproductible de la concentration relative en glycérophosphocholine (liée à la dégradation lipidique) ou encore de la réaction de transamination entre le pyruvate et l'alanine mis en évidence par l'acquisition des spectres en milieu deutéré, les auteurs démontrent une lente évolution métabolique sur une durée de 4h à basse température pour le tissu du cortex rénal. Par contraste, pour le tissu issu du foie aucune dégradation n'est relevée. Une autre partie de cette publication s'attèle à décrire les modifications liées à la congélation du tissu. Les différences notées (augmentation de certains acides aminés tels que la leucine, l'isoleucine, la valine pour les tissus congelés) sont néanmoins sujets à cautions compte tenu de la méthodologie employée. En effet les spectres obtenus à partir des tissus n'ayant pas subi de congélation ont été acquis après un délai de 1h ou plus induisant de fait une potentielle évolution métabolique. Enfin, les effets du sang résiduel dans les échantillons sont étudiés et les auteurs démontrent que la présence de cet élément dégrade la qualité de données de par son caractère paramagnétique qui limite l'homogénéité au sein de l'échantillon et donc la résolution spectrale.

Appliquant les méthodologies présentées par Waters et coll., Bollard et coll. vont établir une base de données des différents métabolites observables par RMN HRMAS en ^1H et ^{13}C d'un foie de rat (Bollard et al., 2000). Ces premiers résultats serviront de base pour une nouvelle étude réalisée par la même équipe et dont les résultats seront publiés en 2002. Dans cette publication, les auteurs ont étudié les effets du D-Galactateosamine (produit induisant une nécrose du tissu rénal) sur le métabolisme du foie au travers de cultures cellulaires de type sphéroïdes. Les profils métaboliques obtenus ont été comparés à des profils métaboliques obtenus sur des tissus sains et hépatiques de rat. Les auteurs démontrent dans un premier temps que le modèle de culture cellulaire sphéroïde conduit à des profils métaboliques où le glycogène et le glucose sont absents. Ce modèle de culture sphéroïde conduit à des profils métaboliques proches du tissu sain et permet ainsi d'effectuer une étude de toxicité *in vitro*. Les résultats de l'étude de toxicité menée démontrent clairement le potentiel de la SRM HRMAS dans ce domaine permettant de suivre l'évolution métabolique dans le temps.

De manière plus fondamentale dans un article d'Y. Wang de 2003, la même équipe de recherche a étudié l'influence de différentes méthodologies d'acquisition RMN HRMAS sur l'interprétation statistique des classifications. Ces travaux reposent sur une méthodologie similaire d'induction de nécrose du foie par administration d'un toxique dans le cadre d'un

modèle animal. Les auteurs ont employé quatre séquences d'acquisitions RMN : une séquence simple ne comprenant qu'un schéma de saturation de l'eau, une séquence filtrée en T2 de type Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), une séquence incluant un filtre de diffusion et une séquence permettant de s'affranchir du couplage de spin (J-RES) (Viant, 2003). Les résultats obtenus montrent que la discrimination entre le tissu sain et pathologique est possible peu importe le schéma d'acquisition utilisé mais que les contributions statistiques des différents métabolites sont modifiées en fonction de celui-ci. Il apparaît donc au vu de ces résultats que la détection de modifications métaboliques de faibles amplitudes peut être mise à jour avec l'utilisation de la séquence RMN adéquate et que le choix méthodologique est difficile *a priori*. Basé sur la même problématique, O.M. Rooney, du même laboratoire de recherche que Wang, s'est plus spécifiquement intéressé aux séquences d'édition par relaxation et aux mesures des temps de relaxations associés. Parallèlement l'auteur s'est aussi attaché à déterminer les coefficients de diffusion liés aux métabolites les plus importants. Travaillant sur du tissu de foie sain de rat, l'auteur démontre la possibilité d'augmenter le pouvoir de résolution de la RMN HRMAS par l'emploi de séquences d'éditions adaptées à la problématique rencontrée. L'ensemble de ces techniques, démontrées pour l'étude de tissu issu de foie, est bien entendu adaptable à l'ensemble des systèmes biologiques compatibles avec la RMN HRMAS.

En 2005, I. Duarte en collaboration avec l'équipe de J.K. Nicholson démontre pour la première fois l'intérêt de la RMN HRMAS pour l'étude du métabolome du foie dans la problématique de la transplantation (Duarte et al., 2005). Cette publication est la première faisant état de l'application de la SRM HRMAS au tissu de foie humain. Des échantillons issus d'un groupe de 6 donneurs obtenus à trois instants clés du processus de transplantation, avant le prélèvement, lors de la conservation à basse température et après la transplantation ont été analysés dans l'optique de définir des caractères métaboliques liés à la réussite de la greffe. Un listing complet de l'ensemble des déplacements chimiques en ^{13}C et ^1H associés à 31 métabolites identifiés par les auteurs est donné. Ces derniers démontrent que les caractéristiques déterminées par histopathologie et HRMAS sont en adéquation, notamment pour les résultats obtenus pour les teneurs en lipides des échantillons, et que cette composition en lipides peut être détaillée par utilisation de la méthode RMN. De plus, les auteurs ont pu suivre la cinétique de la composition métabolique des échantillons et mettre en évidence des différences du métabolisme corrélant avec le degré d'infiltration des lipides. Néanmoins en raison du faible nombre de cas et du peu de recul cette étude n'a pu permettre aux auteurs de conclure quant à la détection de biomarqueurs de réussite de greffe.

D) LES REINS

Le rein est, peut être plus encore que la prostate, un organe dont le métabolisme a fréquemment été exploré par RMN HRMAS au cours de ces 10 dernières années. Ces travaux sont principalement l'œuvre de l'équipe de J.K. Nicholson. La première publication présentant des travaux impliquant la RMN HRMAS appliquées aux biopsies de tissus rénaux date de 1997 (Moka et al., 1997) et a été réalisée par l'équipe de D. Moka en collaboration, justement, avec J.K. Nicholson. Cette étude fait écho aux premiers résultats publiés par Cheng et coll. en 1996 et 1997 sur du tissu cérébral (Cheng et al., 1996; Cheng et al., 1997). Elle présente les résultats préliminaires de faisabilité d'une mesure HRMAS sur le tissu rénal. Les caractéristiques de la méthodologie telles que le temps d'acquisition et le peu de préparation nécessaire pour l'échantillon sont présentées comme des arguments faisant de la RMN HRMAS un outil potentiel de diagnostic clinique. Enfin, cette publication fait état du premier spectre 2D haute résolution de tissu biologique humain intact. Dès l'année suivante, les mêmes auteurs présentent les avancées obtenues par application de la méthodologie RMN HRMAS à l'étude d'un groupe de 10 patients ayant subi une biopsie des reins (Moka et al., 1998). Les profils métaboliques obtenus à partir de biopsies de tissu rénal « sain » ou caractérisés comme tel par l'histopathologie sont alors comparés aux profils métaboliques des carcinomes rénaux. De manière intéressante, les auteurs rapportent que les différences métaboliques observées entre les tissus sains et pathologiques sont plus importantes que celles relevées par utilisation de la RMN *in vivo* ou *in vitro* justifiant ainsi pleinement l'emploi de la RMN HRMAS.

Ces premiers résultats encourageant vont pousser l'équipe de J. K. Nicholson à prolonger ces travaux. Entre 1999 et 2005 une dizaine d'articles seront publiés par ce groupe de chercheurs dans le cadre de cette problématique. S. Garrod (Garrod et al., 1999) va ainsi étudier le métabolome naturel des différentes régions anatomiques des reins (médullaire et cortex) et montrer que la concentration globale en acides aminés est plus importante dans le cortex rénal que dans le papilla mais aussi que certains de ces acides aminés sont absents des spectres issus de cette région (aspartate, glycine, taurine...). L'auteur a aussi pu mettre en évidence l'existence d'une plus faible mobilité des lipides (majoritairement présents dans les membranes et ainsi fortement contraints) au niveau du cortex, comparativement au papilla, dans lesquels les lipides sont plus mobiles (sans doute sous forme de gouttelettes) en réalisant des acquisitions à différentes vitesses de rotation utilisant ainsi une caractéristique différenciant la RMN HRMAS de la RMN *in vitro*.

Suite à ces premiers articles, une série de publications va s'atteler à décrire les problématiques de méthodologie rencontrées lors de l'application de la RMN HRMAS au tissu rénal animal. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent Waters et coll. (Waters et al., 2000) se sont proposés de présenter les résultats obtenus après optimisation des procédures de préparation des échantillons issus de foie et de rein animal ainsi que les résultats issus de l'étude de la stabilité biochimique des échantillons lors de l'acquisition des spectres HRMAS.

Mettant en œuvre les résultats méthodologiques publiés précédemment, J.L. Griffin dans un papier daté de 2000 se propose de comparer les profils métaboliques obtenus sur des échantillons d'urine et de tissu rénal d'un ensemble de quatre espèces animales (des rats de laboratoire et 3 espèces sauvages). Démontrant clairement la possibilité de différencier ces différentes espèces sur la base des profils RMN des urines mais aussi des tissus rénaux, ces résultats mettent en évidence la possibilité de s'affranchir des étapes de préparation nécessaires à la réalisation d'acquisition sur des liquides biologiques. Néanmoins les résultats obtenus démontrent de la même manière la difficulté de transposer les résultats obtenus d'une espèce à l'autre dans le cadre d'une étude toxicologique par exemple. La même année, cette équipe au travers de travaux publiés par R. Tate va pour la première fois appliquer des algorithmes statistiques de reconnaissance de profils (pattern recognition) en combinaison avec la RMN HRMAS pour différencier le tissu rénal sain du tissu issu de carcinomes rénaux (Tate et al., 2000). Cette publication marque une étape importante dans ce qu'aujourd'hui nous appelons la métabolomique telle que nous l'avons définie précédemment. Celle-ci elle se propose d'étudier l'ensemble du métabolome accessible par RMN HRMAS. Mettant en jeu un ensemble de 22 échantillons (11 sains, 11 pathologiques), les auteurs démontrent la possibilité de les classer sur la base de leur profil métabolique sans intervention humaine.

En 2001, Garrod et coll. publient un article présentant les résultats obtenus par HRMAS pour l'étude des modifications biochimiques induites par un produit toxicologique (le 2-bromoethanamine hydrobromide, BEA²) au niveau du métabolome des reins et du foie (Garrod et al., 2001). L'emploi de la RMN HRMAS a permis de mettre en évidence la métabolisation rapide du BEA (indétectable dans les tissus) et la mise en évidence de deux conséquences toxicologiques distinctes, dans un premier temps des lésions mitochondriales au niveau du foie et des reins avant l'induction de la nécrose au niveau rénal. Les résultats d'une étude du même type, publié en 2006, démontre les effets d'une « terre rare », le Ce(NO₃)₃ sur le métabolisme du foie et des reins (Wu et al., 2006).

² *Produit induisant la nécrose de façon rapide au niveau des reins de manière à établir un modèle animal de nécrose typiquement associé à l'utilisation d'analgésiques tels que l'aspirine.*

E) LE SEIN

La technique RMN HRMAS appliquée aux tumeurs du sein a fait l'objet de deux publications récentes de la part de l'équipe de B. Sitter de l'université de Trondheim en Norvège. La première, réalisée en 2002, présentait les résultats obtenus lors de l'analyse de 10 cas par spectroscopie RMN HRMAS et parallèlement en RMN liquide sur des extraits tissulaires par PCA (Sitter et al., 2002). Se basant sur les résultats d'une étude précédente réalisée sur des biopsies de cancer de sein (Mackinnon et al., 1997) mettant en avant l'importance de différencier les divers éléments du métabolisme de la choline, l'objectif principal de cette première étude était de mettre en évidence la possibilité de réaliser des enregistrements HRMAS sur ce type de tissu tout en conservant une résolution spectrale proche de celle obtenue sur le même type d'échantillons après extraction. Les auteurs concluent sur la faisabilité de telles mesures et sur le besoin d'élargir le groupe de patients afin de conclure quant à la valeur diagnostique de la technique.

Cette étape sera atteinte en 2006 avec la publication de données obtenus sur un groupe de 85 patientes (Sitter et al., 2006). Comparant les résultats obtenus par étude HRMAS du tissu avec les résultats de publications antérieures basées sur l'étude d'extraits de tumeurs (Beckonert et al., 2003; Gribbestad et al., 1999) les auteurs démontrent la possibilité de discriminer les tissus cancéreux des tissus sains sur la base de leur profil métabolique ou plus spécifiquement en se focalisant sur le métabolisme lié à la choline (Mackinnon et al., 1997). L'Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les profils métaboliques s'est de plus avérée refléter l'atteinte du réseau lymphatique des patientes ajoutant ainsi une valeur informative supplémentaire à la technique HRMAS dans le cadre de l'établissement d'un diagnostic.

F) LES AUTRES ORGANES

En plus des applications sur les différents organes cités précédemment différents travaux annexes ont été menés sur divers organes et tissus, pathologiques ou sains comme le tissu musculaire par Bertram et coll. en 2005 (Bertram et al., 2005), les liposacromes au travers de deux études menées par K. Millis en 1999 (Millis et al., 1999) et J.H. Chen en 2001 (Chen et al., 2001), ou encore le tissu cardiaque illustré par les publications de J.L. Griffin en 2001 (Griffin et al., 2001) et Bollard et coll. deux ans plus tard (Bollard et al., 2003). Les tissus des muqueuses

gastriques ainsi que des intestins ont eux aussi fait l'objet de travaux entre 2005 et 2007 illustrés par les publications de Tignoli et coll. (Tignoli et al., 2004; Tignoli et al., 2006a), de Martin et coll. (Martin et al., 2005) et de Wang et coll. (Wang et al., 2007; Wang et al., 2005). Enfin l'endomètre a lui aussi été étudié par application de la technique de RMN HRMAS (Griffin et al., 2003b; Sitter et al., 2004b).

1.2.2. DU METABOLISME A LA METABOLOMIQUE

Dans l'article fondateur de la métabonomique, J.K. Nicholson démontre que les techniques d'analyses ne sont qu'un versant de la problématique soulevée par la métabolomique. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, dès les années 80 un grand nombre d'articles se proposent déjà de faire le catalogue des métabolites présents dans des fluides biologiques tel que le plasma, les urines, le liquide céphalorachidien (Bales et al., 1984; Govindaraju et al., 2000; Nicholson et al., 1983), directement au niveau des cellules (Mountford et al., 1993; Mountford et al., 1984) ou encore au niveau tissulaire (Burri et al., 1990; Cheng et al., 1997; Moka et al., 1998; Mountford et al., 1986; Peeling and Sutherland, 1992; Sitter et al., 2004b). Ce n'est pourtant qu'avec l'émergence de la bioinformatique (Gartland et al., 1989; Holmes et al., 1992; Holmes et al., 1994; Holmes et al., 1997; Holmes et al., 1998a; Tate et al., 1998) et l'essor de la chimiométrie (Deming, 1986; Gasteiger, 2006; Goodacre et al., 2004; Lavine and Workman, 2002; Trygg et al., 2007; Wold, 1991) (analyses multi-variables, classifications, etc...) que la métabolomique, telle que nous l'entendons aujourd'hui (Fiehn et al., 2001; Kell, 2005; Lindon et al., 2004b; Nicholson et al., 1999; Weckwerth and Morgenthal, 2005), a réellement vu le jour.

Entre ces deux étapes, nombre d'études que l'on peut classer en deux groupes ont été réalisées :

les études descriptives, se proposant de dresser un catalogue exhaustif des métabolites détectés dans les systèmes étudiés que nous avons brièvement abordé précédemment (Govindaraju et al., 2000; Nicholson et al., 1983).

les études se focalisant sur un nombre restreint de variables métaboliques, faute d'outils statistiques adéquats. Ces dernières sont souvent orientées dans un cadre clinique lors d'études de métabolismes pathologiques comme pour l'étude du cancer (Griffin and Shockcor, 2004) et plus particulièrement des tumeurs cérébrales (Cheng et al., 2000b; Cheng et al., 1997; Czernicki et al., 2000; Florian et al., 1995b; Kinoshita and Yokota, 1997; Roda et al., 2000; Rutter et al., 1995).

La métabolomique possède l'énorme avantage d'être à la fois une technique fondamentale et applicative. Intégrée, à son origine, au sein des autres « omiques » afin d'optimiser la compréhension des systèmes biologiques (Fiehn, 2002; Griffin, 2004, 2006; Kell, 2005, 2006; Kell et al., 2005), la métabolomique, de par son positionnement final dans les processus biologiques et sa très haute sensibilité aux modifications (liée à l'environnement ou à un état pathologique) du génome, du transcriptome, du protéome ou même du métabolome (Steuer et al., 2003b), a acquis un rôle privilégié en tant que découvreur de nouveaux biomarqueurs. Des études ont prouvé que des modifications génétiques affectant des gènes silencieux d'un point de vue phénotypique classique (vitesse de croissance des levures par exemple), ont pu être détectées en employant des techniques métabolomiques (Allen et al., 2003; Raamsdonk et al., 2001; Steuer et al., 2003a). Ce type d'études tend à prouver que, pour nombre de modifications « biologiques », la définition phénotypique actuelle n'est pas suffisante et que l'utilisation de phénotypes à l'échelle métabolique pourrait être une réelle alternative.

Une utilisation évidente de la métabolomique est la recherche de nouveaux biomarqueurs de pathologies (Griffin, 2003; Lindon et al., 2004a; Lindon et al., 2004b; Shockcor and Holmes, 2002). Bien avant l'utilisation de la métabolomique, la détection dans le sang de métabolites spécifiques tels que les lipides était utilisée comme indicateur de pathologies. L'apport majeur de la métabolomique est que l'analyse porte maintenant sur l'ensemble des métabolites présents (et détectables) dans un échantillon (tissu, sérum, sang, urine,...), recherchant ceux qui se corrèlent positivement ou négativement avec la maladie, dans le but d'identifier de nouveaux indicateurs pronostiques. Les métabolites sont ainsi considérés non plus en tant qu'entités discrètes, mais comme des membres d'un réseau fortement interconnecté (Goodacre et al., 2004; Kell, 2004; Steuer et al., 2003b). Implicitement il en résulte que l'acquisition de profils métaboliques pourrait fournir les outils de différenciation fonctionnelle suffisants pour classifier les états physiologiques humains.

1.2.2.1. METABOLOMIQUE, ONCOLOGIE ET AUTRES APPLICATIONS CLINIQUES

K.W. Jordan et L.L. Cheng définissent la métabolomique appliquée au cancer (*cancer metabolomics*) comme étant l'étude des variations métaboliques globales ainsi que la mesure des profils biochimiques liés aux voies métaboliques connues sous l'influence d'un processus oncogène (Jordan and Cheng, 2007). C'est le caractère global de l'analyse qui différencie l'approche post génomique, et par extension métabolomique, des analyses classiques réalisées en oncologie.

Fin 2005, l'utilisation et l'intérêt de la métabolomique, dans le cadre de la recherche sur le cancer, ont été discutés lors d'un congrès du National Cancer Institut (*FRONTIERS IN METABOLOMICS FOR CANCER RESEARCH*)³. Un certain nombre d'interrogations sur la pertinence de l'emploi de la métabolomique en tant qu'outil de diagnostic clinique, en oncologie mais aussi dans le cadre d'autres pathologies, y ont été soulevées :

(i) Les changements métaboliques spécifiques liés à un état pathologique peuvent-ils être détectés par l'étude du métabolisme?

(ii) Si oui, de tels changements peuvent-ils être employés pour la détection de la pathologie, l'établissement d'un diagnostic et d'un pronostic ?

(iii) Quels métabolites, ensembles de métabolites ou réseaux métaboliques, devraient être étudiés plus spécifiquement par la métabolomique?

(iv) Quelle est la sensibilité, la reproductibilité, et la gamme dynamique nécessaire à l'emploi de la métabolomique dans le cadre d'études cliniques systématique?

L'une des pathologies les plus étudiées par les techniques de la métabolomique reste le cancer (Fan et al., 2004; Griffin and Shockcor, 2004; Griffiths and Stubbs, 2003). Des études du métabolome tumoral par RMN ont démontré, dès 1995, l'intérêt de la méthode en caractérisant des réseaux biochimiques distincts en fonction du type tumoral (Florian et al., 1995a; Florian et al., 1995b). Un certain nombre d'autres travaux ont prouvé le fort potentiel de la métabolomique dans l'optique de la caractérisation et de la compréhension des processus oncologiques (Cheng et al., 2000b; Cheng et al., 2005; Cheng et al., 1998a; Cheng et al., 1998b; Griffin and Shockcor, 2004; Griffiths et al., 2002; Millis et al., 1999; Morvan et al., 2002; Morvan et al., 2003; Tate et al., 2000). Au centre médical de l'université de Duke, les chercheurs de l'équipe de Newgard recherchent des biomarqueurs métaboliques pour le cancer du sein. En identifiant des profils métaboliques de tumeurs malignes et en les comparant à des tumeurs non agressives, l'objectif est de détecter la présence des tumeurs malignes de manière précoce. Parallèlement à ces travaux, d'autres équipes travaillent sur la problématique des cancers du sein (Beckonert et al., 2003; Cheng et al., 1998b; Mountford et al., 2001; Sharma et al., 2004; Sitter et al., 2006; Sitter et al., 2002) en comparant des profils métaboliques avec les critères de malignité issus de l'histopathologie. Sitter et son équipe ont utilisé les rapports des composés de la choline pour la détermination d'éventuelles infiltrations cancéreuses des tissus adjacents à la tumeur, avec une sensibilité de 82% et une spécificité de 100%. Ces mêmes paramètres sont utilisés pour l'évaluation des infiltrations des cancers de l'utérus (Mahon et al., 2004a; Mahon et al., 2004b; Mountford et al., 1990; Sitter et al., 2004b). Le cancer de la prostate a aussi été

³ http://www.cancer.gov/prevention/frontiers/Executive_Summary_Metabolomics.pdf

étudié récemment (Burns et al., 2004; Cheng et al., 2005; Jordan and Cheng, 2007; Kurhanewicz et al., 2002; Swanson et al., 2003). Ces études ont démontré avec une très grande sensibilité, dans des tissus présentant moins de 20% de cellules cancéreuses, la spécificité des mesures de concentration de certains métabolites (choline totale (tCHO), polyamines, taurine et citrate) dans la détermination de l'agressivité du cancer prostatique.

Parallèlement aux travaux en oncologie, dans un article de revue de 2005, l'apport de la métabolomique à la problématique des transplantations d'organes est discuté par l'auteur (Wishart, 2005). Cet article s'appuie principalement sur l'étude des cas de transplantation du rein et du foie, deux organes centraux dans les cycles métaboliques. L'ensemble des recherches sur les urines, dans le cas des transplantations rénales, ont montré des profils métaboliques différents pour les cas de rejets et sont donc potentiellement des biomarqueurs valides (Al Banchaabouchi et al., 2000; Le Moyec et al., 1993; Serkova et al., 2005).

Des études du même type ont montré leur efficacité dans les cas de transplantations du foie (Melendez et al., 2001; Singh et al., 2003a; Singh et al., 2003b) ou encore pour la détection précoce de rejets après transplantation cardiaque (Kober et al., 2002; Lukes et al., 2001).

Mais plus encore que les problématiques diagnostiques, qui dans certains cas peuvent être élucidées à l'aide d'un unique biomarqueur (glucose pour le diabète, cholestérol pour l'artériosclérose), l'usage de la métabolomique permet l'analyse d'un métabolome complet et donc potentiellement la compréhension des processus métaboliques sous-jacents à la pathologie (Lindon et al., 2004b). Cette compréhension est aujourd'hui nécessaire au choix de la meilleure thérapeutique voire à l'établissement d'un processus thérapeutique individualisé.

1.2.2.2. METABOLOMIQUE ET PHARMACOLOGIE.

Conjointement à son utilisation dans un cadre biomédical pour la compréhension des processus pathologiques, ou médical en tant que nouvel outil de (ou d'aide au) diagnostic, la métabolomique a naturellement suscité un grand intérêt dans le monde de la pharmacologie. Pour toutes les entreprises pharmacologiques la découverte de nouveaux biomarqueurs représente un objectif important pour l'étude et le développement de nouvelles thérapeutiques (Griffin and Bollard, 2004; Harrigan, 2006; Harrigan and Yates, 2006; Keun, 2006; Lindon et al., 2006).

Cet intérêt a permis la création du Consortium sur la toxicologie de METabonomic (COMET) (Ebbels et al., 2007; Lindon et al., 2005; Lindon et al., 2003b). Celui-ci a été créé par

cinq compagnies pharmaceutiques (Bristol-Meyers-Squibb, Eli-Lilly, Hoffmann-La-Roche, NovoNordisk et Pfizer) et Imperial College de Londres. Son objectif principal est de définir et d'appliquer des techniques métabolomiques utilisant la spectroscopie RMN du proton sur des échantillons biologiques (urine, sérum, extrait de tissus) pour le criblage toxicologique préclinique des produits pharmaceutiques en cours de développement. Dans ce cadre, depuis 2003, ces différents partenaires ont acquis des bases de données métaboliques pour un éventail de composés, de toxines modèles et de drogues, dans le but d'établir un modèle prédictif de toxicité au niveau des organes cibles. Jusqu'à présent les efforts se sont concentrés sur l'étude de la toxicité au niveau du foie et du rein chez les rats et les souris. De plus, pendant la phase initiale du projet, une comparaison détaillée a été faite de la capacité des six partenaires à fournir des enregistrements homogènes. Cette étude, menée sur un modèle de toxicité liée à l'hydrazine chez le rat masculin. (Keun et al., 2002b), a démontré que la variabilité métabolique induite par le produit est largement supérieure à la variabilité induite par le caractère multicentrique de l'étude. Ce projet, initié en 2003 pour une durée de 3 ans, touche maintenant à sa fin. Au total un ensemble de résultats portants sur 147 études ont été regroupés et analysés. Des modèles chimiométriques (sans interprétation métabolique) ont été reportés pour chaque étude sur la base de trois groupe par étude, (i) les animaux témoins, (ii) les animaux soumis à de faibles doses de traitement et (iii) ceux soumis à de fortes doses (Lindon et al., 2007; Lindon et al., 2005).

Une autre association entre laboratoires industriels et universitaires, portant le nom de HUMSERMET, a vu le jour plus récemment. Mené par professeur D. Kell, de l'université de Manchester, en association avec Astra Zeneca et GlaxoSmithKline, ce consortium cherche à développer et valider des méthodes pour l'acquisition et l'analyse du métabolome humain⁴. Les buts de ce consortium incluent principalement la détermination de la « gamme normale » du métabolome humain pour ainsi identifier des biomarqueurs pronostiques et diagnostiques de maladies ou déterminer l'efficacité des drogues et d'autres traitements. Les maladies actuellement à l'étude incluent la maladie d'Alzheimer et le cancer ovarien.

Ainsi, bien que clairement défini par Nicholson dès 1998, le terme métabolomique reste pour beaucoup un terme générique derrière lequel se regroupe un ensemble de méthodologies dont le point commun reste l'étude des systèmes biologique d'un point de vue métabolique. Ces méthodologies (étude ciblée, profilage, analyse globale, étude de flux,...), détaillées dans le Tableau 1, ont cependant en commun les deux fondements de la métabolomique que sont :

- (i) l'analyse physico-chimique des échantillons

⁴ www.metabolomics.co.uk

(ii) le traitement chimiométrique.

Cette présentation de la bibliographie attenante à la métabolomique montre que son application pour la compréhension des pathologies humaines, comme outil diagnostique et pronostique en clinique, ou son utilisation dans le processus de développement pharmacologique n'en est pour le moment qu'à ses débuts. Les informations apportées par ce type d'analyse et la relative facilité de mise en œuvre de l'ensemble, sont des arguments forts pour cette technique. Les progrès techniques réalisés, les travaux de standardisation entrepris par les spécialistes ainsi que la création de bases de données métaboliques sont autant d'arguments en faveur d'un développement de la métabolomique dans les prochaines années. De même, la présentation réalisée de l'application de la RMN (*in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*) à l'étude du métabolome, nous a permis de mettre en évidence l'intérêt grandissant pour cette technique d'analyse dans l'optique de la métabolomique.

Etude métabolique ciblée (Metabolite target analysis)
<i>C'est une approche qui limite le nombre de métabolites d'intérêts, par exemple en se focalisant sur un métabolite particulier ou sur un nombre restreint de métabolites hypothétiquement liés à une modification enzymatique ou une perturbation génétique. On peut rapprocher ce type d'étude des études réalisées en spectroscopie RMN <i>in vivo</i> à la différence que les métabolites observés ne sont pas forcément limités par la technique mais par un choix raisonné. (Jewett et al., 2006)</i>
L'étude du profil métabolique (Metabolite profiling)
<i>C'est une technique qui se focalise sur un groupe de métabolites spécifiques tel que les acides aminés ou encore les lipides (exemple de la lipidomique, nouvelle branche issue de la métabolomique aujourd'hui en plein essor (German et al., 2007)). Ce type d'analyses se fait souvent dans le cadre d'études cliniques ou pharmacologiques. Dans le secteur pharmaceutique on utilise la terminologie de profilage métabolique. Celui-ci est employé pour tracer le destin d'une drogue ou d'un métabolite. C'est aujourd'hui la technique de base de la métabolomique et, bien souvent, c'est elle qui est utilisée lorsque l'on évoque la métabolomique sans plus d'informations.</i>
La métabolomique
<i>Elle se définit comme l'étude (non exhaustive) du métabolome complet d'un système biologique sous un ensemble de conditions déterminées. Ce terme est souvent confondu avec la métabonomique qui est l'étude du métabolome complet d'un système biologique face à des perturbations (pathologique, environnementale,...). La métabolomique est aujourd'hui plus un concept qu'une réalité car il n'existe pas de technique analytique suffisamment performante pour réaliser un profil complet d'un système.</i>
Etude des flux métabolique
<i>L'étude de flux ou fluxomique met en jeu l'étude de produits marqués et leurs suivis dans un processus métabolique donné. Technique de base dans ce type d'analyse la spectroscopie RMN du carbone 13 permet par exemple d'étudier la glycolyse après absorption de glucose marqué en carbone 13 (Fan et al., 2006).</i>
Etude de fingerprinting / footprinting
<i>Enfin les principes de « fingerprint » et « footprint » sont des techniques dites de profilage métabolique dans lesquels ont été introduits la notion de provenance des métabolites. En effet on parlera de fingerprint pour tout ce qui a trait au milieu cellulaire (endométabolome), et de footprint lorsque l'on s'intéressera au milieu extracellulaire (exométabolome) (Kell et al., 2005). L'ensemble des métabolites y est étudié sans a priori.</i>

Tableau 1 : Définition des différentes techniques d'analyse du métabolome regroupées sous l'appellation générale métabolomique.

1.3. TECHNIQUES DE LA METABOLOMIQUE.

Comme cela a été dit en introduction de ce chapitre la métabolomique est comprise comme un ensemble regroupant (i) l'acquisition des données métaboliques et (ii) leurs traitements statistiques.

(i) Pour qu'une méthode analytique puisse contribuer efficacement à un projet de métabolomique, celle-ci doit impérativement être caractérisée par un haut pouvoir de résolution permettant l'identification et l'analyse qualitative et/ou quantitative d'un grand nombre de constituants. Elle doit être rapide pour permettre l'analyse de nombreux échantillons nécessaires pour le traitement statistique. Ce sont des méthodes qualifiées de haut débit.

La RMN n'est pas la seule technique employée pour l'analyse en métabolomique. Ainsi, les technologies couramment utilisées pour l'analyse métabolomique incluent, principalement, en plus de la RMN, la chromatographie (gazeuse, GC ou liquide, LC) et la spectroscopie de masse (Masse spectroscopy – MS) souvent couplée à la chromatographie, et plus rarement la spectroscopie Raman.

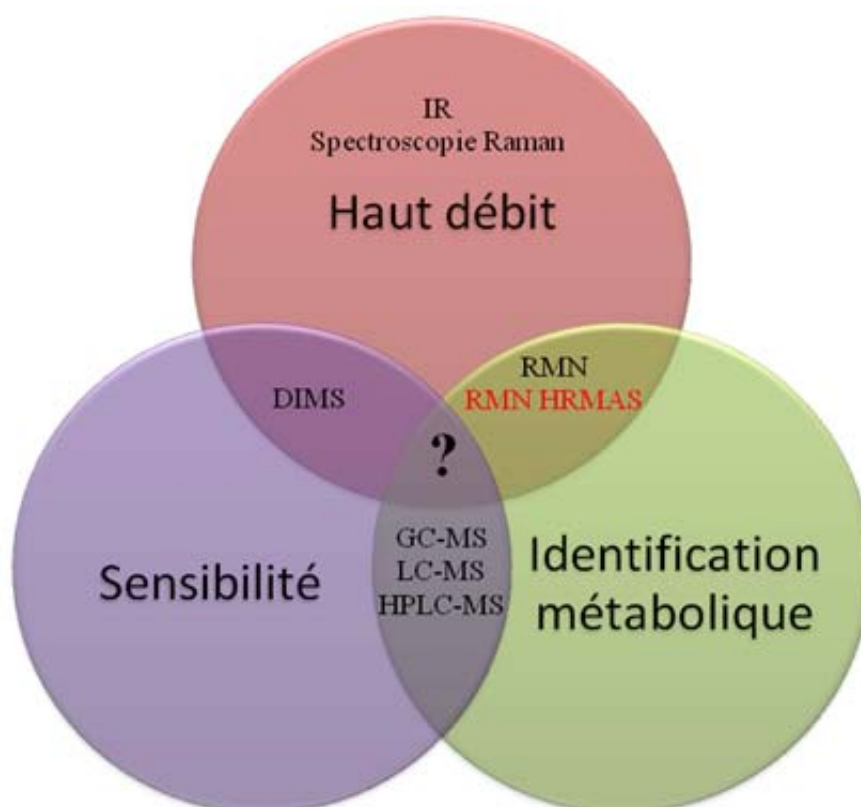


Figure 2: Caractéristiques principales des techniques analytiques les plus couramment utilisées en métabolomique (Dunn et al., 2005).

La MS est une technique analytique par laquelle les substances chimiques sont identifiées par classement en fonction du rapport masse/charge des ions placés dans les champs électriques et magnétiques. Les spectromètres de masse sont constitués de quatre parties fondamentales, un système de manipulation destiné à introduire l'échantillon dans le dispositif, une source d'ions, dans laquelle un faisceau de particules caractéristiques de l'échantillon est produit, un analyseur qui sépare les particules en fonction d'une masse et un détecteur, dans lequel les composants des ions séparés sont récupérés et caractérisés.

La MS est une technique destructive, nécessitant de surcroît une mise en forme de l'échantillon. Ainsi pour les techniques couplant GC et MS la couverture métabolique est liée à la volatilité des métabolites. Lors d'analyses par LC/MS et GC/MS, les échantillons sont issus d'extractions cellulaires ou de précipitations à l'aide de solvants spécifiques, dont la représentativité métabolique de l'échantillon d'origine est difficilement vérifiable. De plus, seuls les métabolites que l'on peut ioniser en retirant ou ajoutant un proton ou une autre espèce ionisée sont observables.

Néanmoins, les progrès récents, notamment liés à l'emploi de la technique de type MALDI (*Matrix Laser Desorption Ionisation*), ont permis d'optimiser la phase préparatoire des échantillons, en évitant l'emploi de procédures d'extractions des métabolites dans une phase liquide, même si l'étape d'ionisation reste encore et toujours indispensable. Enfin, les dernières évolutions de cette technique ont permis d'accéder à une dimension spatiale lors de l'étude d'échantillons biologiques directement positionnés sur une matrice. Cependant ces approches nécessitent une préparation importante de l'échantillon tissulaire et sont pour le moment peu accessibles et très coûteuses.

Finalement, l'un des points essentiels qui apparaît lorsque l'on parcourt la bibliographie faisant référence à la métabolomique est l'absence de plateformes d'analyses répondant à la définition même de cette science, c'est-à-dire permettant d'obtenir un profil métabolique complet et non biaisé du système étudié (Dunn et al., 2005; Hollywood et al., 2006; Oldiges et al., 2007; Teahan et al., 2006). Chacune de ces techniques présente des limitations significatives, que ce soit pour la quantification (MS, chromatographie), la reproductibilité (MS), la sensibilité (RMN) (Dunn et al., 2005; Lindon et al., 2004a). De cette observation découle aujourd'hui deux écoles distinctes quant à l'approche de la métabolomique : l'une visant à l'analyse exhaustive du métabolome, l'autre, plus ciblée, visant à analyser un reflet fidèle du métabolome global au travers d'une empreinte partielle de celui-ci (Tableau 1). C'est dans cette optique que s'entend le choix de la technique analytique en métabolomique.

Ainsi, J.C. Pérez, directeur du développement du marché de LC MS de la société Waters Corp, décrit la situation de la sorte: "avec la RMN nous pouvons voir des choses que nous ne pouvons pas voir par MS, et vis et versa". Il rajoute que "plus le nombre d'informations extraites d'un système est important, meilleur en sera l'interprétation". Ce dernier argument, compte tenu de la sensibilité inférieure de la RMN à celle de la MS d'un ordre de grandeur 4 plaide pour l'emploi de la MS. Ceci explique pourquoi, aujourd'hui, la MS, combinée ou non avec des systèmes de chromatographie gazeuse ou liquide (GC et LC/MS), est la technique la plus utilisée pour l'enregistrement des profils métaboliques. Dans un article de 2005, Villas-Boas se propose de dresser un portrait complet de l'application de la spectroscopie de masse à l'étude du métabolome (Villas-Boas et al., 2005). Néanmoins la technique MS n'est pas exempte de défauts et la Figure 3 adaptée d'un article de revue de Robertson (Robertson, 2005) se propose de lister, pragmatiquement, les avantages et inconvénients de la RMN et de la MS.

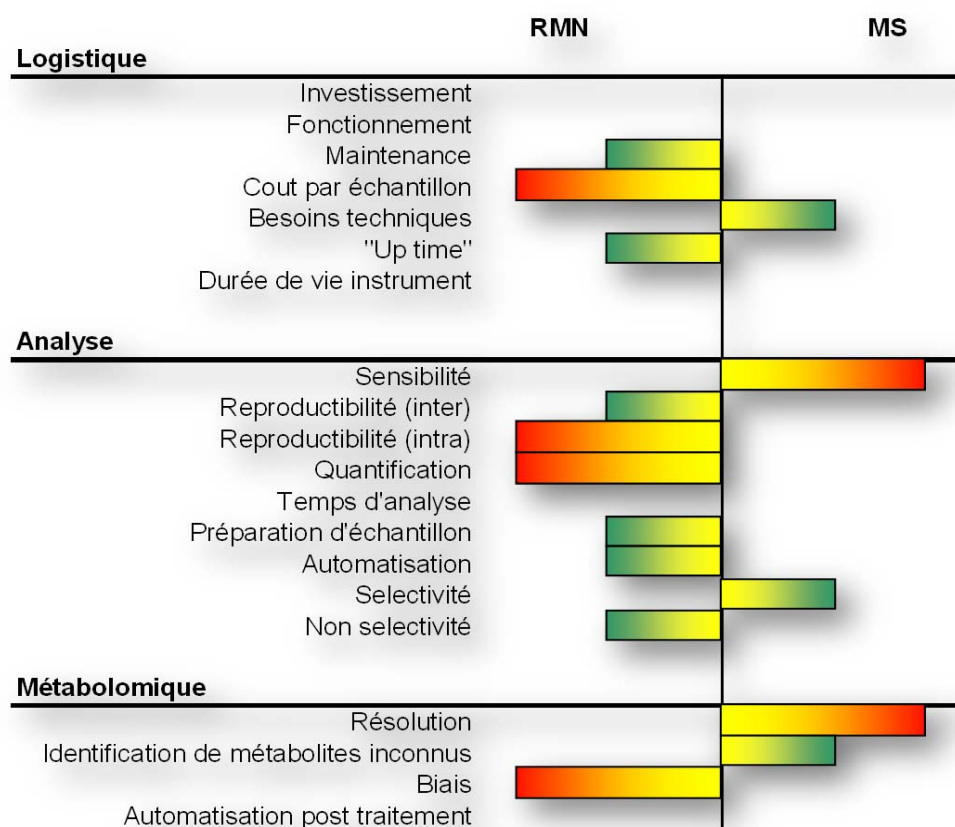


Figure 3 : Comparatif entre la RMN et MS lors d'une utilisation en métabolomique (Robertson, 2005).

Il apparaît clairement que le principal désavantage de la RMN par rapport à la MS est son manque de sensibilité.

Le principal avantage de la RMN HRMAS par rapport à l'ensemble des techniques d'analyses de la métabolomique réside dans la simplicité de préparation de l'échantillon. Ainsi contrairement aux phases de préparations fastidieuses nécessaires en MS et en RMN des liquides

pour l'étude du métabolome d'échantillons tissulaire, notamment les protocoles d'extraction chimique des métabolites, la RMN HRMAS permet l'analyse de l'échantillon en l'état, sans aucune modification. Ceci entraîne un gain en temps lié à l'emploi de la technique RMN HRMAS qui n'est pas négligeable comparé aux autres techniques (quelques minutes comparés à plus de 2 heures pour l'extraction PCA par exemple).

De plus, la technique présente l'avantage considérable de pouvoir transposer facilement les résultats obtenus d'une espèce (animale ou végétale) à l'autre et finalement à l'homme. Par ailleurs, la RMN HRMAS reposant sur les mêmes principes physiques que la SRM *in vivo* les résultats obtenus par ces deux techniques sont directement comparables et permettent ainsi de mieux comprendre les observations faites en SRM *in vivo* (Barton et al., 1999; Swanson et al., 2003 ; Tugnoli et al., 2006b).

L'analyse simultanée de métabolites de nature physico chimique différents par opposition avec la technique MS, couplé à l'accès direct à des données structurales en cas de mise en évidence de pics « anormaux » est encore un avantage primordiale de la RMN, et donc de la RMN HRMAS, principalement lors d'études prospectives où les métabolites d'intérêts ne sont pas connus *a priori*.

Bien que la sensibilité de la technique RMN HRMAS soit largement plus faible que pour la MS, le développement de sondes plus sensibles dans les prochaines années (sondes cryogéniques) (Griffin et al., 2003a; Keun et al., 2002a), l'augmentation du champ magnétique principal (les spectromètres 500, 600MHz voir 700MHz sont maintenant courants), la diminution des volumes nécessaires (10 μ L en RMN liquide, 12 μ L en HRMAS) et potentiellement l'utilisation de techniques d'acquisitions parallèles dérivant de ce qui se pratique couramment en IRM de nos jours, pourraient réduire cet écart dans le futur (Grivet et al., 2003). Ainsi article de revue datant de 1999 (Lacey et al., 1999) rapporte un seuil de détection, en RMN ^1H , sur un spectromètre RMN 600Mhz sans accumulation, à 0.54nmol.

De plus, le problème posé par a faible résolution spectrale, notamment en spectroscopie du proton, entraînant un fort chevauchement des pics dans certaines régions du spectre (principalement entre 3 et 4ppm) trouve une réponse dans l'emploi de champs magnétiques de plus en plus intenses (700 à 800MHz et même supérieur dans certains cas) ainsi qu'avec l'utilisation de séquences RMN spécifique comme la J-RES ou l'emploi de techniques multidimensionnelles (homo ou hétéronucléaire).

La reproductibilité intra-laboratoire, mais aussi et surtout inter-laboratoire, (Keun et al., 2002b) est aussi un autre avantage prépondérant pour l'utilisation de la métabolomique (qui plus est dans une optique clinique).

Enfin le caractère non destructif de la RMN HRMAS permet d'envisager l'étude de systèmes biologiques en évolution ce qui pourrait s'avérer d'un grand intérêt dans l'étude, par exemple, de la réponse du tissu à un traitement thérapeutique. De plus, la conservation de l'intégrité du tissu permet aussi la réalisation d'examen complémentaires (en anatomie pathologique, biologie moléculaire, MS, ou tout autre examen envisageable sur ce type d'échantillons). Ainsi le rapprochement des analyses métaboliques effectuées en RMN HRMAS avec les données *in vivo* fournis par les marqueurs métaboliques utilisés aujourd'hui en clinique (FDG, carbone 11, choline marqué au fluor 18), ou les analyses complémentaires réalisées sur la même pièce biologique pourrait s'avérer intéressant dans l'optique du développement de nouveaux marqueurs métaboliques de diagnostic, de pronostic ou encore de réponse au traitement.

Néanmoins, il convient de noter qu'une technologie unique, aujourd'hui, ne peut efficacement mesurer, identifier et quantifier, avec une sensibilité et une précision suffisante, la gamme des métabolites d'un système biologique. C'est pourquoi il apparaît plus judicieux de sélectionner une technologie particulière en fonction de la problématique et du système que l'on souhaite étudier. Un choix est nécessaire quant à la stratégie à mener (étude ciblée, étude de flux, analyse de profil métabolique). L'apparition de nouvelles technologies, ou l'amélioration des technologies déjà employées, permettent et permettront d'améliorer grandement le spectre observable par l'emploi d'une technique unique. Ainsi, aujourd'hui, l'observation globale du métabolome, si celle-ci est hypothétiquement possible, impliquerait un ensemble intégré de technologies pour dresser l'éventail exhaustif des métabolites d'un système. Cette solution serait consommatrice de temps et de moyens et donc pourrait s'avérer inapplicable dans un grand nombre de cas (système biologique en évolution par exemple).

(ii) La chimiométrie (Wold, 1991) est un outil principalement mathématique, reposant sur les statistiques et les probabilités, utilisé afin d'extraire de l'information pertinente et utile à partir de données physicochimiques mesurées ou connues brutes. Elle est basé sur la construction, puis l'exploitation d'un modèle de comportement à l'aide d'outils statistiques. Elle peut traiter des systèmes complexes et donc généralement multi-variables (Holmes and Antti, 2002). Le terme « chimiométrie » vient de l'anglais « *chemometrics* », jeune discipline associant initialement analyse de données et chimie analytique (Deming, 1986). Aujourd'hui, elle recouvre l'ensemble des applications de la chimie, de la physique, des sciences de la vie, de l'économie, de la sociologie, des méthodes statistiques et de l'informatique. Aussi, on lui préfère souvent le terme moins restrictif (par rapport à la chimie) « d'analyse multi-variable » (« *multivariate*

analysis »), voire de reconnaissance de formes au sens large (« *pattern recognition* ») (Brindle et al., 2003; Eriksson et al., 2004). La chimiométrie en instrumentation consiste à modéliser les variations d'un certain nombre de variables dont l'obtention est délicate (dans le cas présent ces variables peuvent être le diagnostic clinique ou encore le pronostic d'évolution pathologique par exemple) en fonction d'autres variables mesurables « facilement » afin de pouvoir se passer ultérieurement de l'obtention des premières. Les méthodes les plus utilisées pour l'analyse de données issues des analyses spectroscopiques et des profils métaboliques sont l'ACP (Carey et al., 1975) et l'analyse par régression au moindre carré partielle (PLS) (Stahle and Wold, 1986) que nous détaillerons au chapitre II.

1.4. OBJECTIFS DE LA THESE.

Le terme de cancer regroupe un ensemble de maladies englobant plus de 100 types de cancers distincts, mais tous ont en commun la croissance anormale des cellules qui envahissent et détruisent les tissus normaux au lieu de les construire ou de les réparer. Aujourd'hui encore l'examen histologique reste indispensable aussi bien sur le plan du diagnostic que sur l'évaluation pronostique des tumeurs. Cette analyse donne deux informations qui sont la classification histologique (reposant sur le concept que le développement tumoral se fait à partir de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de leur développement) et la *grading* ou gradation (reposant sur la théorie de l'anaplasie). Chaque type tumoral a donc bénéficié de ce système de graduation qui s'échelonne du grade I au grade IV en fonction de la malignité tumorale.

Cependant, pour certains cancers il existe, soit une dissociation entre le diagnostic histopathologique de la tumeur et le devenir du patient, soit une discordance à la réponse thérapeutique pour un sous-type de tumeur. Ainsi des tumeurs ayant des critères histologiques communs peuvent présenter des évolutions pathologiques variées ou des diverses réponses aux traitements. Il semble donc qu'aucun marqueur prédictif ou diagnostique sur la pièce d'exérèse ne soit, à l'heure actuelle, déterminant dans l'évaluation pronostique.

L'existence de ce type de marqueur(s), au niveau du métabolome, se base sur l'hypothèse que l'activité métabolique dans les tissus malins est différente de celle de tissus sains et que celle-ci évolue conjointement à la pathologie.

Ainsi, le processus oncologique résulte d'une anomalie de réplication d'une cellule, non contrôlée, entraînant la création de néoplasme. Néanmoins il est souvent difficile d'appréhender l'ensemble des perturbations biologiques qui en résultent. Cette complexité s'explique par le fait que, d'une part l'anomalie (ou les anomalies) génétique se situe en amont d'une cascade d'événements cellulaires qui comprend de nombreux intermédiaires (transcriptome, protéome, métabolome) mais aussi, d'autre part, parce que plusieurs voies de régulations cellulaires sont souvent perturbées simultanément.

L'étude du métabolome présente l'intérêt majeur de donner accès à la résultante finale de ces cascades d'événements. En partant de l'observation d'un « *pool* » métabolique correspondant à l'ensemble de métabolites observables par la technique analytique choisie (RMN HRMAS) et, en déterminant les modifications métaboliques systématiques inhérentes au processus pathologique, nous pouvons émettre l'hypothèse que nous mettrons en évidence les perturbations de certaines voies métaboliques. Comprenant le système biologique dans son

ensemble, l'apparition des altérations biologiques liées à la pathologie est potentiellement compensée par d'autres processus métaboliques, rétroactifs ou parallèles. Néanmoins il est grandement probable que les compensations métaboliques mises en place soient limitées et que les altérations métaboliques soient détectables plus précocement que les modifications morphologiques. Il semble donc qu'une évaluation de l'activité biochimique d'une lésion ait un caractère plus sensible et puisse donner accès à des informations prédictives capables d'affiner la classification issue de l'histopathologie, celle-ci restant le standard de classification.

Afin de vérifier ces hypothèses, les travaux de cette thèse se proposent d'appliquer la métabolomique par RMN HRMAS à trois types de tumeurs, à savoir :

- les tumeurs cérébrales et en particulier les oligodendrogliomes dans une étude confrontant les données issues des examens d'anatomie pathologie ainsi que l'évolution clinique aux enregistrements RMN HRMAS du métabolome de ces tumeurs.
- les lymphomes, dans l'optique d'étudier les bases métaboliques liées à la fixation de ^{18}F -FDG (Fluoro-désoxy-glucose marqué au fluor 18) lors d'enregistrements par tomographie par émission de positrons.
- les neuroblastomes, afin de confronter les divers facteurs pronostiques communément utilisés en clinique vis-à-vis de leurs profils métaboliques respectifs.

CHAPITRE II.

MATERIELS ET METHODES

L'étude du métabolome dans sa globalité est une tâche ardue du fait de sa grande complexité ainsi que de la dynamique animant ses constituants. La distribution des différents « *pools* » métaboliques est sujet à une grande variabilité qui peut être spatiale (variant en fonction de la localisation du prélèvement, *i.e.* en fonction de l'organe), temporelle (car liée au cycle circadien) ou liée à l'environnement (alimentation...) et au statut de l'organisme (sain ou pathologique). La complexité de l'ensemble est encore accrue par la combinaison de ces différents effets. Cette variabilité naturelle complique grandement l'étude du métabolome, principalement dans l'optique d'observer des variations métaboliques liées à des influences environnementales, pathologiques, liées à l'administration de produits exogènes, ou issues de modifications génétiques. Il importe alors de minimiser au maximum les effets indésirables au travers des protocoles expérimentaux.

Le métabolome est constitué d'une grande variété d'éléments appartenant à une large variété de composés tel que les acides aminés, les lipides, les acides organiques ou encore les nucléotides... Tous ces composés sont très variables dans leur comportement physique ou chimique tout comme dans leur concentration naturelle.

2.1. LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES:

Leur préparation (prélèvement, manipulation, conservation, mise en forme) est une étape essentielle dans le processus d'analyse et est aujourd'hui considéré comme l'une des limites majeure dans l'analyse du métabolome (Villas-Boas and Bruheim, 2007). La nécessité d'obtenir des profils métaboliques reproduisant fidèlement la réalité biochimique, implique l'utilisation de méthodologies n'induisant idéalement aucun biais. Lors du prélèvement, les facteurs biologiques liés au métabolisme naturel (diurne/nocturne, à jeun ou non, ...) peuvent

facilement induire un biais lors de l'analyse. De même, les stratégies de prélèvement peuvent aussi être source de variabilité (Hines et al., 2007). En effet, il a été montré que le processus métabolique est rapide (temps de réaction inférieur à la seconde), c'est pourquoi, si l'on souhaite réaliser le profil métabolique d'un organisme à un instant donné, il convient de bloquer au plus vite le métabolisme de celui-ci. A cela viennent s'ajouter les problématiques de conservations des prélèvements (durée, température de stockage). Dans cette optique, l'utilisation de la surcongélation à -80°C est une technique de choix. Il apparaît cependant que celle-ci n'est pas exempte d'effets sur le profil métabolique (Wu et al., 2003).

Finalement il convient de toujours garder à l'esprit que la variabilité induite par la méthodologie, puisque celle-ci semble inévitable, doit toujours être inférieure à la variabilité biologique du système que l'on souhaite étudier. La préparation d'un échantillon en vue d'une analyse métabolique doit se caractériser par un respect maximal du profil métabolique initial. Pour cela il est nécessaire de répondre à certains critères :

- **Etre parfaitement reproductible sur un nombre important d'échantillons et dans le temps.** Il est essentiel d'adopter une méthodologie unique pour tous les échantillons. Une modification du protocole de préparation, un paramètre non contrôlé dans la chaîne de préparation peut entraîner une variabilité importante des profils métaboliques. La technique RMN HRMAS est particulièrement bien adaptée aux contraintes de reproductibilité compte tenu du faible nombre d'étapes de préparation du tissu (limitant de fait les possibilités de biais)
- **Etre robuste.** La technique de préparation ne doit pas induire de biais de par sa nature (élimination de certains métabolites par exemple). Ne nécessitant pas l'emploi de techniques chimiques ou mécaniques pour la mise en forme de l'échantillon (comme cela est le cas en RMN liquide ou en MS) et permettant l'acquisition de l'ensemble des métabolites sans sélectivité par opposition avec la GC MS (limitée aux métabolites volatiles), la LC MS (limitée aux métabolites ionisables) ou la RMN liquide (métabolite hydrophyle après extraction PCA, lipides avec extraction chloroforme/méthanol), la RMN HRMAS est une technique analytique répondant à cette contrainte de robustesse.
- **Simple d'emploi.** Des deux premiers points abordés découle naturellement celui-ci. Pour qu'une méthodologie puisse être appliquée et reproduite à l'identique un grand nombre de fois il est nécessaire de la rendre simple d'emploi. Cet objectif peut être atteint soit par une grande automatisation du processus de préparation soit en limitant le nombre d'étapes de préparation, caractéristiques premières de l'analyse par RMN HRMAS.

- **Non discriminative entre les différents échantillons.** Les échantillons à analyser peuvent présenter une forte hétérogénéité de composition comme dans le cas de tumeurs, où certaines peuvent être fortement nécrosées et d'autres non. Ainsi, par opposition avec la RMN liquide à partir d'extraction, l'analyse par RMN HRMAS permet, au sein du même échantillon, d'acquérir les profils métaboliques complets, comprenant les métabolites hydrophiles et hydrophobes en ne modifiant que les paramètres d'acquisitions des séquences RMN.
- **Doit limiter la variabilité entre les différents échantillons** telle que la variabilité du pH dans les études sur l'urine par exemple. Un grand nombre d'études en métabolomique ont porté sur l'étude d'échantillons d'urines qui naturellement présentent une gamme de pH fortement variable (typiquement de 6.5 à 7.5 mais pouvant varier de 5 à 8 en fonction des conditions physiologiques et pathologiques). La dépendance qui existe entre les déplacements chimiques mesurés par RMN et le pH de l'échantillon pose de sérieux problèmes d'interprétation. Cette dépendance est par exemple fortement marquée dans le cas du citrate (métabolite important dans l'étude des pathologies du rein (Tate et al., 2000)) où le déplacement chimique est de 1ppm entre une mesure effectuée à pH 5 et une mesure effectuée à pH 8. Il devient alors obligatoire d'équilibrer les pH par adjonction d'un tampon phosphate. Cette technique d'équilibrage de pH est aussi couramment appliquée lors d'études portant sur des échantillons obtenus par extraction chimique à partir de cellules ou de tissus.
- **Conservation de l'échantillon pour répétition de l'analyse.** La conservation du tissu à une température réduite lors de l'acquisition couplée à la limitation de ce temps d'acquisition, permet, si besoin, de conserver l'échantillon en l'état, à très basse température (-80°C) pour répéter l'analyse ultérieurement (pour la vérification des observations ou l'analyse complète du métabolome par analyse homonucléaire ou hétéronucléaire). De plus, le caractère non destructif de la RMN HRMAS permet l'analyse de la même pièce par diverses techniques complémentaires en métabolomique (MS, FTIR, RMN liquide) ou annexes (anatomopathologie, biologie moléculaire, analyse protéomique).

Pour répondre à ces différents items, la préparation de ces échantillons nécessite trois étapes essentielles, (i) l'arrêt du métabolisme, (ii) la mise en forme de l'échantillon afin de le rendre compatible avec la technique d'acquisition sans altérer celui-ci et (iii) l'optimisation et éventuellement l'ajout de références.

2.1.1. ARRET DU METABOLISME ET CONSERVATION.

Cette étape, obligatoire quelque soit la méthode d'analyse employée, est certainement l'étape la plus difficile à standardiser et à maîtriser (Morrison et al., 2006). Comme les métabolites sont le reflet final de l'état d'un système biologique soumis à un environnement donnée (éléments extérieurs, pathologies, études toxicologiques), l'arrêt rapide du métabolisme cellulaire et de l'activité enzymatique est une étape essentielle (Villas-Boas and Bruheim, 2007). L'objectif est de fixer le métabolome dans un état donné à un instant « t » correspondant à son état au moment de la résection du tissu ou du prélèvement du liquide biologique. Il est important de limiter le délai d'ischémie et l'utilisation de produits (pharmacologiques ou chimiques tels que les désinfectants alcoolisés) lors de l'intervention chirurgicale qui pourrait induire des biais lors de l'analyse. Cette étape d'arrêt du rapide du métabolisme, dénommé *quench* ou *quenching* (en anglais) a ainsi pour but de préserver le profil métabolique de l'échantillon dans un état identique à celui où il était avant prélèvement.

La technique la plus utilisée pour stopper le métabolisme est aujourd'hui la surcongélation dans l'azote liquide (Waters et al., 2000). Parallèlement, il existe des procédures chimiques pour stopper le métabolisme, la plus fréquemment employée étant celle à base d'acide perchlorique (Villas-Boas et al., 2005).

Dans le cas de la conservation de plasma, Deprez et ses collaborateurs n'ont pu détecter de modifications métaboliques après 6 mois de stockage à -80°C (Deprez et al., 2002). De même, les travaux menés par le consortium COMET (*cf. chapitre I*) n'ont constaté que de très légères modifications dans le métabolome des urines après une conservation de 9 mois à -40°C. Enfin, dans une étude récente de l'équipe de L.L. Cheng (Jordan et al., 2007), seules de très légères modifications ont pu être mises à jour sur du tissu de foie après une conservation à -80°C sur une durée de 3 ans.

2.1.2. MISE EN FORME DE L'ECHANTILLON.

Dans un cadre d'analyse par RMN liquide, mais aussi pour les techniques de MS couplée à un chromatographe à phases liquides, une procédure d'extraction est nécessaire pour rendre l'échantillon compatible avec la technique d'acquisition utilisée. Pour ce faire il est nécessaire de casser mécaniquement le tissu afin d'en extraire les métabolites de faibles poids moléculaires. Plusieurs types de méthodes d'extraction chimique existent, les deux principales étant l'extraction PCA et l'extraction par la technique méthanol/chloroforme. L'extraction des

métabolites polaires, hydrophiles, se fait préférentiellement par technique PCA alors que l'extraction des métabolites de type lipides se fera par méthanol/chloroforme. Cette étape d'extraction, en plus d'extraire préférentiellement un type de métabolites, permet d'éliminer les autres composants du système biologique tel que l'ADN, l'ARN, ou les protéines donnant des signaux RMN faiblement résolus et perturbant fortement la ligne de base des spectres acquis. De plus, le fait de déprotéiniser le système permet de stopper définitivement le métabolisme de l'échantillon et permet donc de ne plus être limité pour la durée d'acquisition des spectres RMN. Pour l'application des techniques de MS couplée à des chromatographes à phases gazeuses, cette phase d'extraction est aussi obligatoire mais elle nécessite de plus la volatilisation des métabolites (réduisant de fait le nombre de composés observables).

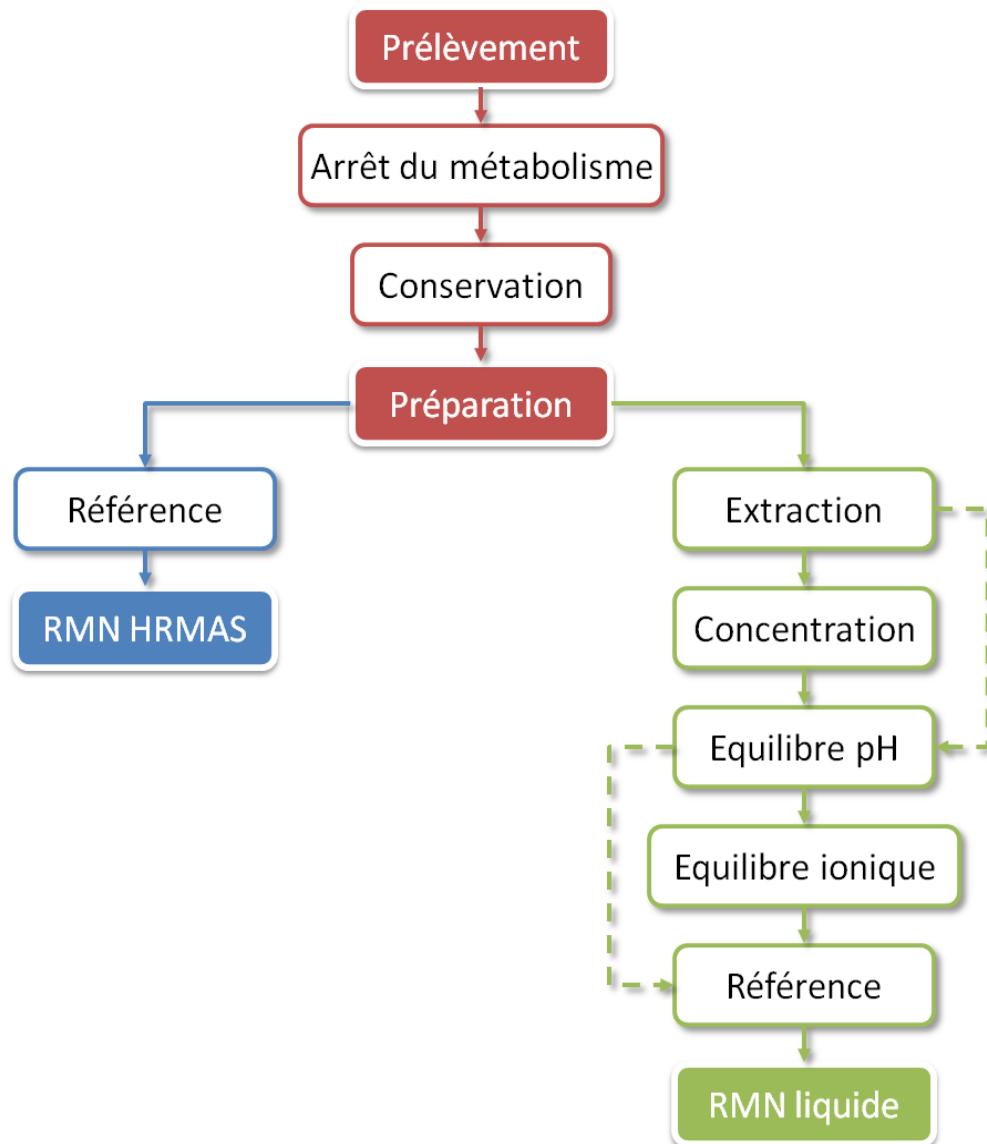


Figure 4: Principe de préparation d'un échantillon. Comparatif entre la RMN liquide et la RMN HRMAS.

Ces techniques d'extraction sont consommatrices en temps et la multiplication des étapes de préparation rend celles-ci peu applicables pour une étude systématique à grande échelle (de par son caractère fastidieux mais aussi et surtout de par la difficulté à reproduire à l'identique la procédure).

Dans le cas d'une étude par RMN HRMAS, seul l'insertion du tissu biologique dans son intégrité au sein du rotor est nécessaire. Ainsi aucun traitement chimique ou mécanique n'est utile. Néanmoins la nécessité de bloquer le métabolisme de l'échantillon implique des manipulations à basse température et sur des temps très limités.

Le fait de préparer la pièce en quelques minutes dans une pièce à basse température est suffisant pour ne pas induire de biais méthodologiques.

2.1.3. OPTIMISATIONS ET REFERENCES.

L'optimisation et l'ajout d'une référence sont des étapes souhaitables mais non obligatoires. L'optimisation peut consister en une concentration de l'échantillon (après extraction dans une phase liquide) par lyophilisation par exemple, en l'équilibrage de l'ionisation de la solution qui peut engendrer des déplacements chimiques, en la solubilisation dans un solvant deutéré propice à l'acquisition des spectres RMN haute résolution. Enfin l'ajout d'un étalon tel que le TMS permet d'obtenir une référence pour le déplacement chimique de l'enregistrement et aussi de réaliser une quantification absolue des divers métabolites.

Les paragraphes précédents ont clairement mis en avant la difficulté d'obtenir des échantillons répondant aux divers critères nécessaires à la réalisation d'une étude métabolique par RMN. L'un des atouts majeurs de la RMN HRMAS comparativement à la RMN des liquides est l'extrême simplification de cette phase de préparation. En effet le tissu ne subit qu'un nombre extrêmement limité de manipulations réduisant d'autant les risques d'introduire des biais méthodologiques lors de la phase de préparation de l'échantillon. Le schéma présenté dans la Figure 4 donne, pour comparaison, les différentes étapes de préparation dans le cadre d'une étude en RMN liquide (partie droite) et en RMN HRMAS (partie gauche).

2.1.4. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE PAR RMN HRMAS.

La procédure de préparation des rotors pour la RMN HRMAS est la suivante (Figure 5) :

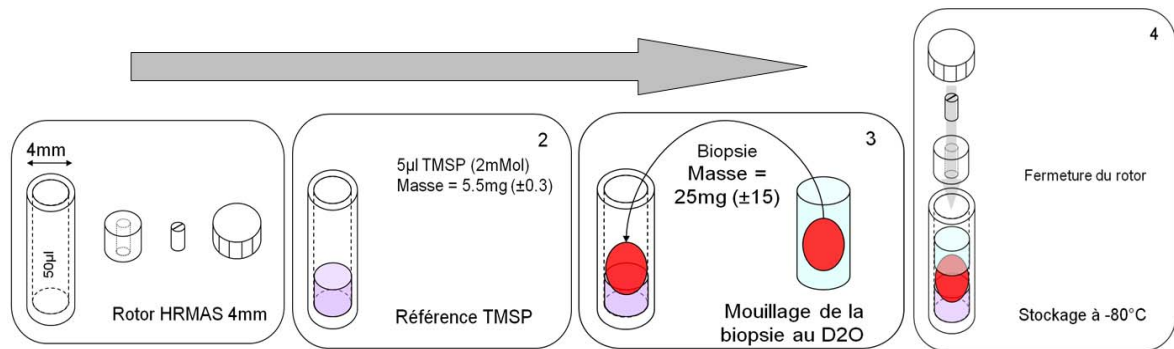


Figure 5 Préparation des rotors HRMAS pour l'analyse de tissus biologiques.

Chaque enregistrement RMN HRMAS est calibré en fréquence et en intensité à l'aide d'une référence externe. Pour ce faire, 5 microlitres d'une solution de TMSP (référence à -0.015ppm) à 2mMol/l sont préalablement introduits dans chaque rotor. La masse du TMSP introduit dans le rotor est de l'ordre de 5.5mg. La phase de préparation du tissu biologique doit être la plus courte possible afin de limiter la dégradation de celui-ci. Le tissu est introduit dans un eppendorf contenant du D₂O afin d'éliminer un surplus éventuel d'hémoglobine et/ou une trace de contaminant. Cette phase ne doit pas dépasser quelques secondes pour ne pas réchauffer le tissu de manière trop importante et ainsi le dégrader métaboliquement. L'échantillon est par la suite introduit dans le rotor et celui-ci est pesé. La masse typique d'un échantillon est de 20mg. Une fois le tissu introduit dans le rotor et celui-ci pesé, un complément à 50mg est effectué à l'aide de D₂O. Pour ce faire, l'approximation 1mg = 1µl est utilisée. Pour finir le rotor est fermé avec l'insert, la vis d'étanchéité et le capuchon à ailettes du rotor et celui-ci peut être stocké à -80°C en attendant son utilisation en spectrométrie RMN HRMAS.

Cette phase de préparation des rotors HRMAS est une étape cruciale lors d'une étude de métabolomique. Le risque de pollution ou de dégradation de l'échantillon est maximal. Il est impératif de travailler rapidement, en n'utilisant aucun élément contaminant (alcool pour la stérilisation des instruments par exemple) et à basse température. Idéalement cette phase de préparation pourrait se faire directement au bloc opératoire afin de limiter au maximum les risques d'erreurs méthodologiques.

2.1.5. STABILITE METABOLIQUE DU TISSU LORS DE L'ANALYSE RMN

La vérification de la stabilité du métabolome au cours du temps est nécessaire compte tenu des contraintes extérieures liées à l'acquisition HRMAS. Ces contraintes sont

essentiellement de trois types :

Tout d'abord mécaniques compte tenu de la rotation appliquée à l'échantillon. En effet, bien que le rotor soit de dimension réduite (diamètre de 4mm), la rotation à environ 3000Hz implique une vitesse linéaire supérieure à 100 km/h et une force centrifuge appliquée au tissu de plusieurs milliers de fois la force de pesanteur. Néanmoins, des études réalisées préalablement par diverses équipes ont démontré que la structure morphologique même du tissu n'était pas fortement altérée permettant l'analyse anatomo-pathologique d'échantillons ayant subi un enregistrement RMN HRMAS (Cheng et al., 2000a).

La seconde contrainte est une contrainte thermique. La rotation provoque une élévation de la température interne de l'échantillon qui peut conduire à une reprise de l'activité métabolique. Cet effet est limité par la réduction de la température grâce à l'emploi d'un souffle d'air refroidi ou d'azote dont la température est contrôlée et ajustée automatiquement tout au long de l'expérience. Cette température a été fixée à 273 Kelvin après une étape d'ajustement expérimental. Une température inférieure nous a amené à observer des changements de phases au cœur de l'échantillon dégradant grandement la qualité des spectres. Néanmoins il est important de noter que la température de l'échantillon n'est pas équivalente à la température du flux d'air mais qu'il faut tenir compte de l'élévation de la température liée à la rotation. Celle-ci peut être estimée à environ 1°C par kHz (Andrew and Russell, 2001) lorsque la vitesse de rotation reste relativement faible ce qui est le cas ici.

Enfin la troisième contrainte est une contrainte temporelle. Celle-ci est fortement liée à la contrainte thermique précédente, le métabolisme étant lui aussi lié à la température de l'échantillon. Il apparaît néanmoins qu'indépendamment de la température il est nécessaire de limiter au maximum le temps d'acquisition pour limiter l'évolution biochimique de l'échantillon.

Les résultats présentés ci-après sont issus de l'acquisition de spectres RMN successifs sur un échantillon de tumeur cérébrale. Cette expérience a été répétée sur trois échantillons sur des durées de 12h pour deux d'entre eux et 16h pour le cas exposé ci-après. La séquence employée est une séquence CPMG avec une simple présaturation. Chaque spectre est acquis sur une période de 15 minutes correspondant à 64 accumulations du signal. La correction de ligne de base ainsi que l'ajustement de la phase ont été réalisés automatiquement sur le premier spectre et les paramètres d'ajustements reconduits pour le traitement de l'ensemble des données. Les spectres ont été contrôlés individuellement et n'ont pas nécessité de nouvelles corrections dans le prétraitement (Figure 6.a).

Les données ont par la suite fait l'objet d'un traitement statistique de type analyse en composantes principales (ACP, cf chapitre II, Statistiques) afin de mettre en évidence de manière

automatique les fréquences de résonances liées au maximum de variations. Un ensemble de variables liées à un nombre limité de métabolites a ainsi pu être identifié (Figure 6.b) regroupant principalement le N-acétyl-aspartate, le lactate, la créatine, les composés liés à la choline et à un degré moindre le myo-Inositol.

L'évolution temporelle de ces métabolites a finalement été relevée en tenant compte de l'intégrale des pics les plus significatifs observés lors de l'ACP. Ces métabolites associés sont repérés sur les spectres de la figure 15.a. La valeur de référence pour déterminer les intervalles de confiance liée à l'incertitude de la mesure a été déterminée à l'aide de l'intégrale relevée sur la référence externe introduite dans le rotor, à savoir le TMSP.

Les résultats montrent clairement une évolution "significative" au cours du temps de la concentration pour certains métabolites. La direction préférentielle déterminée par l'ACP dans sa composante 1 met en avant un ensemble de trois métabolites, respectivement et par ordre d'importance décroissante, le lactate, la créatine, et le myo-Inositol. L'évolution temporelle de la concentration de ces trois métabolites est donnée dans la colonne de gauche de la Figure 6.c. Il apparaît clairement que les variations relevées sont principalement des variations liées aux incertitudes de la mesure compte tenu de l'absence d'évolution "systématique". Seule la créatine semble montrer une légère évolution croissante de la concentration mais son amplitude reste relativement faible comparativement à l'évolution relevée sur la référence TMSP. De manière plus intéressante, la composante 2 de l'ACP met en avant un ensemble de deux métabolites dont l'évolution est opposée. Cette observation est corroborée par l'évolution temporelle de la concentration relative en N-acétyl-aspartate et en phosphocholine. En effet la concentration en phosphocholine montre une évolution croissante, amplifiée après 400 minutes environ, alors que l'évolution de la concentration en N-acétyl-aspartate est elle clairement décroissante.

Ces résultats démontrent nettement que dans le cadre d'une étude métabolomique la durée d'acquisition est un paramètre essentiel à prendre en compte et que celle-ci, pour pouvoir être considérée comme négligeable, implique des acquisitions RMN réalisées à basse température et dans un laps de temps réduit. Il apparaît, compte tenu de ces résultats, peu réaliste de faire une étude de type métabolomique sur des enregistrements nécessitant des temps d'acquisition importants tels que des enregistrements 2D hétéronucléaires, voire même homonucléaires.

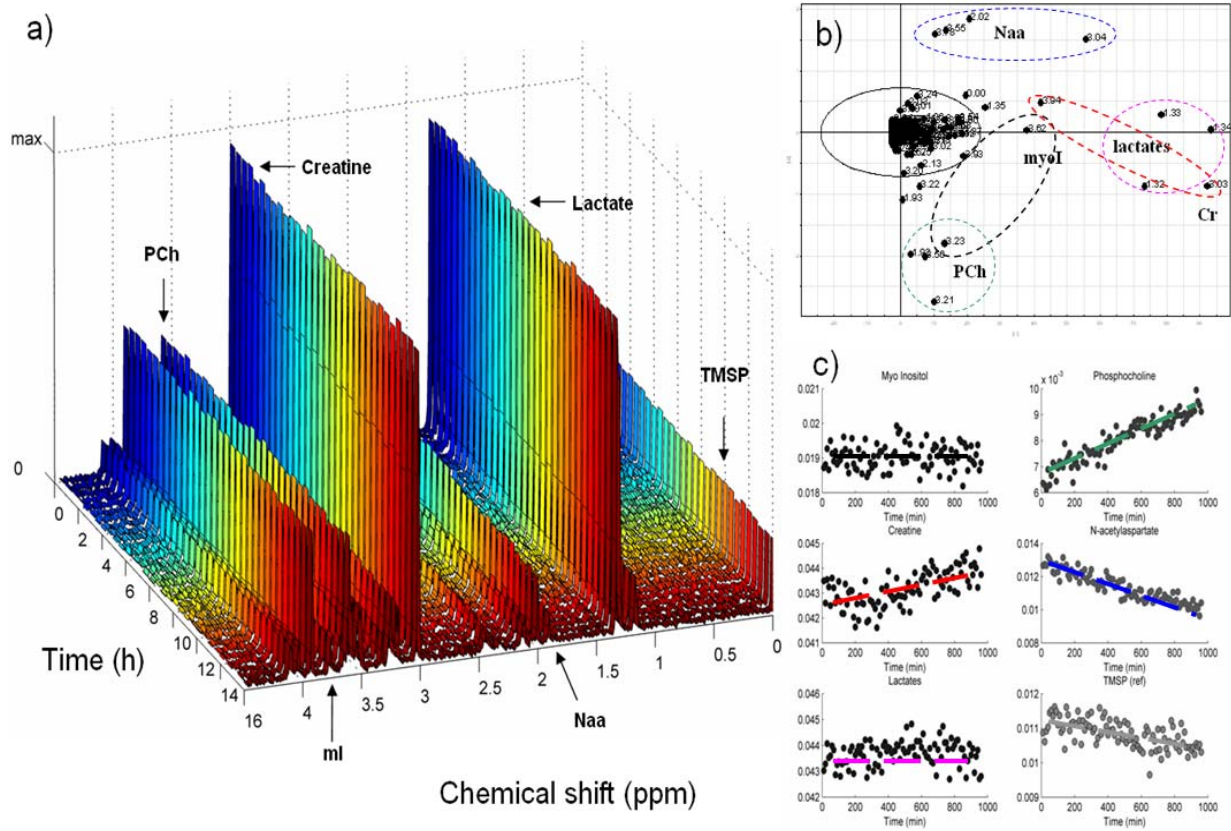


Figure 6: Etude de dégradation métabolique liée à l'acquisition HRMAS.

a) cinétique de dégradation sur un intervalle de 16h d'acquisition réalisée sur une biopsie de tumeur cérébrale.

b) Analyse ACP sur les données issues de a). L'analyse en composante principale permet de dégager un nombre limité de métabolites responsable de la variabilité de l'ensemble des données acquises.

c) Evolution de la concentration relative de métabolites d'intérêt détectés par l'ACP.

2.2. ACQUISITION DES PROFILS METABOLIQUE PAR RMN HRMAS

2.2.1. INTRODUCTION ET PRINCIPES DE LA RMN HRMAS

La limitation due à la faible sensibilité et à la faible résolution pour la spectroscopie RMN *in vivo* ou *in vitro* peut être en partie écartée par l'utilisation d'expériences *ex-vivo* sur des spectromètres hauts champs avec des sondes plus sensibles en détection, comparativement aux instruments classiques. Cependant, même à hauts champs la sensibilité et la résolution spectrale sont souvent limitées par les multiples mécanismes d'élargissement des raies inhérents à ces systèmes dits « mous ». Les principaux mécanismes à l'origine de ces élargissements sont le **couplage dipolaire** et les **différences de susceptibilité magnétique hétérogène** existant dans les échantillons biologiques comme les tissus et les cellules.

Une technique RMN, à l'origine développée pour la RMN du solide par E.R. Andrew (Andrew and Newing, 1958), a la capacité de moyenner les différents mécanismes d'élargissements des raies et a été utilisée afin d'acquérir avec succès des spectres de haute résolution sur des échantillons de tissus et de cellules (Cheng et al., 1996). Cette technique est la RMN HRMAS. Dans les paragraphes suivants nous allons :

1. présenter les principes de base de cette technique,
2. faire ressortir les mécanismes d'élargissement des raies pour les échantillons de tissus et de cellules
3. et discuter du « moyennement » de ces interactions par la rotation à l'angle magique.

La discussion théorique se concentrera sur la rotation de l'échantillon à l'angle magique et son efficacité pour moyenner les interactions qui élargissent le signal et plus particulièrement sur le couplage dipolaire et les différences de susceptibilité magnétique.

2.2.2. THEORIE DE LA SPECTROSCOPIE RMN HAUTE RESOLUTION EN ROTATION A L'ANGLE MAGIQUE

L'élargissement des raies dans de tels échantillons provient essentiellement de l'interaction dipolaire proton-proton, de l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique et de la différence de susceptibilité magnétique du milieu. Pour obtenir des spectres analysables, il est nécessaire de réintroduire suffisamment de mobilité au sein de l'échantillon. Pour résoudre

ces problèmes liés à la largeur des signaux RMN, la technique RMN HRMAS, appliquée aux tissus biologiques, combine les propriétés inhérentes au tissu et les techniques provenant de la RMN du solide. Ainsi, la technique RMN HRMAS consiste à utiliser, dans un premier temps, les propriétés mécaniques du tissu, matériau mou, présentant un certain degré de mobilité intrinsèque, et dans un second temps, à tourner l'échantillon à l'angle magique ($54,7^\circ$) pour moyenner toutes les interactions résiduelles.

La rotation à l'angle magique permet de moyenner mécaniquement l'interaction dipolaire, l'anisotropie de déplacement chimique, ainsi que l'interaction quadripolaire électrique au premier ordre, par une rotation rapide de l'échantillon selon un axe faisant un angle de $54,7^\circ$ avec le champ magnétique B_0 , ce qui a pour conséquence d'affiner les raies de résonance et donc d'obtenir une meilleure résolution. Cependant, tous les termes des différentes intéréactions impliquées ne sont pas moyennés à zéro. Ainsi, si la fréquence de rotation est inférieure à la largeur de la raie statique (exprimée en Hz), le signal se répartit en une raie centrale fine et en une série de raies satellites latérales (appelées bandes de rotation) espacées de la fréquence de rotation de l'échantillon. Si la vitesse de rotation est supérieure à la largeur du spectre statique, l'anisotropie est alors moyennée et l'intensité des raies satellites devient négligeable. Il est important de noter que chacune de ces propriétés est nécessaire, mais non suffisante, à l'obtention d'un spectre proton suffisamment résolu pour une analyse complète.

2.2.2.1. LES INTERACTIONS

A) L'HAMILTONIEN DE SPIN NUCLEAIRE : L'ELARGISSEMENT PAR EFFETS DE CHAMP LOCAL

Le mécanisme d'élargissement peut être illustré d'une meilleure façon par l'utilisation de l'Hamiltonien de spin dépendant du champ localisé. L'Hamiltonien de spin dépend des multiples interactions de spins existants avec les champs externes et avec les autres spins internes. Nous simplifierons l'Hamiltonien en n'incluant que les termes importants pour notre discussion. En absence d'un champ radiofréquence, l'Hamiltonien de spin peut s'écrire comme suit :

$$H(r) = H_0 + H_{DD}(r) + H_{sus}(r) \quad \text{Équation 1}$$

où $H_0 = -\sum_j \gamma^j B_0 I_z^j$ correspond à l'interaction des spins avec B_0 où γ est le rapport

gyromagnétique et \vec{I} est le moment angulaire de spin, la somme se faisant sur l'ensemble des spins de l'échantillon. Dans ce terme nous assumons qu'un champ statique très homogène peut être obtenu et que les inhomogénéités subsistantes peuvent être négligées en comparaison des termes résultants de l'Hamiltonien de spin.

Le deuxième terme de l'équation (3.5), H_{DD} , provient du couplage dipolaire qui peut être intra ou intermoléculaire.

Le troisième terme, H_{SUS} , provient des susceptibilités hétérogènes. Les matériaux magnétiques ont une susceptibilité magnétique finie et lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique externe, celui-ci modifie le champ magnétique à l'intérieur et à l'extérieur de ces matériaux. Pour un traitement théorique des échantillons liquides homogènes, cet effet peut être inclus dans le champ statique avec une légère modification. Malgré tout, dans les tissus et les cellules ce terme est la principale cause d'élargissement des raies et nécessite des considérations particulières. Les termes de dipôle et de susceptibilité sont tous les deux des termes dépendants de la position dans l'échantillon. Ceci provient du fait que le champ magnétique local, créé par le couplage dipolaire et par la susceptibilité hétérogène, varie d'une position à une autre et que la fréquence de résonance varie en fonction de ce champ local. La propagation de la fréquence à partir de cette différence de champ local est la cause de cet élargissement.

B) L'HAMILTONIEN DE SPIN NUCLEAIRE : L'INTERACTION DIPOLE-DIPOLE

I) LE COUPLAGE DIPOLE - DIPOLE POUR UNE PAIRE DE SPINS

Chaque spin a un moment magnétique $\vec{\mu} = \gamma\hbar\vec{I}$ induisant un champ magnétique nucléaire autour de lui-même. Un second voisin interagit avec ce champ. Cette interaction est mutuelle et est appelée couplage dipôle – dipôle au travers de l'espace. Ce couplage dipôle – dipôle de deux spins dépend de l'aimantation et de l'orientation des moments magnétiques mais également de la distance et de l'orientation du vecteur décrivant leurs positions relatives. En raisonnant simplement sur un système avec une paire de spins rigides à distance internucléaire fixe on obtient :

$$H_{DD}^{ij} = \frac{q_{ij}}{r_{ij}^3} \left[\vec{I}_i \cdot \vec{I}_j - 3(\vec{I}_i \cdot \vec{e}_{ij})(\vec{I}_j \cdot \vec{e}_{ij}) \right] \quad \text{Équation 2}$$

où $q = \frac{\mu_0}{4\pi} \gamma_i \gamma_j$ et $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ S.I. est la perméabilité magnétique, \vec{e}_{ij} est le vecteur unitaire liant le spin i au spin j et r_{ij} est la distance internucléaire.

Pour les applications à hauts champs magnétiques, la partie non séculaire du couplage dipolaire peut être négligée en tenant compte de l'approximation séculaire. Ce terme dépend principalement des interactions de spins. L'approximation séculaire se base sur la différence de niveaux d'énergie qui dépend principalement du fait que le système de spin soit homonucléaire ou hétéro nucléaire. Le couplage dipolaire homonucléaire séculaire est :

$$H_{DD, \text{homo}}^{ij} = \frac{q_{ij}}{r_{ij}^3} \frac{3 \cos^2 \theta_{ij} - 1}{2} (3I_{iz} I_{jz} - \vec{I}_i \cdot \vec{I}_j) \quad \text{Équation 3}$$

Dans lequel θ_{ij} est l'angle entre le vecteur \vec{e}_{ij} et le champ magnétique statique.

Le couplage dipolaire hétéro nucléaire séculaire est :

$$H_{DD, \text{hétéro}}^{ij} = \frac{q_{ij}}{r_{ij}^3} \frac{3 \cos^2 \theta_{ij} - 1}{2} 2I_{iz} I_{jz} \quad \text{Équation 4}$$

L'Hamiltonien de spin est donné par la somme sur l'ensemble des paires de spins du système :

$$H_{DD} = \sum_{i \neq j} H_{DD}^{ij} \quad \text{Équation 5}$$

Dans l'Hamiltonien de spin de couplage dipolaire homonucléaire, l'opérateur de spin $\vec{I}_i \cdot \vec{I}_j$ induit un terme $\vec{I}_{i\mp} \cdot \vec{I}_{j\mp}$ qui génère une diffusion de spin rapide dans la molécule. Celle-ci correspond alors à un transfert d'aimantation rapide pour un échantillon du type tissu ou cellule.

II) MOYENNER LES INTERACTIONS PAR LE MOUVEMENT.

Le tenseur de couplage dipolaire dépend de la direction et de la distance entre une paire de spins. Chaque changement de direction ou de distance lié à cette paire de spins peut influencer le couplage dipolaire. Par conséquent, l'importance du couplage dipolaire est fortement dépendant du type de mouvement moléculaire (mouvements de rotation de chaque

molécule individuelle, mouvements de translation et migrations d'atomes ou groupes d'atomes des molécules entre elles mais les molécules peuvent également avoir un mouvement interne, comme la vibration, la rotation, les mécanismes d'isomérisation chimique) ainsi que de la vitesse de ceux-ci. Pour une molécule subissant un mouvement rapide, le couplage dipolaire fluctue dans le temps. L'Hamiltonien de couplage dipolaire peut alors formellement se diviser en deux parties, une partie dépendante et une autre, indépendante du temps :

$$H_{DD}(t) = \bar{H}_{DD} + H_{DD}^1(t) \quad \text{Équation 6}$$

$$\text{avec : } \bar{H}_{DD} = \tau^{-1} \int_0^{\tau} H_{DD}(t) dt \quad \text{Équation 7}$$

$$\text{et : } H_{DD}^1(t) = H_{DD}(t) - \bar{H}_{DD} \quad \text{Équation 8}$$

Le terme $H_{DD}^1(t)$, dépendant du temps, correspond à la relaxation des spins. Dans un échantillon solide, les mouvements moléculaires, bien que faibles, existent toujours. L'important couplage dipolaire non moyenné est la source principale de la forme et de la largeur spectrale observée pour un spectre RMN sur un échantillon solide, tandis que la composante dépendante du temps du couplage dipolaire est responsable de la relaxation. Dans les liquides isotropes, les mouvements moléculaires rapides moyennent totalement le couplage dipolaire \bar{H}_{DD} à zéro ; et par conséquent le couplage dipolaire est essentiellement un pur mécanisme de relaxation. Pour les liquides anisotropes, il existe une orientation moléculaire préférentielle. Dans ces milieux, le couplage dipolaire n'est pas totalement moyenné. Les faibles couplages dipolaires résiduels non moyennés observés dans les liquides anisotropes sont très utiles pour la détermination des structures moléculaires. Actuellement, la dissolution de molécules dans les liquides anisotropes afin de déterminer la structure moléculaire via le couplage dipolaire résiduel est un des champs d'action les plus prometteurs et les plus actifs des études par RMN du liquide (Lancelot et al., 2004).

Il est important de noter que les expressions de l'Hamiltonien de spin dipôle-dipôle, homo et hétéronucléaire sont tout deux proportionnels à un facteur $(3 \cos^2 \theta - 1)$.

C) L'HAMILTONIEN DE SPIN ET LES HETEROGENEITES DE SUSCEPTIBILITE ISOTROPE.

Afin de formuler l'Hamiltonien de spin à partir des interactions faisant intervenir le

champ magnétique induit, il est utile de calculer le champ magnétique pour chaque spin individuel. Pour traiter ce problème, il faut introduire l'aimantation \vec{M} , définie comme le moment dipolaire moyenné par unités de volume. Dans les prochains paragraphes, nous nous attacherons également à étudier l'interaction des spins avec le phénomène de susceptibilité hétérogène.

I) LE CHAMP MAGNETIQUE MACROSCOPIQUE DANS UN MILIEU MAGNETIQUE.

Lorsqu'un objet magnétique est introduit dans un champ magnétique statique B_0 (suivant le vecteur unitaire \vec{e}_z), celui-ci est animé par une aimantation définie comme la moyenne magnétique du moment dipolaire par unité de volume,

$$\vec{M} = \mu_0^{-1} \chi B_0 \vec{e}_z \quad \text{Équation 9}$$

dans laquelle χ est la susceptibilité magnétique et dépend de l'objet. La susceptibilité est dite isotrope ce qui implique que celle-ci est dépendante de sa localisation spatiale au sein de l'échantillon.

L'aimantation est donc déterminée à la fois par le champ magnétique appliqué mais aussi par la nature de l'échantillon. Il est important à ce stade de faire la distinction entre l'aimantation de spin et l'aimantation électronique. L'aimantation de spin correspond à la somme de l'ensemble des moments de spins nucléaires, et c'est cette dernière qui produit la totalité des signaux RMN. L'aimantation électronique est due à la perturbation de l'orbitale et des mouvements de spin des électrons lors de l'application d'un champ magnétique. Dans la plupart des cas, l'intensité de l'aimantation électronique est le terme dominant de l'aimantation globale. Le champ magnétique auquel est soumis l'objet est largement modifié et n'est plus uniquement déterminé par B_0 . Il en découle qu'il est possible de négliger l'influence de l'aimantation de spin et de considérer uniquement l'aimantation électronique dans la suite de notre démonstration.

Si l'échantillon étudié est homogène, le champ magnétique induit par l'aimantation est $\vec{B}_M = \chi B_0 \vec{e}_z$. La susceptibilité magnétique est variable dans un échantillon naturel comme peuvent l'être les cellules ou le tissu biologique. La « constante » de susceptibilité $\chi(\vec{r})$ apparaît donc comme étant dépendante de la position. Un échantillon hétérogène peut se diviser en plusieurs petites régions ayant une susceptibilité uniforme $\chi_i = \chi(\vec{r}_i)$. Ces régions

individuelles suivant un volume Δv sont décrites par un moment magnétique :

$$\vec{m}_i = \vec{m}(r_i) = \mu_0^{-1} \chi_i B_0 \Delta v \vec{e}_z \quad \text{Équation 10}$$

Chaque moment magnétique induit d'une part, un champ homogène à l'intérieur et d'autre part un champ dipolaire autour de la région. Le champ magnétique peut alors s'écrire comme une superposition linéaire de l'ensemble des champs dipolaires induits.

$$\vec{B}_m(r) = \frac{2}{3} \mu_0 \vec{m}(r) + \sum_i \frac{\mu_0}{4\pi r_i^3} [3(\vec{m}_i \cdot \vec{e}_i) \vec{e}_i - \vec{m}_i] \quad \text{Équation 11}$$

Ceci correspond au champ magnétique macroscopique.

II) LE CHAMP MAGNETIQUE LOCAL MICROSCOPIQUE ET L'HAMILTONIEN DE SPIN :

Les spins nucléaires sont des dipôles magnétiques de dimension spatiale négligeable, ainsi le champ magnétique exact ressenti par un spin est de dimension microscopique. En RMN, le calcul du champ magnétique local microscopique considère normalement le champ de « démagnétisation » des spins voisins. Le champ local microscopique est ainsi relié au champ macroscopique par :

$$\vec{B}_{sus}(r) = \vec{B}_m(r) - \frac{2}{3} \mu_0 \vec{m}(r) \quad \text{Équation 12}$$

Dans cette équation, le champ local $\vec{B}_{sus}(r)$ dépend de chaque position de spin.

Le terme séculaire de l'Hamiltonien de spin pour un spin I_{jz} à une position r_j à partir de l'interaction de spins avec l'aimantation électronique induit par la susceptibilité hétérogène devient :

$$H_m(r) = \sum_i \frac{\mu_0}{4\pi r_i^3} (3 \cos^2 \theta_{ij} - 1) I_{jz} \quad \text{Équation 13}$$

Et l'Hamiltonien de spin global est :

$$\hat{H}_m = \sum_{j \neq i} \sum_i \frac{\mu_0}{4\pi r_i^3} (3 \cos^2 \theta_{ij} - 1) I_{jz} \quad \text{Équation 14}$$

L'indice i correspond à l'ensemble des régions homogènes de l'échantillon formellement découpé et j correspond à l'ensemble des spins de l'échantillon.

Tout comme l'Hamiltonien de spin dipôle-dipôle homo et hétéronucléaire, cette expression de l'Hamiltonien de spin de susceptibilité est proportionnel à $(3\cos^2\theta - 1)$

D) MOYENNE COHERENTE PAR ROTATION A L'ANGLE MAGIQUE

En mode statique, les signaux RMN d'une molécule dans un échantillon de tissu sont élargis par le couplage dipolaire résiduel et la susceptibilité hétérogène. La rotation à l'angle magique est introduite afin d'éliminer l'élargissement causé par ces mécanismes. Comme il a été souligné auparavant, les Hamiltonien de spins de ces interactions sont tous proportionnels au terme $(3\cos^2\theta - 1)$. Une rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique moyenne ces interactions à zéro de sorte qu'un spectre RMN haute résolution est obtenu. Pour les applications MAS sur des échantillons de tissus ou de cellules, il est nécessaire de maintenir l'intégrité de l'échantillon. Néanmoins il est clair que faire tourner l'échantillon à des vitesses trop importantes peut induire une dégradation accélérée de l'échantillon. Il devient dès lors essentiel de comprendre comment la rotation à l'angle magique réalise une moyenne cohérente des interactions et comment les propriétés de ces interactions influencent le moyennement cohérent par MAS et ceci afin de déterminer les vitesses de rotation nécessaires à l'obtention de spectres optimaux et de voir si ces valeurs restent compatibles avec la conservation de l'échantillon. Pour ce faire nous allons introduire la théorie de l'Hamiltonien moyen et ainsi discuter des interactions entre mouvements moléculaires et MAS.

E) L'HAMILTONIEN MOYEN

I) LA THEORIE DE L'HAMILTONIEN MOYEN.

Faire tourner l'échantillon physiquement le long d'un axe fixe avec une vitesse de rotation ω_r introduit une modulation périodique dans l'Hamiltonien de spin, suivant une période $\tau_r = 2\pi/\omega_r$. L'idée de base de la théorie de l'Hamiltonien moyen est, que si l'Hamiltonien est périodiquement dépendant du temps, l'évolution du système de spins sur une période peut être décrite en utilisant « l'Hamiltonien moyen » \bar{H} , indépendant du temps, défini sur une période de rotation comme suit :

$$\bar{H} = \sum_{\mu=0}^{\infty} H_{\mu} \quad \text{Équation 15}$$

$$H_0 = \frac{1}{\tau_r} \int_0^{\tau_r} H(t) dt \quad \text{Équation 16}$$

$$H_1 = \frac{-i}{2\tau_r} \int_0^{\tau_r} \int_0^t [H(t), H(t')] dt dt' \quad \text{Équation 17}$$

et ainsi de suite, où $i = (-1)^{1/2}$ et le commutateur $[H(t), H(t')] = H(t)H(t') - H(t')H(t)$ implique que l'Hamiltonien commute avec lui-même lorsque t varie. Dans l'équation (3.20) on observe une convergence du plus grand ordre vers :

$$H_{\mu+1} \approx \frac{\Delta\tau_r}{\mu+1} H_{\mu} \quad \text{Équation 18}$$

où Δ correspond à la largeur de raie pour l'échantillon en mode statique. Comme la période $\Delta\tau_r$ diminue en fonction de l'inverse de la largeur de raie en statique et ceci pour un échantillon ne tournant pas ($1/\Delta$), les termes de grand ordre deviennent de moins en moins importants.

Si $\Delta\tau_r \ll 1$, ceci correspond au fait que la vitesse de rotation est beaucoup plus grande que la largeur de raie, que tous les termes de plus grand ordre peuvent être négligés et que le terme restant est d'ordre zéro, terme qui ne donne pas d'élargissement.

II) INTERACTIONS HOMOGENES ET HETEROGENES :

Si l'Hamiltonien d'interaction commute avec lui-même à des instants différents, le commutateur de l'équation (3.20b) disparaît (l'interaction est homogène). Tous les termes de plus grand ordre vont également être nuls dans la mesure où ils dépendent du même commutateur. L'Hamiltonien moyen s'annule alors dans l'équation (3.20a). D'un autre côté, si l'Hamiltonien de spin ne commute pas avec lui-même, tous les termes de plus grand ordre de l'équation (3.20) doivent être considérés (l'interaction est hétérogène).

Ainsi, pour des interactions hétérogènes, la réduction de la largeur de raie est indépendante de la vitesse de rotation car tous les termes de plus grand ordre de l'équation (3.20) sont nuls. Une faible vitesse de rotation suffit à éliminer la totalité des interactions inhomogènes et donner lieu à un spectre de type isotrope. Une vitesse de rotation élevée $\omega_r \gg \Delta$ n'améliorera pas la résolution spectrale pour une interaction inhomogène. Cependant, la rotation de l'échantillon conduit à l'apparition de bandes de rotation dispersées sur le spectre RMN à tous les multiples de la vitesse de rotation, ceci sur une gamme de fréquence comparable à la largeur de raie en statique. La distance entre deux bandes de rotation est égale à la vitesse de rotation, ainsi il y aura Δ/ω_r bandes de rotation. Les bandes de rotation provenant de résonances correspondant à différents groupes de spins peuvent se superposer les unes aux autres et conduire à de grandes difficultés dans l'analyse et l'interprétation des spectres. Un autre inconvénient des faibles vitesses de rotation est que la sensibilité de détection pour les signaux isotropes est limitée car l'intensité du signal est distribuée sur l'ensemble des bandes de rotation. Ainsi, pour les signaux élargis par les interactions inhomogènes, une vitesse de rotation rapide ne devrait pas augmenter la résolution du spectre MAS isotrope ; cependant, il doit simplifier le spectre et augmenter la sensibilité de détection. Pour une interaction homogène, une vitesse de rotation rapide $\omega_r \gg \Delta$ est nécessaire afin de réduire la contribution des termes de plus grand ordre de l'équation (3.20) de façon à améliorer la largeur de raies.

F) L'EFFET DU MAS SUR LE COUPLAGE DIPOLAIRE HOMONUCLEAIRE

L'Hamiltonien de spin du couplage dipolaire homonucléaire est important pour l'analyse RMN MAS des échantillons de tissus et de cellules. Celui-ci ne commute pas avec lui-même et est considéré comme une interaction homogène. Comme nous l'avons abordé précédemment, pour parvenir à une amélioration significative de la largeur de raie, les termes de plus grand ordre de l'équation (3.20) doivent être réduits en appliquant une vitesse de rotation élevée. La condition de base est que la vitesse de rotation doit être largement supérieure à la largeur de raie des spectres en statique : $\omega_r \gg \Delta$. Pour une vitesse de rotation équivalente à la largeur de raie des spectres en statique, la contribution de l'Hamiltonien moyen au premier ordre est d'environ 50%, ce qui veut dire que la rotation à l'angle magique réduit la largeur de raie de moitié. Il est cependant important de noter qu'en présence de mouvements moléculaires (ce qui est le cas dans les systèmes « mous » que nous considérons), le couplage dipolaire homonucléaire est largement réduit.

2.2.3. LES EXPERIENCES RMN HRMAS

Les enregistrements HRMAS sont réalisés sur un spectromètre Avance Bruker 500Mhz équipé d'une sonde triple 4mm (^1H , ^{13}C , ^2H). Une unité de refroidissement Bruker est employée pour contrôler la température de la sonde. Un flux d'air asséché maintient la température de l'échantillon à 0°C . Pour tous les enregistrements, la vitesse de rotation de l'échantillon est fixée à 3000 Hz de manière à maintenir les bandes de rotation en dehors de la fenêtre d'intérêt (fenêtre spectrale = 6250Hz). La vitesse de rotation entraîne une élévation de la température intrinsèque du rotor de 1°C par kHz. La température réelle d'enregistrement est donc de 3°C ce qui permet de maintenir la stabilité métabolique de l'échantillon pendant la durée de l'acquisition. De plus, il a été montré qu'une vitesse de rotation de 5kHz n'entraîne pas de détérioration du tissu (Cheng et al., 1998a).

2.2.3.1. LA ROTATION DES ECHANTILLONS A L'ANGLE MAGIQUE

Pour obtenir le MAS il faut faire tourner les échantillons à un angle $\theta_{mas} = 54.7^\circ$ ce qui équivaut à résoudre l'équation $3\cos^2 \theta_{mas} - 1 = 0$ où θ est l'angle par rapport au champ magnétique.

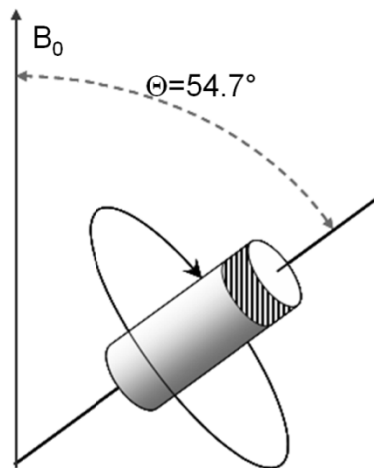


Figure 7 : Principe de la rotation à l'angle magique

La Figure 8 illustre un rotor tournant autour d'un axe incliné à l'angle magique ainsi qu'un rotor Bruker 4mm avec un insert. Un flux d'azote est utilisé pour entraîner la rotation du rotor. L'échantillon est placé à l'intérieur du rotor et occupe généralement une cavité dont le volume est de $50\mu\text{L}$.

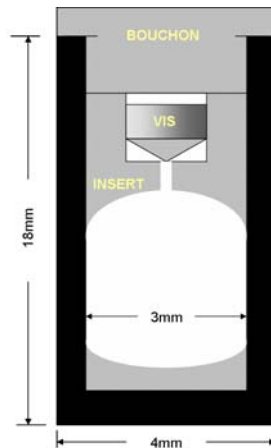


Figure 8: Schéma d'un rotor HRMAS : 4mm, 50µl

2.2.3.2. LES ASPECTS PRATIQUES DES EXPERIENCES RMN EN CONDITIONS MAS

Faire tourner un échantillon dans un rotor scellé peut entraîner différents degrés de dégradation sur ce dernier en fonction du temps d'expérience et du type de cellule ou de tissu analysés. Sous MAS, à 600MHz, un spectre 1 dimension (spectre 1D) du proton est obtenu en environ 10min. Un spectre 2D homonucléaire peut être obtenu en une heure, alors qu'une expérience 2D hétéronucléaire peut prendre plusieurs heures.

Des vitesses de rotation allant de 1 à 6KHz sont généralement utilisées afin d'obtenir des spectres de spécimens de tissus ou d'échantillons de cellules. Une augmentation de la vitesse de rotation en MAS n'induit pas une augmentation de la résolution. La vitesse de rotation adéquate doit être déterminée de façon à placer les bandes de rotation à l'extérieur de la fenêtre spectrale d'intérêt, ce qui correspond généralement à 10ppm. Sur un spectromètre RMN 500MHz, la vitesse de rotation sera donc choisie entre 3 et 4kHz. La dégradation du tissu entraînée par la rotation à l'angle magique peut être limitée par un contrôle de la température de façon à ce que celle-ci ne dépasse pas les 4°C durant l'expérience. La température réelle à l'intérieur de l'échantillon peut être légèrement plus élevée que celle mesurée par le thermocouple à l'extérieur du rotor (Andrew and Russell, 2001).

2.2.4. LES SEQUENCES D'IMPULSIONS CLASSIQUES

La RMN en conditions HRMAS détecte les profils moléculaires des échantillons de cellules ou de tissus. Dans de tels échantillons, les molécules évoluent dans des micro-environnements hétérogènes. Par conséquent, l'abondance, la relaxation, la diffusion et leur

capacité à s'échanger avec l'eau peuvent différer d'un certain nombre d'ordres de grandeurs pour les différents métabolites. Tandis que les conséquences de l'hétérogénéité compliquent la sélection des séquences d'impulsions, elles permettent également de détecter spécifiquement certains métabolites de l'échantillon. En plus du profil métabolique, la RMN en conditions HRMAS peut également réaliser des études dynamiques, détecter la compartimentation, les groupes et la segmentation des métabolites. Ceci peut être réalisé grâce à l'utilisation de différentes séquences techniques d'impulsions dont le but est de « simplifier » l'information spectrale en éliminant les contributions de certaines classes de composées ou encore afin d'obtenir une estimation des temps de relaxation et des coefficients de diffusion de ces métabolites.

La polyvalence des séquences d'impulsions RMN est une des clés qui fait que la spectroscopie RMN est du plus grand intérêt, que ce soit dans le domaine de la physique, de la chimie, de la biologie à la médecine. Certains métabolites, comme par exemple ceux liés aux membranes, ou les protéines, ont un comportement plus proche des solides, alors que d'autres, de faible poids moléculaire; présentent des caractéristiques plus proches des liquides. La résolution obtenue en RMN HRMAS sur des échantillons de tissus et de cultures cellulaires est proche de celles obtenues avec les expériences liquides conventionnelles. Bien que la plupart des séquences d'impulsions utilisées en RMN HRMAS proviennent directement de la RMN du liquide sans aucune modification, une attention particulière doit être portée sur les caractéristiques de certains métabolites, comme les temps de relaxation transversaux très courts et la diffusion lente, dans la mesure où ces comportements particuliers peuvent influencer significativement le spectre. De plus, le couplage dipolaire homonucléaire ^1H - ^1H dans les protéines pourvues d'une rotation axiale lente ne peut pas être moyenné par le MAS comme nous l'avons vu précédemment. La diffusion rapide de spin provenant de ce couplage dipolaire non moyenné peut facilement transférer de l'aimantation au travers de longues distances ou vers d'autres métabolites *via* l'échange chimique (NOE). Ces mécanismes de transfert d'aimantation peuvent également influencer significativement le spectre.

Dans l'objectif d'une analyse quantitative et systématique des métabolites, les spectres 1D ^1H sont les techniques les plus utilisées. Ces spectres reflètent la distribution des métabolites et leur abondance relative dans l'échantillon. Cependant, une certaine quantité de signaux peut être perdue au travers d'un spectre 1D quand différentes séquences d'impulsions sont utilisées, et surtout ces pertes sont fortement liées au type de séquence employée. Afin d'étudier cette influence et de déterminer les séquences optimales pour l'acquisition reproductible d'un grand nombre d'échantillons, un ensemble de séquences d'impulsions 1D ont été examinées de façon

à faire ressortir la manière dont la séquence d'impulsion influence le profil métabolique détecté et une comparaison des spectres de biopsies de tumeurs solides obtenus a été effectuée. Dans l'optique d'une analyse statistique ultérieure pour un traitement de type métabolomique, le nombre d'étapes de post-traitement doit être limité et les séquences étudiées le seront aussi. L'ensemble de ces travaux, exposés dans les paragraphes suivants, a fait l'objet d'une soumission de publication scientifique {Weingertner 2008}.

2.2.4.1. LES SEQUENCES D'IMPULSIONS RMN 1D

A) LA PROBLEMATIQUE DE LA SUPPRESSION DE L'EAU EN RMN HRMAS

L'une des caractéristiques principales des systèmes biologiques est leur forte teneur en eau. Alors que les métabolites sont dans la gamme du micro molaire, l'eau dans les tissus est présente à une concentration supérieure à 100 moles par litres. Cette différence est un souci majeur dans l'acquisition de spectre RMN proton du métabolome. En effet, les spectromètres couramment utilisés sont équipés de digitaliseurs 16 bit, d'où une gamme de détection d'environ 10^6 ordre de grandeur. Pour pouvoir distinguer un métabolite il faut que l'intensité du signal de l'eau soit au maximum 10^6 fois plus important que son signal propre. Il est donc nécessaire de réduire le signal de l'eau d'un facteur minimal de 10^2 . Ainsi, la suppression du signal de l'eau est généralement utilisée afin d'augmenter la sensibilité de détection. Dans les applications RMN HRMAS, la technique de présaturation est la technique la plus utilisée pour l'élimination du signal de l'eau. Cependant, dans un échantillon comme du tissu ou des cellules, l'eau échange de l'aimantation avec les autres molécules. Une irradiation en onde continue du signal de l'eau pendant quelques secondes, comme dans le cas de la présaturation peut induire une perte de signaux et ceci pour un certains nombre d'autres métabolites.

Il existe aujourd'hui un grand nombre de techniques de suppression d'eau largement documentées au travers des publications scientifiques. Néanmoins la problématique de suppression d'eau a surtout été étudiée et optimisée dans le cadre de la RMN du liquide (Chen et al., 2004). Dans le cadre des travaux de cette thèse nous avons étudié les modifications dans les profils métaboliques en fonction des séquences d'impulsions utilisées.

L'objectif principal de ces travaux préparatoires est l'obtention de spectres optimaux en vue d'un traitement de type métabolomique. Ceci implique une reproductibilité et une stabilité maximales au travers de l'ensemble des jeux de données acquis. Nous postulons dans le cadre de cette étude que la variabilité maximale, indépendante de la nature de l'échantillon, dépend

principalement des manipulations humaines. Ainsi les séquences optimales se devront de nécessiter un minimum d'interventions lors de réglages de paramètres avant l'acquisition mais aussi lors de la phase de post-traitement des données. Pour ce faire nous avons comparé une séquence avec simple présaturation, avec une séquence mettant en jeu une présaturation couplée à une séquence d'écho de spin (CPMG), une séquence de type SEEN (*Selective Excitation to Empirically Null*), une séquence de type PURGE (*Presaturation utilizing relaxation gradients and echoes*), une séquence de type NOEPR et une séquence de type WATERGATE, couplée ou non à une séquence d'écho de spin.

1) LES SEQUENCES TESTEES.

La présaturation est la plus simple des techniques de suppression du signal de l'eau (Figure 9). Généralement cette séquence est suffisante pour obtenir une saturation efficace de la résonance de l'eau efficace et une ligne de base relativement plate sur des échantillons de tissus.

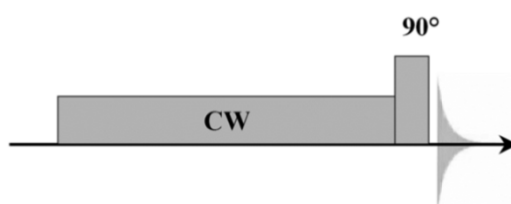


Figure 9 : Séquence de présaturation

L'efficacité de l'élimination du signal de l'eau par présaturation sur un échantillon de cellule ou de tissu est fortement influencée par l'homogénéité du champ statique au travers de l'échantillon. Un bon ajustement des shimms donne lieu à une suppression d'eau plus efficace et améliore la forme sur signal résiduel. Dans le cadre de nos travaux, l'impulsion de présaturation appliquée est de faible puissance (0.755mW) sur une durée de 5 secondes.

L'expérience CPMG (Figure 10), développée par Carr-Purcell-Meiboom-Gill pour les séries d'échos de spins, le cyclage de phase mis en œuvre dans le cadre de cette expérience a la capacité de compenser les petites imperfections de l'impulsion 180°.

La séquence CPMG permet une acquisition sélective des métabolites de faible poids moléculaire ou signaux fins. Ceux-ci correspondent à des composés possédant une forte mobilité ou de faibles temps de corrélation. Il y a deux facteurs qu'il faut prendre en considération afin de choisir la valeur du délai, τ inter-impulsion de l'expérience CPMG : la distorsion de phase

introduite par le couplage scalaire homonucléaire durant les délais et la synchronisation avec la vitesse de rotation MAS. La plus simple des méthodes détermine la valeur du délai τ comme l'inverse de la vitesse de rotation. Par exemple, si la vitesse de rotation à l'angle magique est de 3kHz, le délai τ idéal sera de 300 μ s. Il est ainsi possible de faire varier le délai de $2n\tau$ entre 30ms et quelques secondes en fonction des signaux larges à éliminer et ainsi d'utiliser la séquence CPMG comme un filtre macromoléculaire. Cette séquence a été énormément utilisée afin d'obtenir les profils métaboliques sur des échantillons tissulaires avec l'inconvénient majeur de la perte d'informations des molécules de mobilité plus restreinte qui apparaissent sous forme de signaux larges en RMN du proton.

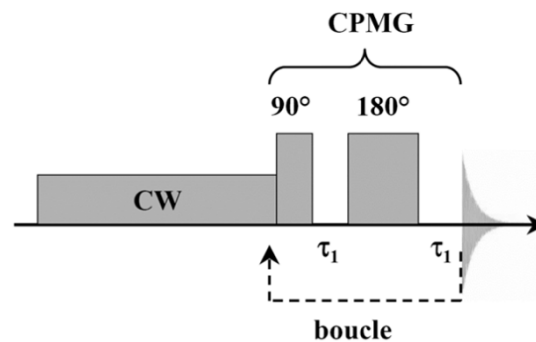


Figure 10: Séquence de présaturation couplée CPMG

Quatre méthodes de suppression du signal de l'eau basées sur des principes différents ont été étudiées :

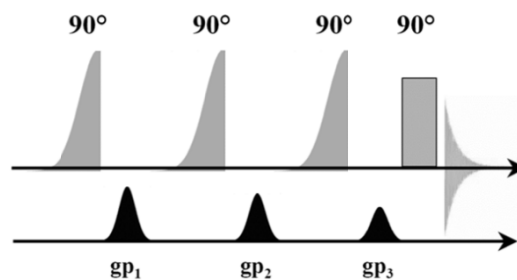


Figure 11: séquence SEEN

La séquence SEEN (Chen et al., 2004) a été développée afin de supprimer la résonance de l'eau, tout en ne supprimant pas l'information relative aux autres métabolites présents dans les spécimens de tissus et les échantillons de cellules. Cette séquence d'impulsions comprend trois répétitions de CHESS (*chemical-shift-selective*) dont la dernière excitation sélective a pour objectif de réduire à zéro le signal de l'eau (Figure 11).

Cette séquence présente un grand intérêt du fait que l'eau effectue des échanges

d'aimantation rapides avec les phospholipides de la membrane: supprimer la résonance de l'eau implique de supprimer également l'information relative aux lipides. Par conséquent, une présaturation de plusieurs secondes (typiquement la durée d'application de la présaturation est de 1 à 5s) peut engendrer des pertes de signaux importantes pour les lipides membranaires. D'autres métabolites sont en échange avec l'eau comme par exemple les protéines ou encore des plus petites molécules contenant des protons amides. Les signaux de ces métabolites sont également préservés par application de la séquence SEEN. Comme l'échange d'aimantation se fait toujours durant l'impulsion sélective, la longueur de cette impulsion doit être la plus courte possible.

L'expérience NOESYPR (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) utilise le premier incrément de l'expérience 2D NOESY (Figure 12).

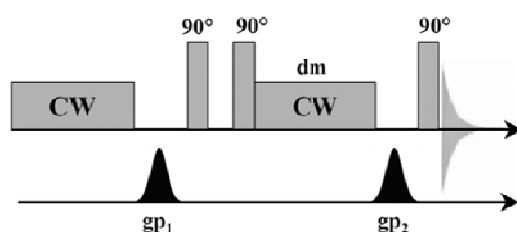


Figure 12 : Séquence NOESY PR

C'est une technique couramment employée en RMN du liquide. Les deux délais sont classiquement choisis avec τ_1 d'environ $3\mu\text{s}$ et τ_m de 100ms. La présaturation basse puissance durant le temps de mélange τ_m permet d'éviter le rétablissement du signal de l'eau par la relaxation longitudinale. Cette irradiation n'est pas nécessaire si le délai est suffisamment court. Un gradient peut être rajouté au début du temps de mélange afin d'éliminer l'aimantation transversale résiduelle. La NOESYPR peut permettre d'obtenir une meilleure ligne de base que la présaturation simple et un temps de mélange de 100ms ne permet pas de générer un NOE significatif pour les métabolites très mobiles. Pour les macromolécules ou les groupements de molécules comme les membranes lipidiques, un temps de mélange de 100ms doit conduire à un effet NOE intramoléculaire significatif et redistribuer les intensités des signaux entre les différentes résonances. Dans le cadre de nos travaux les paramètres employés sont un temps d'échange de 10ms, les gradients pulsés (forme SINE, puissance de $15.00\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour gp_1 et $-3.00\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour gp_2) sont appliqués le long de l'axe Z.

L'expérience WATERGATE (Liu et al., 2001; Piotto et al., 1992) (WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation) consiste en une succession de trois paires d'impulsions symétriques suivant un schéma $3\alpha - \tau - 9\alpha - \tau - 19\alpha - \tau - 19\alpha - \tau - 9\alpha - \tau - 3\alpha$ que l'on nomme

habituellement W3, et pour lequel on a $62\alpha=180^\circ$ (Figure 13).

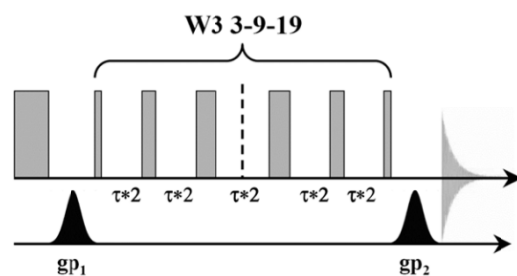


Figure 13 : Séquence WATERGATE

La séquence PURGE (Simpson and Brown, 2005) est une séquence de présaturation mettant en jeu des gradients de relaxation ainsi que des échos (Figure 14).

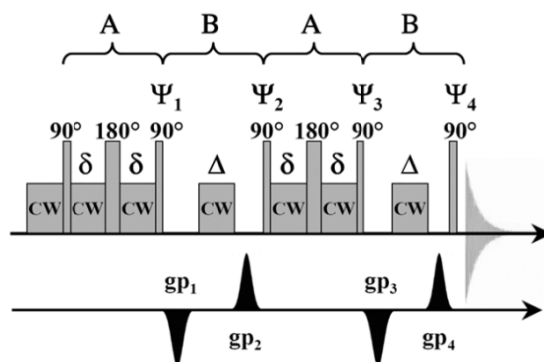


Figure 14 : Séquence PURGE

Tout comme pour la séquence NOESYPR les gradients sont appliqués le long de l'axe Z avec des puissances respectives de $-2.05\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour gp_1 , $7.90\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour gp_2 , $-2.57\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour gp_3 et $10.29\text{G}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour gp_4 . La durée d'application des impulsions de présaturation a été fixée à $200\mu\text{s}$ pour Δ , et $333\mu\text{s}$ pour δ .

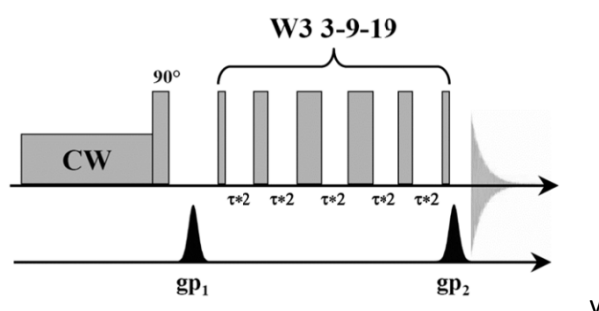


Figure 15: Séquence WATERGATE avec présaturation

Enfin une combinaison de techniques de suppression d'eau a été étudiée dans l'optique d'une part, d'optimiser les séquences d'acquisitions, et d'autre part, de réaliser une exploitation statistique. Pour ce faire la combinaison des expériences WATERGATE et présaturation classique a été réalisée, puis complétée dans un second temps par l'ajout d'une CPMG comme filtre macromoléculaire

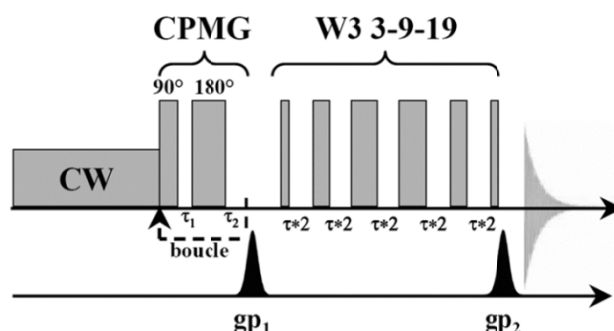


Figure 16 : Séquence WATERGATE CPMG avec présaturation

II) RESULTATS

Figure 16, on peut trouver les spectres relatifs aux précédentes séquences d'impulsions sur un spectromètre RMN Bruker Avance 500MHz avec une sonde triple (^1H - ^{13}C - ^2H) HRMAS. L'échantillon utilisé pour cette acquisition est un neuroblastome. D'une masse de 20mg, l'échantillon a été congelé dans l'azote liquide immédiatement après résection afin d'éviter toute modification métabolique. La préparation du rotor HRMAS a été réalisée dans un laps de temps minimal (inférieur à 5 min) sur un lit de glace toujours dans le but de limiter toute évolution biochimique. En plus du tissu, 30 μL de $\text{D}_2\text{O}/2\text{mM}$ TSP (3-(triméthylsilyl) [2,2,3,3- D_4] propionate sodium salt) ont été ajoutés dans le rotor HRMAS 4mm. Le but de cette manipulation est de compléter le volume et de fournir une référence ainsi qu'un signal de lock évitant les dérives en fréquence au cours des enregistrements.

La vitesse de rotation MAS aura été fixée à 3125Hz. L'ensemble des spectres a été obtenu avec le même facteur de gain pour le récepteur et 13 minutes d'acquisition. Les paramètres communs sont les suivants : 128 scans, 16k de points, un recyclage de 5 sec et un temps d'acquisition de 1.14 sec pour un scan ; application d'un lb (*line broadening*) de 0.2Hz avant la transformée de Fourier, correction de la ligne de base manuelle et calibration en fréquence sur le signal du TMSP (0ppm).

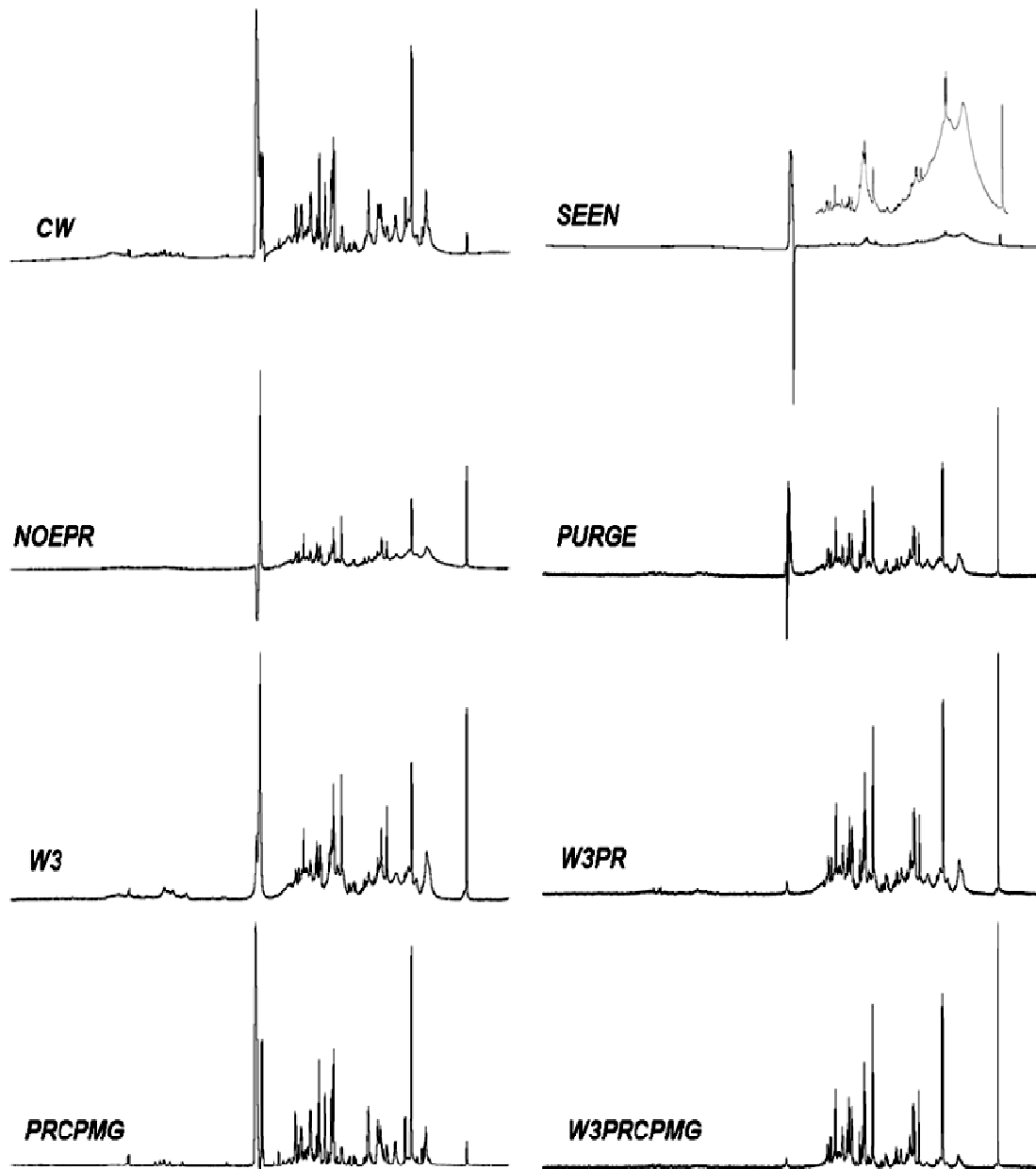


Figure 17 : Spectres comparatifs des différentes séquences de suppression du signal de l'eau.

Il apparaît clairement qu'en plus des caractéristiques de suppression de l'eau les profils métaboliques, dans les intervalles 0 à 4.5ppm et 5.5 à 10ppm sont très variables en fonction de la séquence employée. Afin de mieux appréhender la problématique de suppression de l'eau et son influence sur les profils métaboliques un ensemble de profils de saturation du signal de l'eau a été réalisé sur des échantillons d'eau deutérée (HOD) mais aussi directement sur des échantillons de tissus biologiques (Figure 18).

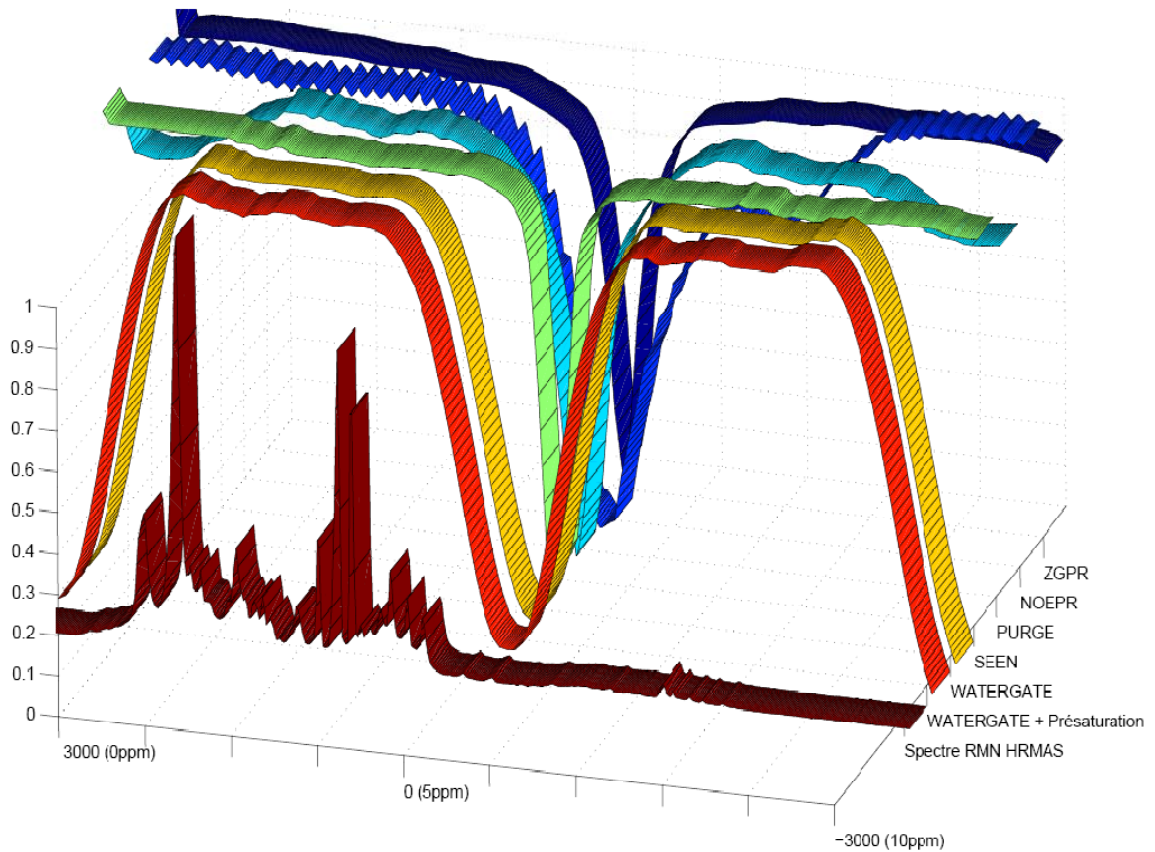


Figure 18: Profils de suppression de l'eau

Dans un objectif d'automatisation d'un point de vue acquisition, les facteurs les plus importants sont la reproductibilité et la conservation des informations métaboliques. Pour répondre à cette problématique le profil de saturation parfait devrait présenter des plateaux parfaitement plats et réguliers et un « trou » de saturation ayant des pentes les plus abruptes et aussi régulières possibles ainsi qu'un fond large et plat (Figure 19). Le profil associé à la séquence SEEN est ainsi proche de ce profil théorique, néanmoins la saturation n'est pas parfaite et la finesse du « trou » nécessite un ajustement précis de la fréquence de saturation. Enfin la séquence SEEN permet de conserver un maximum d'information comme le démontre le profil métabolique obtenu dans la Figure 17, cependant cette abondance d'information peut en masquer certaines autres et l'acquisition de l'ensemble des signaux entraîne un grand problème de correction de ligne de base. Le profil associé à la séquence PURGE présente quant à lui un profil de suppression d'eau similaire, fortement dépendant de l'ajustement en fréquence de la séquence, avec de plus, des modifications d'intensité dans les régions d'intérêt d'autant plus marquées lorsque l'échantillon est du tissu biologique. Ce profil est fortement asymétrique faisant apparaître une perte de signal dans la région des résonances N-H. Ceci est principalement dû au fait que la séquence PURGE met en jeu des impulsions de présaturation

(CW), le fait d'éliminer le signal de l'eau entraîne une baisse de signal des protons en échange avec les protons de l'eau.

La suppression d'eau effective obtenue avec la séquence PURGE est supérieure à celle obtenue avec la séquence SEEN (Figure 17) le signal d'eau résiduel est d'intensité équivalente aux métabolites les plus importants. Bien que le profil de suppression soit plus large pour la séquence PURGE, les métabolites ayant une fréquence de résonance proche de celle de l'eau restent détectables et l'intensité relative de ceux-ci est peu affectée. Il apparaît donc que la séquence PURGE est plus adéquate que la séquence SEEN pour la réalisation d'acquisition de type métabolomique, tout du moins si l'on se focalise sur les métabolites de faible poids moléculaire. Néanmoins cette séquence ne laisse que peu de latitude quant à l'ajustement en fréquence (de l'ordre de 12Hz), et de plus la suppression de l'eau n'est pas parfaite et induit des problèmes de phases et de ligne de base non négligeables.

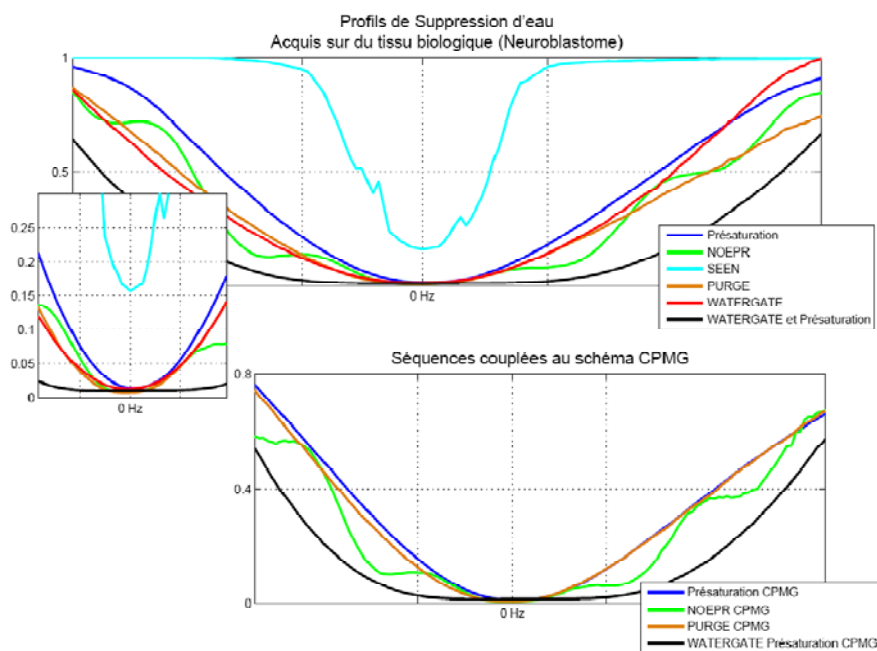


Figure 19 : Profils de suppression d'eau

La séquence NOEPR est la séquence la plus employée pour l'étude des liquides biologiques. Il apparaît intéressant de vérifier son applicabilité aux enregistrements HRMAS et sur des tissus biologiques. L'emploi des paramètres classiques des séquences NOE utilisées en liquide conduit à une inversion des raies fines comparativement aux résonances faiblement résolues, probablement liée à un effet NOE négatif.

De ce fait, un réajustement de la puissance des gradients est nécessaire pour appliquer ce type de séquence à ce type d'échantillon. Les profils de suppression des séquences NOEPR et

SEEN sont proches, avec un minimum supplémentaire apparaissant dans le cas des biopsies dans la région des liaisons N-H (encore une fois lié à l'utilisation de présaturations) dans le cas de NOEPR. On observe de plus une modulation sinusoïdale du profil liée à l'application de la seconde impulsion de présaturation. Il apparaît que la durée d'application de cette impulsion est égale à l'inverse de la fréquence d'oscillation. Enfin la suppression du signal de l'eau obtenu par application de cette séquence n'est pas optimale : le signal résiduel étant supérieur à celui du métabolite le plus important.

La séquence WATERGATE présente des profils de suppression d'eau parfaitement équivalents sur le tissu biologique et sur l'échantillon d'eau deutérée.

Cette observation démontre que cette méthode est hautement reproductible et indépendante par rapport à la nature de l'échantillon. Bien que la région de suppression soit plus large que pour les séquences SEEN, PURGE et NOEPR, les métabolites dont la fréquence de résonance est proche de l'eau restent largement observables et l'intensité relative de ceux-ci est peu affectée. Néanmoins la largeur du profil de suppression est faible, faisant de la séquence WATERGATE une méthode fortement dépendante de l'ajustement en fréquence. De plus la suppression effective du signal de l'eau est moyenne : le signal résiduel étant du même ordre de grandeur que celui des métabolites. La combinaison d'une séquence WATERGATE avec une présaturation permet d'obtenir un profil de suppression répondant à l'ensemble des critères nécessaires pour une étude optimale des métabolites de faible poids moléculaire dont les fréquences de résonance sont situées entre 0 et 4.5ppm. En effet, l'adjonction de la présaturation conduit à nouveau à la perte de signal des protons des groupements N-H rendant difficile l'étude de ces métabolites. Néanmoins cette séquence présente le meilleur compromis pour la réalisation d'études en métabolomique.

Elle est relativement peu sensible à l'ajustement en fréquence de la séquence (marge de 128Hz), n'induit pas de problème de phase et nécessite peu de correction de ligne de base en post-traitement. L'ensemble de ces résultats a donné lieu à la rédaction d'un article en cours d'évaluation par la revue Analytical Biochemistry

B) LES TECHNIQUES D'ÉDITION SPECTRALE

I) ÉDITION PAR TEMPS DE RELAXATION

Les molécules de grande taille, avec un poids moléculaire important, présentent, comme nous l'avons abordé précédemment, un temps de relaxation T2 plus court que les molécules

plus petites. Cette caractéristique peut être exploitée lors d'acquisition de profils métaboliques RMN en supprimant, partiellement ou complètement, les signaux issus des plus grosses molécules (lipides et protéines). Pour ce faire, une séquence CPMG, basée sur une succession d'échos de spin est généralement utilisée.

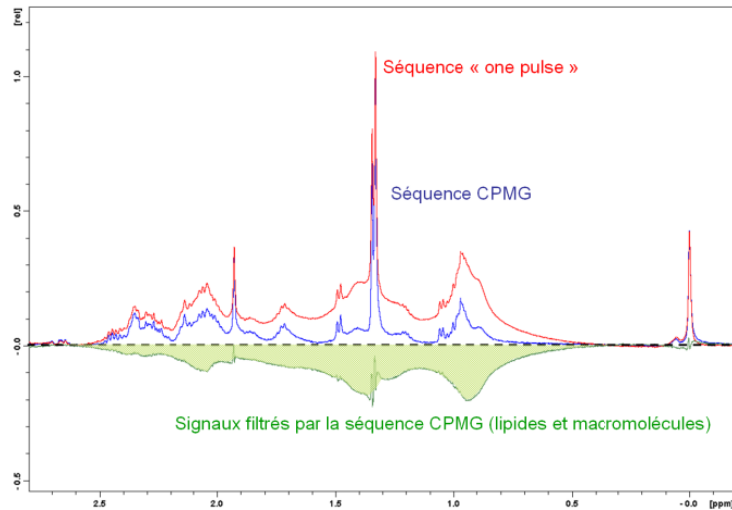


Figure 20: Suppression des signaux des macromolécules par utilisation d'une séquence d'édition spectrale (CPMG)

Schématiquement, le filtre intervient en retardant l'acquisition du signal du système après avoir laissé celui-ci relaxer. La puissance du filtre appliqué dépend du délai de relaxation laissé au système : plus le délai est long, plus le filtre est puissant et élimine les signaux des molécules les plus grosses.

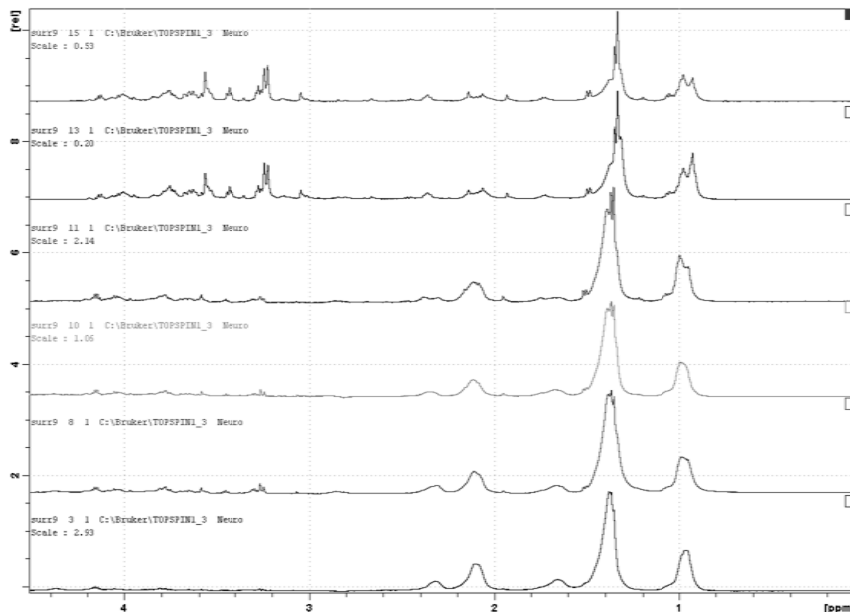


Figure 21 ; Mise en évidence du filtre lipidique (T2). Profil métabolique acquis sur un ganglion surrénal. Du bas vers le haut de la figure ; 40, 60, 80, 160, 300 et 600 ($T_2=333$) boucles réalisées dans la séquence CPMG. Les spectres sont normalisés par rapport au signal d'intensité maximale de chaque acquisition.

Cependant il est important de noter qu'un filtre CPMG élimine une partie des signaux de toutes les molécules. De plus, comme pour chaque type de molécules la relaxation est différente, l'application de ce type de séquence ne permet pas d'effectuer d'enregistrements quantitatifs à moins de connaître chaque paramètre T2 pour chaque métabolite.

L'optimisation des paramètres de filtre des séquences CPMG s'est avérée particulièrement importante dans le cas de neuroblastome, échantillons fortement lipidique. En particulier le nombre de boucles effectuées dans la séquence CPMG a été augmenté afin de filtrer au mieux les signaux dominants associés aux lipides (Figure 21) tout en conservant un maximum d'intensité pour les signaux issus des petits métabolites.

Ainsi la problématique liée à l'analyse PLS peut se poser sous forme d'équation $f(X) = Y$ où Y est une matrice à entrées multiples. Chaque colonne de la matrice Y est un des paramètres cliniques abordés précédemment, dont la valeur a été "stratifiée", c'est-à-dire limitée à un nombre réduit de cas (2 ou 3 par catégorie). L'analyse PLS peut alors être globale entraînant la résolution de l'équation $f(X) = Y$ dans son ensemble ou hiérarchisé impliquant la résolution successive des équations $f(X) = Y_m$ où m correspond au choix du critère pronostique analysé.

II) EDITION PAR DIFFUSION

L'édition par diffusion consiste en une séquence d'échos de spin à laquelle on adjoint l'application de gradient de champ. La séquence d'échos de spin a pour but de s'affranchir de l'inhomogénéité de B_0 ; or ce processus est contrecarré si durant la phase de refocalisation les molécules translatent, c'est à dire passent d'une position Z à une position Z'. Ceci conduit à une induction différente ainsi qu'à une modification de la fréquence de précession. La défocalisation qui s'en suit amène à une atténuation du signal de nature irréversible. Cette atténuation est d'autant plus marquée que le mouvement de la molécule est important. Dans les cellules, la mobilité des molécules dépend de leur taille, de leur environnement et de la façon dont elles sont liées. Par exemple, les petites molécules sont pourvues d'une mobilité plus importante que les macromolécules et les petites molécules dissoutes dans le cytoplasme cellulaire sont pourvues d'une mobilité plus importante que les petites molécules qui sont en interaction avec les macromolécules. Un amas de molécules peut limiter les mouvements dans une direction privilégiée. Ce qui rend les choses plus complexes dans un système naturel, c'est qu'une même molécule peut exister dans différents environnements et, par conséquent, posséder des mobilités différentes. Ainsi, l'eau est l'espèce moléculaire la plus abondante dans la cellule et le

cytoplasme cellulaire. Cependant, une petite partie de ces molécules d'eau reste dans le noyau et possède alors une mobilité plus faible que l'eau contenue dans le cytoplasme.

Pour résumer, la RMN en conditions HRMAS enregistre un spectre isotrope de haute résolution pour les métabolites de faible poids moléculaire possédant une mobilité importante, pour les membranes de phospholipides et les petites protéines des échantillons de cellules et de tissus. Bien sûr, le spectre va fortement dépendre de la séquence d'impulsions utilisée pour l'expérience RMN.

C) ACQUISITION DES PROFILS METABOLIQUES

Chaque série d'enregistrements RMN HRMAS se décompose comme suit :

1. Séquence « One Pulse »
2. Séquence Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG)

En fonction du besoin cette séquence peut se prolonger comme suit :

3. Séquence 1D spécifique d'édition spectrale (augmentation du filtre T2 avec incrémentation des boucles de la séquence CPMG, amélioration de la suppression de l'eau résiduelle par modification de la séquence de présaturation, édition par ajout d'un filtre de diffusion, etc...)
4. Séquence 2D homo nucléaire TOCSY (TOtal Correlation Spectroscopy) pour l'attribution des signaux RMN
5. Séquence 2D hétéro nucléaire HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) pour compléter l'attribution des signaux RMN
6. Autres études complémentaires (mesure de dégradation métabolique, mesure de temps de relaxation, etc...)

Au début et à la fin de chaque série d'enregistrements, une acquisition 1D avec présaturation du signal de l'eau est réalisée sur peu de répétition (n=16) afin de contrôler la dégradation métabolique potentielle de l'échantillon. L'optimisation des paramètres d'acquisitions se fait suivant une procédure « simplifiée » du fait du faible volume total de l'échantillon (50µL). Elle est jugée acceptable lorsque le signal du doublet du Lactate à 1.33ppm est correctement résolu (Piotto et al., 2005).

Les spectres ^1H 1D avec présaturation du signal de l'eau ont été enregistrés avec les paramètres d'acquisitions suivants :

- durée totale d'acquisition = 32 min,
- durée d'acquisition = 2.18s,
- 128 répétitions,
- fenêtre spectrale = 6250 Hz
- durée de relaxation = 15s.

Le cerveau étant composé d'un fort pourcentage de lipides, la contribution des métabolites de faible poids moléculaire pourrait être minoritaire, c'est pourquoi une acquisition de type CPMG est également effectuée. Cette séquence se décompose comme suit (délais de relaxation- 90° - (τ_1 - 180° - τ)_n - acquisition du signal) avec 128 répétitions. Les enregistrements sont réalisés avec les paramètres d'acquisition suivants :

- durée totale d'acquisition = 32 min,
- $\tau=333\mu\text{s}$
- $n=150$
- durée d'acquisition = 2.18s,
- 128 répétitions, fenêtre spectrale = 6250 Hz
- durée de relaxation = 15s

D) RESULTATS

L'optimisation des paramètres HRMAS a permis d'obtenir des profils métaboliques reproductibles, d'un enregistrement à l'autre, en minimisant au maximum l'intervention humaine lors de l'acquisition. L'emploi des séquences « one pulse » et CPMG permet la réalisation de 2 profils métabolites de caractéristiques différentes. La forte proportion de lipides présents dans les échantillons biologiques humains induit un signal RMN associé qui peut s'avérer prédominant, et ainsi masquer les fluctuations d'un métabolite résonant dans la même gamme de fréquences.

L'utilisation de la séquence CPMG, avec des réglages optimaux permet de réduire très fortement les signaux issus des lipides et autres macromolécules. De ce fait, l'analyse statistique pourra se faire sur le tissu biologique global (petits métabolites, macromolécules et lipides) ou

sur l'information unique des petits métabolites. Il est, de la même manière, possible de réaliser d'autres séquences RMN 1D spécifiques pour observer plus particulièrement certaines composantes du métabolome comme par exemple des séquences de diffusion où l'on se focalisera cette fois sur les molécules dont le mouvement est limité (les lipides et macromolécules, les métabolites des membranes).

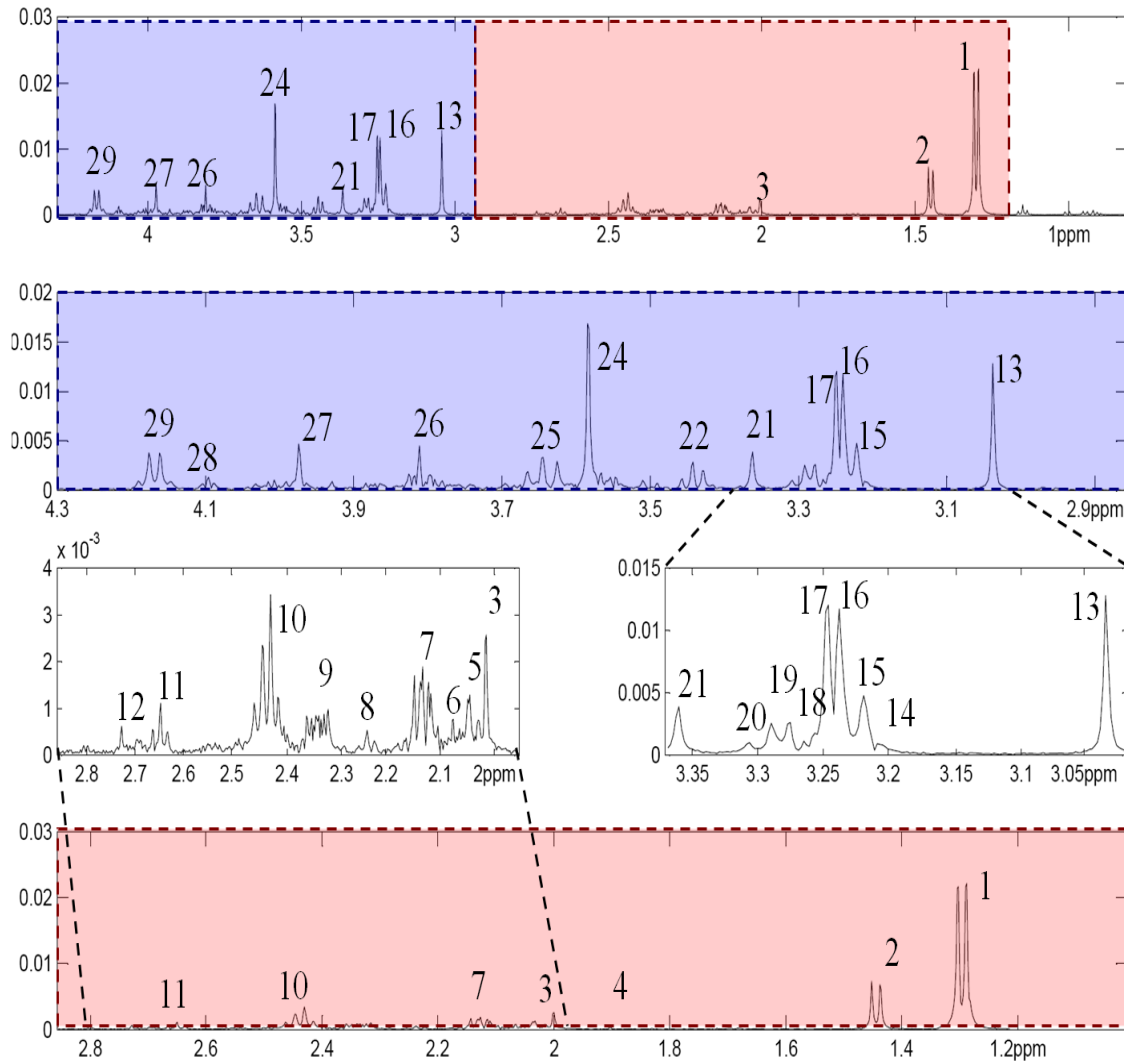


Figure 22: Spectre RMN HRMAS 1D CPMG d'un astrocytome pylocitique. (1) Lactate, (2) Ala, (3) N-acétylaspartate, (4) acétate, (5) glu, (6) proline, (7) Glu et Gln, (8) GABA, (9) Glu, (10) Gln, (11) acide aspartique, (12) malate, (13) Cr, (14) Tyrosine, (15) Ch, (16) Phosphocholine, (17) GPC, (18) Tau, (19) ml, (20) phénylalanine, (21) proline, (22) Tau, (24) Gly, (25) Phosphocholine, (26) Gly, (27) Cr, (29) Lactate

Cependant la problématique soulevée par un fort recouvrement des signaux reste entière et l'emploi de séquence 1D ne peut y répondre aisément. Néanmoins, cela n'est pas impossible, l'utilisation d'un spectromètre dont le champ magnétique principal serait beaucoup plus intense nous permettrait d'obtenir une meilleure résolution spectrale. Il existe cependant des techniques plus élégantes pour la détermination et l'attribution des signaux RMN comme la RMN 2D homo et hétéronucléaire.

2.4.4.2. LES SEQUENCES D'IMPULSIONS RMN 2D

A) LES SEQUENCES TESTEES.

Les spectres 2D (Aue et al., 1976) des échantillons de cellules et de tissus servent principalement d'outils pour l'attribution des résonances. Certains métabolites, pas suffisamment résolus sur le spectre 1D, sont facilement décelables en regardant les spectres 2D. Ceci est particulièrement utile lorsque l'objectif est de détecter de très faibles variations métaboliques entre différents types de tumeurs ou les effets d'une chimiothérapie sur une tumeur ou des lignées cellulaires. Les séquences d'impulsions 2D utilisées en HRMAS sont généralement les mêmes que pour les expériences de RMN du liquide, c'est pourquoi nous n'introduirons que les techniques mises en œuvre dans le cadre des travaux de cette thèse. Généralement, on sépare les séquences de corrélation 2D en deux grands groupes:

A. **les séquences de corrélations homonucléaires** qui relient entre eux les déplacements chimiques d'une même espèce nucléaire. Celles-ci se décomposent ensuite en séquences mettant en jeu les corrélations *via* le couplage scalaire (COSY acronyme de COrrélation SpectroscopY (Aue et al., 1976), TOCSY (Bax and Davis, 1985), ...) et celles utilisant les corrélations *via* le couplage dipolaire (NOESY). La séquence COSY liée au couplage scalaire (J_{IS} entre les spins I et S, non équivalent chimiquement, de fréquences respectives ν_I et ν_S comporte que deux impulsions, généralement de 90° , séparées par un temps variable et incrémentable t_1 . Elle se décompose en quatre étapes fondamentales : une période de préparation permettant le retour à l'équilibre dynamique avant une première impulsion 90° , une période d'évolution durant laquelle le spin S est « étiqueté par la fréquence de résonance ν_I et le couplage scalaire J_{IS} du spin I, une troisième étape de mélange où une seconde impulsion 90° est appliquée et enfin la quatrième étape de détection du signal émis. Un cyclage adéquat des phases des diverses impulsions est une condition *sine qua non* pour obtenir un spectre "propre" par élimination des signaux parasites. L'expérience COSY, sous sa forme usuelle demande un cyclage de phases à 16 pas. Les autres corrélations homonucléaires utilisant le couplage scalaire sont essentiellement les expériences de COSY multiquanta, les expériences relayées dans les quelles l'information entre deux spins non couplés d'un réseau complexe de couplage est transmise *via* un ou plusieurs relais telles que les expériences TOCSY. En verrouillant les spins au moyen de séquences d'impulsions composites telles que WALTZ, MLEV (Malcolm Levitt's CPD sequence) ou DIPSI (Decoupling In the Presence of Scalar Interactions), l'expérience se comporte comme une

expérience multi-relais dans laquelle le système de spins évolue seulement sous l'influence prépondérante du couplage scalaire fort. Dans le cadre de nos travaux la séquence 2D homonucléaire employée préférentiellement sera une séquence TOCSY dont le verrouillage des spins sera assuré par une séquence MLEV 16.

B. **les séquences de corrélations hétéronucléaires** qui relient entre eux les déplacements chimiques de deux espèces nucléaires distinctes. Tout comme pour les séquences homonucléaires le codage a lieu soit *via* le couplage scalaire hétéronucléaire J_{IS} , soit *via* le couplage dipolaire entre les spins. Lorsque le codage se fait par l'intermédiaire du couplage à l'aide d'expérience INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer (Morris and Freeman, 1979), cela correspond à un transfert de polarisation d'un noyau I « riche » vers un autre noyau S « pauvre » à condition que ceux-ci soient fortement couplés scalairement (Morris and Freeman, 1979)). La séquence 2D hétéro nucléaire privilégiée dans le cadre de nos travaux est la séquence HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) développée au début des années 80 par G. Bodenhausen et D. G. Ruben (Bodenhausen and Ruben, 1980). Elle met en jeu une cohérence simple quantum hétéronucléaire, fondée sur un transfert de polarisation INEPT direct suivi, après une période d'évolution t_1 d'un transfert INEPT inverse.

L'expérience TOCSY est l'expérience 2D homonucléaire la plus souvent utilisée sur les échantillons de cellules ou de tissus. Elle a l'avantage de nécessiter des temps d'acquisition plus courts que les autres expériences 2D. TOCSY transfère une aimantation en phase entre les spins *via* le couplage scalaire. L'intensité des corrélations TOCSY dépend de la topologie du système de spins, des constantes de couplage entre spins, de l'efficacité de la séquence de mélange et de la relaxation des spins. De cette façon, une attention particulière doit être portée lorsque l'on observe les intensités relatives des corrélations en provenance de différents métabolites dans l'objectif d'une analyse quantitative. La diagonale et les corrélations ont la même phase. Le champ RF classiquement utilisé pour le temps de spin lock en TOCSY est de l'ordre de 10kHz. Dans les spectres TOCSY l'effet Overhauser dans le référentiel tournant, l'effet ROE (Rotating Frame Overhauser Effect), peut induire des signaux de signe opposé et peut réduire l'intensité ou éliminer les signaux TOCSY. Pour prévenir cet effet, on acquiert en général différentes cartes TOCSY à des temps de mélange différents afin d'être certain d'avoir observé toutes les corrélations.

La séquence HSQC ^{13}C - ^1H permet la détection des corrélations entre ^{13}C et ^1H par l'utilisation du mécanisme de transfert par simple ou multi quanta. Cette séquence d'impulsions utilise des gradients pulsés afin de sélectionner les cohérences et d'améliorer la sensibilité de la technique. L'expérience HSQC est actuellement largement utilisée dans les études HRMAS

portées sur les échantillons de cellules et de tissus.

En raison de la complexité des systèmes biologiques étudiés, les expériences de RMN 1D ne sont pas assez résolutes. La RMN 2D permet de sélectionner l'information en dispersant les signaux. Le principe de la RMN 2D est le suivant : après un temps de préparation, l'aimantation d'un spin A évolue pendant un temps t_1 donné, puis est transférée au cours d'une période de mélange sur un second spin B avec lequel il est corrélé. L'aimantation est ensuite détectée durant un temps t_2 . L'expérience est répétée pour différentes valeurs de t_1 . Le signal obtenu est donc fonction de deux variables temporelles t_1 et t_2 . Une transformée de Fourier 2D du signal donne un spectre RMN bidimensionnel fonction des fréquences F_1 et F_2 .

I) RMN HRMAS 2 DIMENSIONS HOMONUCLEAIRE

La diagonale du spectre 2D correspond au spectre 1D du système biologique étudié. Hors diagonale, apparaissent des pics de corrélation reliant deux spins. Selon la nature des séquences d'impulsions utilisées, deux types de corrélations peuvent être mis en évidence : les couplages scalaires au travers des séquences COSY et TOCSY ou bien les couplages dipolaires avec les séquences NOESY.

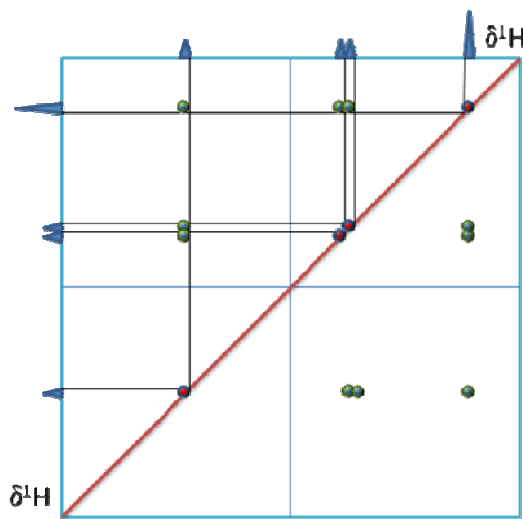


Figure 23: Mode d'interprétation des spectres homonucléaires

La séquence homonucléaire utilisée est une séquence TOCSY. La séquence d'impulsion TOCSY, ou ses variantes (HOHAHA, HOmonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy ; COSY relayée) introduisent une période de mélange de quelques dizaines de ms entre la deuxième et la troisième impulsion. Ceci permet un transfert de cohérence entre deux spins couplés par l'intermédiaire d'un troisième spin. Sur un spectre TOCSY chaque proton présente une corrélation avec tous les autres protons du résidu auquel il appartient (d'où l'appellation « Total

Correlation »). On parle alors de système de spins.

La Figure 23 présente de manière simplifiée la technique d'interprétation d'une séquence de type TOCSY. La diagonale correspond aux signaux d'autocorrélation (corrélation d'un groupement proton avec lui-même), chaque demi-plan correspond aux signaux de corrélation des groupements de protons issus d'une même molécule.

II) RMN HRMAS 2 DIMENSIONS HETERONUCLEAIRE

La séquence hétéronucléaire utilisée est une séquence HSQC. Le spectre obtenu est bidimensionnel, un axe correspondant au signal RMN du proton et l'autre axe à l'élément hétéronucléaire (dans la terminologie RMN un hétéro-noyau est un autre noyau que le proton, le plus souvent du ^{13}C ou du ^{15}N).

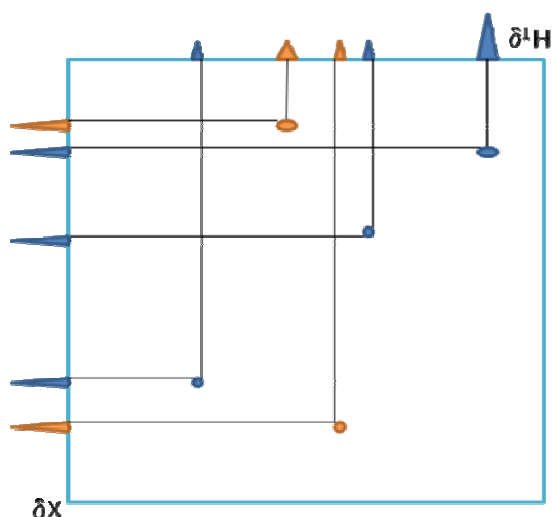


Figure 24: Mode d'interprétation des spectres hétéronucléaires

La Figure 24 présente de manière simplifiée la technique d'interprétation d'une séquence de type HSQC. Chaque pic appaissant sur la cartographie 2D correspond à un couple proton / hétéro-noyau unique. De la sorte, si le déplacement chimique de proton est connu il est possible de déterminer le déplacement chimique de l'hétéro-noyau associé et vis et versa.

III) ACQUISITION RMN HRMAS 2 DIMENSIONS HOMONUCLEAIRE

Les paramètres d'acquisition utilisés sont : séquence DIPSI 2, durée d'acquisition = 170ms, 256 répétitions, fenêtre spectrale = 6000 Hz et durée de relaxation = 1.5s pour un enregistrement total d'une durée de 2h.

IV) ACQUISITION RMN HRMAS 2 DIMENSIONS HETERONUCLEAIRE

Les paramètres d'acquisition utilisés sont : séquence GARP (Globally optimized Alternating phase Rectangular Pulses) pour le découplage ^{13}C , durée d'acquisition = 170ms, 256 répétitions, fenêtre spectrale = 6000 Hz et durée de relaxation = 1.5s pour un enregistrement total d'une durée de 21h.

B) RESULTATS

I) TOCSY

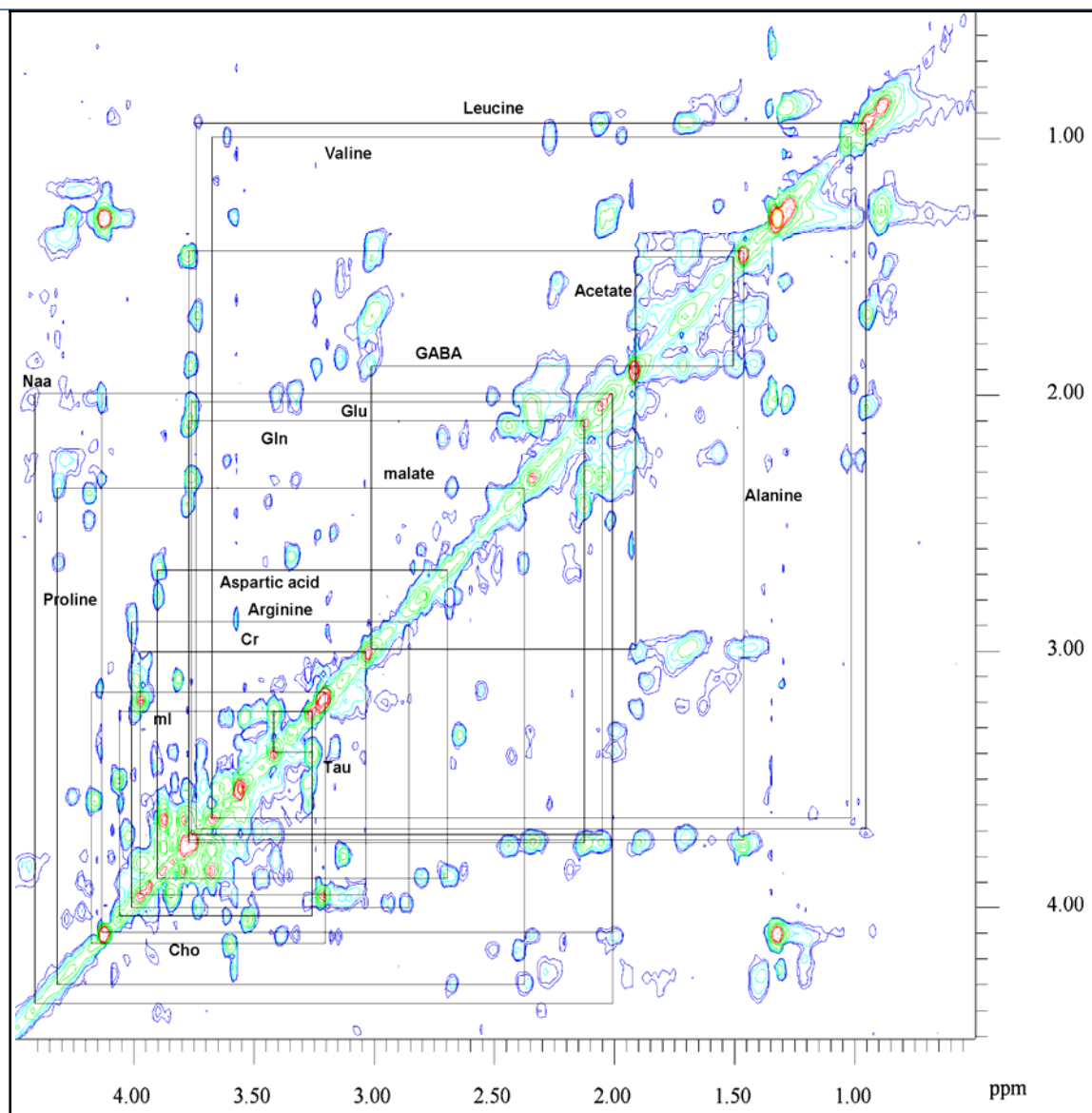


Figure 25: Spectre homonucléaire proton proton (séquence DIPSI) d'un oligodendrogliome.

II) HSQC

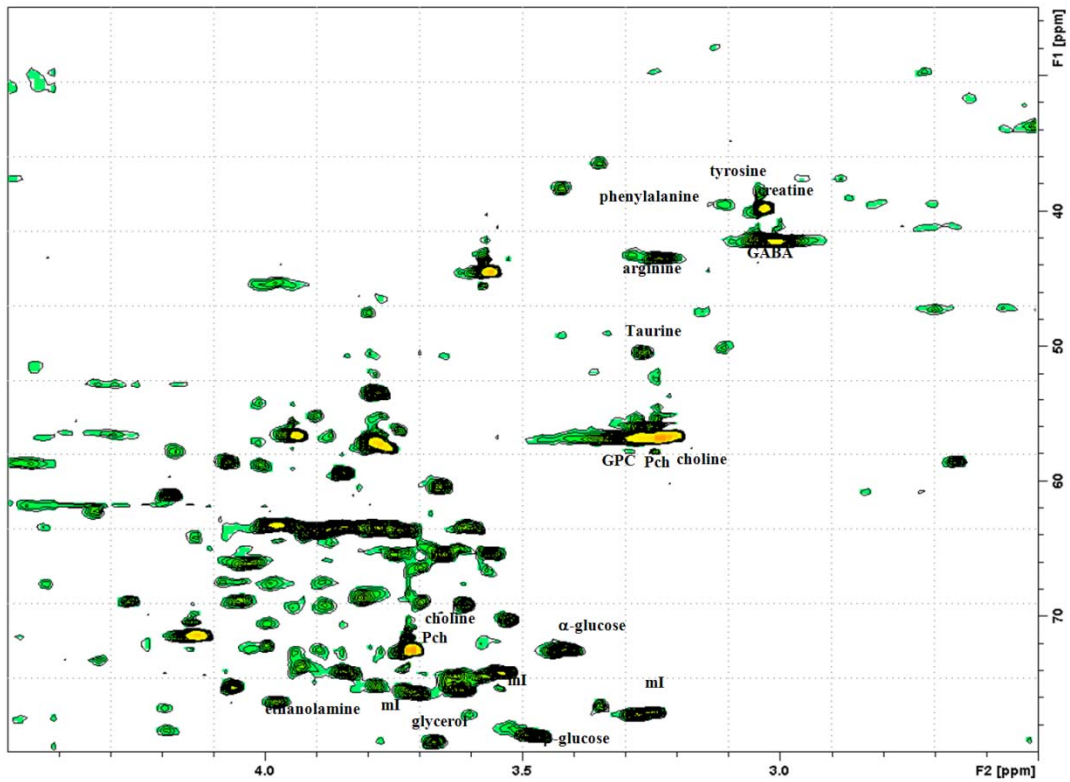


Figure 26 : Spectre 1H 13C (HSQC) d'un glioblastome. Attribution partielle des signaux (2.5 à 4.5ppm en 1H)

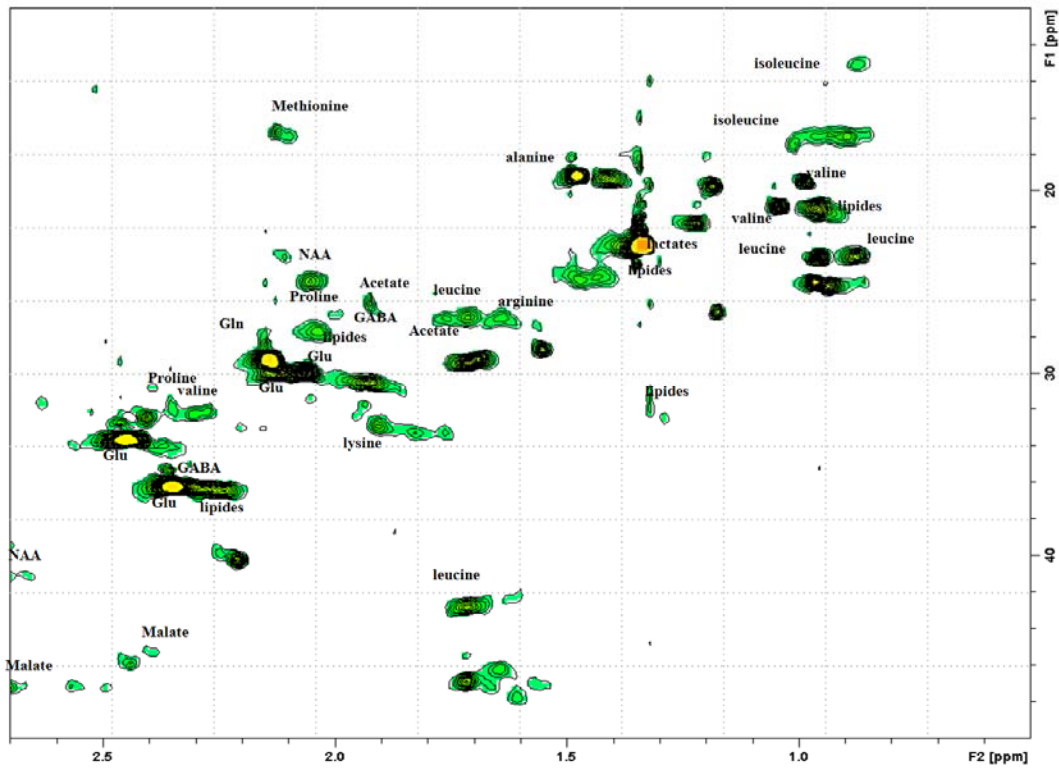


Figure 27: Spectre 1H 13C (HSQC) d'un glioblastome. Attribution partielle des signaux (0.5 à 2.5ppm en 1H)

C) IDENTIFICATIONS METABOLIQUES.

Bien qu'une analyse de type métabolomique ne nécessite pas l'attribution des différents signaux RMN, l'interprétation biologique des résultats ne pourra cependant se faire sans. Comme nous avons pu le voir précédemment cette attribution n'est réalisable qu'avec l'acquisition des spectres RMN 2D compte tenu de la faible dispersion spectrale des signaux en RMN du proton. La table 6 présente les principaux métabolites détectés et les déplacements chimiques qui leur sont associés en ^1H dans la gamme 0.5 à 4.5ppm.

	Metabolite	Group	^1H	^{13}C	Metabolite	Group	^1H	^{13}C
1	Lipides (a)	CH_3	0.90	19.93	Acetate	CH_3	1.91	25.75
2	Isoleucine	δCH_3	0.94	13.90	α -Glucose	C4H	3.40	72.34
3	Leucine	δCH_3	0.95	23.57	α -Glucose	C3H	3.69	75.51
4	Leucine	$\delta'\text{CH}_3$	0.96	24.79	α -Glucose	C6H u	3.78	63.44
5	Valine	γCH_3	0.98	19.25	α -Glucose	C5H	3.83	73.92
6	Isoleucine	γCH_3	1.00	17.33	α -Glucose	C6H d	3.83	63.44
7	Valine	$\gamma'\text{CH}_3$	1.04	20.64	α -Glucose	C1H	5.22	94.83
8	Isoleucine	γCH_2 u	1.25	27.28	Alanine	βCH_3	1.47	18.89
9	Lipides (a)	(2) CH_2	1.29	34.65	Alanine	αCH	3.77	53.30
10	Lipides (a) (b)	(n) CH_2	1.29	32.54	Arginine	γCH_2	1.67	26.58
11	Lipides (a)	(1) CH_2	1.30	25.57	Arginine	βCH_2	1.72	29.11
12	Lipides (c)	(n) CH_2	1.30	31.80	Arginine	δCH_2	3.22	43.21
13	Lactateate	CH_3	1.33	22.70	Arginine	αCH	3.87	56.70
14	Threonine	$g\text{CH}_3$	1.33	21.92	Asparagine	βCH_2 u	2.86	37.38
15	Lipides (b)	(1) CH_2	1.36	32.35	Asparagine	βCH_2 d	2.96	37.38
16	Isoleucine	γCH_2 d	1.46	27.11	Asparagine	αCH	3.99	54.09
17	Lysine	γCH_2	1.46	24.13	A. aspartique	βCH_2 u	2.65	39.31
18	Alanine	βCH_3	1.47	18.89	A. aspartique	βCH_2 d	2.80	39.31
19	Lipides (c)	(2) CH_2	1.59	27.67	A. aspartique	αCH	3.89	55.03
20	Arginine	γCH_2	1.67	26.58	β -Glucose	C4H	3.42	72.31
21	Lysine	δCH_2	1.69	29.20	β -Glucose	C5H	3.46	78.60
22	Leucine	βCH_2	1.71	42.44	β -Glucose	C3H	3.49	78.22
23	Leucine	γCH	1.71	27.00	β -Glucose	C6H u	3.72	63.51
24	Arginine	βCH_2	1.72	29.11	β -Glucose	C6H d	3.90	63.51
25	Lysine	βCH_2	1.90	32.58	β -Glucose	C1H	4.64	98.68
26	GABA	3CH_2	1.90	26.34	Choline	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3.19	56.63
27	Acetate	CH_3	1.91	25.75	Choline	βCH_2	3.52	70.07
28	Isoleucine	βCH	1.97	38.59	Choline	αCH_2	4.06	58.33
29	Proline	γCH_2	2.00	26.51	Creatine	CH_3	3.03	39.75
30	N-acétyl-aspartate	CH_3	2.03	24.71	Creatine	CH_2	3.93	56.59
31	Glutamate	βCH_2 u	2.04	29.53	Ethanolamine	$-\text{CH}_2\text{-NH}_3^+$	3.12	44.03
32	Lipides (b)	(2) CH_2	2.05	27.30	Ethanolamine	$-\text{CH}_2\text{-OH}$	3.79	71.80
33	Proline	βCH_2 u	2.06	31.66	Lipides (a)	CH_3	0.90	19.93
34	Glutamate	βCH_2 d	2.11	29.53	Lipides (a)	(2) CH_2	1.29	34.65
35	Methionine	εCH_3	2.12	16.55	Lipides (a)	(1) CH_2	1.30	25.57
36	Glutamine	βCH_2	2.14	28.91	Lipides (a) (b)	(n) CH_2	1.29	32.54
37	Methionine	βCH_2	2.19	32.37	Lipides (b)	(1) CH_2	1.36	32.35
38	Lipides (c)	(1) CH_2	2.25	36.30	Lipides (b)	(2) CH_2	2.05	27.30
39	GABA	4CH_2	2.27	37.06	Lipides (b)	CH_2	2.82	28.17
40	Valine	βCH	2.28	31.77	Lipides (b)	(2) CH	5.32	132.4
41	Glutamate	γCH_2	2.34	36.11	Lipides (b)	(1) CH	5.33	130.7
42	Proline	βCH_2 d	2.36	31.70	Lipides (c)	(n) CH_2	1.30	31.80
43	Succinate	2,3 CH_2	2.39	36.69	Lipides (c)	(2) CH_2	1.59	27.67

44	Malate	CH ₂ u	2.39	45.24	Lipides (c)	(1) CH ₂	2.25	36.30
45	Glutamine	γCH ₂	2.44	33.53	GABA	3CH ₂	1.90	26.34
46	N-acétyl-aspartate	βCH ₂ u	2.49	40.48	GABA	4CH ₂	2.27	37.06
47	Methionine	γCH ₂	2.63	31.63	GABA	2CH ₂	3.01	41.82
48	A. aspartique	βCH ₂ u	2.65	39.31	Glutamate	βCH ₂ u	2.04	29.53
49	N-acétyl-aspartate	βCH ₂ d	2.68	40.48	Glutamate	βCH ₂ d	2.11	29.53
50	Malate	CH ₂ d	2.68	45.24	Glutamate	γCH ₂	2.34	36.11
51	A. aspartique	βCH ₂ d	2.80	39.31	Glutamate	αCH	3.75	57.38
52	Lipides (b)	CH ₂	2.82	28.17	Glutamine	βCH ₂	2.14	28.91
53	Asparagine	βCH ₂ u	2.86	37.38	Glutamine	γCH ₂	2.44	33.53
54	Asparagine	βCH ₂ d	2.96	37.38	Glutamine	αCH	3.76	56.90
55	GABA	2CH ₂	3.01	41.82	Glycerol	1,3 CH ₂ OH u	3.56	65.08
56	Creatine	CH ₃	3.03	39.75	Glycerol	1,3 CH ₂ OH d	3.64	65.08
57	Lysine	εCH ₂	3.05	41.64	Glycerol	-CH(OH)-	3.79	74.82
58	Tyrosine	βCH ₂ u	3.06	38.26	Glycine	αCH	3.55	44.16
59	Ethanolamine	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.12	44.03	GPhosphocholineo	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.23	56.81
60	Phenylalanine	βCH ₂ u	3.12	39.09	GPhosphocholineo	βCH ₂	3.67	68.63
61	Choline	-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.19	56.63	GPhosphocholineo	αCH ₂	4.28	56.65
62	Tyrosine	βCH ₂ d	3.19	38.26	Isoleucine	δCH ₃	0.94	13.90
63	Phosphocholineo	-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.20	56.71	Isoleucine	γCH ₃	1.00	17.33
64	Arginine	δCH ₂	3.22	43.21	Isoleucine	γCH ₂ u	1.25	27.28
65	GPhosphocholineo	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.23	56.81	Isoleucine	γ CH ₂ d	1.46	27.11
66	myo-Inositol	C5H	3.24	76.88	Isoleucine	βCH	1.97	38.59
67	Taurine	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.26	50.21	Isoleucine	αCH	3.67	62.13
68	Phenylalanine	βCH ₂ d	3.30	39.15	Lactateate	CH ₃	1.33	22.70
69	Proline	δCH ₂ u	3.34	48.77	Lactateate	CH	4.11	71.15
70	a-Glucose	C4H	3.40	72.34	Leucine	δCH ₃	0.95	23.57
71	b-Glucose	C4H	3.42	72.31	Leucine	δ'CH ₃	0.96	24.79
72	Taurine	-CH ₂ -SO ₃ ⁻	3.42	37.99	Leucine	βCH ₂	1.71	42.44
73	Proline	δCH ₂ d	3.42	48.77	Leucine	γCH	1.71	27.00
74	b-Glucose	C5H	3.46	78.60	Leucine	αCH	3.74	56.22
75	b-Glucose	C3H	3.49	78.22	Lysine	γCH ₂	1.46	24.13
76	Choline	βCH ₂	3.52	70.07	Lysine	δCH ₂	1.69	29.20
77	myo-Inositol	C1H, C3H	3.53	74.06	Lysine	βCH ₂	1.90	32.58
78	Glycine	αCH	3.55	44.16	Lysine	εCH ₂	3.05	41.64
79	Glycerol	1,3 CH ₂ OH u	3.56	65.08	Lysine	αCH	3.77	56.22
80	Phosphocholineo	βCH ₂	3.57	69.30	Malate	CH ₂ u	2.39	45.24
81	Threonine	αCH	3.58	63.17	Malate	CH ₂ d	2.68	45.24
82	Valine	αCH	3.61	63.08	Malate	CH	4.32	73.23
83	myo-Inositol	C4H, C6H	3.61	75.16	Methionine	εCH ₃	2.12	16.55
84	GPhosphocholineo	βCH ₂	3.67	68.63	Methionine	βCH ₂	2.19	32.37
85	Glycerol	1,3 CH ₂ OH d	3.64	65.08	Methionine	γCH ₂	2.63	31.63
86	Isoleucine	αCH	3.67	62.13	Methionine	αCH	3.85	56.58
87	a-Glucose	C3H	3.69	75.51	myo-Inositol	C5H	3.24	76.88
88	b-Glucose	C6H u	3.72	63.51	myo-Inositol	C1H, C3H	3.53	74.06
89	Leucine	αCH	3.74	56.22	myo-Inositol	C4H, C6H	3.61	75.16
90	Glutamate	αCH	3.75	57.38	myo-Inositol	C2H	4.05	74.98
91	Glutamine	αCH	3.76	56.90	N-acétyl-aspartate	CH ₃	2.03	24.71
92	Lysine	αCH	3.77	56.22	N-acétyl-aspartate	βCH ₂ u	2.49	40.48
93	Alanine	αCH	3.77	53.30	N-acétyl-aspartate	βCH ₂ d	2.68	40.48
94	a-Glucose	C6H u	3.78	63.44	N-acétyl-aspartate	αCH	4.38	56.10
95	Ethanolamine	-CH ₂ -OH	3.79	71.80	Phosphocholineo	-N ⁺ -(CH ₃) ₃	3.20	56.71
96	Glycerol	-CH(OH)-	3.79	74.82	Phosphocholineo	βCH ₂	3.57	69.30
97	a-Glucose	C5H	3.83	73.92	Phosphocholineo	αCH ₂	4.18	60.81
98	Serine	αCH	3.83	59.14	Phenylalanine	βCH ₂ u	3.12	39.09
99	a-Glucose	C6H d	3.83	63.44	Phenylalanine	βCH ₂ d	3.30	39.15
100	Methionine	αCH	3.85	56.58	Phenylalanine	αCH	4.00	58.87
101	Arginine	αCH	3.87	56.70	Phenylalanine	CH 2,6	7.31	132.1
102	A. aspartique	αCH	3.89	55.03	Phenylalanine	C4	7.39	130.3
103	b-Glucose	C6H d	3.90	63.51	Phenylalanine	CH 3,5	7.42	131.8

104	Creatine	CH ₂	3.93	56.59	Proline	γCH ₂	2.00	26.51
105	Tyrosine	αCH	3.93	58.75	Proline	βCH ₂ u	2.06	31.66
106	Serine	βCH u	3.94	62.90	Proline	βCH ₂ d	2.36	31.70
107	Serine	βCH d	3.97	62.90	Proline	δCH ₂ u	3.34	48.77
108	Asparagine	αCH	3.99	54.09	Proline	δCH ₂ d	3.42	48.77
109	Phenylalanine	αCH	4.00	58.87	Proline	αCH	4.12	63.97
110	myo-Inositol	C2H	4.05	74.98	Serine	αCH	3.83	59.14
111	Choline	αCH ₂	4.06	58.33	Serine	βCH u	3.94	62.90
112	Lactateate	CH	4.11	71.15	Serine	βCH d	3.97	62.90
113	Proline	αCH	4.12	63.97	Succinate	2,3 CH ₂	2.39	36.69
114	Phosphocholineo	αCH ₂	4.18	60.81	Taurine	-CH ₂ -NH ₃ ⁺	3.26	50.21
115	Threonine	βCH	4.25	68.70	Taurine	-CH ₂ -SO ₃ ⁻	3.42	37.99
116	GPhosphocholineo	αCH ₂	4.28	56.65	Threonine	γCH ₃	1.33	21.92
117	Malate	CH	4.32	73.23	Threonine	αCH	3.58	63.17
118	N-acétyl-aspartate	αCH	4.38	56.10	Threonine	βCH	4.25	68.70
119	b-Glucose	C1H	4.64	98.68	Tyrosine	βCH ₂ u	3.06	38.26
120	a-Glucose	C1H	5.22	94.83	Tyrosine	βCH ₂ d	3.19	38.26
121	Lipides (b)	(2) CH	5.32	132.4	Tyrosine	αCH	3.93	58.75
122	Lipides (b)	(1) CH	5.33	130.7	Tyrosine	CH 3,5	6.88	118.5
123	Uracil	C6H	5.79	103.8	Tyrosine	CH 2,6	7.18	133.5
124	Tyrosine	CH 3,5	6.88	118.5	Uracil	C6H	5.79	103.8
125	Tyrosine	CH 2,6	7.18	133.5	Uracil	C5H	7.88	134.8
126	Phenylalanine	CH 2,6	7.31	132.1	Valine	γCH ₃	0.98	19.25
127	Phenylalanine	C4	7.39	130.3	Valine	γ'CH ₃	1.04	20.64
128	Phenylalanine	CH 3,5	7.42	131.8	Valine	βCH	2.28	31.77
129	Uracil	C5H	7.88	134.8	Valine	αCH	3.61	63.08

Tableau 2 : Caractérisation des principaux métabolites par attribution des déplacements chimiques proton et carbone 13.

2.3. STATISTIQUES

En biologie tout comme en médecine, de même que dans nombre d'autres sciences, l'analyse d'observations nécessite de plus en plus l'acquisition d'un grand nombre de variables. Ces variables, dans notre cas l'ensemble des fréquences de résonance des spectres RMN, peuvent être comprises comme une matrice de données, dans laquelle chaque ligne (1 à N) correspond à l'enregistrement d'un échantillon et où chaque colonne (1 à M) correspond à une fréquence de résonance. Les empreintes métaboliques issues des systèmes biologiques sont des ensembles de données que l'on qualifie classiquement de fortement inhomogènes.

- La plus évidente des caractéristiques est certainement la dissymétrie importante des tableaux de données. En effet, le nombre de conditions expérimentales (*i.e.* le nombre d'échantillons, le nombre de patients) est bien souvent très faible par rapport aux nombres d'observables (variables métaboliques) analysés. Il existe donc une redondance extrême des régresseurs pour caractériser les conditions expérimentales par les données métaboliques, et une sous-paramétrisation pour réaliser la démarche inverse.
- De plus l'observation de la distribution des données métaboliques montre une absence flagrante de normalité. En effet, dans les systèmes biologiques, la grande majorité des métabolites est présente dans des concentrations extrêmement faibles. Il est cependant important de noter que la concentration absolue d'un métabolite n'est en rien liée à l'importance de sa fonction dans un schéma métabolique complet. La distribution métabolique est donc elle aussi fortement dissymétrique et très étirée vers les métabolites de forte concentration.
- Enfin l'indépendance entre les variables nécessaires à l'utilisation de techniques statistiques classiques n'est pas non plus assurée. En effet la plupart des mécanismes biologiques sont intimement interconnectés et organisés en cascade. Cette dépendance est un facteur important à prendre en compte lors des analyses statistiques. De plus, l'utilisation de profils issus de la RMN induit une dépendance forte entre les variables analysées du fait de la multiplicité des signaux associés à chaque métabolite.

Dans la suite de ce chapitre nous allons présenter les techniques les plus courantes utilisées dans le cadre de la métabolomique afin de formaliser les données brutes issues des techniques analytiques pour les rendre exploitables et interprétables au sortir des outils statistiques.

Le traitement statistique entrepris peut être segmenté en trois grandes étapes schématisées Figure 28

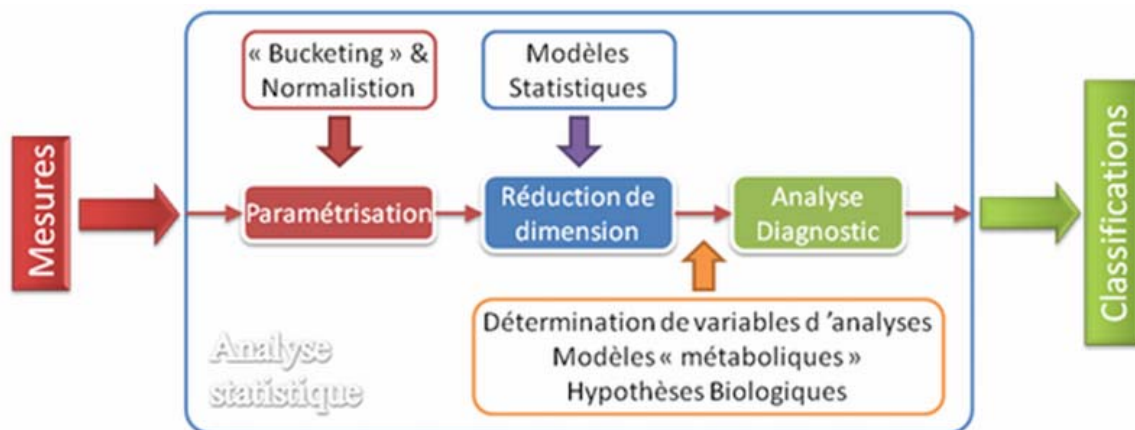


Figure 28 : Schématisation du traitement statistique des données métabolomiques.

2.3.1. PRETRAITEMENT ET NORMALISATION

La première étape de normalisation des données issues des techniques analytiques est fortement dépendante du soin pris lors de l'élaboration du protocole. En effet, il n'existe aucune technique mathématique ou statistique qui puisse éliminer parfaitement et de façon systématique l'ensemble des erreurs méthodologiques. Le soin apporté à la standardisation de la préparation et des acquisitions est donc une étape essentielle (Webb-Robertson et al., 2005).

L'acquisition terminée, débute l'étape de prétraitement RMN (ajustement des phases, correction de la ligne de base, calibrage en fréquence) et de mise en forme des données RMN. L'objectif de ces étapes est de fournir aux outils statistiques un jeu de données dont la variabilité est principalement dépendante de la biologie.

2.3.1.1. REGIONS D'INTERETS ET EXCLUSIONS

La définition des régions d'intérêt pour l'analyse statistique est la première étape du prétraitement des données acquises par RMN. Il apparaît avec l'expérience que cette étape correspond peut être plus à la sélection des régions d'exclusions pour des raisons techniques, méthodologiques, ou simplement de choix liés aux objectifs de l'étude. On commence naturellement par la suppression des régions associées aux signaux de l'eau. Pratiquement cela correspond à la fenêtre spectrale allant de 4.6 à 5.0 ppm. En raisonnant dans le cas pratique des acquisitions HRMAS sur les tissus biologiques, il apparaît effectivement que l'intensité du signal résiduel de l'eau est fortement dépendante de la séquence RMN employée, mais qu'au sein de la même technique, cette variabilité peut être importante compte tenu des profils de suppression d'eau observée. Il apparaît que compte tenu de ces profils, les importants échanges

de magnétisation existants entre les groupements N-H et l'eau rende l'exploitation de la région N-H pour une analyse statistique difficile, principalement si la séquence d'acquisition RMN fait appel à un schéma de présaturation. De manière analogue, les échanges importants existant entre les lipides et l'eau impliquent qu'il est difficile d'utiliser les signaux issus des lipides. Néanmoins les gammes de fréquence d'apparition des signaux des lipides ne permettent pas d'exclure ces régions dans la phase de prétraitement. Il convient néanmoins de tenir compte de ces paramètres lors de l'analyse statistique et, en amont, lors de la sélection des séquences d'acquisitions RMN.

2.3.1.2. ECHANTILLONNAGE.

La segmentation des profils métaboliques en variables analysables dans les phases de traitements statistiques peut être réalisée suivant différentes stratégies et il n'existe à ce jour aucun consensus à ce sujet. Classiquement les spectres RMN acquis correspondent à un ensemble de plusieurs milliers de points. Les données spectrales HRMAS acquises sur les tissus biologiques présentent quant à eux les informations correspondant à une cinquantaine de métabolites. Cet écart entre le nombre de variables disponibles et le nombre de variables utiles doit être réduit avant le traitement statistique. Cette étape de segmentation (ou *bucketing* ou encore *binning*) doit donc dans un premier temps réduire la dimensionnalité du problème afin d'extraire N variables de chaque profil métabolique acquis, ces variables devant impérativement reproduire au mieux la diversité métabolique des échantillons. Il apparaît que, peu importe la technique utilisée pour segmenter le spectre RMN, il est indispensable de calibrer en fréquence l'ensemble des données acquises. Ceci peut être fait sur les raies attribuées à des métabolites de références ou encore sur la fréquence de résonance d'une référence qui peut être soit chimique avec l'ajout de TMS dans l'échantillon, soit électronique à l'aide des techniques d'acquisition de type ERETIC. Il existe aujourd'hui un certain nombre d'algorithmes permettant d'automatiser cette étape, telle que la détermination du maximum de vraisemblance par maximisation du calcul de corrélation entre les intervalles prédéterminés (Hemmati et al.). Bien que ces méthodes donnent des résultats prometteurs une étape de validation reste nécessaire.

La technique de segmentation la plus employée est la segmentation équidistante qui se contente de segmenter le spectre en N régions de même largeur (bandes de fréquences). Il est important de correctement sélectionner la largeur des intervalles afin de refléter au mieux le profil métabolique d'origine. En effet, des intervalles trop petits vont renforcer l'influence du rapport SNR ainsi que les imperfections d'alignement (Figure 29) des spectres ou d'ajustement

des shimms (modification des largeurs de raies). A l'opposé, la sélection de bandes de fréquences trop larges va « noyer » l'information en moyennant les composantes de plusieurs métabolites au sein de chaque nouvelle variable. Il apparaît au travers de la littérature que les intervalles de segmentation oscillent entre 0.02 et 0.04ppm.

Afin de répondre à cette problématique il est possible de réaliser des segmentations d'intervalles variables. Cette technique nécessite cependant la connaissance *a priori*, au moins partielle, des métabolites et de leurs fréquences de résonances respectives. L'utilisation de la technique de segmentation à pas variable est d'un grand intérêt pour l'étude d'échantillons dont la composition chimique peut induire des dérives de la fréquence de résonance comme par exemple pour les urines (dépendance de certains métabolites par rapport au pH).

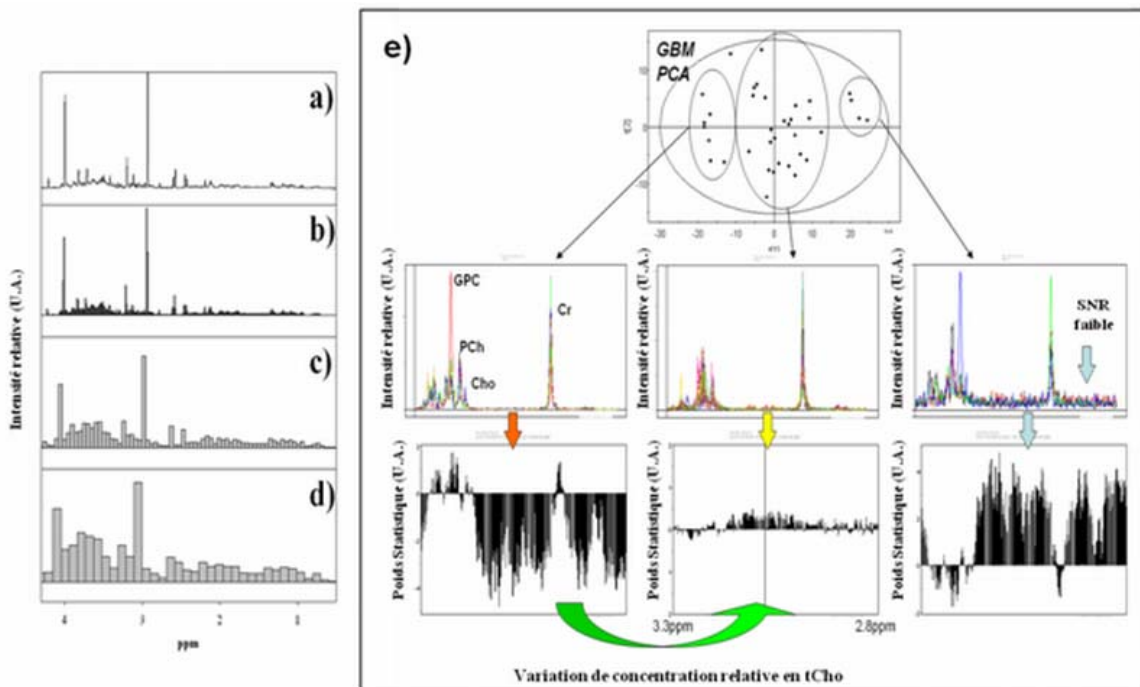


Figure 29: Illustration de la problématique d'échantillonnage.
a-d) Echantillonnage d'un spectre RMN classique a) avec perte d'informations liée à un choix de pas d'échantillonnage trop grand d) ou un choix de pas d'échantillonnage trop faible b) c)
e) La perte d'information liée au choix d'un pas d'échantillonnage trop petit est illustrée sur un exemple pratique (partie droite de la figure) réalisé sur un ensemble de tumeurs cérébrales (glioblastomes GBM). La sélection d'un pas d'échantillonnage trop petit conduit à une analyse où l'information métabolique est masquée par la variabilité de la mesure, en l'occurrence au bruit ou au rapport signal à bruit des différentes expériences.

Il existe aujourd'hui des techniques de *bucketing* plus sélectives, s'appuyant sur des algorithmes de déconvolution spectrale. Chaque *bucket* ainsi généré ne sera ainsi plus associé à un déplacement chimique mais à un métabolite sur l'ensemble de sa représentation spectrale. Cette technique présente l'énorme avantage de travailler directement sur des variables

identifiées et de tenir compte de leur redondance spectrale (éliminations partielles de l'interdépendance entre les variables). Néanmoins les algorithmes de déconvolution spectrale sont encore largement perfectibles et une étape de validation « manuelle » est toujours nécessaire. De plus, cette technique ne permet pas de réaliser un profil métabolique sur des échantillons dont certains composés sont inconnus. L'établissement de bases de données métaboliques exhaustives est dès lors une étape préliminaire nécessaire.

2.3.1.3. LA NORMALISATION SPECTRALE

La grande majorité des applications de la métabolomique se concentre sur l'étude de variation relative de concentration des métabolites au sein des échantillons. Ceci implique que la concentration globale en métabolite, en d'autres termes l'intégrale globale du spectre d'intérêt, doit être équivalente pour tous les échantillons. Cette étape a pour effet de masquer les effets de variation globale de concentration, ainsi que d'atténuer d'éventuelles différences de paramètres d'acquisitions RMN telles que le nombre d'accumulation. La formule de normalisation utilisée classiquement est la suivante :

$$I(i) = \frac{I_{\text{originale}}(i)}{\sum_n \left[\int_{j^1}^{j^N} (I(x)) dx \right]} \quad \text{Équation 19}$$

L'intégrale correspond à l'ensemble des intervalles déterminés par la segmentation du spectre, ce qui revient à normaliser l'intensité globale du spectre RMN sur l'intervalle d'intérêt à 1. Il est bien entendu possible de modifier ce critère de normalisation en réduisant l'intervalle de normalisation $\{j^1; j^N\}$. de façon à le fixer sur un métabolite spécifique. La créatine est par exemple couramment utilisée comme métabolite de référence dans le cadre d'étude RMN *in vivo*. Ceci se traduit par un intervalle de normalisation égal à $\{3\text{ppm}; 3.04\text{ppm}\}$. L'utilisation de la normalisation globale présente cependant des limites, principalement dans les cas où les modifications métaboliques sont très importantes entre les différents états observés.

2.3.1.4. NORMALISATION BIOLOGIQUE.

Le *bucketing* réduit la matrice $N \times M$ en une matrice $N \times P$ ou $P < M$. L'ensemble P

correspond à l'ensemble des informations utiles du spectre RMN défini par la segmentation des données brutes. La valeur de la matrice $N \times P$ correspond au final à l'ensemble des concentrations des P variables (métabolites) pour les N observations. La résolution spectrale implique que chaque variable p de l'ensemble P peut contenir des informations liées à un ou plusieurs métabolites, en fonction de la densité de résonance dans cet intervalle. Cette matrice subit une première étape de normalisation que nous avons décrite précédemment. Celle-ci correspond à normaliser à 1 la somme de chaque ligne. Cette étape est nécessaire afin de réduire la variabilité inter échantillon (Figure 30). Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 30.b, les données sont homogénéisées dans la dimension verticale. Il apparaît au vu de cette matrice que certaines valeurs sont peu influentes du fait de leur relative faible concentration

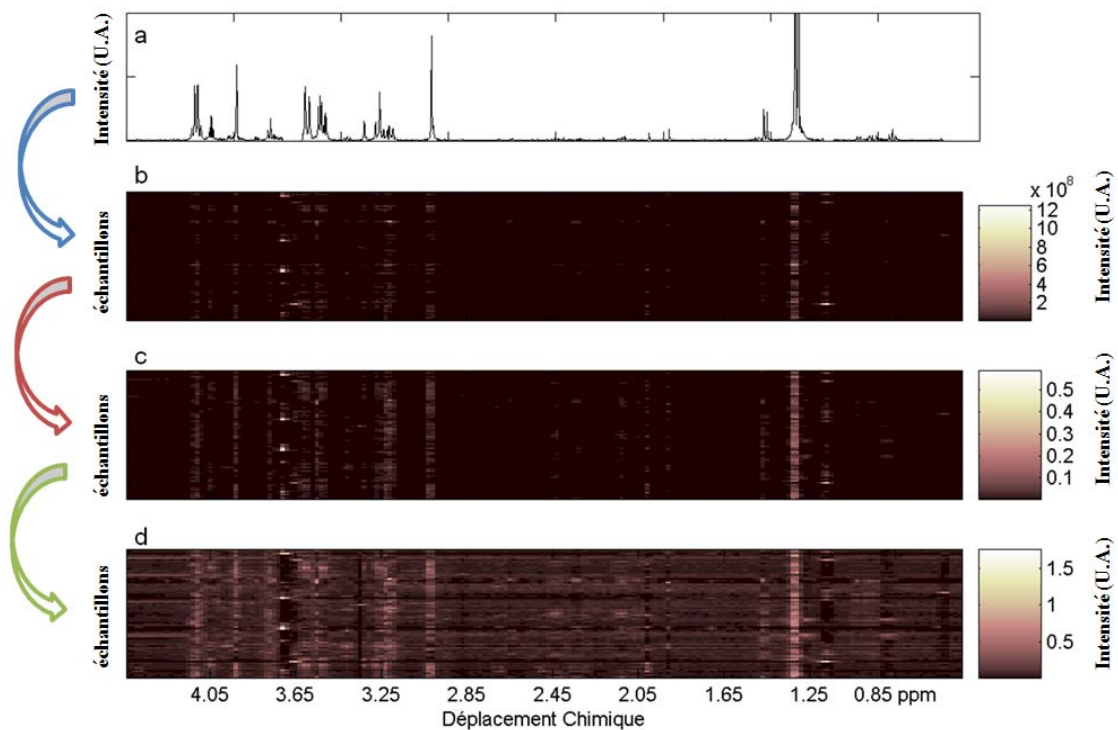


Figure 30: Schéma illustrant les différentes étapes de prétraitement des données métaboliques issues des acquisitions RMN HRMAS

Il n'existe néanmoins aucun fondement biologique permettant de lier les effets biologiques à la concentration relative d'un métabolite. Nombre de métabolites ont une concentration extrêmement faible comparativement à la moyenne des métabolites du métabolome, mais ont des effets importants sur le métabolisme global. Afin d'en tenir compte, il est nécessaire de normaliser l'influence des différentes variables de la matrice $N \times P$.

Pour ce faire il est courant d'appliquer un algorithme de normalisation de type Pareto. Celui-ci consiste à normaliser chaque variable par rapport à la racine carrée de l'écart type de

cette variable sur l'ensemble des échantillons.

Dans le schéma de prétraitement décrit nous n'avons volontairement pas réalisé l'étape de centrage des données pour des raisons de lisibilité. Cette étape correspond à une soustraction de chaque spectre par la moyenne des spectres acquis. Elle permet de se focaliser principalement sur les différences entre les spectres et non plus sur les similarités. En effet, le fait de soustraire la moyenne ramène à des valeurs nulles les variables dont l'hétérogénéité est quasi-nulle au sein de la population étudiée.

2.3.1.5. FORMALISME MATHEMATIQUE.

La méthodologie appliquée est standard pour ce type de données et un certain nombre d'articles de revues décrivent les intérêts de chacune d'entre elles (Mendes, 2002; Nobeli and Thornton, 2006; van den Berg et al., 2006). Le Tableau 3 reprend les trois étapes de normalisation nécessaires pour générer un jeu de données adéquat au traitement statistique.

Etape	Méthode	Formule Mathématique	Unité des variable	Objectifs	Avantages	Inconvénients
I	Centrage	$\tilde{x}_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_i$	O Pas de modification	Permet de se focaliser sur les différences et non plus sur les similarités	Permet de s'affranchir des valeurs de lignes de base élevées	Quand les données sont hétéroscedastiques (variances différentes en fonction des observables) les effets du centrage peuvent ne pas être efficaces
II	Pareto	$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{\sqrt{SD_j}}$ SD = écart type.	O Pas de modification	Réduire l'importance relative des grandes valeurs en maintenant la structure générale des données partiellement intacte	Reste très fidèle à la mesure originale	Est sensible à des modifications (variations) importantes
III	transformation Log	$\tilde{x}_{ij} = {}^{10}\log(x_{ij})$ $\bar{x}_{ij} = \tilde{x}_{ij} - \bar{\tilde{x}}_i$	Log O	Corriger l'hétéroscedasticité des données, et rendre les modèles multiplicatifs additifs	Corrige l'hétéroscedasticité des données rend les modèles multiplicatifs additifs	Problématique avec les données présentant des valeurs de déviation standard importantes ou des valeurs nulles.

Tableau 3: Résumé des étapes normalisation de données métabolomiques (adapté de (439))

2.3.2. L'ANALYSE STATISTIQUE

2.3.2.1. LE CONCEPT DES BIOMARQUEURS

L'objectif premier des analyses statistiques est la détermination de paramètres discriminatoires entre deux états A et B d'un même système biologique (deux stades d'évolutions d'un même type de tumeur par exemple).

L'identification d'empreintes métaboliques spécifiques liées à des états biologiques déterminés, aussi intéressante soit-elle dans une optique diagnostique, n'est pas une fin en soi car elle ne peut pas permettre de mieux comprendre les mécanismes biochimiques liés à la pathologie. Cependant, cette interprétation permet de mettre en évidence des différences métaboliques liées à l'évolution pathologique. De plus, celles-ci contiennent nombre d'informations utiles pour une meilleure compréhension des processus métaboliques associés à la maladie. Ces "discriminants", que l'on qualifie généralement de biomarqueurs, doivent alors être clairement identifiés. La grande difficulté réside dans un premier temps à l'identification des biomarqueurs, à la mise en évidence de leur inter-connectivité au sein de voies métaboliques et ainsi à la mise en évidence des perturbations du métabolisme. Ces perturbations peuvent être observées de manière qualitative mais aussi quantitative et c'est dans ce cadre que la RMN présente un intérêt majeur pour les études métabolomiques de part sa propension à une meilleure reproductibilité intra et inter-laboratoires, et surtout par sa capacité à réaliser des acquisitions de type quantitatives. Bien évidemment la recherche de biomarqueurs n'est pas un domaine réservé à la métabolomique, et bien avant la fondation de cette nouvelle science l'étude du métabolisme a conduit à la découverte de biomarqueurs d'états pathologiques tel que le glucose dans le sang pour le diabète. La rupture résulte finalement de la complexification de la définition du terme biomarqueur qui, dans le cadre de la métabolomique, s'entend bien souvent comme la combinaison de multiples variables qui, prises indépendamment, n'ont pas de poids statistiquement suffisant. En effet, il est rapidement apparu que l'identification d'un biomarqueur unique que l'on pourrait qualifier de binaire est une chimère lorsque les processus biochimiques impliqués sont complexes. Le solution face à cette problématique est apparu avec l'utilisation des méthodes statistiques permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre de variables, variables qui peuvent être indépendantes mais aussi fortement interdépendantes comme cela est le cas dans tout cycle métabolique.

Typiquement cela peut se représenter mathématiquement comme une combinaison linéaire de l'ensemble des variables analysées auxquelles on applique des coefficients de

pondération :

$$w = \sum_{i=1}^N \alpha_i x_i \quad \text{Équation 20}$$

C'est la compréhension des coefficients α_i attribués à l'ensemble des variables de départ x_i qui détermine le degré de compréhension du modèle métabolique. La valeur w obtenue pour chaque échantillon doit être discriminante entre les différents états étudiés pour que le modèle soit statistiquement probant ($w > \text{seuil}$ pour les cas sains et $w < \text{seuil}$ pour les cas pathologiques par exemple, Figure 31). Cette situation peut encore être compliquée si le paramètre w ainsi déterminé n'est pas suffisamment significatif. Dans ce cas il peut s'avérer utile de combiner plusieurs biomarqueurs afin d'obtenir de nouvelles variables discriminantes. L'ensemble de ces facteurs α_i peut être exploité par la suite dans le cadre strict de la biochimie de façon à mettre en évidence les *pools* métaboliques affectés par la perturbation étudiée. Ces facteurs peuvent être positifs (le métabolite associé présente une concentration relative plus importante dans cet état) ou négatifs (la concentration de ce métabolite chute conjointement à la perturbation). Les valeurs relatives de α_i ne sont cependant pas directement liées à la valeur quantitative de cette variation. Il va de soi que plus la différence entre la concentration d'un métabolite à l'état A et B est importante plus ce paramètre peut être facilement détecté, cependant le caractère discriminatoire de celui-ci dépendra principalement du caractère systématique de la différence. D'un point de vue biologique cette assumption peut s'exprimer par le fait qu'un métabolite présent en forte quantité dans un système n'a pas forcément une influence plus importante sur le comportement général du système qu'un métabolite présent à l'état de trace. Il est possible qu'une faible variation de concentration de ce second métabolite ait plus d'influence qu'une large variation du premier.

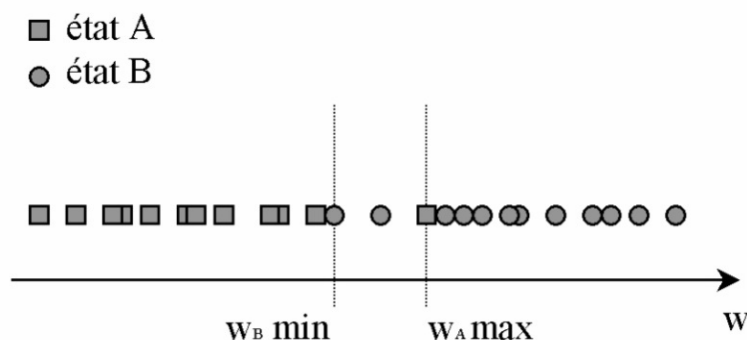


Figure 31 : Différenciation entre deux états : schéma de principe.

Cette hypothèse comporte cependant un principe que n'exprime pas la formule donnée

précédemment qui est le principe d'égale importance *a priori* de chaque métabolite. La métabolomique dans sa définition ne fait pas état de pondération quant à la définition du métabolome. La large gamme de concentration que l'on trouve au sein du métabolome, allant du molaire à l'état de trace (nano voir picomolaire) agit comme un *a priori* lors de l'acquisition des données mais aussi lors du traitement statistique de celles-ci. Cette seconde problématique trouve néanmoins une réponse dans les prétraitements statistiques des données acquises que nous avons détaillés précédemment

2.3.2.2. INTRODUCTION AUX STATISTIQUES DE LA METABOLOMIQUE.

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

Mathématiquement le problème se résume à l'équation suivante.

$$f \begin{bmatrix} X_1 & .. & .. & .. & X_n \\ \cdot & \cdot & & & \cdot \\ \cdot & & \cdot & & \cdot \\ \cdot & & & \cdot & \cdot \\ X_1^p & .. & .. & .. & X_n^p \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Y \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ Y^p \end{bmatrix} \quad \text{Équation 21}$$

On souhaite comprendre et décrire les relations entre X et Y en l'absence d'un modèle théorique. De plus, le nombre de variables d'entrées (X) est souvent très important par rapport au nombre d'observations. L'analyse des données en métabolomique, bien que se résumant souvent et principalement à une relation $Y=f(X)$ comme celle décrite ci-avant, se caractérise aussi et surtout par deux approches diamétralement opposées.

1. On parle de « méthode supervisée » lorsqu'on dispose d'un nombre fini de réalisations d'un phénomène sous la forme entrée – sortie et on souhaite obtenir, d'une manière automatique, un système capable de trouver de façon relativement fiable la sortie correspondante à toute nouvelle entrée qui pourrait lui être présentée. L'entrée correspond à une instance d'une classe, et la sortie qui y est associée indique la classe.
2. On parle de « méthode non-supervisée » lorsqu'il n'y a pas de notion de sortie désirée : on dispose seulement d'un nombre fini de données observées, c'est à dire d'« entrées », sans qu'aucun label n'y soit rattaché.

Une réduction de la dimension de l'espace de représentation (les n variables observées

pour les m cas) est souvent nécessaire afin de ne conserver que les paramètres pertinents pour le diagnostic. Cette étape fait appel à des méthodes d'analyse de données telles que l'analyse en composantes principales ou la régression aux moindres carrés partiels.

Nous allons dans un premier temps nous pencher sur cette réduction d'espace de variables. Une matrice de données de n métabolites et m échantillons représente un espace de données à n points et m dimensions. Quelque soit la configuration, le caractère multidimensionnel des données est difficile à appréhender. Actuellement, aucun outil de visualisation n'est capable d'analyser un si grand espace. Toutefois, les analyses factorielles, méthodes statistiques descriptives, permettent de réduire le nombre de dimensions de l'espace des données et par conséquent la complexité du problème. Le principe des analyses factorielles est la projection des données dans un espace aux dimensions réduites. Cet espace est construit grâce à une combinaison linéaire des variables qui explique le mieux les variations des données d'origine, l'objectif étant de perdre le moins d'informations possibles. Ces techniques reposent sur l'idée qu'une grande partie de la variation des données peut être expliquée par un petit nombre de variables transformées. L'idée directrice de l'analyse factorielle est de résumer le problème en réduisant le nombre de variables explicatives en restant le plus fidèle possible au problème d'origine.

Les méthodes factorielles regroupent trois principales techniques, déjà employées dans l'analyse des données d'expression : l'analyse en composantes principales (Alter et al., 2000; Fellenberg et al., 2001), l'analyse des correspondances (Khan et al., 1998) et l'analyse des correspondances multiples (Bittner et al., 2000).

2.3.2.3. ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE

Présentée pour la première fois en 1933 par Hotelling, l'ACP est une méthode statistique pour l'exploration de données multi-variables, également connue sous les noms « d'analyse par décomposition des données en valeur singulière » (SVD - *Singular Value Decomposition*) (Alter et al., 2000; Holter et al., 2000) dans le domaine de la transcriptomique ou, dans le domaine plus général du traitement du signal, comme l'« *Karhunen-Loève expansion* » (Alter et al., 2000). L'ACP est la méthode de base qui sert de fondement théorique aux autres méthodes de statistiques factorielles.

L'objectif de cette méthode est de réduire la dimension de l'espace des données en déformant le moins possible la réalité. Pratiquement, l'ACP consiste en la détermination d'une suite d'axes orthogonaux, non corrélés, conservant au mieux les distances entre les individus.

Ces axes sont appelés axes principaux d'inertie ou composantes principales et forment un nouvel espace dimensionnel pour les données. Les composantes principales (axes) sont définies par les vecteurs propres. La conservation des distances (aux données d'origine) pour chaque axe est mesurée par la variance des coordonnées des individus sur cet axe, encore appelée valeur propre.

Mathématiquement cela correspond, à partir d'une matrice de données d'expression à m observations et n variables, à calculer un nouveau système de coordonnées. La matrice de données peut être centrée ou non, normalisée (basée sur la matrice de corrélations) ou non (basée sur la matrice de variance-covariance). Ceci définit les différents types d'ACP et explique également les différences de noms (Yeung and Ruzzo, 2001). Les directions du nouveau système de coordonnées sont les vecteurs propres de la matrice de variance-covariance ou de la matrice des corrélations des profils d'expression.

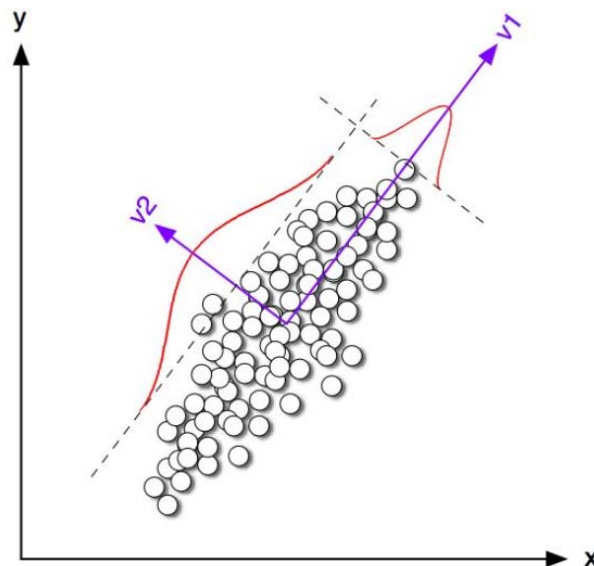


Figure 32: distribution spatiale normale et principe de l'analyse en composante principale.

De manière plus imagée, la nouvelle matrice capture la forme des données. Par exemple, pour un nuage de points ovoïde à n dimensions, le vecteur propre de la matrice (composante principale) est le grand axe de l'ovale. Ce premier axe d'inertie est l'axe sur lequel la projection du nuage de points a le plus de variance. L'axe secondaire sera l'axe orthogonal au premier et calculé de la même manière. p axes principaux d'inertie sont ainsi calculés par rotation et dans l'ordre décroissant de la variation qu'ils expliquent. Cet ensemble de p axes principaux ainsi généré est représentatif des composantes principales de la distribution. Généralement, mais aussi idéalement, les composantes principales utilisées sont les 2 ou 3 premières puisqu'elles témoignent des principales variations observées dans le jeu de données

original et permettent une représentation spatiale aisée du résultat. Les dernières composantes reflètent quant à elles les bruits résiduels. Cependant, il a été montré que les premières composantes d'une ACP ne permettent pas nécessairement de mettre en évidence la structure des données, *i.e.* la répartition en groupes (Yeung and Ruzzo, 2001). Néanmoins l'ACP et ses variantes peuvent s'avérer utile dans le choix du nombre de classes à définir *a priori* pour l'application des algorithmes de classification supervisée telles que l'analyse PLS ou la classification par technique de type *K-means*. Elle peut également être à la base de certains de ces algorithmes (Bicciato et al., 2003). Il est toutefois intéressant de noter que l'ACP, selon certain auteurs ne forme pas de groupe et encore moins de classification (Yeung and Ruzzo, 2001). Selon ces auteurs, elles n'améliorent pas, voire dégradent, la qualité des regroupements, c'est pourquoi ils déconseillent l'utilisation directe des vecteurs propres (et ou valeurs propres) dans les algorithmes de classification.

Moins répandu dans le monde de la métabolomique, l'analyse factorielle des correspondances ou AFC (*CA - Correspondance Analysis*), proposée par Benzécri dans les années 60, est une méthode exploratoire pour analyser des données qualitatives (tableaux de contingence, présence-absence, enquête). L'objectif est de rechercher et d'étudier les associations entre variables. Tout comme l'ACP, elle représente les données dans un espace de dimension réduite, encore appelé carte. Elle permet de visualiser les paramètres (variables gènes) et les objets (variables échantillons) dans le même espace, mettant en évidence d'éventuelles dépendances entre les deux. C'est en employant une technique d'AFC que Fellenberg (Fellenberg et al., 2001) a pu mettre en évidence des gènes associés à certaines phases du cycle cellulaire de la levure. De même, le positionnement multidimensionnel (MDS - *Multidimensional Scaling*) proposé par Shepard et Kruskal dans les années 60, bien qu'étant une technique principalement utilisée dans le monde économique, a elle aussi montré sa possible application au domaine de la métabolomique. Ainsi, Bittner (Bittner et al., 2000) a pu démontrer que la méthode MDS, couplée à des méthodes de classification, permet de distinguer des catégories de mélanomes jusqu'à présent non identifiées sur la base de critères cliniques. Cette technique permet donc d'estimer le nombre de classes à définir *a priori* pour l'application des algorithmes de classification supervisée. Elle peut également aider au choix de la distance à utiliser lors de l'application d'un algorithme de regroupement.

2.3.2.4. LA REGRESSION AUX MOINDRES CARRES PARTIELS.

A) LA REGRESSION LINEAIRE SIMPLE

La régression OLS (*Ordinary Least Squares*) est plus communément appelée régression linéaire (simple ou multiple). Dans le cas d'un modèle à p variables explicatives, le modèle statistique de la régression OLS s'écrit

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^p \beta_j X_j + \varepsilon \quad \text{Équation 22}$$

où Y désigne la variable dépendante, β_0 est la constante du modèle, X_j désigne la $j^{\text{ème}}$ variable explicative du modèle (j allant de 1 à p) et ε une erreur aléatoire d'espérance 0 et de variance σ^2 . Dans le cas où l'on dispose de n observations, l'estimation de la valeur de la variable Y pour l'observation i est donnée par l'équation suivante :

$$\hat{y}_i = \beta_0 + \sum_{j=1}^p \beta_j X_{ij} \quad (i=1, \dots, n) \quad \text{Équation 23}$$

La méthode OLS correspond à la minimisation de la somme des écarts quadratiques entre les valeurs observées et les valeurs prédites. On montre que cette minimisation conduit aux estimateurs des paramètres du modèle suivants :

$$\begin{cases} \hat{\beta} = (X'DX)^{-1} X'Dy \\ \hat{\sigma}^2 = \frac{1}{W-p^*} \sum w_i (y_i - \hat{y}_i)^2 \end{cases} \quad \text{Équation 24}$$

où β désigne le vecteur des estimateurs des paramètres β_i , X est la matrice des variables explicatives précédées d'un vecteur de 1, y est le vecteur des n valeurs observées pour la variable dépendante, p^* est le nombre de variables explicatives auquel on additionne 1 si la constante n'est pas fixée, w_i est le poids associé à l'observation i , W est la somme des poids w_i et D est la matrice diagonale des poids w_i . Le vecteur des valeurs prédites s'écrit finalement :

$$\hat{y} = (X'DX)^{-1} X'Dy \quad \text{Équation 25}$$

Les limitations de la régression OLS viennent de la contrainte issue du calcul de l'inverse de la matrice $X'X$. En effet il faut que la matrice soit de rang $p+1$. En outre, certains problèmes

numériques peuvent être rencontrés. Il est possible de contourner partiellement ces problèmes en utilisant des algorithmes notamment dus à Dempster (1969) : dans le cas où la matrice est de rang q , où q est strictement inférieur à $p+1$, certaines variables sont supprimées du modèle, soit parce qu'elles sont constantes, soit parce qu'elles font partie d'un bloc de variables colinéaires. Par ailleurs, une sélection automatique des variables est effectuée dans le cas où le modèle se baserait sur un nombre de variables trop important pour le nombre d'observations (la limite théorique est $n-1$, car au-delà la matrice $X'X$ est non inversible). La suppression de certaines variables peut ne pas être optimale. Dans certains cas, on n'ajoute pas une variable au modèle en raison de colinéarité avec une variable ou un bloc de variables déjà présentes, mais il se pourrait qu'il soit plus pertinent de retirer une variable déjà présente dans le modèle et d'ajouter cette nouvelle variable. En raison de ces problèmes, d'autres méthodes ont été proposées s'appliquant mieux au problème de la métabolomique où les hypothèses des bases métabolomiques impliquent une forte colinéarité des variables (interaction entre les métabolites, inter connectivité des voies métaboliques, ...).

B) LA REGRESSION SUR LES COMPOSANTES PRINCIPALES

La régression PCR (*Principal Components Regression*) ou régression sur composantes principales comprend trois étapes :

1. on réalise d'abord une ACP sur le tableau des variables explicatives
2. on effectue une régression OLS sur les composantes retenues
3. on calcule les paramètres du modèle sur les variables d'origine

Comme nous l'avons vu précédemment l'ACP permet de réduire sensiblement la dimensionnalité d'un problème. En d'autres termes cela correspond à passer d'un tableau X comprenant n observations décrites par p variables à un tableau S de n observations décrites par q composantes, où q est inférieur ou égal à p et tel que $(S'S)$ est inversible. Les composantes q étant des combinaisons linéaires des variables p . Une sélection supplémentaire peut être effectuée de telle sorte que seuls les r composantes les plus corrélées avec la variable Y soient gardées pour la régression OLS. On obtient alors le tableau R . Ceci revient schématiquement à passer d'un problème de dimensionnalité p à un problème de dimensionnalité r avec $r \ll p$ ($r < q < p$).

Le calcul de la régression OLS s'effectue sur le tableau R . On obtient alors les paramètres correspondants à chacun des r facteurs. Afin de contourner le problème d'interprétation des

paramètres ainsi obtenus, il est utile de faire les calculs nécessaires pour obtenir les paramètres et les intervalles de confiance pour les variables de départ.

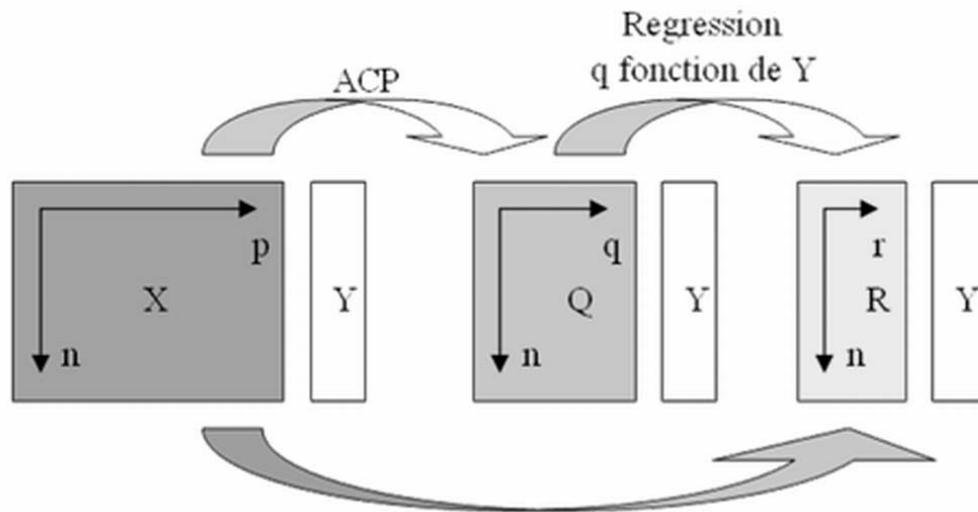


Figure 33 : Schématisation d'un traitement par régression sur les composantes principales.

C) LA REGRESSION AUX MOINDRES CARRES PARTIELS.

Les méthodes PLS, développées au cours des années 80 (Wold et al., 1983), sont des techniques d'analyse de données particulièrement bien adaptées pour l'étude de problèmes de type métabolomique (Wold, 1991). C'est une méthode d'analyse des données spécifiquement construite pour l'étude des relations entre un ensemble de variables réponses Y et un ensemble de variables explicatives X lorsque la multi-colinéarité est forte ou lorsque le nombre de variables explicatives et/ou réponses est élevé par rapport au nombre d'individus. La régression PLS effectue une analyse en composantes principales pour chaque ensemble de variables X et Y , sous la contrainte que les composantes de X soient fortement corrélées à celles de Y . Cette méthode est rapide, efficace et optimale pour un critère de minimisation des covariances bien maîtrisé. Son utilisation est recommandée dans le cas où un grand nombre de variables explicatives est utilisé, ou lorsqu'il y a de fortes colinéarités entre les variables.

Afin de bien appréhender le principe de la classification PLS nous allons raisonner sur un problème théorique simple. Soit un ensemble de p variables (X_1 à X_p) acquises sur n individus. La dimensionnalité du système, en d'autres termes, l'espace de représentation de n individus est un espace à p dimensions. Le but de cette analyse est de générer q variables ($q \ll p$) pertinentes pour le diagnostic, obtenues par combinaisons linéaires des p variables initiales (Tenenhaus, 1998).

	V a r i a b l e s				Y
	X ₁		X _j		
1					
2					
i			x _{ij}		
n					

à expliquer
catégorielle
numérique

p variables explicatives

L'idée de la régression PLS est de créer à partir d'un tableau de n observations décrites par p variables, un ensemble de h composantes avec $h \ll p$. Contrairement à la PCR la méthode de construction des composantes diffère légèrement de celle de l'ACP, et présente l'avantage de bien s'accommoder de la présence de données manquantes. La PLS est une technique quantitative de décomposition spectrale étroitement liée à la PCR. Cependant, dans la PLS, la décomposition est faite d'une manière légèrement différente. Au lieu de décomposer d'abord la matrice spectrale X en un ensemble de vecteurs propres et de scores, et de les régresser contre les Y dans une étape séparée, la PLS utilise l'information de Y en même temps que le processus de décomposition. Ceci implique que les variables expliquant le mieux les Y seront plus fortement pondérées. De plus, les vecteurs propres et les scores calculés en utilisant PLS seront différents de ceux de PCR. L'idée principale de PLS est de donner le plus d'informations possible sur Y dans les premiers vecteurs construits.

Le nombre maximal de composantes (A) est fixé par la dimension de la matrice X de départ. Parallèlement à cela on définit des critères permettant de déterminer A de façon raisonnable. La détermination du nombre de composantes à retenir est en général fondée sur un critère mettant en jeu une validation croisée. Après avoir enlevé un individu (une observation, j) des matrices X et Y du modèle, on calcule les β_A^j qui représentent la matrice des coefficients du modèle construit avec les individus restants. Puis on calcule l'erreur de prédiction faite sur l'individu j. La valeur de l'erreur de prédiction doit être minimisée en fonction de A. Celle-ci est défini par la valeur du PRESS (*PREDiction Sum of Square* qui est défini par la formule :

$$\text{PRESS}(A) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left\| \mathbf{E}_A^{(i)} \right\|^2 \quad \text{Équation 26}$$

L'utilisateur peut aussi fixer lui-même le nombre de composantes à retenir. Le "FIT" ou "Critère d'Ajustement" dans lequel le nombre total A d'axes ou de composantes (*i.e.* la

dimension du modèle) est le super-paramètre de la méthode. Lors de l'exécution de l'algorithme, il est utile de voir évoluer, à chaque nouvel axe construit, la reconstruction de la variance des prédictors et des réponses. La stratégie consiste à s'arrêter lorsque le pourcentage de la variance de X est suffisamment grand, pour un gain faible dans le pourcentage de variance de Y . Ce critère est donc basé sur l'ajustement des données. En termes d'ajustement il est aussi intéressant de regarder l'évolution des coefficients du modèle de régression linéaire $Y_A = X\beta_A$ en fonction de la valeur de A . Pour une réponse j choisie, l'étendue des valeurs du vecteur β_A^j reste stable jusqu'à une certaine valeur de A . Au delà de cette valeur A , pour certains prédictors fortement corrélés, les valeurs des coefficients β_A^j semblent exploser. On choisit alors la plus petite valeur A avant que ce phénomène n'apparaisse.

On distingue souvent la PLS1 de la méthode PLS2. La PLS1 est utilisée lorsqu'il y a une seule variable dépendante, la PLS2 lorsqu'il y en a plusieurs. Dans le cas des méthodes OLS et PCR, si l'on doit calculer les modèles pour plusieurs variables dépendantes, le calcul des modèles consiste en une simple boucle sur les colonnes du tableau des variables dépendantes. Dans le cas de la régression PLS, la structure de covariance du tableau des variables dépendantes influe aussi sur les calculs. L'équation du modèle de la régression PLS est donnée par :

$$\begin{aligned} Y &= T_k C'_k + E_k \\ Y &= XW_k^* C'_k + E_k \\ Y &= XW_k (P'_k W_k)^{-1} C'_k + E_k \end{aligned} \quad \text{Équation 27}$$

où Y est la matrice des variables dépendantes, X celle des variables explicatives, T_k , C'_k , W_k^* , W_k et P_k , sont des matrices générées par l'algorithme PLS et E_k est la matrice des résidus. La régression PLS produit une matrice de poids W reflétant les structures de covariance entre les prédictors et les réponses. Pour établir le modèle, la régression PLS produit une matrice de poids W pour X telle que $T = XW$, c'est à dire que les colonnes de W sont des vecteurs de poids pour les colonnes de X produisant la matrice de facteurs de score T correspondante. Ces poids sont calculés de telle façon qu'ils maximisent la covariance entre la réponse et les facteurs de score correspondants. La matrice B des coefficients de régression de Y sur X , en utilisant h composantes générées par l'algorithme de régression PLS, est donc définie par :

$$B = W_k (P'_k W_k)^{-1} C'_k \quad \text{Équation 28}$$

Il s'agit donc, comme en régression OLS ou PCR, d'un modèle linéaire. Les trois méthodes donnent le même résultat si le nombre de composantes issues de l'ACP (en régression

PCR) ou de la PLS (régression PLS) est égal au nombre de variables explicatives sélectionnées.

L'utilisation de l'algorithme NIPALS (*Nonlinear Estimation by Iterative Partial Least Squares*) permet de déterminer séquentiellement les paramètres de la régression PLS et donc de traiter des jeux de données avec des données manquantes, situation classique pour les données de métabolomique. Cet algorithme est l'un des outils les plus puissants en analyse de données manquantes. Utilisant la formule de reconstitution de données sur les composantes principales, il est à la base des techniques PLS. Une des particularités de la régression PLS est que le modèle obtenu dépend du nombre de composantes PLS générées. Cette variable intervient lors du déroulement de l'algorithme NIPALS. Ce nombre est alors considéré comme un paramètre qu'il faut choisir avec soin. Pour décider de la dimension du modèle, deux considérations sont à prendre en compte :

1. la qualité de l'ajustement aux données (pourcentage de variance expliquée). Nous reverrons cette variable sous le nom de R^2 lors des traitements effectués sur les jeux de données métabolomiques acquis.
2. la qualité de prédiction (somme des carrés des erreurs de prédiction ou PRESS) par validation croisée. Nous reverrons cette variable sous le nom de Q^2 lors des traitements effectués sur les jeux de données métabolomiques acquis.

En régression PLS, les composantes sont créées de telle sorte qu'elles expliquent au mieux Y, alors qu'en PCR elles sont au départ créées uniquement en fonction de X. Outre les avantages précédents, elle permet d'exprimer le modèle sous-jacent directement à partir des données initiales X et Y, mais aussi à partir des composantes PLS. Les composantes PLS ainsi obtenues sont orthogonales deux à deux. On peut grouper les techniques PLS en trois grandes catégories :

1. La régression PLS : le modèle linéaire généralisé est traité à l'aide de l'approche PLS. La stabilité du modèle est assurée même dans le cas où le nombre de variables explicatives est supérieur au nombre d'observations. L'approximation linéaire est donnée par validation croisée ce qui confère en plus de la stabilité du modèle, un pouvoir prédictif élevé. Le traitement de données manquantes est pris en compte en utilisant les estimations données par l'algorithme NIPALS.

2. Analyse discriminante PLS : La technique classique d'analyse discriminante est adaptée au cas où le nombre de variables prédictives est supérieur au nombre d'observations. Les coefficients des fonctions discriminantes sont généralement plus stables que dans le cas classique.

3. L'analyse de données longitudinales : la caractéristique principale des données longitudinales est que les individus sont observés au cours du temps. Les analyses de ce type de données sont en contraste avec celles où une variable est mesurée une seule fois sur un individu. De ce fait, les techniques classiques d'analyse de données (régression, analyses factorielles) atteignent leurs limites dans ce contexte. La modélisation de ces types de données par les processus stochastiques à temps continu ou discret étend les techniques factorielles classiques à l'analyse harmonique. L'évolution de l'état d'un patient (mesuré éventuellement par plusieurs variables) au cours d'une période donnée, l'observation en temps d'un phénomène, le contrôle de qualité, font que les données médicales constituent une source importante des applications de techniques récentes d'analyse de données longitudinales.

2.3.3. QUELLE(S) TECHNIQUE(S) DE CLASSIFICATION?

Les méthodes de classification les plus connues sont bien souvent le résultat de recherches menées afin de répondre aux attentes des milieux économiques (études de marchés, fluctuation, prise de décision, modèle prévisionnel,...). Cependant, un grand nombre d'algorithmes de classification développés dans ce cadre se sont montrés particulièrement efficaces pour regrouper et classer les gènes dans les études de génomique (Kim, 2002) (Alizadeh et al., 1998).

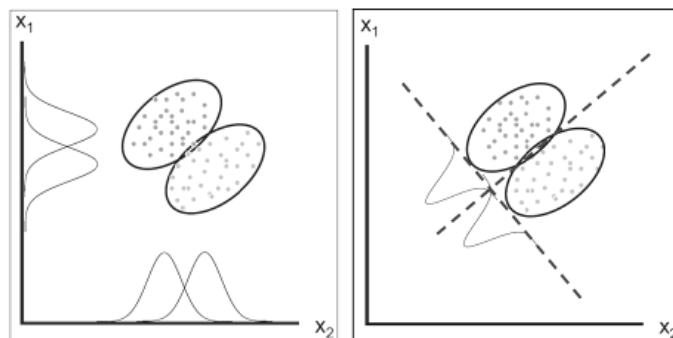


Figure 34 : Projection ACP dans un espace 2D

De nombreuses études comparatives ont été réalisées afin de déterminer l'algorithme de classification le plus performant dans le cadre des « omiques » (Goodacre, 2005a; Goodacre et al., 2004; Kell, 2004; Ramadan et al., 2006; Tate et al., 2006; Taylor, 2007) mais actuellement aucun consensus n'est établi. Parmi les méthodes de classification non supervisée l'ACP est, comme nous l'avons vu précédemment, la méthode la plus employée en métabolomique. La

PLS, qui est la méthode de classification supervisée la plus employée en métabolomique repose sur un principe similaire auquel on applique des contraintes (Boulesteix and Strimmer, 2007). La Figure 34, bien que ne présentant qu'un raisonnement suivant deux variables, démontre clairement l'intérêt que peut présenter l'utilisation d'une technique de type ACP pour la compréhension d'un problème. L'établissement d'un nouvel espace de projection des échantillons permet de réduire la dimensionnalité du problème tout en restant suffisant à la classification. L'intérêt principal de ces méthodes statistiques est la possibilité d'introduire dans un modèle précédemment créé, de nouveaux individus. Ceux-ci vont être projetés dans le graphique, sans modifier la structure initiale des composantes principales (PCs) ou PLSs qui expliquait les variations des groupes d'échantillons.

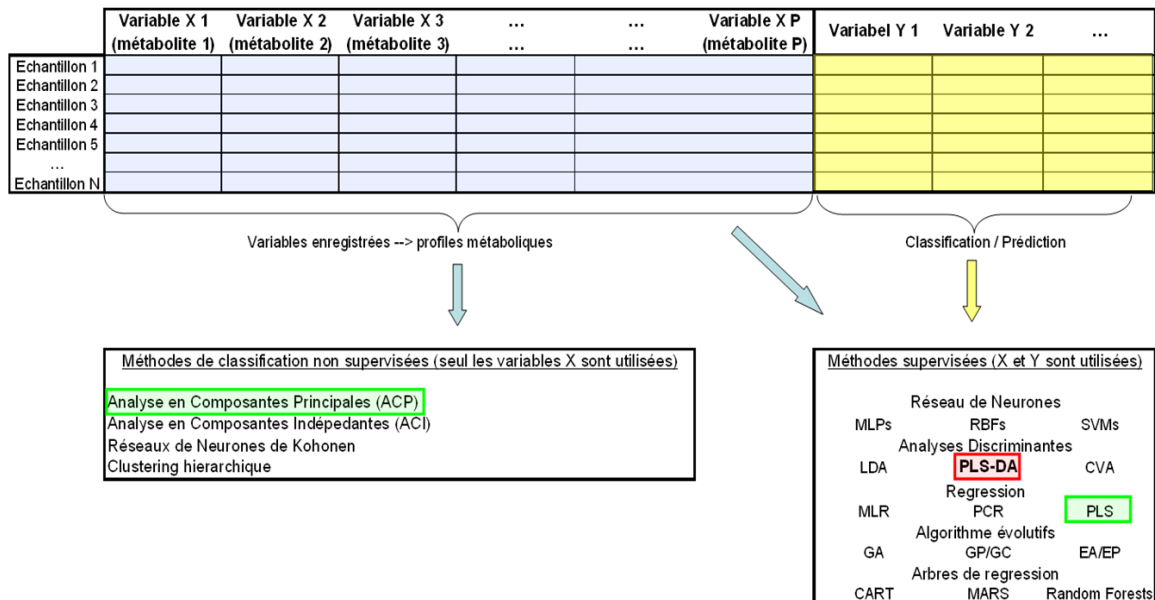


Figure 35 : Méthodes statistiques les plus courantes employées dans les études de types « omiques ». Les méthodes utilisées dans ce mémoire sont repérées en rouge et vert sur la figure.

Les nouveaux individus seront visualisés dans le graphique de façon comparative avec les individus et les variables précédemment analysés. Comparé à d'autres méthodes de régression pour des données colinéaires, il a été établi que le plus grand avantage de l'analyse PLS est que "l'information dans la variable Y est utilisée", mais c'est une notion qu'il est difficile d'établir statistiquement. Un avantage plus évident est que la méthode rend possible la combinaison de la prédiction avec l'étude d'une structure jointe latente dans les variables X et Y. Ainsi, la méthode demande souvent moins de composantes que l'analyse PCR pour donner une bonne prédiction. Avec la facilité d'implémentation, cela a rendu cette méthode très populaire en chimie, en particulier en spectroscopie, mais les applications dans d'autres domaines sont

aussi très répandues.

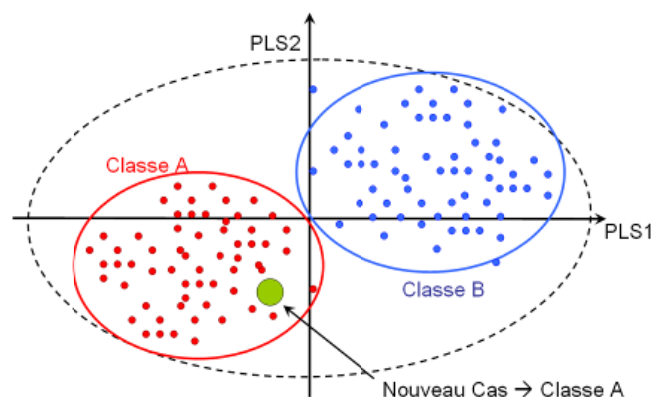


Figure 36 : Principe de classification et de diagnostic par étude PLS

L'utilisation de l'ACP ou de la PLS présente donc le grand avantage de permettre l'établissement de modèle de « diagnostics » simples et visuels. Typiquement, un modèle prédictif se présentera sous la forme d'un graphique (1D, 2D ou 3D) dont l'espace de projection sera divisé en surface prédictive. Le positionnement spatial d'un nouvel échantillon dans cet espace de projection fera office de classification.

2.3.4. COMPARAISON PLS ET PCA SUR UN CAS REEL.

Les modèles statistiques élaborés dans le cadre d'une étude métabolomique peuvent être de deux ordres : soit supervisés soit non-supervisés. Il a été démontré que l'utilisation de l'approche supervisée, dans le cas où des contraintes (éléments de classification extérieurs, jeu de données test, etc...) sont disponibles, est à privilégier (Hagberg, 1998 ; Perez-Enciso and Tenenhaus, 2003). L'utilisation des techniques non supervisées est néanmoins très utile dans l'optique d'explorer le jeu de données disponibles et de détecter d'éventuels « cas aberrants ». Dans les quelques lignes ci-dessous seule l'interprétation des résultats sera discutée.

L'ACP permet de vérifier la normalité des jeux de données. La présence d'éventuels cas aberrants peut être ainsi décelée et expliquée par une exploration approfondie du profil métabolique. L'exemple présenté Figure 38 est le cas pratique d'un groupe d'échantillons classifiés par l'histopathologie en tant que glioblastome (WHO grade IV, cf. chapitre III). La projection du jeu de données, dans le nouvel espace 2D, repose sur les composante PC1 et PC2 générées par l'ACP. La PC1, combinaison linéaire des variables d'entrée, explicite 40% de la variance totale de la distribution. De même la PC2 explicite 12% de cette variance. Ce modèle ACP à deux composantes permet donc de résumer 52% de la variance globale sur un espace

restreint bidimensionnel (passage de 250 variables d'entrée à 2 variables explicatives).

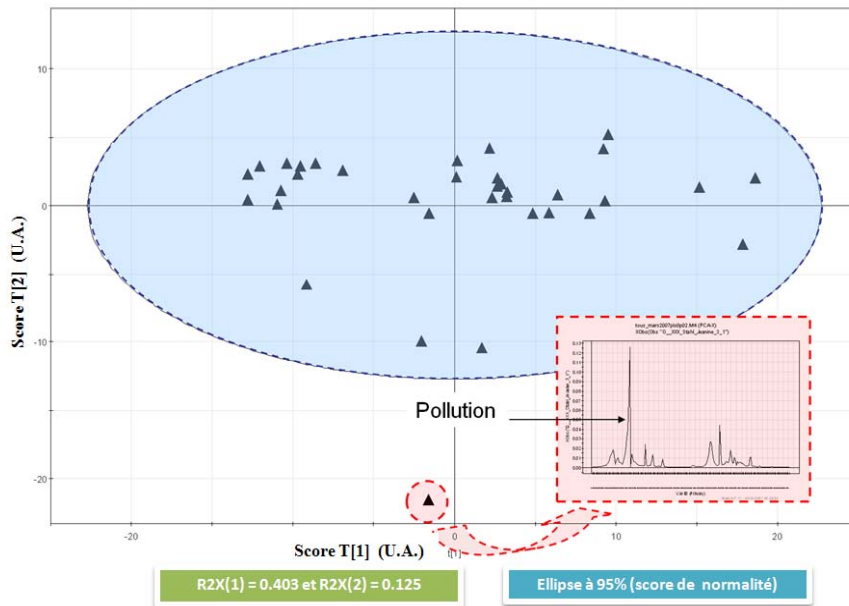


Figure 37: Classification ACP d'un groupe de glioblastomes (WHO grade IV). Un élément est considéré comme statistiquement différent de la moyenne (norme à 95% de variance). Une analyse de l'échantillon démontre la prédominance d'un signal issu de pollution (médium de fixation utilisé en anatomie pathologique).

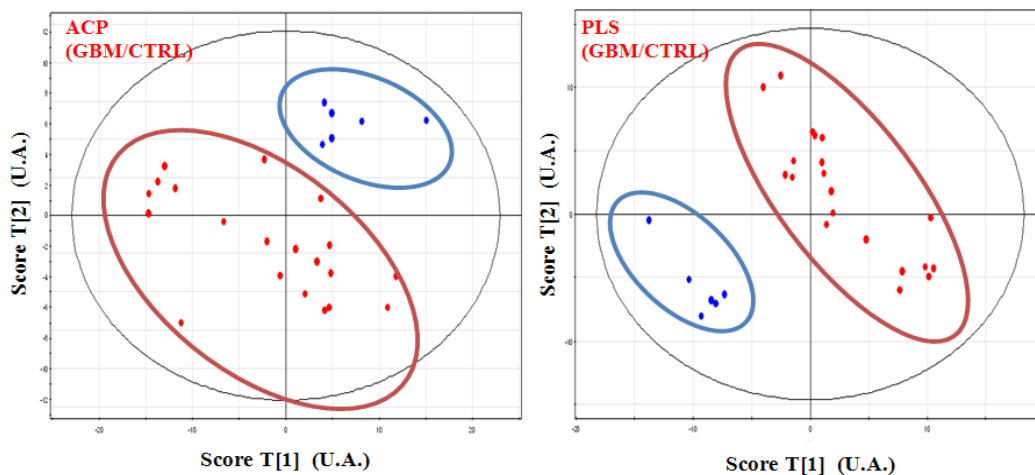


Figure 38: Modèles ACP (à gauche) et PLS-DA (à droite).

Ce modèle est facilement interprétable graphiquement et la présence d'un point extérieur à la « surface de normalité » s'explique par un examen de son profil métabolique. L'échantillon (représenté en rouge sur la Figure 37) correspond à un élément contaminé lors de sa phase de préparation (détection d'un fort signal parasite). Cette pollution a pu être identifiée. Elle correspond à la présence d'un médium de fixation utilisé en anatomie pathologique

(Carbowax[®]). Il est dès lors important d'exclure ce cas d'une étude statistique ultérieure.

Ces données, une fois « nettoyées » des cas aberrants, peuvent être soumises à une analyse de type supervisée ou non supervisée. Pour ce faire nous allons raisonner sur un ensemble de cas composé de glioblastomes et de biopsie de sclérose de la corne d'Amon (Figure 38).

L'étude sera effectuée à l'aide d'une méthode PLS-DA et comparée aux résultats obtenus en ACP. La contrainte de classification est déterminée par le type histopathologique de l'échantillon (glioblastomes / sclérose) pour la PLS-DA. Histopathologiquement les échantillons de sclérose ont majoritairement été classifiés comme tissus d'apparence normal.

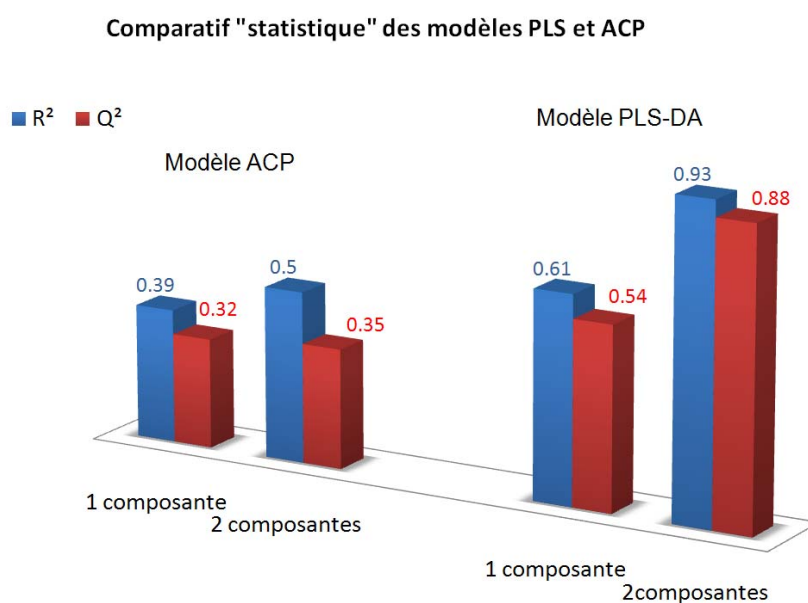


Figure 39 : Comparaison statistique des modèles ACP et PLS-DA

La génération d'un modèle ACP, bien qu'il permette de déterminer des classes, prend en compte la variabilité globale des données. Les différences entre les profils métaboliques des deux groupes sont suffisantes pour permettre une classification. Cependant l'amélioration notable, obtenue en se basant sur un modèle PLS-DA (Figure 38), démontre clairement que l'information métabolique liée à l'appartenance aux différents groupes est partiellement masquée par la variabilité biologique naturelle.

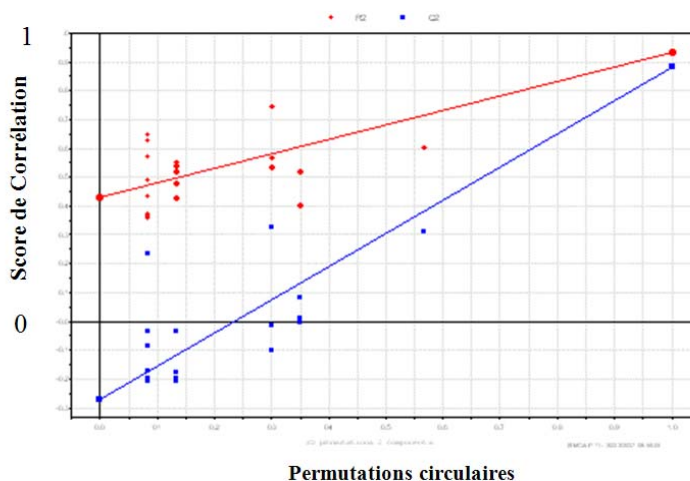


Figure 40 : Test de sur-modélisation de l'analyse PLS DA

L'indice Q^2 cumulé est une mesure globale de la qualité de l'ajustement et de la qualité prédictive des modèles. La qualité de l'ajustement est classiquement jugée comme « satisfaisante » lorsque Q^2 est supérieur à 0.5 au moins. Les R^2Y cumulés (en bleu sur la Figure 39) correspondent aux corrélations entre les composantes et les variables de départ. Lorsque cette valeur tend vers 1 cela indique que les composantes sont bien représentatives des Y.

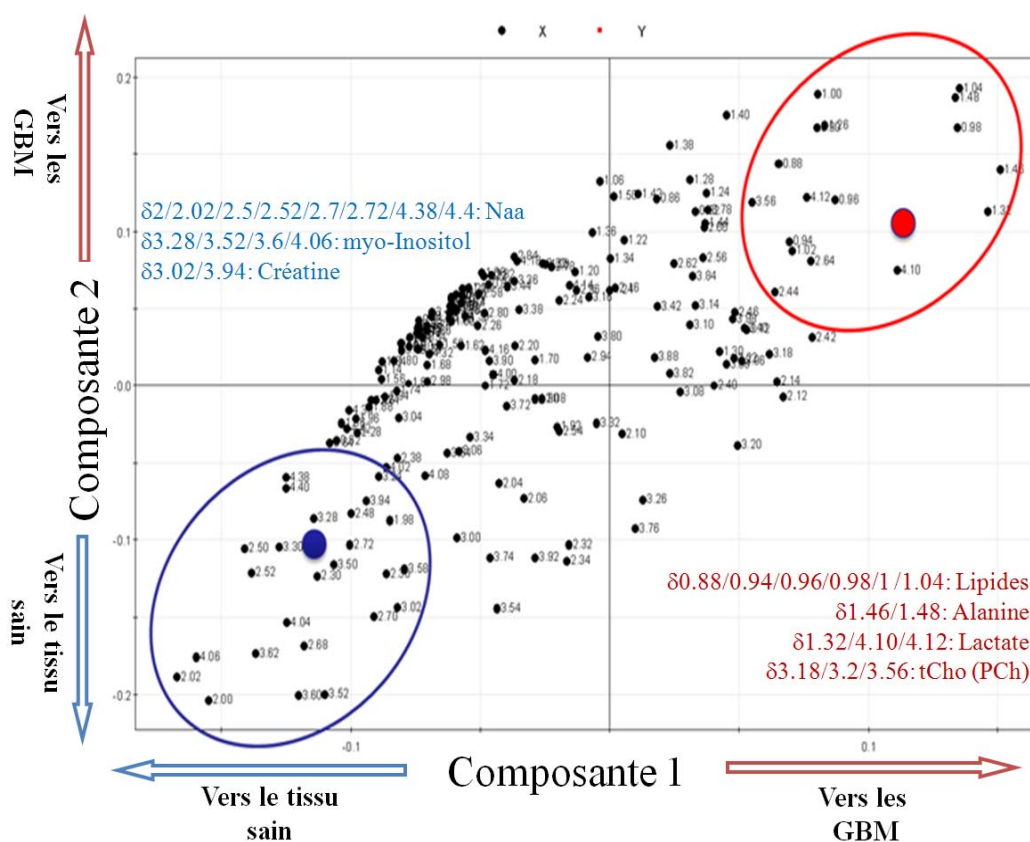


Figure 41 : Interprétation métabolique de la classification PLS DA des glioblastomes et du tissu sain (Figure 38)

Les valeurs de Q^2 obtenues sont largement en la faveur d'un modèle PLS-DA (0.88 contre 0.35). De plus le modèle PLS-DA permet de mesurer la qualité de l'ajustement réalisé en se basant sur un algorithme de validation circulaire. En partant du modèle établi, les contraintes Y vont être permutées sur un cycle de N itérations. A chaque itération une valeur de Q^2 et R^2 sera à nouveau calculée. La droite de régression ainsi obtenue doit tendre vers 0 pour ces deux valeurs. Cet algorithme permet de vérifier le caractère « *d'overfit* » du modèle. Dans l'exemple présent, compte tenu du faible nombre d'échantillons de chaque groupe, cette validation peut être jugée comme excellente (Figure 40).

La phase d'interprétation des deux modèles repose sur l'examen des variables prépondérantes dans la génération de l'ACP et de la PLS-DA. Cette distribution (Figure 41) est représentative de la distribution observée lors de la classification (Figure 37).

2.3.5. PHASES PRATIQUES DANS LA CONSTRUCTION D'UN MODELE PREDICTIF.

L'établissement d'un modèle prédictif dépend grandement du type d'approche choisi préalablement. Soit cette approche est purement statistique et nécessite alors une validation purement mathématique qui se décompose comme suit :

1. Phase de **construction** d'un ou de plusieurs modèle(s) de régression ou de classification, sur la base d'une série d'exemples pour lesquels la valeur de Y est connue, ce qui correspond à un **ensemble d'apprentissage** $\{(X_i, Y_i)\}$ où X_i représente les enregistrements des profils métaboliques d'une population donnée et Y_i correspond à la réponse à la question posée pour cette population (classification anatomo-pathologique, pronostic clinique, réponse à un traitement pharmacologique,...)
2. Phase de **validation**, sur une série indépendante d'exemples (Y connue) qui n'a pas servi à établir le modèle et que l'on appelle **ensemble de validation**. Cette étape permet de comparer la qualité prédictive de plusieurs modèles sur base d'un critère d'erreur (par exemple les erreurs de prédiction). Elle détermine le choix d'un modèle définitif (le plus performant) construit sur l'ensemble des données disponibles (apprentissage + validation).
3. Phase d'**estimation des performances** du modèle choisi, sur une nouvelle série indépendante de données qui n'a pas servi à établir ou à comparer les modèles. Cet ensemble est appelé **ensemble de test** et permet d'évaluer la **qualité prédictive** du modèle. Le critère de validation sera établi suivant un taux de détection correct.
4. Phase d'**application**, sur une série de nouveaux cas où seules les données métaboliques seront connues, soit un jeu de données du type $\{(X_i, ?)\}$.

Ce type d'approche, bien qu'étant théoriquement le plus robuste, présente l'énorme désavantage de nécessiter un nombre important de données (d'échantillons). Bien que les techniques statistiques mises en œuvre soient spécifiquement conçues pour contourner ce problème, l'élaboration d'un modèle « parfaitement » valide, statistiquement et mathématiquement parlant, nécessite un groupe d'échantillons d'une taille sensiblement similaire au nombre de variables, et ceci dans le cas hypothétique où la classification recherchée est purement binaire (pathologique *versus* sain par exemple).

La seconde approche consiste, lors de l'élaboration d'un modèle prédictif, à déterminer, en plus de la contrainte nécessaire à la PLS-DA, une ou plusieurs hypothèses biologiques/métaboliques liées à la problématique. De fait, cette approche se décompose comme suit :

1. Phase de **construction** d'un ou de plusieurs modèle(s) de régression ou de classification, sur la base d'une série d'exemples pour lesquels la valeur de Y est connue, ce qui correspond à un **ensemble d'apprentissage** $\{(X_i, Y_i)\}$ où X_i représente les enregistrements des profils métaboliques d'une population donnée et Y_i correspond à la réponse à la question posée pour cette population (classification anatomo-pathologique, pronostic clinique, réponse à un traitement pharmacologique,...)
2. Phase de **validation**, sur cette même série (Y connue) par divers algorithmes (validation circulaire, mesure de « *l'overfit* », ...). Cette étape permet de vérifier la cohérence du modèle établi et détermine le choix d'un modèle définitif (le plus performant, présentant les critères de Q^2 et R^2 les plus « sûrs » et la meilleure tendance lors de la validation).
3. Phase d'**estimation de la cohérence biologique** du modèle choisi. L'ensemble des métabolites concernés par l'établissement du modèle sera classifié en fonction de son poids statistique. Une cohérence biologique sera cherchée compte tenu des hypothèses de départ. Un ou des réseaux métaboliques seront étudiés pour vérifier la validité des biomarqueurs détectés. Cette phase de validation, si elle s'avère concluante débouchera sur une hypothèse métabolique qui pourra être affinée en réduisant le champ d'investigation métabolique lors de la procédure statistique (on pourra se focaliser sur certains métabolites comme les acides aminés par exemple).
4. Phase d'**application**, sur une série de nouveaux cas où seules les données métaboliques seront connues, soit un jeu de données du type $\{(X_i, ?)\}$.

Cette deuxième option est plus élégante d'un point de vue biologique mais la validation du modèle établi reposera toujours sur l'augmentation du nombre de cas inclus dans le modèle. Ce processus peut néanmoins devenir itératif en incluant tout nouveau cas dans la base de données prédictive et en confirmant à chaque itération le caractère prédictif du modèle. C'est pourquoi, dans cette thèse, nous préférons donner une orientation exploratoire à la métabolomique en posant des bases de réflexions sur les modèles métaboliques impliqués dans les processus oncologiques. Cette approche sera l'objet de la seconde partie de ce mémoire qui se propose d'appliquer les outils de la métabolomique que nous avons décrits auparavant (HRMAS, ACP, PLS-DA) à l'étude des tumeurs cancéreuses

CHAPITRE III.

RESULTATS.

3.1. LA METABOLOMIQUE APPLIQUEE A L'ETUDE DES TUMEURS CEREBRALES.

Les tumeurs cérébrales résultent de la prolifération non contrôlée de certaines cellules. Celles-ci sont qualifiées de "primitives" si elles se développent à partir des cellules du cerveau comme les astrocytes ou oligodendrocytes, et de "secondaires" (ou encore métastases) si elles ont pour origine une tumeur située ailleurs dans l'organisme (poumon, sein, rein...). La majorité des tumeurs primitives du système nerveux central sont dérivées des cellules gliales donnant ainsi naissance aux gliomes (entre 64% à 90% selon les études), dont le représentant le plus fréquent et le plus malin est le glioblastome.

La distribution épidémiologique des tumeurs cérébrales, en fonction de l'âge, est bimodale, avec une incidence⁵ maximale chez l'enfant et un second pic chez l'adulte, entre 45 et 70 ans (Fleury et al., 1997 ; Wrensch et al., 2005). L'incidence des tumeurs cérébrales primitives est estimée entre 10 à 15 cas pour 100.000 habitants par an et la prévalence⁶ de 60 pour 100.000 habitants. D'une manière générale les taux d'incidence sont plus élevés chez les hommes, particulièrement dans le cas des tumeurs malignes. Dans les pays développés, les tumeurs cérébrales sont la 12^{ème} cause la plus fréquente de mortalité liée au cancer. Chez l'enfant, les tumeurs cérébrales sont proportionnellement plus fréquentes et viennent en deuxième position après les tumeurs du sang (leucémie). Ainsi on estime qu'environ 2500 à 3000 nouveaux patients sont touchés par des gliomes chaque année en France.

Les tumeurs cérébrales se réfèrent à une collection de néoplasmes qui ont une biologie, un pronostic et un traitement propre permettant de les classer, les répertorier et éventuellement de

⁵ L'incidence : Nombre de cas nouveaux d'une maladie ou de sujets atteints d'une maladie dans une population déterminée et durant un laps de temps donné.

⁶ La prévalence : Nombre des cas de maladies, d'accidents, de suicide, etc., qui surviennent dans une population donnée, sans distinguer entre les cas nouveaux et les cas anciens.

les traiter. La première classification histologique des tumeurs cérébrales a été publiée en 1926 par Bailey et Cushing (Cushing and Bailey, 1926). Les bases de ce travail reposent sur la « théorie des restes embryonnaires » de Cohnheim datant milieu du 19^{ème} siècle, qui stipulait que le développement tumoral se fait à partir de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de leur développement. De plus, les observations de Bailey et Cushing montraient que, les cas pour lesquels la durée de vie des patients était la plus longue, étaient ceux dont les tumeurs étaient les plus différenciées.

Un outil supplémentaire a fait sensiblement évoluer cette classification : le « *grading* » ou gradation de malignité de la tumeur. Ce concept repose sur la théorie de l'anaplasie (dédifférenciation). La dédifférenciation des cellules normales donnerait naissance aux cellules tumorales. Chaque type tumoral a donc bénéficié de ce système de gradation. Il s'échelonne du grade I au grade IV en fonction de la malignité tumorale et repose sur l'analyse de critères théoriquement aisément évaluables pour un pathologiste entraîné tels que l'index mitotique, le pourcentage de cellules indifférenciées, l'étendue de la nécrose, les atypies nucléaires, le degré de polymorphisme et l'importance de la prolifération vasculaire (Tableau 4).

	Atypies nucléaires	Mitoses	Prolifération endothéliale	Nécroses
Grade I	-	-	-	-
Grade II	+	-	-	-
Grade III	+	+	-	-
Grade IV	+	+	+	+

Tableau 4: Principaux critères de gradation de malignité des tumeurs

Ces moyens d'évaluation pronostique permettent le regroupement de certains patients présentant des pathologies comparables et la prise de décision dans les choix thérapeutiques.

Aujourd'hui encore, la technique de classification employée repose essentiellement sur l'étude morphologique des biopsies prélevées lors de l'opération. Les principaux critères de classification utilisés sont le type cellulaire primitif de la tumeur et son degré d'anaplasie.

Bien que la classification établie par l'**Organisation Mondiale de la Santé** (OMS, en *anglais World Health Organization - WHO*) regroupe l'ensemble de ces critères (Cohen and Weller, 2007; Louis et al., 2007), un grand nombre de questions restent en suspens quant à la pertinence de cette classification comme outil d'évaluation de l'évolution clinique des patients (Daumas-Duport, 1994). L'un des principaux défauts de ce type de classification est le manque de reproductibilité dû à la différence d'interprétation inter-neuropathologistes (la proportion estimée des tumeurs oligodendrocytaires au sein des gliomes varie selon l'expérience des neuropathologistes dans des

proportions considérables, de 5 % à 30 %) (Giannini et al., 2001). Plus encore que le manque de reproductibilité, c'est probablement le manque de représentativité de l'évolution clinique qui pose aujourd'hui problème.

TUMEURS DU TISSU NEUROEPITHELIAL

GLIOMES

- **Tumeurs astrocytaires :**
 - astrocytome pilocytique (grade I)
 - astrocytome diffus (grade II)
 - astrocytome anaplasique (grade III)
 - glioblastome (grade IV)
- **Tumeurs oligodendrogiales**
 - oligodendrogliomes (grade II)
 - oligodendrogliomes anaplasiques (grade III)
- **Gliomes mixtes :**
 - oligoastrocytomes
 - oligoastrocytomes anaplastique

AUTRES TUMEURS

- **Tumeurs épendymaires**
- **Tumeurs mixtes glio-neuronaux :**
 - gangliocytome, gangliogliome
 - tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique (DNET)

- **Tumeurs pinéales**

- **Tumeurs embryonnaires**

- medulloblastome
- tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET)

TUMEURS MENINGEES PRIMITIVES

- méningiome

LYMPHOME PRIMITIF DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

TUMEURS DE LA REGION SELLAIRE

- adénome et carcinome hypophysaire
- crâniopharyngiome

METASTASES INTRACRANIENNES

- cérébrales
- dures
- méningées

Tableau 5: Classification simplifiée des tumeurs cérébrales (OMS 2000).

D'autres classifications, telles que celle de Daumas Duport (Daumas-Duport et al., 2000), ont intégré de nouveaux critères de classification telle que la prise de contraste en IRM, afin de mieux refléter une réalité clinique sans pour autant être totalement satisfaisants (Daumas-Duport et al., 2005; Gilles et al., 2004). Ainsi, aucun marqueur prédictif ou diagnostique sur la pièce d'exérèse n'est à l'heure actuelle déterminant dans l'évaluation pronostique, et il n'est pas rare d'observer des tumeurs ayant des critères histologiques communs qui présentent des évolutions pathologiques variées.

3.1.2. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.

Les oligodendrogliomes (oligodendrogliomes et oligoastrocytomes mixtes) représentent 5 à 30 % de l'ensemble des gliomes (Giannini et al., 2001; Maiuri et al., 2006; Tews et al., 2006) et sont souvent sous-diagnostiqués (Nataf et al., 2005). Cette variabilité est souvent expliquée par la découverte récente de leur remarquable chimio-sensibilité qui a poussé les pathologistes à optimiser la recherche des composantes oligodendromateuses et donc à réévaluer le pourcentage des

oligodendrogliomes.

Ce type de tumeur se subdivise en deux groupes en fonction du degré de malignité observé. Toutefois, l'évolution classique de ces tumeurs implique une évolution du stade de malignité de grade II vers un grade III au cours du temps. Cette augmentation de la malignité des oligodendrogliomes est cependant très hétérogène quant à la durée nécessaire à cette modification. De plus, il n'existe à ce jour aucun critère de pronostic et les mécanismes mis en jeu restent à découvrir.

Ce manque de marqueurs pronostiques faisant le lien entre l'état du patient à l'instant « t » et son évolution clinique est un problème majeur dans la prise en charge des patients. La classification purement morphologique des oligodendrogliomes est insuffisante et souffre de la carence de marqueurs biologiques à visée diagnostique et pronostique. Il est donc important d'identifier des marqueurs, métaboliques (ou protéiques, ou encore génétiques, comme les délétions des régions chromosomiques 1p et 19q (Carrato-Monino and Ariza, 2007; Hartmann and von Deimling, 2005) marqueur de chimiosensibilité pour les oligodendrogliomes (Agulnik and Mason, 2006)) qui permettraient de discriminer les différents types de gliomes afin de développer des thérapies plus ciblées et par là même plus efficaces (Koschny et al., 2002; Ohgaki and Kleihues, 2005a, b).

L'intérêt de notre étude réside dans l'intégration de données issues du métabolisme tumoral afin de vérifier leur potentiel comme critère de gradation et de pronostic. Le métabolome des tumeurs cérébrales a été étudié par une technique RMN HRMAS, cette technique présentant, comme nous l'avons vu lors des chapitres précédents, l'avantage de nécessiter peu de matériel biologique et aucune préparation de celui-ci.

3.1.3. Populations et données cliniques

L'étude a porté sur 34 patients répartis en 10 oligodendrogliomes bas grade et 24 oligodendrogliomes haut grade. L'ensemble des données cliniques et techniques est résumé au sein du tableau ci-après (Tableau 6).

Type	Oligodendrogliomes bas grade	Oligodendrogliomes haut grade
Nombre	10	24
Age (\pm écart type)	48.5 \pm 19.6	44.6 \pm 12.0
Sexe	7H, 3F	17H, 7F
Masse des échantillons (\pm écart type)	23.3 \pm 5.3	23.8 \pm 6.3

Tableau 6: Récapitulatif des données cliniques de l'ensemble des échantillons analysés dans cette étude.

3.1.4. Résultats : Les oligodendrogliomes

Le premier modèle métabolique généré repose sur une analyse complète du profil métabolique des oligodendrogliomes de haut grade et de bas grade. Le groupe analysé est composé de 34 échantillons scindés en deux classes (oligodendrogliomes haut grade et oligodendrogliomes bas grade). L'hypothèse sous-jacente à la classification PLS-DA est que les différences anatomomorphologiques relevées par les pathologistes sont corrélées à des profils métaboliques distincts. Sur ces bases, le modèle obtenu est un modèle à 3 composantes PLS dont la validation par permutation circulaire ne permet pas de détecter une sur-modélisation. Comme le nombre de cas étudiés est limité, le modèle est validé à l'aide d'une technique circulaire de validation où chaque observation est successivement exclue du modèle et estimée par celui-ci. Ce processus est répété jusqu'à ce que chaque observation ait été exclue et estimée une fois. On appelle cette technique la technique du *Leave One Out* (LOO). Aucun cas d'erreur de classification n'a été observé pour les oligodendrogliomes de haut ou de bas grade.

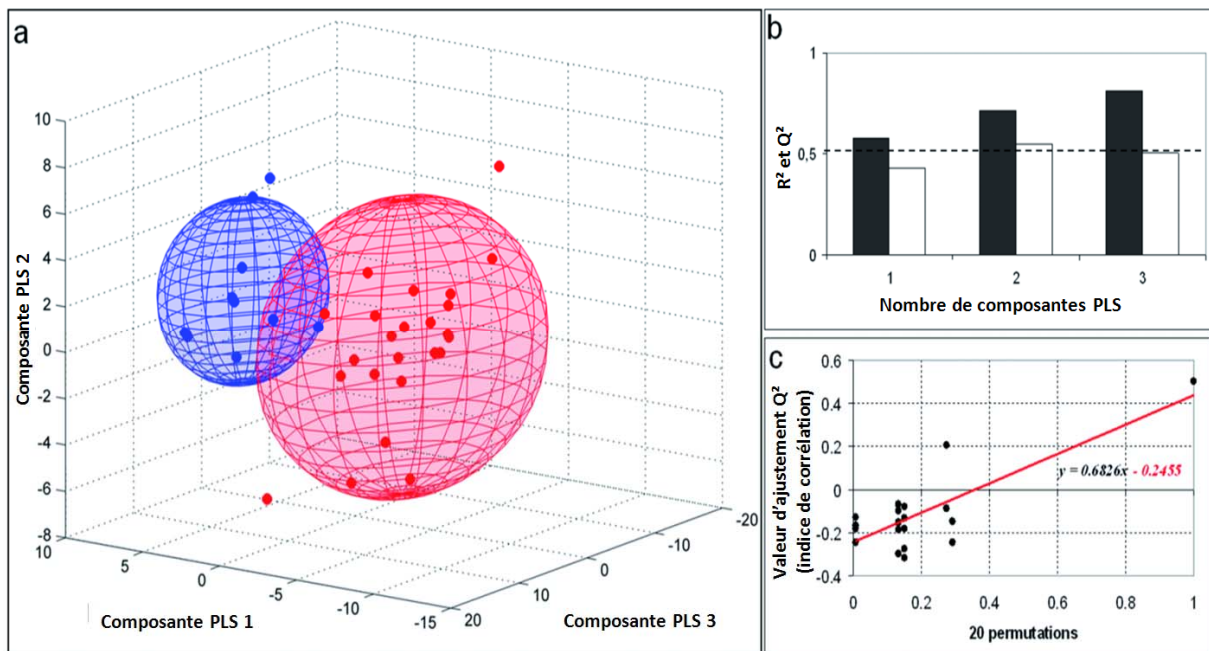


Figure 42: a) Classification PLS DA des oligodendrogliomes bas grade (bleu) et des oligodendrogliomes haut grade (rouge) (le critère de confiance de 95% est affiché en transparence) à partir du spectre global (fenêtre spectrale de 4.5ppm à 0.5ppm). Une différenciation claire est obtenue avec un faible recouvrement des volumes de confiance des oligodendrogliomes bas grade (volume bleu) et oligodendrogliomes haut grade (volume rouge).

b) Valeur statistique de validation du modèle PLS.

c) Mesure de la surmodélisation.

Le pourcentage de variabilité du jeu de données de départ explicité par ces 3 composantes

est de 81% (R^2) et le critère de confiance lié à cette classification est de 0.5 (Figure 42). Il apparaît donc que le modèle généré sur des bases métaboliques est représentatif de la classification établie par l'anatomie pathologique. Un examen détaillé des composantes PLS va permettre de déterminer un ensemble de métabolites dont le poids statistique est important pour cette première analyse globale. Ainsi cette classification peut être exprimée en termes de métabolites en fonction de l'influence de chaque variable sur l'établissement du modèle (Figure 43).

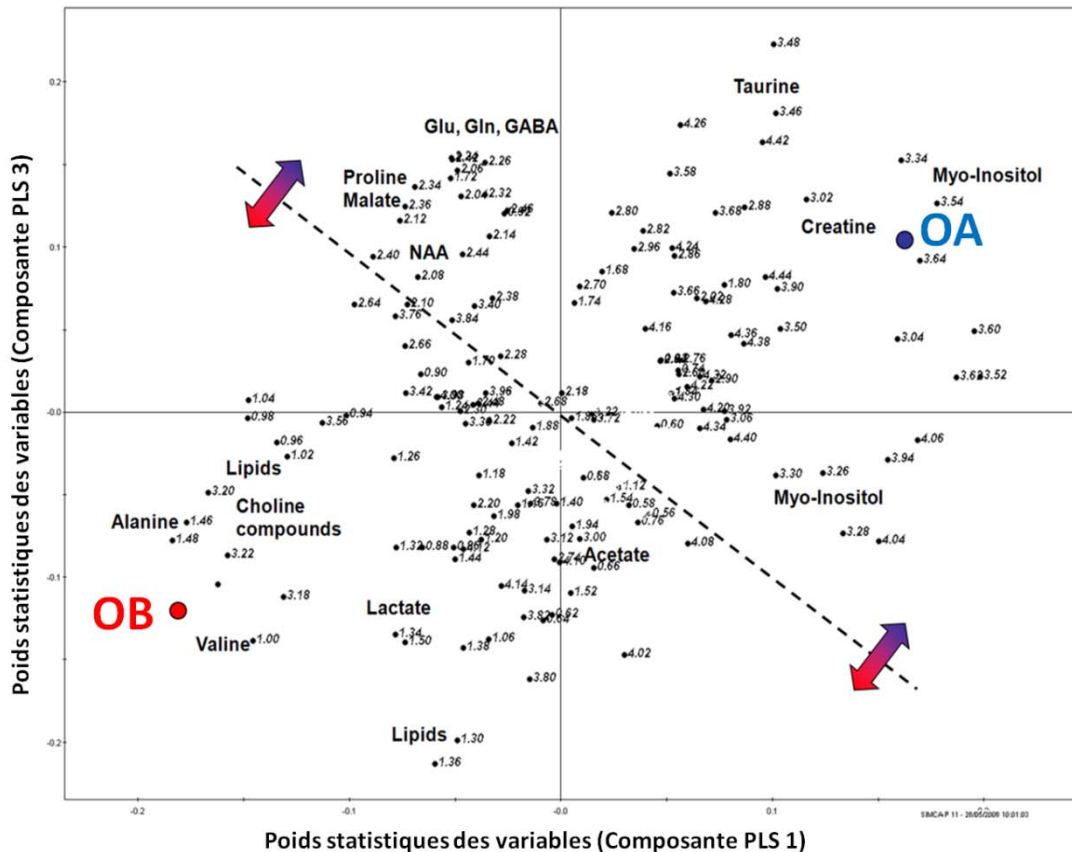


Figure 43 : Poids statistique des variables lors de l'établissement du modèle PLS: Oligodendrogliomes bas grade (bleu) comparativement aux Oligodendrogliomes haut grade (rouge). La différence entre les oligodendrogliomes bas grade (LGO) et oligodendrogliomes haut grade (HGO) est ici affichée en termes de variables. Les variables les plus influentes sont l'alanine, les lipides, les composés liés à la choline et l'acétate pour les tumeurs de haut grade alors que ce sont le myo-inositol, la créatine, le glutamate (Glu), la glutamine (Gln), le GABA et la glycine pour les bas grades.

En ordre d'importance décroissante nous trouvons : l'alanine, les lipides et la valine, les composés associés à la choline (tCho), la proline, le myo-inositol et la taurine, la glutamine, le glutamate, le GABA et le malate, le N-acétyl-aspartate, l'acétate et la créatine. A l'énoncé de ces quelques métabolites détectés comme étant les plus influents lors de la classification, certains sont largement établis comme étant liés à des phénomènes oncologiques et utilisés classiquement lors d'analyse *in-vivo* (notamment choline, créatine et N-acétyl-aspartate).

Ainsi l'ensemble des composés associés à la choline est lié à une activité accrue du *turn-over*

membranaire dû à la croissance de la tumeur. Il a été clairement établi qu'une élévation de la concentration de l'ensemble de ces composés correspond à la phase de prolifération de la tumeur avec la mise en évidence d'une corrélation positive en l'indice de prolifération Ki-67 et l'augmentation de la concentration en choline (Tamiya et al., 2000). De manière analogue, le N-acétyl-aspartate est lié à la présence de neurones au sein du tissu analysé. La croissance d'une tumeur implique une diminution de la concentration en N-acétyl-aspartate due au caractère infiltrant de celle-ci. Ces résultats sont notamment en accord avec les observations faites par Peeling (Peeling and Sutherland, 1992). Les lipides sont eux aussi détectés comme présentant une concentration accrue dans les cas des tumeurs de plus haut grades, observation cohérente en accord avec nombre de références bibliographiques (Kuesel et al., 1994 ; McKnight, 2004). Cette augmentation a ainsi souvent été mise en corrélation avec une forte présence de nécrose (Cheng et al., 2000b; Podo et al., 1987).

Un examen de l'ensemble des autres métabolites influents dans l'établissement de ce premier modèle métabolique laisse apparaître une forte prédominance du métabolisme des acides aminés. Il est intéressant de se focaliser principalement sur le métabolisme de ces composés afin de vérifier leur caractère discriminant entre les oligodendrogliomes de haut grade et de bas grade et de déterminer sur quelle base métabolique s'effectue cette classification.

Afin de valider leur caractère discriminatoire un nouveau modèle métabolique a été établi sur un jeu de données restreint en termes d'informations métaboliques. Pour ce faire, seules les informations comprises dans les fenêtres spectrales 3.95 et 1.40 ppm ainsi que 1.30 et 0.95 ppm ont été utilisées lors de l'analyse PLS.

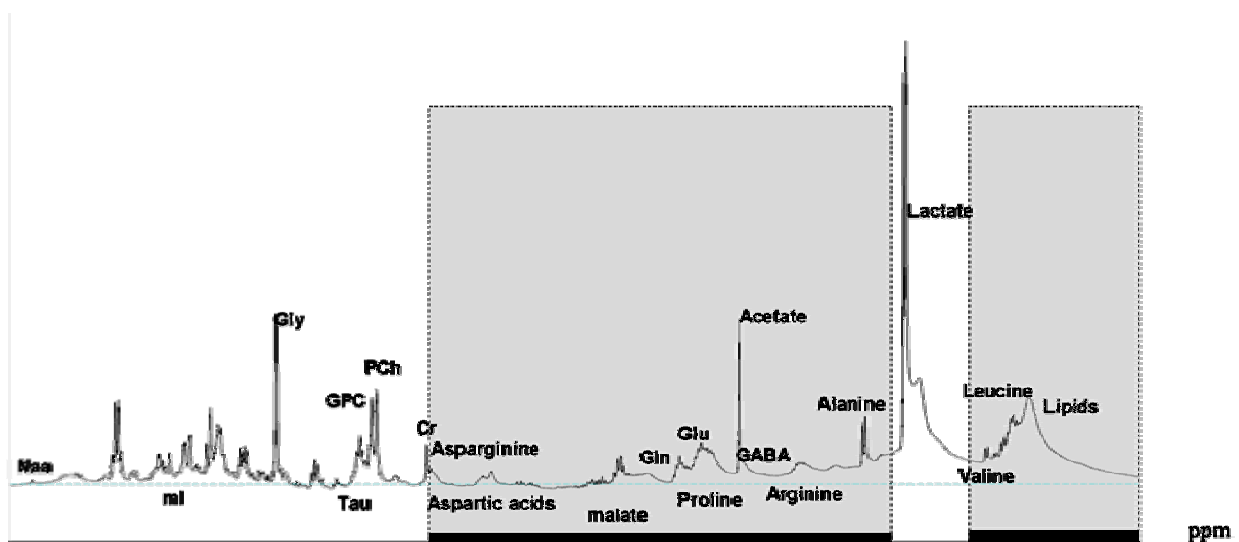


Figure 44: Spectre 1D. Détermination du jeu de données contraint pour l'analyse métabolique focalisée sur le métabolisme des acides aminés. Naa : N-acétyl-aspartate ; ml : myo inositol ; Gly : glycine ; Tau : taurine ; GPC ; glycérophosphocholine ; PCh : phosphocholine ; Cr : créatine ; Gln : glutamine ; Glu : glutamate.

La fréquence prédominante du lactate (1.33ppm) a été exclue de l'analyse compte tenu du lien établi avec la progression tumorale sans que pour autant un caractère discriminatoire ait pu y être attribué. Afin de limiter la contribution des signaux des lipides et de permettre ainsi une attribution plus sûre des fréquences de résonance analysées, les données RMN HRMAS sont issues d'une acquisition réalisée à l'aide d'une séquence CPMG (cf. chapitre II).

La Figure 44 résume ces différents points. La partie grisée sur le spectre 1D correspond à l'intervalle d'analyse sélectionnée. Une attribution partielle a été réalisée sur la figure afin de mettre en évidence les métabolites d'importance sélectionnés dans la nouvelle analyse et ceux exclus de celle-ci. Il apparaît ainsi clairement que le nouveau modèle PLS de classification établi se focalise principalement sur métabolisme des acides aminés.

Comme précédemment, la classification établie par anatomie pathologique est utilisée comme *a priori* au modèle. Sur ces bases, le modèle obtenu est un modèle à 4 composantes PLS dont la validation par LOO ne permet pas de détecter une sur-modélisation. Le pourcentage de variabilité du jeu de données de départ explicité par ces trois composantes est de 81% (R^2) et le critère de confiance lié à cette classification est de 0.48 (Figure 45). Tout comme pour l'analyse du profil métabolique global il apparaît que le modèle ainsi généré sur des bases métaboliques soit représentatif de la classification établie par l'anatomie pathologique. Compte tenu des contraintes posées lors de l'établissement du modèle, cette classification est fortement corrélée à une modification du cycle métabolique lié à la production des acides aminés.

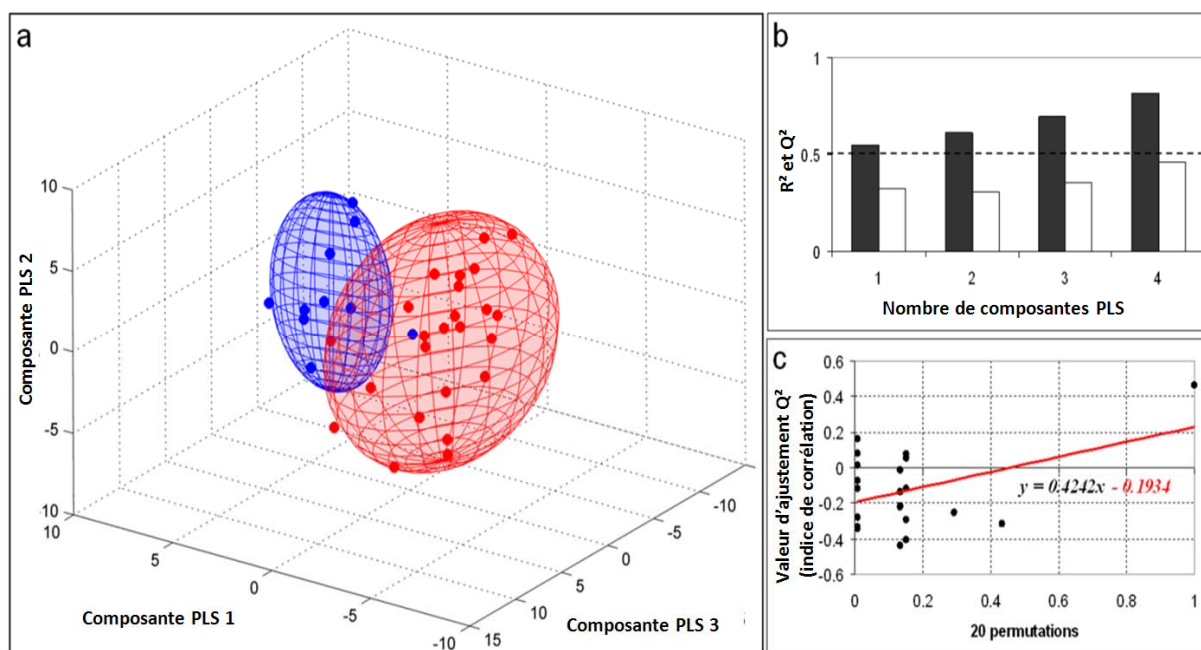


Figure 45: a) Analyse PLS partielle : Classification PLS DA des oligodendrogliomes bas grade (bleu) et des oligodendrogliomes haut grade (rouge) (le critère de confiance de 95% est affiché en transparence) obtenu à partir du spectre HRMAS partiel. Les résultats sont similaires à ceux obtenus lors de l'analyse du spectre global. b) Valeur statistique de validation du modèle PLS. c) Mesure de la surmodélisation.

Or l'ensemble de ces métabolites peut être relié à un cycle métabolique bien connu qui est le cycle de Krebs (Figure 46). Ces observations confirment que la distinction entre oligodendroglomes haut grade et bas grade repose principalement sur le métabolisme des acides aminés.

Dans le cas des oligodendroglomes de haut grade, nous observons une production accrue d'alanine et de valine liée à la voie métabolique anaérobie, alors que pour les oligodendroglomes de bas grade, c'est une production supérieure de proline, de glutamate, de glutamine, de GABA et d'aspartate, liée au cycle de Krebs qui est détectée. L'ajout des informations complémentaires liées aux lipides (présence de nécrose), des composés tCho (*turn over* membranaire) et du myo inositol (métabolisme glial) renforce néanmoins ce modèle.

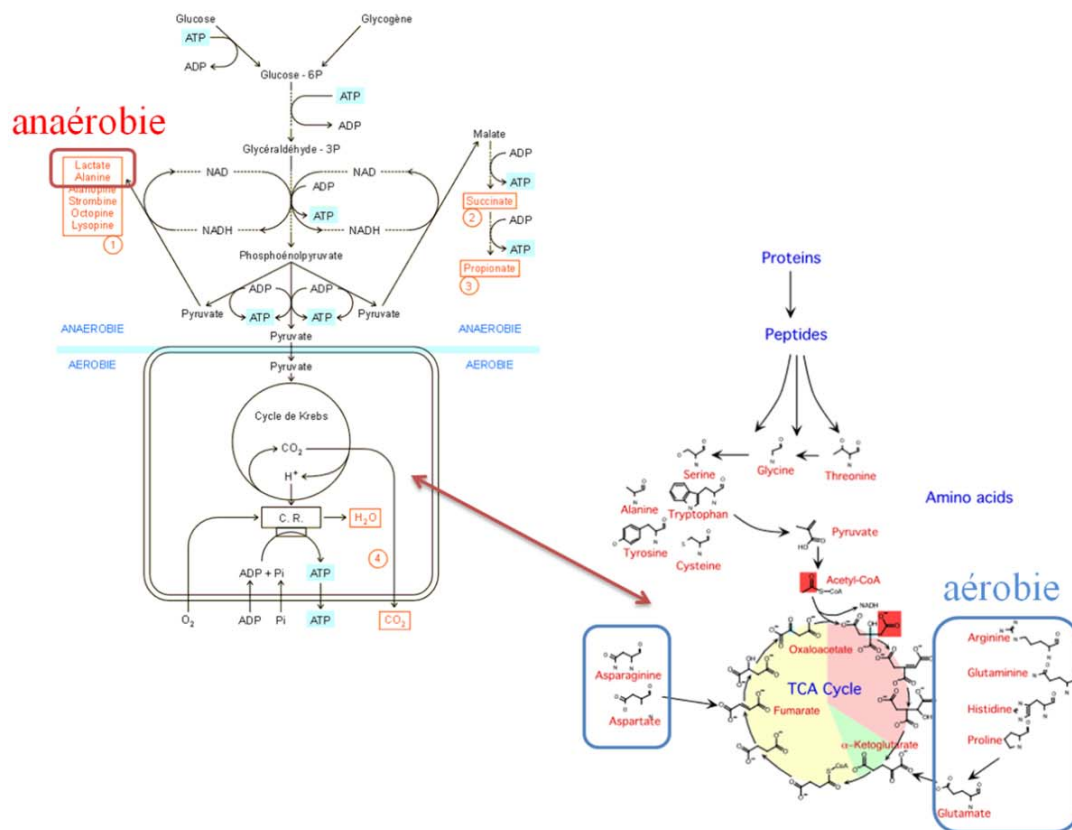


Figure 46 : Modèle simplifié du cycle de Krebs : différences de productions métaboliques liées aux conditions d'hypoxie des tissus.(source : <http://www.bct.wise.edu>)

3.1.5. Conclusions : le modèle métabolique « hypoxie »

L'hypoxie tumorale est un problème thérapeutique majeur dans le traitement des cancers car elle rend les tumeurs solides plus résistantes aux radiations ionisantes (Moeller et al., 2007). Il

apparaît à la lumière de résultats récents, issus de travaux expérimentaux et de données cliniques, que l'absence intratumorale d'oxygène peut moduler le degré de malignité d'un néoplasme (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2006 ; Semenza, 2000).

Un ensemble de mécanismes complexes entraîne la stabilisation de l'hypoxia-inducible factor (HIF)⁷ (Clottes, 2005 ; Lauzier et al., 2006). L'activation de HIF sous hypoxie a comme conséquence le déclenchement de l'expression de nombreux gènes pour que les cellules s'adaptent au manque d'oxygène. L'angiogénèse est le mécanisme principal mis en œuvre pour suppléer à la demande en oxygène nécessaire au maintien du métabolisme. Ainsi l'hypoxie stimule l'expansion et le remodelage de la vascularisation existante pour augmenter le débit sanguin vers les tissus privés d'oxygène. Aujourd'hui il est communément admis que les tumeurs se développent préférentiellement dans des régions hypoxiques entraînant potentiellement un lien entre le grade de malignité et le degré d'hypoxie. La présence de régions hypoxiques au sein des tumeurs pourrait ainsi être associée à un phénotype tumoral plus agressif et à un pronostic défavorable pour le patient. De plus, l'hypoxie tumorale est corrélée à une résistance à la radiothérapie (Hockel et al., 1996 ; Hockel et al., 1999 ; Hockel and Vaupel, 2001) et à la chimiothérapie (Comerford et al., 2002).

Les travaux menés par application de la RMN HRMAS au tissu tumoral ont permis de montrer que cette technique était sensible à la modification des voies métaboliques induites par les conditions d'hypoxie liée à la progression tumorale. Il semble donc que l'application de la RMN HRMAS puisse apporter des informations complémentaires à la classification anatomo-pathologique, et potentiellement améliorer le traitement des cas aujourd'hui considérés comme atypiques. De plus, les liens qui semblent se dessiner entre la classification métabolique (associée au degré d'hypoxie des tissus) et le pronostic clinique à partir des résultats préliminaires de notre étude font écho aux résultats énumérés précédemment.

3.1.6. Elargissements aux glioblastomes et oligodendrogliomes intermédiaires

Afin de confronter le modèle métabolique ainsi obtenu à un nouveau groupe de patients, un jeu de données composé de 6 cas intermédiaires d'oligodendrogliomes (bas grade en phase de transition) et de 30 glioblastomes est introduit dans le modèle précédent, bâti principalement sur le métabolisme des acides aminés.

⁷ Ce facteur de transcription stimule l'expression d'une multitude de gènes permettant une adaptation de la cellule à l'hypoxie. L'activation de la voie de HIF est régulée à de nombreux niveaux, de façon à ce que la réponse à l'hypoxie soit adéquate et efficace. Le changement de concentration en oxygène intracellulaire est le stimulus principal qui gouverne la régulation de l'activité de HIF, mais il existe des facteurs non liés à l'hypoxie qui peuvent également la stimuler. Ainsi, certains facteurs de croissance, comme l'insuline, l'epidermal growth factor (EGF) et le PDGF, mais aussi des cytokines, comme le tumor necrosis factor- α et l'interleukine 1 β , peuvent augmenter l'expression de la protéine HIF1 α . Cela souligne l'importance de l'activation de HIF pendant les processus pathologiques de l'inflammation et de la tumorigénèse.

Type	Oligodendrogliomes intermédiaires	Glioblastomes
Nombre	6	30
Age (\pm écart type)	37.7 \pm 14.2	51.3 \pm 19.6
Sexe	5H, 1F	12H, 18F
Masse des échantillons (\pm écart type)	25.8 \pm 9.7	23.0 \pm 5.7

Tableau 7: Récapitulatif des données cliniques de l'ensemble des échantillons analysés dans cette étude.

Les glioblastomes sont les gliomes ayant le plus haut grade de malignité, avec une durée de survie généralement comprise entre un et vingt-quatre mois, avec une médiane de de survie à six mois. Cependant, certains cas de glioblastomes présentent des durées de survie largement supérieures à ces moyennes, et leur évolution est alors qualifiée d'atypique. Il paraît dès lors intéressant de confronter ces tumeurs au modèle métabolique précédent afin de vérifier s'il existe un fondement métabolique à ces évolutions pathologiques différentes.

Parallèlement, un groupe de six cas d'oligodendrogliomes bas grade en phase de transition vers des oligodendrogliomes haut grade est inclus dans ce modèle. Il apparaît intéressant de vérifier si la transition d'un état bas grade vers un état haut grade trouve son reflet au niveau de la distribution métabolique générée précédemment. L'hypothèse soulevée par l'établissement du modèle "hypoxie" est que la classification métabolique ainsi obtenue est un reflet fidèle et fiable de la gradation de malignité des gliomes.

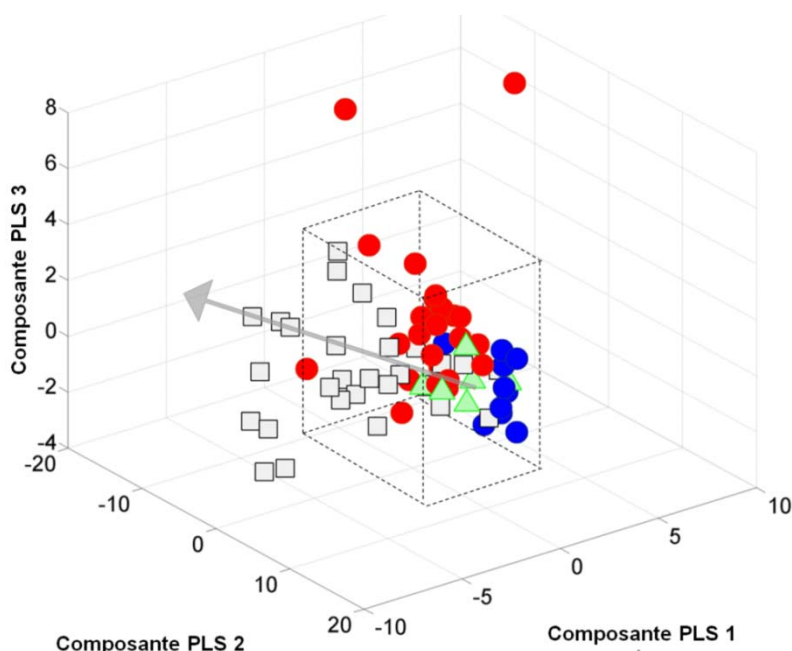


Figure 47 : Classification des oligodendrogliomes bas grade (points bleus), haut grade (points rouges), intermédiaires (triangles verts) et des glioblastomes (carrés gris): La direction apparente d'augmentation du grade de malignité est représentée par le vecteur grisé sur la figure.

La Figure 47 est obtenue en introduisant les données métaboliques des glioblastomes et des oligodendrogliomes intermédiaires directement dans l'espace tridimensionnel formé par les composantes PLS 1, 2 et 3 du modèle établi précédemment. Les composantes PLS 1 à 3, bien que ne reflétant pas le modèle optimal précédent (à 4 composantes) permettent de mettre en évidence la présence d'un gradient de « malignité » sous-jacent à ces trois composantes. En effet la représentation 3D montre clairement la présence d'un vecteur préférentiel reliant l'ensemble des points formés par les oligodendrogliomes bas grade (points bleus) à l'ensemble de points formés par les glioblastomes (carrés gris), en passant respectivement par les oligodendrogliomes intermédiaires (triangles verts) et les oligodendrogliomes haut grade (points rouge).

Cette vue, quoique grossière compte tenu du nombre non négligeable de cas atypiques, laisse sous entendre que la classification basée sur des critères purement métaboliques, qui plus est, limitée au métabolisme des acides aminés relié au degré d'hypoxie des tumeurs, est en bonne adéquation avec la classification anatomo-pathologique.

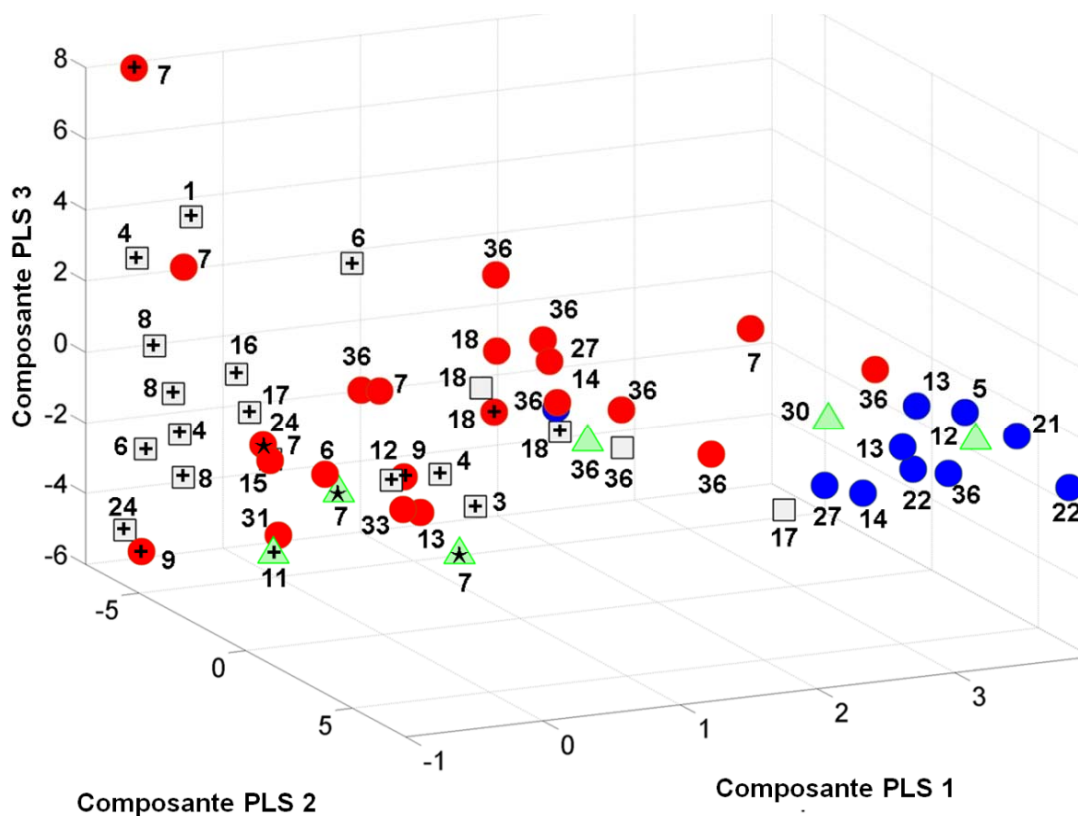


Figure 48: Distribution spatiale dans un espace 3D des OA, OB, O int et GLIOBASTOMES en fonction des 3 premières composantes du modèle PLS DA. Les cas marqués par un « + » sont des cas de patients décédés, les cas marqués par une « * » sont des cas de patients en récidence, le chiffre indiqué pour chaque cas correspond au temps écoulé depuis le diagnostic initial de la pathologie (en mois).

En regardant plus en détails la Figure 48, zoom du cadre en pointillé de la Figure 47, et en

comparant la classification métabolique obtenue avec les données cliniques de ces patients, il apparaît que les cas « atypiques » cités précédemment sont en réalité des cas dont l'évolution clinique puisse expliquer le positionnement. En effet, la durée moyenne de survie d'un patient atteint d'un glioblastome est de huit à douze mois. On constate même des durées de survie largement supérieures à la moyenne. L'évolution clinique est alors qualifiée d'atypique par rapport au diagnostic histopathologique. L'ensemble de ces cas, dont la durée de survie est supérieure à la moyenne, est néanmoins classifié comme des gliomes de plus bas grade (oligodendrogliomes haut grade voire même oligodendrogliomes de bas grade). Cette observation met en avant une meilleure adéquation entre le pronostic clinique et la classification métabolique des gliomes.

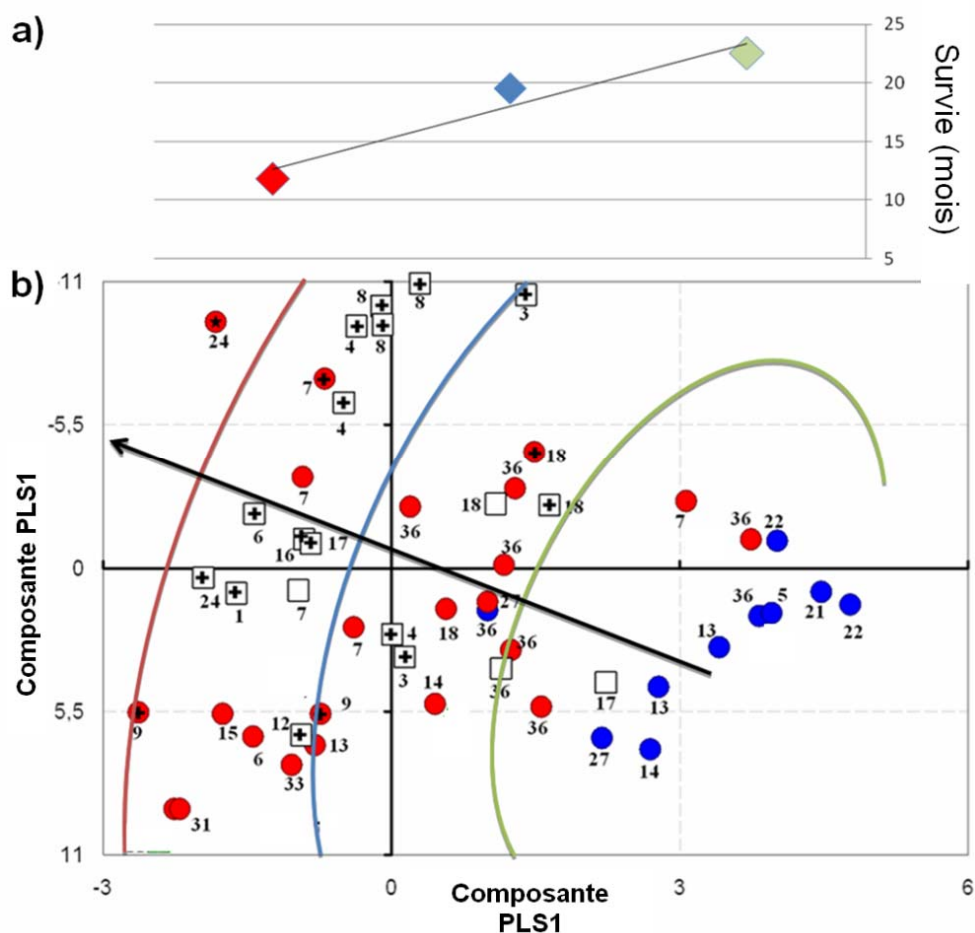


Figure 49 : Modèle PLS DA de classification des oligodendrogliomes (haut grade, bas grade et intermédiaire) et des glioblastomes.

Durée moyenne de survie (en mois) en fonction du positionnement dans l'espace PLS DA 2D.

Distribution issue de la classification PLS DA en 2D à l'aide des composantes PLS DA 1 et 2. Les intervalles représentés en surimpression sur la figure sont calculés de façon à répartir les cas en groupes similaires pour le calcul de la durée moyenne de survie.

En superposant les données cliniques (survie des patients) et la classification métabolique obtenue dans un espace à deux dimensions (composante PLS 1 et 2), et en divisant l'espace sous

forme de surfaces correspondant à un nombre similaire d'échantillons, on obtient la représentation de la Figure 49. Il apparaît que la distribution spatiale issue de la classification PLS-DA est liée à la classification anatomo-pathologique classique, mais qu'en plus celle-ci peut expliciter les évolutions cliniques atypiques d'un certain nombre de cas compte tenu de ce diagnostic initial. Les bases métaboliques liées à cette classification mettent en jeu un processus d'hypoxie du tissu cancéreux analysé.

3.1.7. ELARGISSEMENT A L'ENSEMBLE DES TUMEURS CEREBRALES

Suite à cette première étude focalisée sur les oligodendrogliomes et plus généralement sur le grade de malignité des gliomes, il est apparu comme essentiel de déterminer les différences métaboliques liées au caractère cancéreux du tissu.

Pour ce faire, la population étudiée a été élargie à un ensemble plus important de tumeurs incluant les cas précédemment analysés (oligodendrogliomes et glioblastomes) mais aussi d'autres types de gliomes comme des astrocytomes pilocytique ainsi que des tumeurs non gliales comme des neurinomes ou des méningiomes.

Enfin, afin de pouvoir mettre en évidence le métabolisme lié au processus oncologique, du tissu cérébral non tumoral a lui aussi été analysé par RMN HRMAS. L'obtention du tissu non tumoral a été rendue possible par l'accès à des pièces opératoires issues de patients souffrants de sclérose de la corne d'Amon⁸. Les caractéristiques histopathologique de ces échantillons se sont révélées normales et le tissu a ainsi pu servir de contrôle sain dans le cadre de notre étude. Il est important de noter que cette problématique de tissu contrôle est une problématique qui ne se pose pas dans le cas d'étude *in-vivo* où c'est traditionnellement le tissu contra-latéral à la lésion qui sert de région contrôle.

3.1.7.1. POPULATION.

L'étude a porté sur quatre-vingt-dix-neuf patients répartis en onze groupes tumoraux et un groupe contrôle. L'ensemble des données est résumé au sein du Tableau 8. Il apparaît au vu de cette distribution que seuls huit groupes (sept tumoraux, un contrôle) pourront être analysés sur une base statistique. Les cas dont la population est actuellement trop limitée seront abordés d'un point de vue comparatif.

⁸ Sclérose de l'hippocampe.

Type	SCL	NEU	MEN	MED	AD	DNET	GG	AP	OA	OB	O int	GBM	Tot
Nombre	6	4	10	1	2	1	1	4	10	24	6	30	99

Tableau 8: Récapitulatif des données cliniques de l'ensemble des échantillons analysés dans cette étude. Echantillon contrôle de tissu non tumoral (SCL), neurinomes (NEU), méningiomes (MEN), Medulloblastome (MED), Adénomes de l'hypophyse (AD), neuroepithéliale dysembryoplasique (DNET), gangliogliome (GG), astrocytome pilocytique (AP), oligodendrogliomes haut grade (OB) bas grade (OA) et en oligodendrogliomes en phase de transition (O int) ainsi que glioblastomes (GBM).

3.1.7.4. MODELE METABOLIQUE D'HYPOXIE ET AUTRES TYPES TUMORAUX.

A) LES TUMEURS DE BAS GRADE : ASTROCYTOMES PILOCYTIQUES ET TUMEUR NEUROEPITHELIALE DYSEMBRYOPLASIQUE.

L'astrocytome pilocytique est une tumeur qui se voit le plus souvent chez l'enfant et du jeune adulte, de bon pronostic, ayant des caractéristiques histologiques bien définies permettant un diagnostic dans la plupart des cas. Il se développe préférentiellement dans le cervelet, mais se rencontre aussi dans les nerfs et le chiasma optique, le tronc cérébral, le thalamus ou les hémisphères cérébraux. Lorsque la localisation le permet, le traitement est exclusivement chirurgical avec un excellent pronostic. Classifié en tant que tumeur de grade I selon la classification OMS

La tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique ou DNET (*Dysembryoplastie Neuroepithelial Tumor*) est de description relativement récente (Daumas-Duport et al., 1988) d'aspect histologique bénin. Cette tumeur est rare et souvent découverte car elle provoque la survenue de crise d'épilepsie chez le patient.

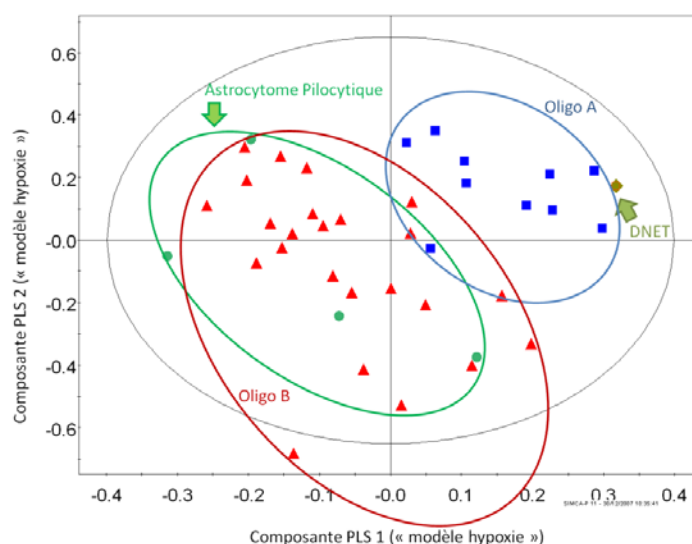


Figure 50 : Classification sur une base métabolique, à partir du modèle PLS DA d'hypoxie établie précédemment. Les cas d'astrocytomes pilocytiques présentent une distribution diffuse dans l'espace 2D du modèle, principalement classifiée comme proche des oligodendrogliomes de haut grade. Le cas de DNET se situe quant à lui à l'extrémité de la distribution, proche des cas d'oligodendrogliomes de bas grade, en accord avec le caractère bénin de la pathologie.

Bien que les astrocytomes pilocytiques soient de bon pronostic, leur classification métabolique est proche de celle des oligodendrogliomes de haut grade sur la base du modèle PLS entre les oligodendrogliomes de bas grade et oligodendrogliomes de haut grade. Ainsi les cas d'astrocytomes pilocytiques étudié par RMN HRMAS présentent un métabolisme des acides aminés proche de celui des oligodendrogliomes de haut grade, caractérisé par une atteinte hypoxique.

A notre connaissance seule une étude datant de 2002 (Tzika et al., 2002) a cherché à analyser le métabolome sous-jacent à un astrocytome pilocytique par RMN HRMAS. Deux cas ont ainsi pu être analysés et, malheureusement, les résultats de ces deux cas ne sont pas ou peu abordés dans les résultats et conclusions de l'article, ne permettant pas de comparer nos observations. De plus, l'étude de Tzika porte exclusivement sur l'étude de tumeurs cérébrales de l'enfant, ce qui n'est pas le cas des oligodendrogliomes qui nous servent de références. Dans une étude plus ancienne de J.H. Hwang, menée par SRM *in vivo*, les auteurs décrivent les astrocytomes pilocytiques comme des tumeurs ayant un fort taux de lactate dont l'origine biochimique n'est pas certaine, mais les hypothèses émises font principalement état d'une altération de l'oxygénation (problème d'apport en oxygène, glycolyse anaérobie). Ces observations sont en accord avec nos observations liées au modèle d'hypoxie établi sur les oligodendrogliomes (Hwang et al., 1998). De plus, K.E. Warren, dans un article de 1994, décrit le profil métabolique des astrocytomes pilocytiques comme proche de celui des tumeurs plus agressives avec notamment une forte concentration en lipides, lactate et choline, ainsi qu'une perte en N-acétyl-aspartate et créatine, suggérant un néoplasme hypermétabolique (Warren, 2004). Ces observations sont ainsi à mettre en parallèle avec les données issues de la neuroimagerie montrant les astrocytomes pilocytique comme une tumeur fixant les agents de contraste en IRM (tout comme les tumeurs agressives) ou fixant fortement le ¹⁸F-FDG en imagerie PET (Fulham et al., 1993).

En comparaison, la position prise par le cas de DNET étudié est en adéquation avec le caractère jugé bénin de la pathologie. Les travaux récents de Bulakbasi (Bulakbasi et al., 2007) en SRM *in vivo* sont en accord avec ces observations, ne relevant que peu de variations métaboliques entre le tissu sain contra-latéral et la tumeur, avec des variations en N-acétyl-aspartate/choline (diminution), N-acétyl-aspartate/créatine (diminution), N-acétyl-aspartate/choline + créatine (diminution) et choline/créatine (augmentation) non significatives statistiquement. Ces observations rapprochent, d'un point de vue métabolique, le tissu de DNET d'un tissu sain ou de tissus tumoraux avec un stade de malignité faible (oligodendrogliomes de bas grade) conformément à ce que nous observons.

B) MENINGIOMES.

Les méningiomes sont des tumeurs généralement bénignes, se développant aux dépens de l'arachnoïde. Un méningiome survient classiquement entre 20 et 60 ans et forme une tumeur bien délimitée, attachée à la dure-mère. Son évolution est lente et il repousse les tissus cérébraux sous-jacents sans pour autant les infiltrer.

La classification des méningiomes par le modèle métabolique issu de la comparaison des oligodendrogliomes bas grade et haut grade situe ceux-ci comme étant proches des tumeurs de plus haut grade. Cette interprétation est cependant majoritairement liée à la présence d'alanine au sein des méningiomes (Cho et al., 2003 ; Florian et al., 1995b ; Tugnoli et al., 2006b), ce métabolite étant le métabolite le plus influant dans le modèle métabolique lié à l'hypoxie (Figure 43). Il est intéressant de noter que la présence d'alanine au sein des méningiomes n'est probablement pas exclusivement liée à ce métabolisme hypoxique car la présence d'alanine est caractéristique des cellules méningiales saines et que cette caractéristique est maintenue lors de la transformation néoplasique des méninges (Florian et al., 1995b ; Tugnoli et al., 2006b), ces deux publications faisant référence à l'étude du métabolome des méningiomes par RMN, respectivement par RMN des liquides suite à extraction PCA, et par RMN HRMAS.

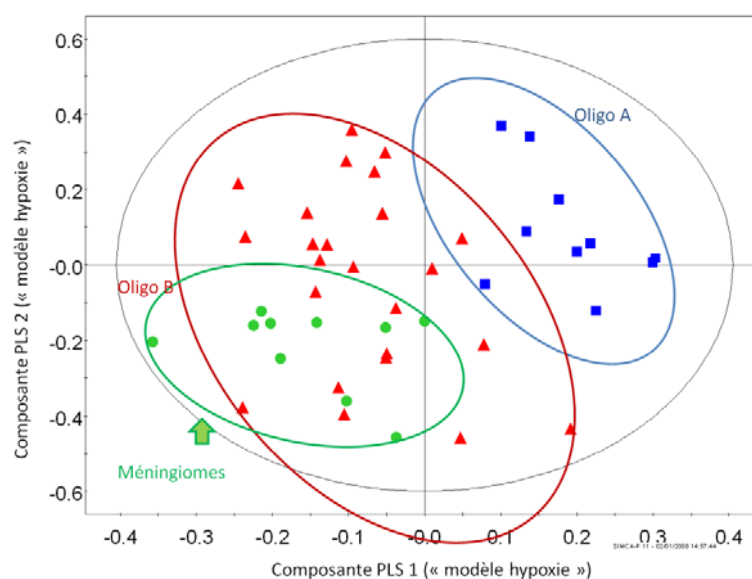


Figure 51 : Classification sur une base métabolique, à partir du modèle PLS DA d'hypoxie établie précédemment. Les cas de méningiomes présentent une distribution dans l'espace 2D du modèle, située à l'extrémité des cas d'oligodendrogliomes de haut grade.

De plus, cette classification « atypique » quant au caractère bénin estimé des méningiomes est renforcée par l'absence de N-acétyl-aspartate liée à la nature du tissu souche de la tumeur (Moller-Hartmann et al., 2002).

C) TISSU NON TUMORAL.

L'introduction du tissu non tumoral dans le modèle PLS établi à partir de la population d'oligodendrogliomes ne permet pas de différencier ceux-ci des oligodendrogliomes de bas grade (Figure 52).

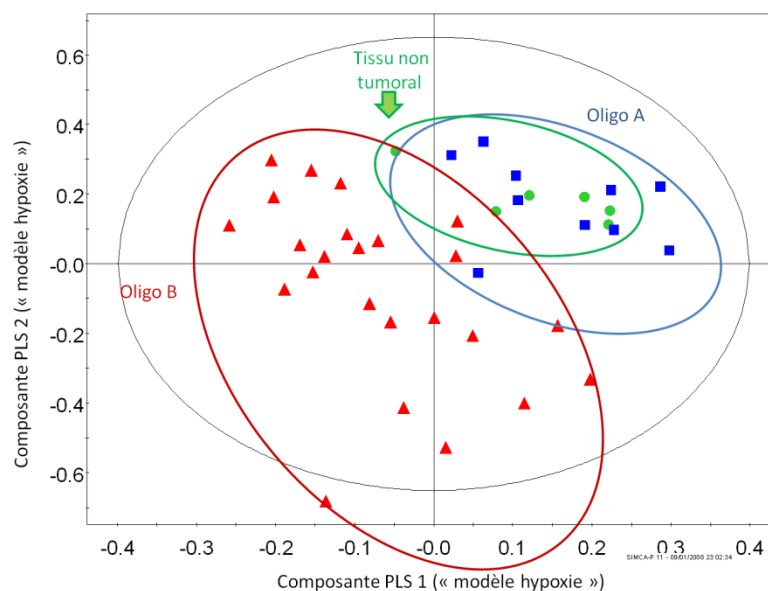


Figure 52 : Classification de tissus non cancéreux sur une base métabolique, à partir du modèle PLS DA d'hypoxie établie précédemment.

Il apparaît important de rapprocher cette observation du fait que le tissu non tumoral n'est pas du tissu sain, bien que celui-ci soit classifié comme tel lors de l'analyse par anatomie pathologie, mais du tissu prélevé sur des patients épileptiques avec une sclérose de la corne d'Amon. Néanmoins, sur la base du modèle hypoxie, il ne se différencie pas des oligodendrogliomes bas grade. Il est difficile d'interpréter cette observation, sur la base du modèle lié à l'hypoxie. En effet, il est impossible de définir si ce sont les oligodendrogliomes qui ne sont pas ou peu soumis à l'hypoxie, ou si c'est le fait que le tissu soit non tumoral et pas réellement sain qui induit une légère hypoxie de celui-ci.

C'est pourquoi il paraît intéressant d'analyser le tissu non tumoral, par rapport aux tissus des divers types de tumeurs, sur la base des profils métaboliques globaux.

3.1.7.3. COMPARATIF TISSU NON TUMORAL ET TISSU TUMORAL

Pour ce faire, nous allons effectuer une analyse PLS ciblée en limitant les sous-groupes pour chaque analyse afin de réaliser des analyses binaires. De plus, nous nous limiterons aux sous-groupes tumoraux correspondant aux gliomes, à savoir : les glioblastomes et du tissu non tumoral (i), les oligodendrogliomes et le tissu non tumoral (ii) et les astrocytomes pilocytiques et le tissu non

tumoral (iii). Les trois modèles, générés à partir de l'ensemble des gliomes et du tissu non tumoral, montrent des contributions métaboliques relativement proches (Figure 53).

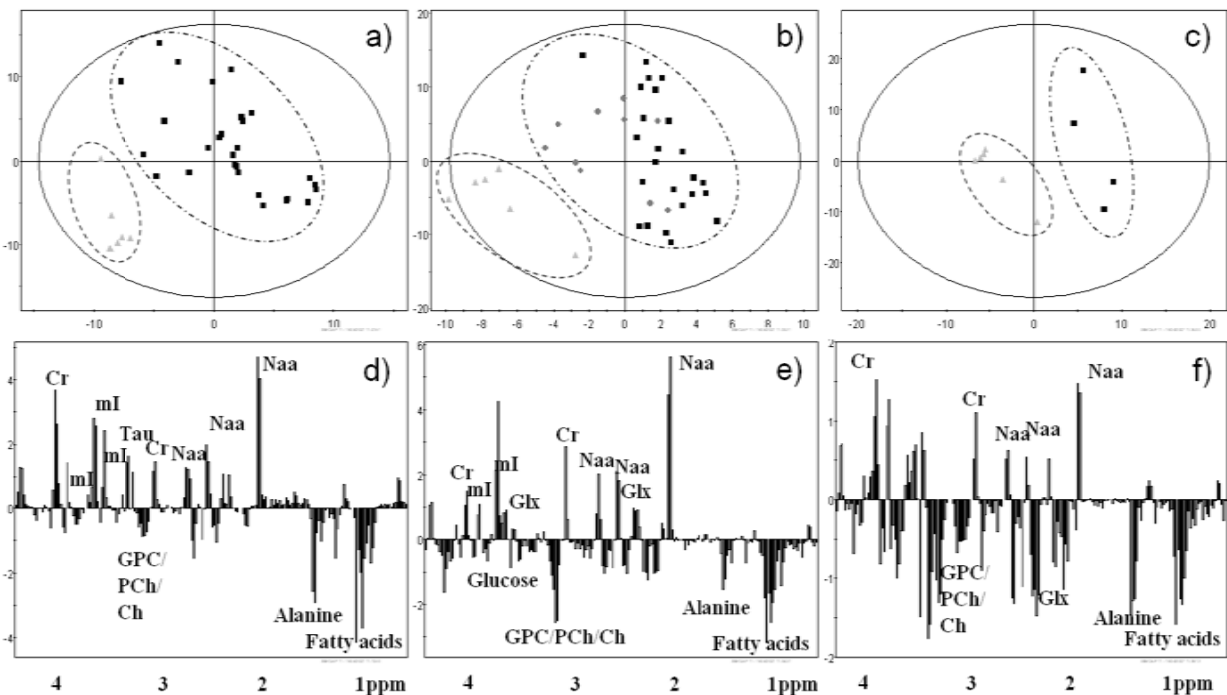


Figure 53: Analyse comparative du tissu sain par rapport au tissu tumoral des gliomes :

a) Classification PLS DA générée à partir des glioblastomes et du tissu sain. Sur la base des informations métaboliques la classification obtenue est probante. La variance R^2 et l'erreur d'estimation du modèle sont minimales pour un modèle à 3 composantes PLS. 87% de la variance totale des données spectrales X sont explicitées par ce modèle et la valeur d'estimation du modèle est de 55% ($Q^2=0.55$). En regardant dans le détail la classification obtenue, il apparaît que les cas de glioblastomes métaboliquement les plus proches des cas de tissus sains sont des cas présentant une évolution clinique notée comme atypique avec une durée de survie proche, voire supérieure à 36 mois.

b) Classification PLS DA générée à partir des oligodendrogliomes et du tissu sain. Sur la base des informations métaboliques, la classification obtenue est probante. La variance R^2 et l'erreur d'estimation du modèle sont minimales pour un modèle à 3 composantes PLS. 76% de la variance totale des données spectrales X sont explicitées par ce modèle et la valeur d'estimation du modèle est de 50% ($Q^2=0.50$). Ce modèle sera discuté plus en détail Figure 54.

c) Classification PLS DA générée à partir des AP et du tissu sain. Sur la base des informations métaboliques la classification obtenue est probante. La variance R^2 et l'erreur d'estimation du modèle sont minimales pour un modèle à 2 composantes PLS. 95% de la variance totale des données spectrales X sont explicitées par ce modèle et la valeur d'estimation du modèle est de 64% ($Q^2=0.64$).

d) Contribution métabolique du tissu sain au modèle de classification PLS DA généré entre les glioblastomes et le tissu sain. La partie supérieure de l'histogramme correspond aux variables métaboliques statistiquement plus importantes dans le tissu sain, et la partie inférieure aux métabolites statistiquement plus importants dans les glioblastomes.

e) Contribution métabolique du tissu sain au modèle de classification PLS DA généré entre les oligodendrogliomes et le tissu sain. La partie supérieure de l'histogramme correspond aux variables métaboliques statistiquement plus importantes dans le tissu sain, et la partie inférieure aux métabolites statistiquement plus importants dans les oligodendrogliomes.

f) Contribution métabolique du tissu sain au modèle de classification PLS DA généré entre les AP et le tissu sain. La partie supérieure de l'histogramme correspond aux variables métaboliques statistiquement plus importantes dans le tissu sain, et la partie inférieure aux métabolites statistiquement plus importantes dans les AP

Celles-ci mettent en avant une prédominance du N-acétyl-aspartate, de la créatine et à un degré moindre du myo-inositol caractérisant le métabolome du tissu non tumoral par rapport aux gliomes. De manière similaire, l'ensemble des gliomes est associé à un groupe de métabolites englobant la choline, phosphocholine et glycérophosphocholine, l'alanine, le lactate et les lipides. Ces éléments métaboliques sont aujourd'hui bien établis comme correspondant au profil classique du tissu cancéreux où l'augmentation des composés liée à la choline est associée au *turn over* membranaire résultant de la prolifération cellulaire. L'alanine, même si ce métabolite est plus fréquemment abordé lorsque l'on parle spécifiquement des méningiomes, est, comme nous avons pu le montrer, un métabolite lié au degré d'hypoxie des tissus par modification des voies métaboliques mises en jeu. Ainsi, son augmentation relative est attendue lors de l'engagement d'un processus métabolique oncologique et est naturellement liée à l'augmentation de la concentration en lactate. Enfin, l'augmentation des signaux dus aux lipides est liée, partiellement, à la nécrose accompagnant le développement tumoral ce qui provoque une augmentation significative des lipides libres (souvent détectés en SRM *in vivo*).

Contrairement aux modèles métaboliques établis en ouverture de ce chapitre, comparant du tissu tumoral de gliomes à différents stades de malignité, pour lesquels la concentration en Glx (glutamate et glutamine) est inversement proportionnelle à leur agressivité, la concentration en Glx est ici corrélée avec le statut de tissu tumoral. Ceci peut être compris comme une accélération globale du métabolisme du tissu à cause de la prolifération cellulaire engagée. Celle-ci se mettant en place dans un premier temps suivant un modèle métabolique aérobie tant que l'angiogénèse associée est suffisante pour alimenter correctement le tissu en oxygène, puis un « *shift* » vers le métabolisme anaérobie s'induit lorsque le processus d'angiogénèse n'est plus suffisant pour suppléer au phénomène d'hypoxie généré par la croissance du tissu tumoral. Il apparaît donc comme logique que le métabolisme global (anaérobie mais aussi aérobie) puisse être amplifié lors de l'étude du comportement métabolique cancéreux global et donc être associé au profil métabolique des gliomes par comparaison au tissu sain.

Plus spécifiquement, il apparaît que la taurine est un métabolite associé au tissu sain dans le cas des glioblastomes, non spécifique par comparaison avec les oligodendrogliomes et finalement associé aux astrocytomes pilocytiques lors de l'établissement du dernier modèle. Cette variabilité laisse supposer que la taurine est fortement variable au travers de l'ensemble des gliomes, et plus spécialement antinomique entre les glioblastomes et astrocytomes pilocytiques.

L'analyse détaillée du modèle PLS DA entre le tissu non tumoral et les oligodendrogliomes conduit au modèle présenté Figure 54.

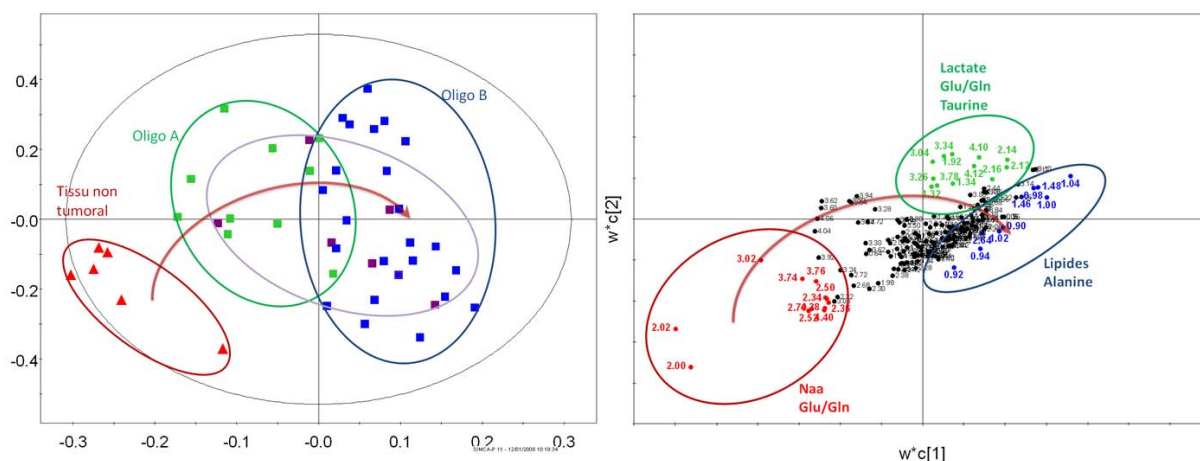


Figure 54 : Comparaison oligodendrogliomes et tissu non tumoral.

Bien que le modèle soit bâti sans tenir compte des différents stades de malignité des oligodendrogliomes (bas grade, en transition et haut grade), cette distinction apparaît néanmoins au niveau du modèle établi. Par exploration des variables métaboliques on en déduit un cheminement conduisant du tissu non tumoral aux oligodendrogliomes de plus haut grade impliquant dans un premier temps une perte en N-acétyl aspartate, liée à une modification du métabolisme des acides aminés principalement représentée par le glutamate et la glutamine, avec la mise en place d'une métabolisme anaérobie conduisant à une augmentation de la concentration de la lactate, et enfin un renforcement du métabolisme anaérobie (augmentation de l'alanine) accompagné de nécrose (lipides).

3.1.7.2. ANALYSE GLOBALE.

En complément de l'analyse PLS, une nouvelle analyse plus classique a été effectuée sur un ensemble de métabolites communément cités au travers de la littérature sur les tumeurs cérébrales. Pour ces analyses, les données sont réduites en intervalles de 0.001ppm à l'aide du logiciel Matlab, afin d'éviter toute perte d'informations métaboliques.

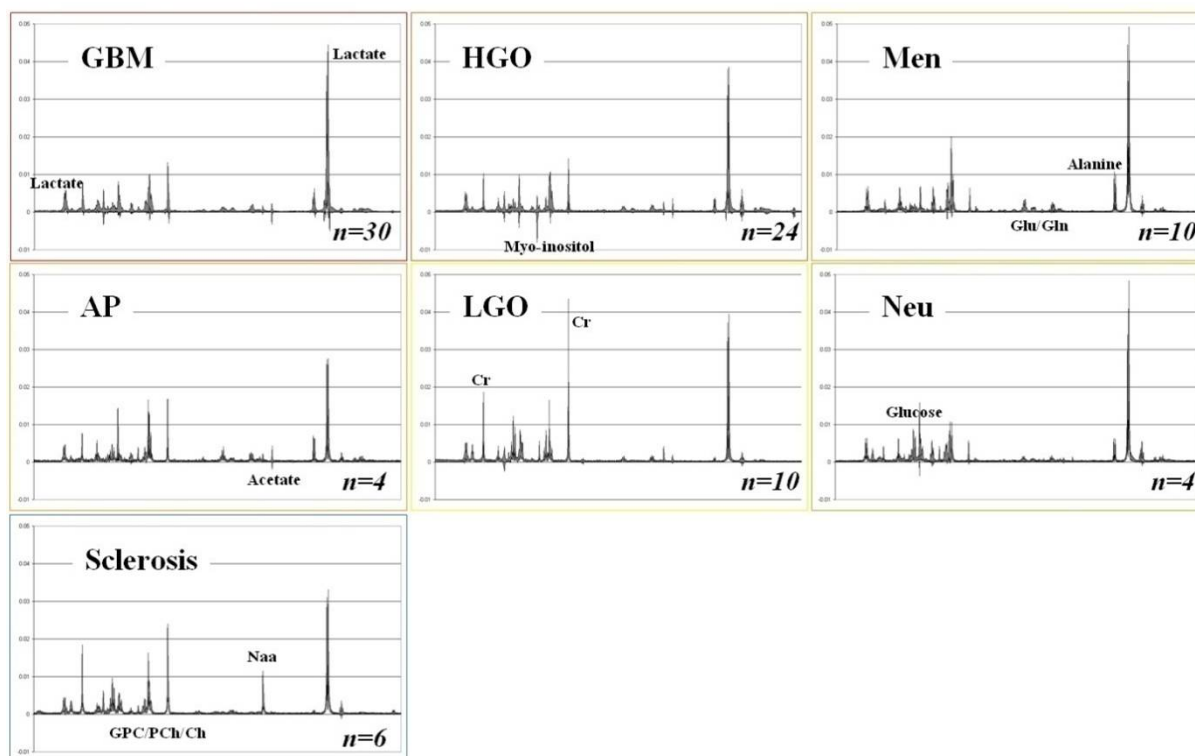


Figure 55 : Spectre moyen et écart type pour divers types tumoraux (n est le nombre de cas étudié pour chaque type tumoral).

Elles sont par la suite normalisées en intensité de sorte que l'intégrale globale de chaque spectre entre 0.5 et 4.5ppm soit égal à 1, et les spectres sont individuellement calibrés en fréquence sur les signaux respectifs du lactate, puis de la créatine et des signaux des composés liés à la choline pour détecter tout éventuel problème de dérive en fréquence lié aux paramètres physicochimiques des échantillons tel que le pH par exemple.

Métabolites	Groupements chimiques	Déplacements chimiques (ppm)
Alanine	β -CH ₃	1.48
Glutamate & glutamine	γ -CH ₂ & γ -CH ₂	2.35 à 2.46
Créatine	N-CH ₃	3.04
Myo Inositol	H-1,3	3.55/3.53
Choline	N-(CH ₃) ₃	3.19
Phosphocholine	N-(CH ₃) ₃	3.22
Glycérophosphocholine	N-(CH ₃) ₃	3.24
N-acétyl-aspartate	CH ₂	2.02
Lactate	β -CH ₃	1.32

Tableau 9 : Métabolites analysés lors de l'analyse statistique classique, groupements chimiques et déplacements chimiques associés.

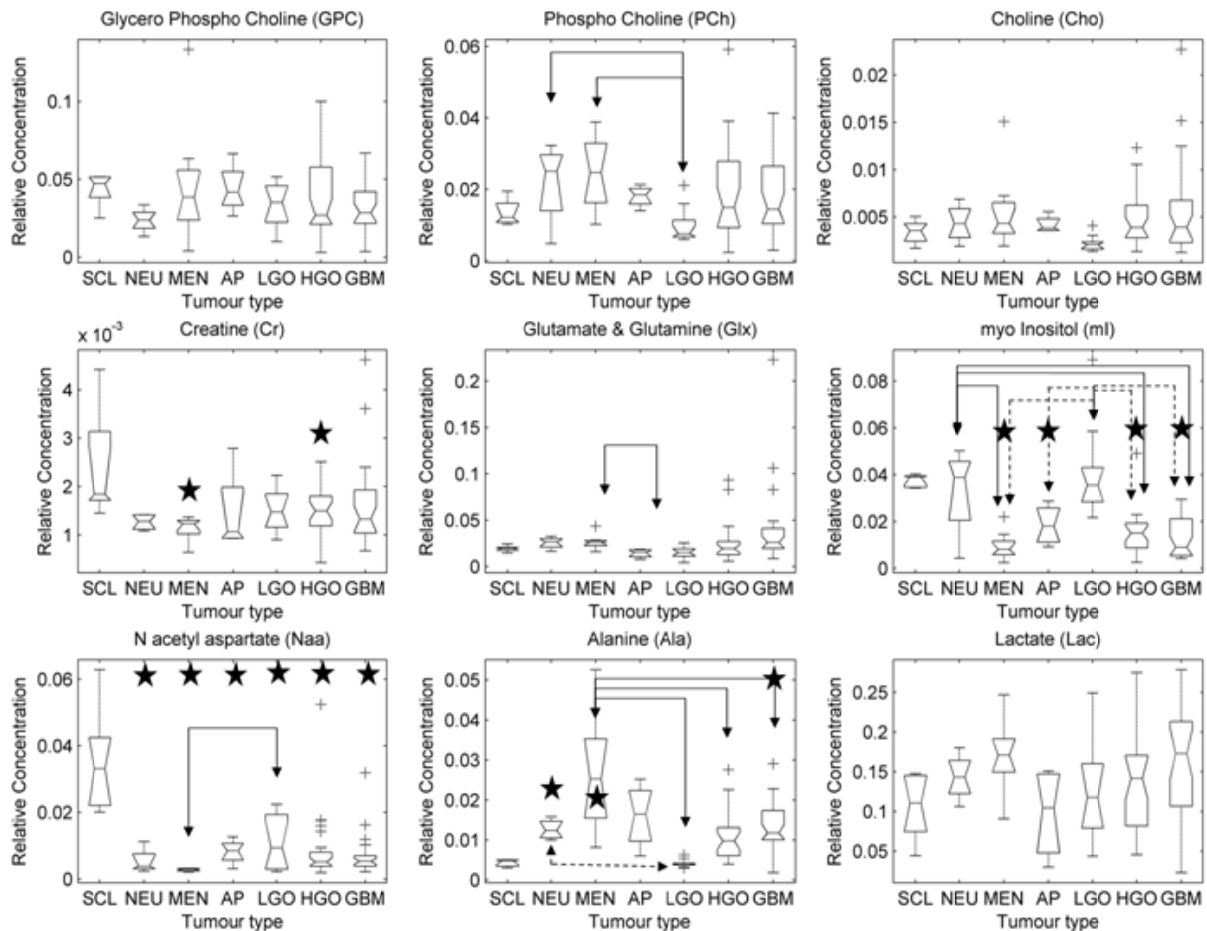


Figure 56: Variation métabolique au travers des sous-groupes tumoraux et du tissu sain (SCL pour tissu non tumoral, NEU pour neurinome, MEN pour méningiome, AP pour astrocytome pilocytique, LGO pour oligodendrogliome de bas grade, HGO pour oligodendrogliome de haut grade et GBM pour glioblastome) à l'aide d'une représentation de type Box and Whiskers Plot ou boîtes à moustaches. La boîte représente les limites du 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} quartile de la distribution des données. Les barres extérieures représentent l'étendue globale du jeu de données et les croix correspondent à des points atypiques compte tenu d'une distribution des données supposée normale. Les étoiles noires correspondent aux types tumoraux significativement différents du tissu sain (Anova $P < 0.01$) en fonction des métabolites. Les flèches relient entre eux les sous-groupes tumoraux dont la concentration du métabolite spécifié est significativement différent (Anova $P < 0.01$). Le ratio entre les composés lié à la choline et la créatine, calculé comme le ratio de la somme des concentrations relatives en phosphocholine, glycérophosphocholine et la choline libre divisé par la concentration relative en créatine, est, respectivement, de 3.39, 6.11, 8.5, 10, 4.45, 6, 8.13 pour le tissu non tumoral, les neurinomes, les méningiomes, les astrocytomes pilocytiques, les oligodendrogliomes bas grade, les oligodendrogliomes haut grade et les glioblastomes.

Les résultats obtenus en se focalisant sur un nombre limité de métabolites montrent que seul un nombre limité de métabolites sont discriminants (statistiquement) dans l'étude du processus oncologique. Ainsi on note que la perte en N-acétyl-aspartate liée à la présence d'un néoplasme, quelque que soit son type, est statistiquement discriminant en comparaison avec le tissu sain contrôle. Ce critère peut même être discriminant entre les gliomes et les tumeurs des méninges, si l'on ne prend en compte que les gliomes de bas grade. L'absence de N-acétyl-aspartate dans les méningiomes s'explique simplement par le caractère méningial du tissu souche couplé au fait que les

méningiomes sont des tumeurs non infiltrantes. La forte variabilité relevée pour la concentration en N-acétyl-aspartate, principalement pour les gliomes de haut grade (glioblastomes et oligodendrogliomes de haut grade) est probablement liée au fait que ces tumeurs sont fortement infiltrantes du tissu sain adjacent.

La composante en choline reflète elle aussi la présence de tissu tumoral avec le ratio entre les composés liés à la choline et la créatine égal à 3.39, 6.11, 8.5, 10, 4.45, 6, 8.13 pour les tissus contrôles, neurinomes, méningiomes, astrocytomes pilocytiques, oligodendrogliomes bas grade, oligodendrogliomes haut grade et glioblastomes respectivement. La variabilité relevée pour la concentration relative des différents composés liés à la choline est importante et ne permet pas de dégager des différences statistiquement significatives entre les différents types de tumeurs. Ces résultats concordent avec ceux de Kotitschke obtenus à partir d'enregistrements *in vitro* (Kotitschke et al., 1994). Ainsi, les différents composants de la choline, à savoir la choline libre, la phosphocholine, et la glycérophosphocholine, ne sont eux pas discriminants. Cette observation rejoint les résultats *in vitro* de Usenius notant que la concentration totale de choline varie peu entre les différents grades d'astrocytomes (Usenius et al., 1994).

L'alanine et le myo inositol sont deux métabolites probants pour la discrimination du tissu sain et des tissus tumoraux, permettant de plus des différenciations entre les types tumoraux. Le lactate n'est probant dans aucun cas de figure, du fait sans doute du caractère particulier du tissu contrôle employé.

Tout comme l'avait relevé Kinoshita en employant une technique de RMN *in vitro*, la concentration en créatine est plus faible pour tous les types de tumeurs comparé au tissu non tumoral (Kinoshita et al., 1994). Cependant cette diminution n'est statistiquement probante que pour les méningiomes et les oligodendrogliomes de haut grade.

Enfin la concentration en glutamate et glutamine est uniquement discriminante entre les méningiomes et les astrocytomes pilocytiques. Cette observation est en accord avec les observations faites par Opstad et Hazany, notant que la concentration en glutamate et glutamine est relativement plus importante pour les méningiomes que pour les astrocytomes (Hazany et al., 2007; Opstad et al., 2003).

Cette diversité de résultats corrobore les études faites par Preul (Preul et al., 1998), Tate (Tate et al., 2003) ou Huang (Huang et al., 2003) lors d'études *in vivo*, cherchant non plus à déterminer des critères uniques de caractérisation des types tumoraux, mais à caractériser ceux-ci sur la base d'analyses multi-variées combinant les informations des divers métabolites.

3.1.8. CONCLUSIONS ET LIMITES ACTUELLES DE L'ETUDE.

Il apparaît, au vu des résultats préliminaires obtenus sur l'ensemble des tumeurs cérébrales analysées, que la techniques RMN HRMAS couplée aux méthodes d'analyses multi-variables soit aujourd'hui l'une des pistes à explorer afin de valider les premières observations faites, et ainsi améliorer les diagnostics et pronostics qui restent une problématique majeure pour la cancérologie.

Néanmoins, un certain nombre de points sont sujets à critiques. En premier lieu, le nombre de cas étudié reste relativement faible. Cette limite réduit de manière importante la puissance statistique des modèles et nécessitera, à terme, la confirmation des observations réalisées en incluant un nombre plus important de cas. Le contrôle des échantillons, lors de la phase de préparation, est une étape essentielle qu'il convient d'améliorer. La sélection de l'échantillon de tissu, le délai d'ischémie, ou encore les conditions de conservation et de conditionnement des échantillons dans les rotors HRMAS dans l'optique d'effectuer des analyses complémentaires (soit par RMNHRMAS comme par exemple des acquisitions de diffusion afin de se focaliser sur le métabolisme lipidique, ou encore des acquisitions 2D afin de détailler l'ensemble du métabolome de chaque échantillon, soit par d'autres techniques comme la biologie moléculaire par exemple) sont autant de points qu'il sera nécessaire de maîtriser parfaitement pour éviter tout biais métabolique lors de l'analyse. Afin de confirmer les liens existants entre le pronostic et les modèles métaboliques, le suivi de l'évolution clinique des patients avec des tumeurs à durée de survie supérieure à la période de l'étude (principalement les oligodendrogliomes) sera nécessaire.

Enfin, confronter au sein de modèles métaboliques les données issues d'autres types d'exams comme la tomographie par émissions de positron ou de la biologie moléculaire est une étape indispensable dans la poursuite de l'étude par métabolomique des tumeurs.

3.2. ETUDE DU METABOLOME DES NEUROBLASTOMES.

Les neuroblastomes sont des tumeurs malignes du système nerveux sympathique. C'est une tumeur hétérogène sur le plan clinique, anatomo-pathologique, biologique, génétique et moléculaire qui se caractérise par un large éventail d'agressivité allant de la régression spontanée à l'évolution tumorale rapide potentiellement fatale bien que des thérapeutiques agressives aient été employées (Tanaka et al., 2005). Représentant environ 10% des cancers chez les enfants, les neuroblastomes touchent en moyenne un enfant sur 8000. L'incidence de ce type de tumeur est d'environ huit pour 10⁶ par an chez les enfants de moins de quinze ans (Miller et al., 1995). Il apparaît, de plus, que, selon certaines études, ce chiffre peut atteindre un sur 4000. Cette divergence épidémiologique laisse sous-entendre l'existence de tumeurs régressant spontanément sans atteindre un stade impliquant une détection symptomatique (Schilling et al., 2002). Ces tumeurs, dérivées des cellules sympathiques embryonnaires, se développent à partir des cellules ganglionnaires du tissu sympathique de la crête neurale. La localisation abdominale, majoritaire, représente environ 65% des cas, dont 35% au niveau de la surrénale⁹, et 20% des cas sont des formes thoraciques.

3.2.1. Problématique et objectifs

3.2.1.1. LA CLASSIFICATION ANATOMO-PATHOLOGIQUE.

La classification anatomo-pathologique aujourd'hui la plus utilisée est la « *International neuroblastoma Pathologic Classification* » (INPC) qui a standardisé les critères d'analyse du tissu tumoral (Peuchmaur et al., 2003; Shimada et al., 1999). Cette classification prend en compte la proportion respective de stroma schwannien et de cellules neuroblastiques ainsi que le degré de différenciation des cellules au sein de l'échantillon. Elle décrit quatre grandes catégories de tumeurs associées aux neuroblastomes :

- le neuroblastome dont le stroma est pauvre,
- le ganglioneuroblastome mélangé dont le stroma est riche,
- le ganglioneuroblastome nodulaire qui est une tumeur composite présentant un mélange de stroma riche et pauvre,
- le ganglioneurome, tumeur dont la composante dominante est le stroma.

Chacune de ces quatre catégories présente un ou plusieurs sous-types.

⁹ Glande située sur la partie supérieure du rein.

3.2.1.2 LA CLASSIFICATION PRONOSTIQUE.

L'extrême diversité d'évolution à long terme des neuroblastomes conduit les oncologues à établir une stratification basée sur des facteurs pronostiques (Burgues et al., 2006; Sano et al., 2006). En effet les traitements couramment employés regroupent la chirurgie, la chimiothérapie, parfois la radiothérapie. Ces thérapies sont lourdes, difficiles à supporter pour le patient, avec des risques toxiques et des séquelles potentielles. L'ensemble de ces éléments doit être mis en balance avec le risque tumoral lié aux neuroblastomes, qui, rappelons le, peuvent potentiellement guérir spontanément. Ainsi une grande variété de systèmes de classification pronostique a été développée et proposée afin de définir au mieux le traitement adapté à chaque cas.

Ceux-ci sont de plusieurs ordres, allant de l'âge du patient au moment du diagnostic, aux données anatomo-pathologiques, en passant par le stade d'extension tumorale (classification INSS pour *International Neuroblastoma Staging System*) (Katzenstein et al., 1998; Katzenstein and Cohn, 1998).

- Les critères anatomo-pathologiques proposés par la classification INPC ont ainsi montré leur potentiel de détermination d'un mauvais pronostic (Shimada et al., 1999)
- L'âge du patient au moment du diagnostic est un critère de pronostic identifié il y a déjà plus de trente ans et reste aujourd'hui l'un des facteurs de base du diagnostic pronostique (Joshi et al., 1992). Il apparaît clairement au vu des données cliniques relevées au travers de la littérature que les cas diagnostiqués après un an présentent un taux de survie largement inférieur aux cas diagnostiqués avant un an (par exemple, pour les neuroblastomes avec un stade d'extension de 4, ce taux est de 60 à 70% pour les cas de moins de un an, alors qu'il n'est que de 25 à 35% pour les cas de plus de un an) (London et al., 2005).
- L'extension tumorale (critère anatomo-clinique) est, elle aussi, un critère de base du pronostic des neuroblastomes. Etablie principalement par scintigraphie ^{123}I -Metaiodobenzylguanidine (^{123}I -mIBG), cette extension correspond souvent à la présence de métastases osseuses ou médullaire. La stratification de l'extension est donnée en quatre grades, correspondant grossièrement à une tumeur limitée à l'organe d'origine pour le stade I et à une extension métastatique atteignant le squelette, les tissus mous ou ganglions lymphatiques à distance de la tumeur pour le stade 4 (Katzenstein et al., 2004). Prises indépendamment, les données de l'anatomo-clinique ont un caractère prédictif très imparfait, nécessitant l'adjonction de nouveaux critères biologiques du pronostic (Huang et al., 2006).

- Enfin l'analyse des métabolites urinaires des catécholamines est un examen qui permet aujourd'hui d'établir le diagnostic de neuroblastome (Ilias and Pacak, 2005; Simon et al., 2003). Ainsi les neuroblastomes les plus graves font preuve d'un déficit en dopamine-béta hydroxylase, conduisant à une excrétion urinaire élevée en DOPA, dopamine, acide vanillylique et homovanillylique couplée à une diminution en acide vanylmandélique. C'est l'analyse de ce ratio entre les acides homovanillylique et vanylmandélique (VMA/HVA) qui est aujourd'hui utilisée comme critère diagnostique et facteur d'intérêt évolutif (Strenger et al., 2007). Néanmoins ces facteurs ne sont ni suffisamment fiables, ni reproductibles pour qu'on puisse les considérer comme indispensables lors de la phase de stratification pronostique.

Les progrès faits en génétique moléculaire ont permis d'identifier différents autres facteurs pronostiques essentiels tel que l'amplification de l'oncogène NMYC, des anomalies cytogénétiques et la ploïdie des cellules tumorales.

- L'amplification de l'oncogène NMYC, décrite comme facteur pronostique (Tonini et al., 1997) est actuellement le facteur biologique de référence, dont la recherche est obligatoire. Elle se présente sous la forme de matériel génétique supplémentaire, extra ou intra chromosomique, qui est observé dans environ 20% des cas. Sa présence est souvent corrélée avec le caractère métastasant de la pathologie (Song et al., 2007) et associée, dans la majorité des études, à un pronostic défavorable. L'oncogène NMYC est impliqué dans la progression du cycle cellulaire dans les phases suivant la phase G1 (Bell et al., 2006), néanmoins les liens reliant son amplification et le degré de sévérité de la pathologie ne sont pas connus.
- La ploïdie, obtenue après analyse du contenu en ADN des cellules tumorales, est un facteur pronostique couramment analysé lors de l'étude des neuroblastomes. La diploïdie est ainsi associée à un pronostic plus sombre que la triploïdie. Ce paramètre semble de plus corrélée avec la détection d'une amplification NMYC (Bagatell et al., 2005).
- La détection de délétion 1p36 (Okawa et al., 2007) ou de gain chromosomique 17q (Morowitz et al., 2003) sont des anomalies cytogénétiques qui ont été décrites lors d'études sur les neuroblastomes sans pour autant que celles-ci soient spécifiques.

3.2.1.3. OBJECTIFS DE L'ETUDE.

La combinaison des facteurs cliniques, anatomo-cliniques, anatomo-pathologiques et biologiques a permis de distinguer divers sous-groupes tumoraux liés à différents pronostics. Il

n'existe cependant pas de consensus quant au marqueur, ou ensemble de marqueurs, le plus significatif pour l'établissement du pronostic d'évolution fiable. On note ainsi nombre de résultats contradictoires au travers de la bibliographie, souvent dus à la diversité des techniques d'études employées ou encore à l'hétérogénéité des cas étudiés. Néanmoins l'utilisation de marqueurs liés aux événements biologiques associés, voire impliqués dans les étapes successives de la cancérogénèse est aujourd'hui courante. Il apparaît donc indispensable de développer et de compléter les divers facteurs pronostics des neuroblastomes afin d'adapter au mieux les thérapeutiques. En effet, l'existence de facteurs diagnostiques permet la détection « aisée » des neuroblastomes. Cependant le manque de spécificité des facteurs pronostiques entraîne potentiellement une toxicité supplémentaire due au traitement.

L'étude réalisée dans le cadre de la thèse utilise l'analyse du métabolome particulier des neuroblastomes par RMN HRMAS, mise en commun avec un ensemble de données cliniques et les critères pronostiques couramment employées pour les neuroblastomes. L'objectif de cette étude étant de mettre en avant des liens potentiels entre une évolution métabolique de la tumeur et divers critères diagnostiques et pronostiques.

3.2.2. Populations et données cliniques.

Sur la période allant de janvier 1995 à décembre 2006, 54 patients souffrant de tumeurs neuroblastiques périphériques ont été admis au centre d'onco-hématologie pédiatrique de l'hôpital universitaire de Strasbourg Hautepierre. Un sous-groupe de 23 patients a été inclus pour l'analyse RMN HRMAS du métabolome des neuroblastomes. Il répondait à l'ensemble des quatre critères suivant :

- (i) diagnostic de tumeurs neuroblastiques périphériques lors de l'examen d'anatomie pathologique,
- (ii) aucun traitement précédant l'obtention de la biopsie,
- (iii) une quantité de tissu suffisante pour un enregistrement RMN HRMAS
- (iv) conservation, après congélation immédiate dans l'azote liquide, des échantillons à -80°C,

En complément neuf échantillons de tissu prélevé sur des ganglions surrénaux sains ont été analysés en tant que tissu contrôle. Sur la population de départ de 23 patients, neuf ont dû être exclus compte tenu de la nature fortement lipidique des échantillons (cet élément sera discuté dans les résultats de ce chapitre) ou de la présence de pollution externe. Pour les mêmes raisons, quatre

enregistrements RMN de tissus sains ont dû être exclus de l'analyse finale.

Pt n°	Sexe	Age (mois)	Stage (I – IV)	Histopathologie (NB/ GNB/ GN)	Localisation (HN/TH/AP)	Origine (Adr/ExAdr)	Différentiation	MKI (1 / 3)	Pt risk (bas & int / Elevé)	Pronostic Histo (Fa/U)	MYCN (Am/NAm)	Plodie (An/Di)	¹²³ I-mIBG ratio T/M	Survie (V/D)
1	M	4	1	NB	ORL	ExAdr	peu diff	1	Bas	Fa	Nam	*	5.44	A
2	M	8	1	NB	AP	Adr	peu diff	1	Bas	Fa	Nam	*	7.28	A
3	M	45	1	GNB	TH	ExAdr	mature		Bas	Fa	Nam	*	1.45	A
4	M	0.5	1	NB	AP	ExAdr	Non différencié	1	Bas	Fa	Nam	*	4.95	A
5	M	18	1	NB	TH	ExAdr	peu diff	1	Bas	Fa	Nam	An	*	A
6	F	18	1	NB	AP	Adr	peu diff	2	Bas	Fa	Nam	*	4.48	A
7	F	3	1	NB	AP	Adr	peu diff	2	Bas	Fa	Nam	Di	*	A
8	M	0.3	1	NB	AP	ExAdr	Non différencié	1	Bas	Fa	Nam	An	*	A
9	M	182	4	NB	AP	ExAdr	peu diff	1	Elevé	U	Nam	*	*	D
10	F	41	1	GN	AP	ExAdr	maturation		Bas	Fa	Nam	Di	*	A
11	M	18	1	GNB	TH	ExAdr	maturation		Bas	Fa	Nam	Di	*	A
12	M	67	2A	GNB	TH	ExAdr	maturation		Elevé	Fa	Nam	*	2.6	A
13	M	2	1	NB	AP	Adr	peu diff	1	Bas	Fa	Nam	*	*	A
14	M	10	1	NB	TH	ExAdr	peu diff	2	Bas	Fa	Nam	*	4.08	A

Tableau 10: Paramètres cliniques des patients inclus dans l'analyse par RMN HRMAS de neuroblastomes. Pt: patient, NB : neuroblastome, GNB : ganglioneuroblastome, GN : ganglioneurome, HD : Tête-cou, TH : thorax, AP : abdomino-pelvien, Adr : Surrénal, ExAdr : extra surrénal, diff : différenciation, MKI : index de mitose de karyorrhexis, MKI 1 : bas, MKI 2 : intermédiaire, MKI 3 : élevé, Fa : favorable, U : Défavorable, Am : amplifié, NAm : non amplifié, An : aneuploïdie, Di : diploïdie, mIBG : metaiodobenzylguanidine, T/M : ratio tumeur/mediastinum, V : vivant, D : décédé, * : non disponible

Compte tenu des objectifs fixés par la problématique de l'étude, 12 facteurs pronostiques ont été enregistrés sur le groupe de 24 patients. Ceux-ci regroupent :

1. Selon la classification internationale (Katzenstein et al., 1998; Katzenstein and Cohn, 1998), les tumeurs ont été classifiées dans trois catégories: neuroblastomas (10 enfant), ganglioneuroblastomas (3), ganglioneuromas (1).
2. Les tumeurs de type neuroblastomes ont été divisées deux sous-catégories: indifférencié (2) et mal différencié (8). Pour des catégories de ganglioneuromes et de ganglioneuroblastomes, le degré de maturation cellulaire a été évalué et toutes les tumeurs ont été classifiées comme mûrissant.
3. L'indice de mitose de kariorexie (MKI) a été enregistré en tant qu'indicateur morphologique pour le sous groupe des neuroblastomes: Trois classes de valeur de MKI (bas, 2% ou inférieure à 100/5000 de cellules mitotiques et karyorrhétiques; intermédiaire, de 2 à 4% soit entre 100 et 200/5000 cellule mitotiques et karyorrhétiques et haut, supérieure à 4% et 200/5000) ont été définies. Ainsi, selon MKI, les neuroblastomes ont été divisés en deux catégories de MKI : bas (7) et intermédiaire (3). Aucune tumeur avec un MKI élevé n'a été incluse.
4. Selon la classification de l'International Neuroblastoma Staging System, respectivement 12,1

et 1 patients ont été classifiés avec des stade de developpement de 1, 2A et 4. Aucun patient de l'étape 3 n'était disponible.

5. Une classification risque (basée sur les critères de stade de développement, l'âge et la biologie cliniques de tumeur (Maris, 2005)des patients) a été faite, définissant 12 patients avec un risque allant de bas à intermédiaire et 2 cas à fort risque.
6. L'index ADN ou de ploïdie des cellules tumorales a été déterminé. Les données de seulement cinq tumeurs primaires ont ainsi pues être analysées. Parmi elles, deux neuroblastomes ont montré un kariotype d'anaploïdie. Les 3 tumeurs restantes (un neuroblastome:, un ganglioneurome et un ganglioneuroblastome) ont été classifiées comme ayant un kariotype de type diploïde.
7. . L'amplification de gène de MYCN a été déterminé par analyse de Southern du nombre de copies des gènes. Les tumeurs avec des cellules contenant plus de 10 copies de MYCN sont alors considérées amplifiées. Aucun amplification de MYCN n'a été montré parmi les 14 cas analysés.
8. Considérant la localisation primaire du développement primaire des neuroblastomes comme facteur pronostique potentiel, les patients ont été groupés selon celle-ci (tête-cou, 1 ; thorax, 5 ; abdomen-bassin, 8)
9. De même les patients ont été classifiés selon l'origine surrénal ou ganglion sympathique de la tumeur (surrénal, 4 ; ganglion sympathique, 10).
10. Tous les patients étudiés sont encore vivants excepté un enfant avec l'étape avec un neuroblastome de stade IV, un risque estimé fort et un pronostic histologique défavorable qui est mort pendant le suivi.
11. Sept enfants sur les 14 ont subi une scintigraphie ^{123}I -mIBG pendant le diagnostic primaire. Les clichés on été réalisés 4 et 24 h après injection intraveineuse de 74 à 111 MBq de ^{123}I -mIBG à l'aide d'une gamma caméra conventionnelle. Les images réalisé à 24h ont été analysé qualitativement (présence ou absence de prise de traceur) et quantitativement ont été interprétées en utilisant la région de la technique de l'intérêt (ROI) et quantitativement en utilisant une technique d'analyse par régions d'intérêts (la valeur mesuré dans la région d'inérêt est ainsi normalisée par rapport à une région d'intérêt médiastinale conduisant à une valeur T/M). Selon l'index de T/M, les enfants ont été divisés en deux groupes, inférieure ou supérieure à la médiane de l'ensemble des T/M (T/M_m)
12. l'âge du patient au moment du diagnostic, classifié en deux groupes, inférieur à un an (N=9) et supérieur à un an (N=8)

Néanmoins cette différenciation pathologique/sain apparaît principalement suivant la composante 2 de l'ACP. Ainsi la première composante, peu discriminante d'un point de vue pathologique, représente cependant plus de 47% de l'ensemble de la variabilité métabolique contenu dans les profils RMN. La seconde composante, naturellement discriminante, compte, quant à elle, pour 12% de la variabilité des données spectrales.

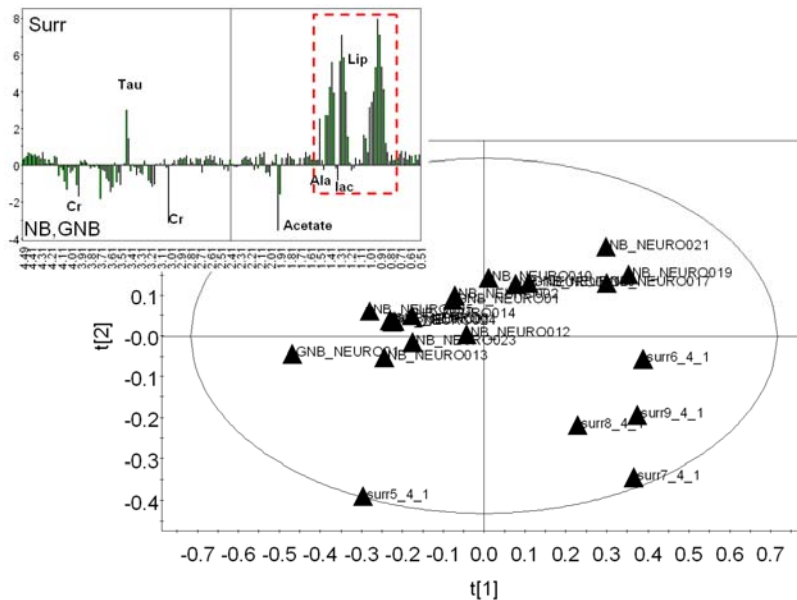


Figure 59: Analyse en composantes principales entre tissu sain et tumeur (neuroblastome et ganglioneuroblastome + ganglioneurome). Identification des métabolites d'intérêt pour la différenciation pathologique (tissu surrénal sain comparativement aux neuroblastomes, ganglioneuroblastome et hanglioneuromes).

Il apparaît ainsi, au vu de ces observations, que l'étude de caractéristiques métaboliques plus fines, comme celles qui pourraient être corrélées avec le pronostic des patients et donc potentiellement avec les divers facteurs listés dans le Tableau 10, ne pourra se faire par analyse ACP. Il est important, dans ce cas, de cibler l'analyse et donc d'employer une technique de type PLS.

En regardant plus en détail la classification obtenue par ACP des cas sains et tumoraux, l'analyse des variables statistiquement discriminantes liées à la seconde composante ACP montre une forte prédominance des composants lipidiques couplés à la présence de taurine pour le tissu sain (Figure 59). Les métabolites caractéristiques du tissu pathologique sont, eux, l'alanine et le lactate liés au métabolisme anaérobie, ainsi que l'acétate, la créatine, l'ensemble des composés de la choline et aussi le glucose (α et β).

L'étape suivante de notre analyse nous a conduits à différencier les classes histologiques des tumeurs étudiées. Ainsi, dans un premier temps, une analyse PLS est menée sur les ganglioneuroblastomes (Figure 60), puis les neuroblastomes (Figure 61), par rapport au tissu sain contrôle.

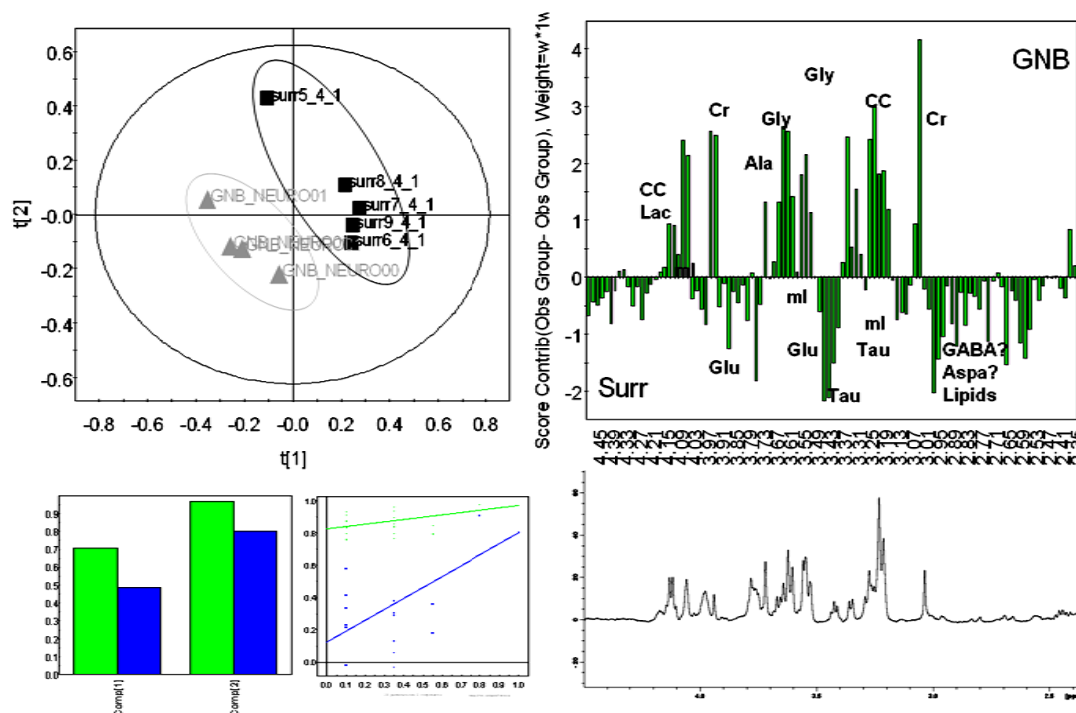


Figure 60 : Analyse discriminante PLS entre les ganglioneuroblastomes et tissu contrôlé. Le nombre réduit de cas induit naturellement des valeurs de Q^2 et R^2 très élevées suggérant un modèle statistiquement fort. Néanmoins la validation circulaire par la technique du LOO (leave one out) n'est pas aussi bonne que pouvait le laisser entendre les valeurs de Q^2 et R^2 , tout en ne montrant aucune sur-modélisation dans l'analyse PLS.

Dans la première analyse PLS mettant en jeu les ganglioneuroblastomes et les échantillons de tissu surrénal sain, les profils spectraux analysés sont limités aux intervalles de fréquence compris entre 4.5 et 2.35 ppm afin de réduire au maximum l'influence des composantes lipidiques dont l'influence prédominante est mise en évidence par l'ACP. Ce traitement est réalisé afin de se focaliser principalement sur les métabolites de petites tailles. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 60.

Le modèle de classification issu de l'analyse PLS des ganglioneuroblastomes et du tissu surrénal est statistiquement très significatif (Q^2 de l'ordre de 0.8 et R^2 proche de 1) avec, cependant, la contrainte liée à un nombre réduit d'échantillons pour chaque groupe ($N=4$ et $N=5$). Il apparaît néanmoins que, lors de, la procédure d'estimation de sur-modélisation le modèle reste valide. Les métabolites les plus significatifs révélés par cette analyse sont d'une part pour le tissu sain, le glucose, la taurine, et potentiellement le myo inositol, et d'autre part, pour les ganglioneuroblastomes, le glycérol, la glycine, l'alanine, le lactate, les composés liés à la choline et la créatine. Les phénomènes de progression tumorale peuvent aisément expliquer l'augmentation de concentration des composés liés à la choline, de même que l'hypoxie souvent liée aux tumeurs peut expliquer l'augmentation en alanine et en lactate.

Il est aussi probable que la contribution des composés liés à la choline soit limitée par la présence de fréquences de résonances associées aux lipides dans la même gamme de fréquences,

entraînant, de fait, un métabolisme lié à la choline plus important que celui qui est détecté. L'augmentation relative de la concentration en créatine est, quant à elle, contradictoire avec la baisse en créatine observée habituellement lors de processus tumoraux et nécessite, sans doute, une première étape de validation des résultats compte tenu du faible nombre de cas étudiés. De même, le phénomène liant l'évolution tumorale à l'augmentation relative de la concentration en glycérol et/ou en glycine demande, lui aussi, à être approfondi sur une population plus vaste. La composante lipidique résultante, bien que des séquences d'acquisitions RMN optimisées aient été employées et que l'intervalle d'analyse ait été restreint, reste problématique de part son interprétabilité bivalente.

Un second modèle PLS a été établi comparant cette fois les neuroblastomes au tissu sain (Figure 61). Des observations métaboliques similaires à celles effectuées pour le modèle établi à partir de ganglioneuroblastomes, ont ainsi été faites. La taurine est à nouveau un métabolite fortement discriminant, lié au statut sain du tissu. Son caractère discriminatoire est plus important dans le cadre de ce modèle que dans le modèle précédent, probablement du fait du nombre de cas plus important étudiés, renforçant le caractère statistique du modèle si celui-ci s'avère valide. De manière plus intéressante, on peut noter une diminution importante de la contribution des lipides à ce modèle (notamment observable par le peu d'importance donnée aux variables situées autour de 2.8ppm). Cela peut être interprété comme une nécrose, ou, tout du moins, une composante lipidique moindre pour les tumeurs de type ganglioneuroblastome en comparaison des neuroblastomes.

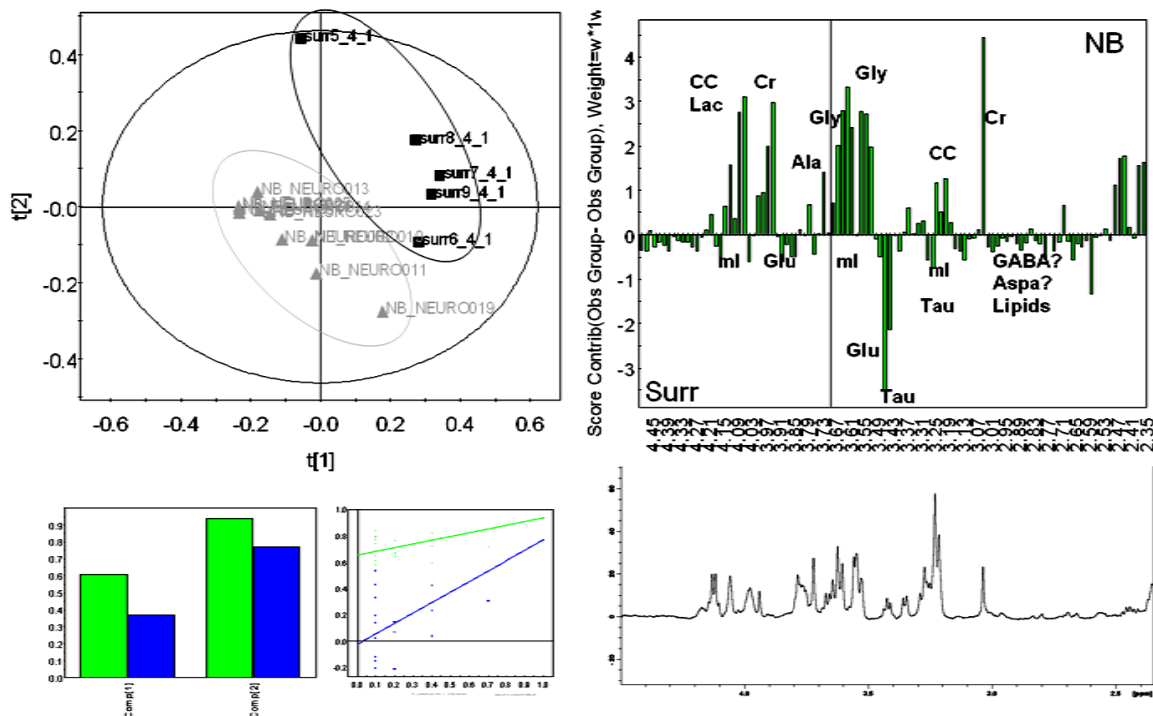


Figure 61: Analyse discriminante PLS entre les neuroblastomes et tissu contrôle. Le nombre réduit de cas induit naturellement des valeurs de Q^2 et R^2 très élevées suggérant un modèle statistiquement fort. La validation circulaire par la technique du LOO (leave one out) est cependant excellente, ne montrant aucune sur-modélisation dans l'analyse PLS.

L'alanine et le lactate sont également des métabolites avec une forte valeur discriminative, liés au métabolisme tumoral, avec cependant, une valeur statistique relative faible par rapport aux autres métabolites analysés. Il est possible que cela soit dû à un métabolisme aérobie relativement moins altéré dans les neuroblastomes que pour les ganglioneuroblastomes, information corrélant avec l'hypothèse de malignité supérieure des ganglioneuroblastomes. Le glycérol et la glycine sont présents en concentrations supérieures dans les neuroblastomes que dans le tissu sain, confortant de sorte l'observation réalisée pour les ganglioneuroblastomes. Enfin la créatine est, elle aussi, relativement plus élevée dans les neuroblastomes que dans le tissu sain (Figure 61).

3.3.4. RESULTATS : COMPARAISON DONNEES CLINIQUES ET DONNEES METABOLIQUES.

Suite à cette première étape, l'ensemble des facteurs pronostiques a fait l'objet d'une série de modèles PLS. L'amplification NMYC n'a pas été incluse comme facteur pronostique lors de tests statistiques de mise en adéquation avec les profils métaboliques car les cas inclus dans notre étude n'ont pas montré d'amplification significative. De même le pronostic histologique n'a pu être employé comme contrainte lors de l'établissement des modèles PLS car seul un cas présentait un diagnostic favorable. L'examen des liens existant entre le métabolome et la localisation A (Tête cou / Thorax / Abdomino pelvien) n'a pas permis d'établir un modèle statistiquement robuste. De même l'application de la localisation B (Surrénal ou extra surrénal) n'a pas permis de construire un modèle statistiquement probant. Ces modèles sont principalement mis en échec par les tests de surmodélisation reflétant un caractère aléatoire du modèle généré.

Le modèle établi sur la base de la calcification relevée lors de l'examen d'anatomie pathologique est lui aussi statistiquement non valide. En effet une surmodélisation flagrante apparaît lors de l'établissement du modèle sur la base de quatre composantes PLS. La diminution du nombre de composantes prises en compte entraîne un écroulement de la représentativité du modèle et ne permet plus de classification des cas.

L'indice MKI établi à partir d'un nombre de cas réduit (13 au lieu de 14) n'a pas permis d'établir de modèle statistiquement valide. La dissymétrie entre les deux populations étudiées (3 comparé à 10) est potentiellement à l'origine de la surmodélisation.

Enfin deux derniers modèles ont pu être établis à partir d'une population fortement réduite (7 cas au lieu des 14 initiaux). Le modèle lié à la ploïdie n'a pu être validé statistiquement. Le modèle lié au mIBG sera abordé ci-après.

Au final, seuls deux modèles (diagnostic histopathologique et âge) présentent des caractéristiques statistiques permettant de suggérer un lien entre le métabolome des tumeurs et les

facteurs pronostiques. De plus le modèle, basé sur la fixation mIBG, bien qu'établi sur un nombre restreint de cas, permet, si l'on réduit le nombre de composantes PLS générées à 1, d'obtenir un modèle avec une validation LOO satisfaisante. Enfin un dernier modèle, lié à l'évolution clinique de la pathologie a été établi, même si le déséquilibre de population étudié est important.

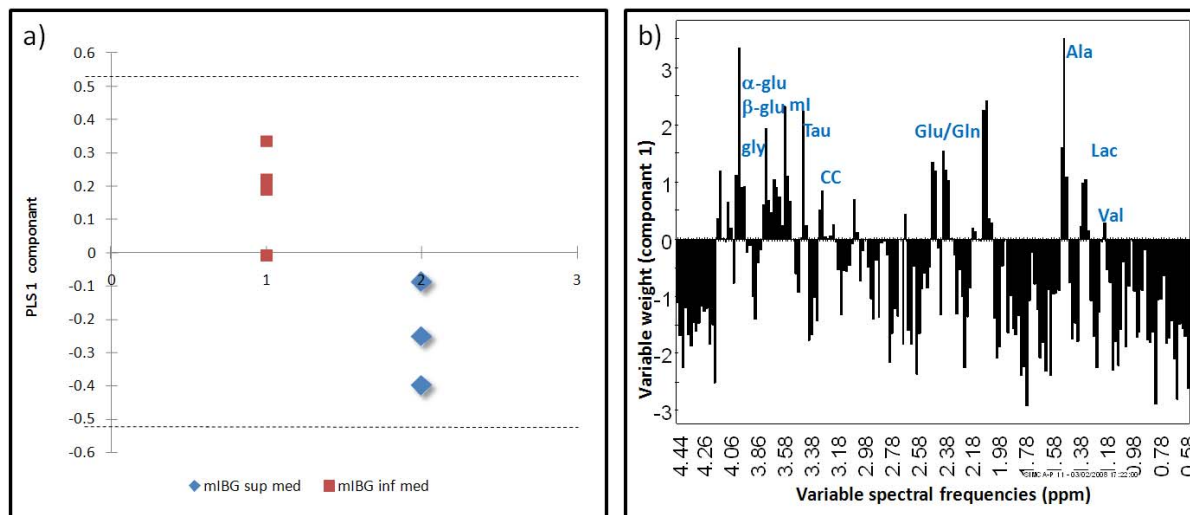


Figure 62 : Classification PLSDA des neuroblastomes en fonction de la fixation en ^{123}I mIBG.

Facteurs pronostiques	Nb de Cas	Nbr de composantes PLS	Q ² cum (1 est optimal, > 0.5 est correct)	R ² cum (1 est optimal)	Validation LOO
Diagnostic histologique	4/10	2	0.573	0.793	++
Stade d'évolution/suivi	2/12	2	0.603	0.86	+
Age	7/7	2	0.81	0.91	++
Localisation A	9/5	2	0.515	0.811	-
Localisation B	4/10	3	0.582	0.977	--
Mitoses	(10) 6/4	3	0.576	0.995	---
Calcification	9/5	4	0.56	0.989	---
mIBG	(7) 3/4	2	0.76	0.991	=
MKI	(10) 7/3	2	0.558	0.929	--
Ploïdie	(5) 2/3	3	0.838	0.993	--

Tableau 11: Comparatif des différents modèles métaboliques de neuroblastomes.

L'étude détaillée des trois modèles PLS, dont la validation statistique est probante à partir des variables d'intérêt, a permis de montrer que les neuroblastomes sont spécifiquement caractérisés par une concentration supérieure en asparagine, glutamate, glutamine, alanine, sérine,

arginine et acide aspartique, et une concentration moindre en myo inositol, phosphocholine, glycérophosphocholine, choline, créatine, lysine, phénylalanine et tyrosine par comparaison avec les ganglioneuroblastomes.

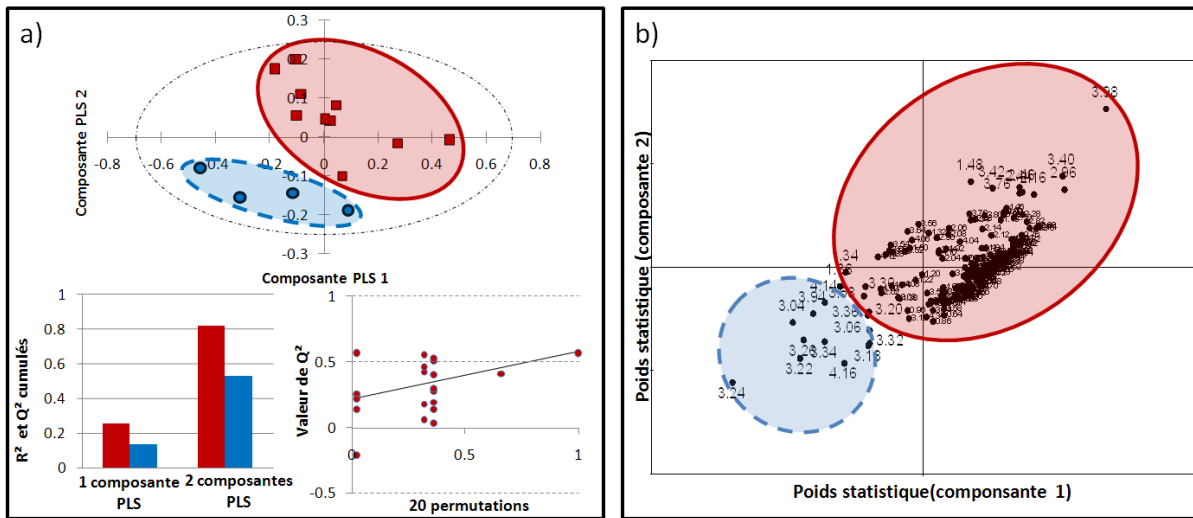


Figure 63 : PLS DA Neuroblastomes(carrés rouges) comparés aux ganglioneuroblastomes(ronds bleus) :
a) Classification dans un espace PLS-DA 2D. Validation: R^2Y (histogramme rouge) égale à 0.83 et Q^2 (histogramme bleu supérieure à 0.5 avec 2 composante. Vérification de la surmodélisation.
b) Variables métaboliques d'intérêt du modèle PLS DA.

En comparant les cas en fonction de l'âge au moment du diagnostic, les métabolites caractéristiques des cas jeunes de neuroblastomes (inférieurs à un an) sont la sérine, le myo inositol, le glucose, la créatine, la taurine, les composés liés à la choline et les lipides alors que les cas les plus âgés (supérieurs à un an) sont associés à la présence de proline, asparagine, arginine, acide aspartique, succinate, glutamate et glutamine, ainsi que de glycérol.

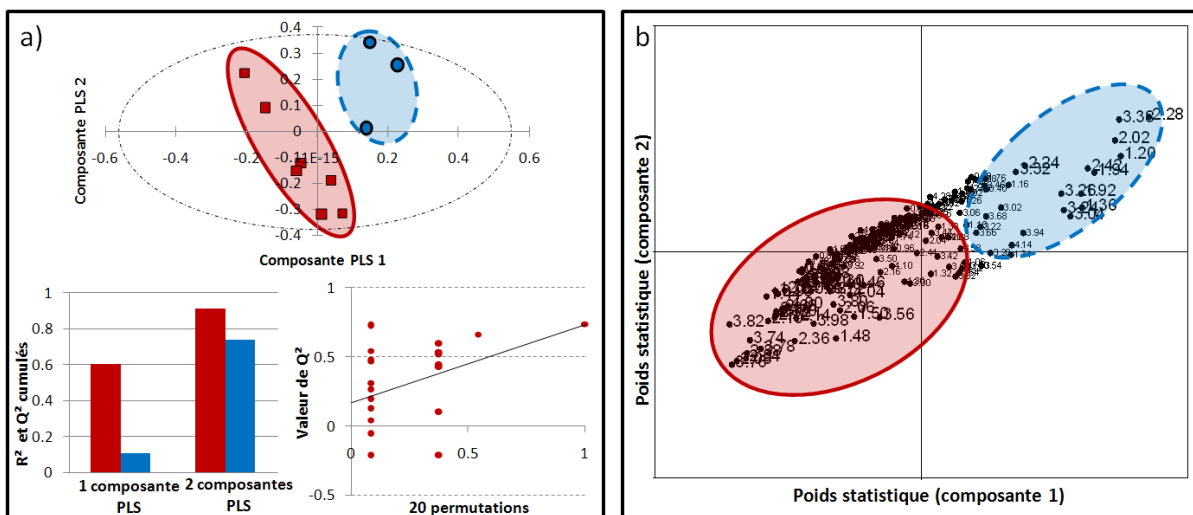


Figure 64 : Classification PLS DA en fonction de l'âge des patients (supérieur à un an en bleu, versus inférieur à un an en rouge) pour les neuroblastomes.
a) Classification dans un espace PLS-DA 2D. Validation: R^2Y (histogramme rouge) égale à 0.91 et Q^2 (histogramme bleu supérieure à 0.5 avec 2 composante. Vérification de la surmodélisation.
b) Variables métaboliques d'intérêt du modèle PLS DA.

Enfin la différenciation en fonction du stade (et donc de l'évolution clinique) se fait par la concentration relative en N-acétyl-aspartate, acide aspartique, asparagine, arginine, proline, β glucose, tCho pour les cas de stade 4 (correspondant aussi aux cas décédés). Les cas de stade 1 sont, eux, corrélés à une prédominance du lactate, du β glucose, des lipides, du glutamate, de la glutamine et du malate.

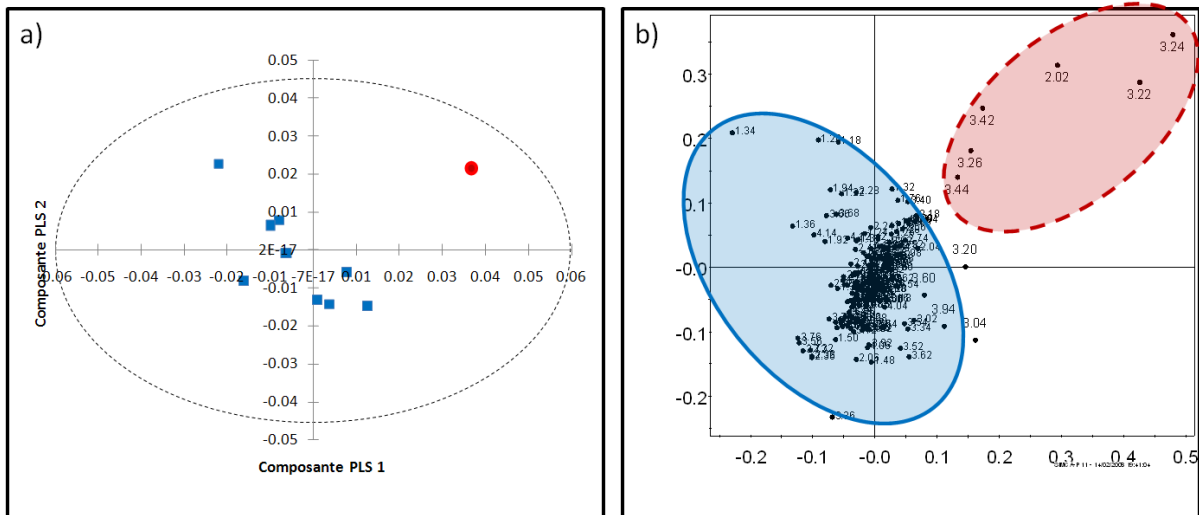


Figure 65 : Classification PLS DA en fonction de l'évolution clinique (survie en bleu versus décès en rouge). a) Classification dans un espace PLS-DA 2D. b) Variables métaboliques d'intérêt du modèle PLS DA.

3.3.5. CONCLUSIONS

3.3.5.1. COMPARATIF TISSU SURRÉNAL ET NEUROBLASTOMES

En comparant les deux modèles (ganglioneuroblastomes et neuroblastomes par rapport au tissu surrénal sain), on note des valeurs statistiques de validation du modèle comparables ($R^2 > 0.95$ et Q^2 environ 0.8). Néanmoins, conformément à l'hypothèse établie précédemment, le fait d'augmenter la population étudiée dans le cas des neuroblastomes permet d'améliorer de manière significative le paramètre de validation circulaire et donc de s'assurer de la non sur-modélisation.

La validation de la classification est générée en réintroduisant les cas ayant servi à bâtir le modèle dans ce même modèle. Il apparaît alors que l'ensemble des neuroblastomes soit correctement classifié démontrant une bonne spécificité de la classification. De même en introduisant les cas de ganglioneuroblastomes dans ce modèle, ils sont tous classifiés comme similaires aux NB, impliquant donc un profil métabolique plus proche du tissu pathologique des neuroblastomes que du tissu contrôle.

L'analyse par anatomie pathologique réalisée sur les tissus surrénaux a néanmoins mis en évidence une forte prédominance du tissu issu du cortex surrénal alors que les tumeurs ont pour

origine le tissu médullaire. Ce biais important dans l'analyse peut, d'une part, expliquer la forte concentration en lipides relevée lors de l'analyse des surrénaux.

3.3.5.2 CONCLUSIONS : COMPARAISON DONNEES CLINIQUES ET DONNEES METABOLIQUES.

En employant une technique de RMN *in vitro* haute résolution sur des cultures cellulaires ainsi que des analyses chromatographiques, C.L. Florian (Florian et al., 1995a) a déterminé les caractéristiques métaboliques de trois types de tumeurs du système nerveux central, à savoir: les méningiomes, neuroblastomes, et glioblastomes. Il a ainsi décrit des signaux communs de la leucine, de l'isoleucine, de la valine, de la thréonine, du lactate, de l'acétate, du glutamate, choline-contenant des composés et de la glycine. Nos résultats corroborent ceux rapportés par Florian dans son article. Néanmoins, même si des composés de la choline étaient largement représentés dans le tissu de neuroblastomes, en particulier dans des échantillons de neuroblastomes provenant des enfants plus vieux qu'un an, ces métabolites ont aussi semblé être particulièrement abondants dans les ganglioneuroblastomes et ganglioneuromes, jouant un rôle important dans l'analyse discriminante exécutée. Néanmoins, une plus grande cohorte des patients sera nécessaire pour confirmer cette observation préliminaire.

Des pics de résonance de N-acétyl-aspartate ont été notés en examinant des spectres RMN HRMAS des neuroblastomes. N-acétyl-aspartate est généralement trouvé dans le neurone normal et on lui associe un rôle de marqueur neural. L'origine des neuroblastomes au niveau des cellules de la crête neurales peut expliquer la détection de N-acétyl-aspartate dans nos enregistrements. De même, des signaux du complexe de GABA/glutamate/glutamine ont été également détectés par RMN HRMAS dans le tissu de neuroblastomes. Une explication possible est que quelques lignées cellulaires humaines de neuroblastomes ont des caractéristiques de type neurotransmetteur et que de la sorte elles peuvent convertir le glutamate en GABA (Biedler et al., 1978). S. Roberts (Roberts et al., 2004) a ainsi rapporté pour la première fois l'association entre le système GABAergique et les résultats cliniques dans le modèle humain de neuroblastomes. Ces résultats ont montré que des niveaux plus bas d'expression des gènes du système GABAergique ont été associés à un âge plus élevé au moment du diagnostic, suggérant que la réduction d'expression de gène GABAergique puisse être prédictive du comportement agressif de tumeur. Ainsi, la limitation du potentiel inhibiteur exercé par le GABA la prolifération et la différenciation des neuroblastomes pourrait jouer un rôle dans le développement des neuroblastomes.

Dans nos expériences, les cas de neuroblastomes des enfants les plus jeunes, d'âge inférieur

à un an, ont été caractérisés des niveaux relativement plus élevés de GABA. Ce lien entre la concentration de GABA et l'âge de patient devra être évalué dans une étude plus vaste, sur un temps plus long et un plus grand nombre de cas avant que le niveau intracellulaire de GABA puisse être considéré comme prédictif d'évolution clinique des patients.

Le mIBG est un analogue structural de noradrénaline, qui, marqué par du ^{131}I , a été le premier produit radiopharmaceutique utilisé l'imagerie clinique des cellules chromaffines (petites cellules présentes dans les glandes médullosurrénales et dans les ganglions du système nerveux sympathique, elles dérivent de la crête neurale embryonnaire et font partie du système neuroendocrine) et du tissu adrénergique. Sa concentration au niveau cellulaire est basée sur le mécanisme du stockage et de réassimilation de catécholamines (Tobes et al., 1985). La scintigraphie au ^{123}I -mIBG est aujourd'hui largement répandue dans l'établissement du diagnostic des neuroblastomes ainsi que pendant le suivi bien qu'il est été noté que quelques tumeurs ne montrent pas la prise de radio-traceur ce qui pourrait s'expliquer par la différenciation cellulaire ou la modification des mécanismes d'assimilation. Parmi les sept patients ayant subi la scintigraphie au ^{123}I -mIBG, ceux présentant une prise plus élevée de traceur ont principalement été caractérisés par les marqueurs biochimiques de l'hypoxie et de la prolifération cellulaire comme le lactate, l'alanine, la choline, la phosphocholine et le glycérol-phosphocholine. La résonance du GABA a été détectée sur des tumeurs avec une assimilation de radio-traceur inférieure. Bien qu'une différenciation de profils métaboliques ait été montrée entre des tumeurs avec le degré différent de prise de radio-traceur, le nombre très limité de cas ne permet pas poser des conclusions définitives.

Enfin, le patient avec un neuroblastome au stade IV, d'un âge supérieur à un an au diagnostic, présentant une tumeur mal différenciée, considérée en tant que patient avec un fort risque, une histologie défavorable et morte pendant le suivi, a été caractérisé par un profil métabolique distinct où l'on note principalement les composés totaux de la choline. Des études complémentaires, mettant en œuvre un cohorte de patients plus importante, avec notamment des cas où le suivi des patients montre un nombre de décès du même ordre que pour la survie, est nécessaire pour confirmer cette première observation attrayante.

Comme nous avons pu le voir au travers de cette étude prospective préliminaire, la compréhension des facteurs pronostiques aujourd'hui utilisés pour la stratification des neuroblastomes est limitée et leur intérêt pronostique (spécificité et validité) est encore parfois sujet à discussion. La compréhension des modifications métaboliques sous-jacentes au processus tumoral dans un premier temps, mais aussi et surtout liée à l'évolution clinique de la pathologie peut, à terme, conduire à l'amélioration des thérapeutiques employées en ciblant plus finement les sites d'actions.

Dans cette optique, la mise en corrélation des facteurs pronostiques, communément utilisés

dans le cas des tumeurs neuroblastiques, avec les profils métaboliques, acquis par RMN HRMAS, présente un grand intérêt. La mise en évidence de cohérences entre les métabolomes tumoraux et les indicateurs pronostiques devrait permettre de caractériser les voies métaboliques altérées par une progression tumorale défavorable. Ainsi les résultats préliminaires obtenus dans cette étude ont permis de mettre en évidence une concordance entre trois facteurs pronostiques communément employés dans la stratification d'évolution des neuroblastomes et leurs profils métaboliques respectifs. Un certain nombre de pistes métaboliques ont ainsi pu être mises en évidence et la réalisation d'études complémentaires sur une population plus vaste est indispensable.

En effet, le nombre de cas étudiés représente la principale critique à cette étude. De plus, ce nombre de cas se trouve encore réduit lors de mise en corrélation avec certains facteurs pronostiques étudiés (MYCN). A terme, l'augmentation de la population étudiée devra permettre d'obtenir des groupes de patients représentatifs pour chaque facteur pronostique et ainsi conduire à l'établissement de modèles statistiquement fiables. Cette étape est obligatoire afin d'entériner, ou non, les résultats préliminaires exposés ci-avant.

3.3. LES LYMPHOMES : SIGNIFICATION METABOLIQUE DE LA FIXATION ^{18}F -FDG POUR LA MALADIE DE HODGKIN

La maladie de Hodgkin ou lymphome hodgkinien est une affection maligne du système lymphatique dont la cause exacte demeure inconnue bien que l'implication du virus d'Epstein-Barr ait pu être démontrée dans 30 à 50% des cas (Trzcinska and Litwinska, 2003). Il existe également un risque accru de maladie de Hodgkin chez les patients ayant une mononucléose infectieuse si celle-ci est liée à l'EBV. Elle représente 1% de la totalité des cancers. Il y a environ 1100 nouveaux cas de lymphomes hodgkiniens en France chaque année et contrairement aux lymphomes non hodgkiniens dont l'incidence continue d'augmenter, celle des lymphomes hodgkiniens diminue faiblement. La maladie reste plus fréquente chez l'homme que chez la femme ; elle survient plutôt chez l'adulte jeune, et occupe le vingtième rang des cancers chez l'homme et chez la femme (Baris and Zahm, 2000). C'est un cancer qui aujourd'hui est soignable dans 85 à 95% des cas (Diehl, 2007).

3.3.1. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

L'objectif principal de cette étude préliminaire, menée sur les lymphomes, est de confronter les résultats issus de l'analyse métabolomique aux données de l'examen TEP mené sur un échantillon de patients souffrants de lymphomes hodgkiniens dans le but de déterminer quelle est la signification métabolique de la fixation élevée du ^{18}F -FDG (Fluoro-désoxy-glucose).

La concentration tissulaire du ^{18}F -FDG est la somme de la concentration intravasculaire du ^{18}F -FDG non phosphorylé et des concentrations intracellulaires du ^{18}F -FDG phosphorylé et non phosphorylé. Seule la composante intracellulaire est directement liée à l'activité métabolique de la tumeur. Si on effectue la mesure suffisamment longtemps après l'injection (environ 45 min), les composantes non liées au métabolisme peuvent être tenues pour négligeables. Cette fixation de ^{18}F -FDG est liée au métabolisme du glucose. Néanmoins le mécanisme énergétique de la cellule dépend aussi d'autres substrats, comme les acides gras ou le lactate. De plus, la quantité d'énergie produite par molécule de glucose consommée par la cellule dépend d'autres paramètres, tels que l'oxygénation de la cellule, voire l'état de différenciation cellulaire.

Une meilleure compréhension des relations entre activité tumorale, consommation de glucose, perfusion et oxygénation des cellules est nécessaire pour une meilleure interprétation des examens TEP au ^{18}F -FDG (Buvat, 2007). Ainsi, dans le cas des tumeurs, il est difficile de savoir

quelle est la part de fixation en ^{18}F -FDG qui est directement liée la consommation de glucose, ou celle liée au transport du glucose ou encore les caractéristiques du métabolisme sous-jacent (aérobie ou anaérobie).

De plus, compte tenu de la population analysée, cette étude a permis de comparer le métabolome des lymphomes non hodgkiniens au métabolome des lymphomes hodgkiniens.

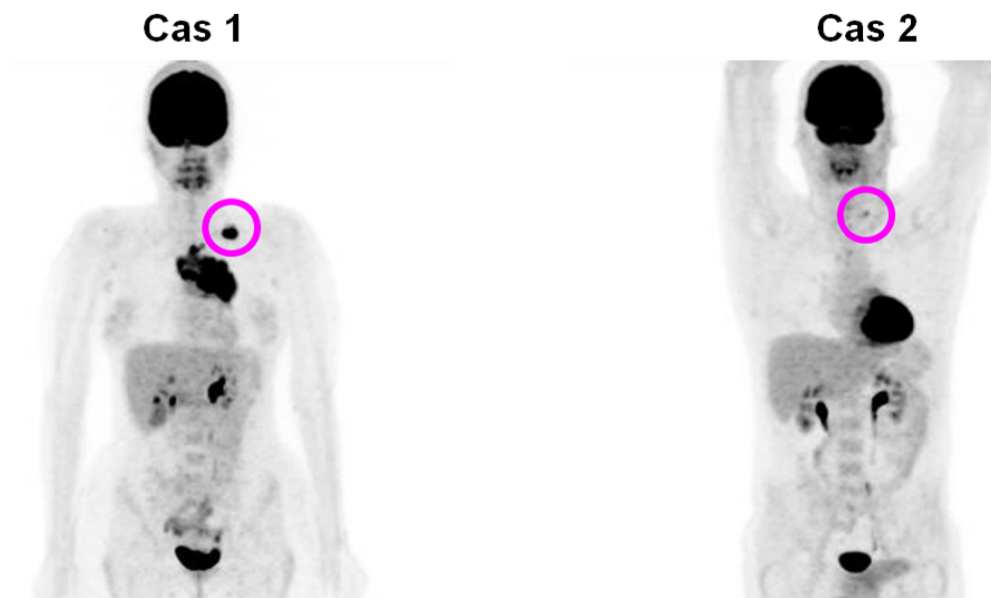


Figure 66: Examen TEP 3D MIP (Maximal Intensity Projection). Exemple de deux cas de maladie de Hodgkin présentant (cas 1) une forte fixation de ^{18}F FDG et (cas 2) une faible fixation FDG.

3.3.2. POPULATIONS ET DONNEES CLINIQUES

Un ensemble de 10 enregistrements RMN HRMAS a été réalisés sur un groupe de 10 patients atteints de lymphomes hodgkiniens scléro-nodulaires. Ces 10 cas ont aussi pu subir un examen TEP au ^{18}F -FDG permettant de confronter les données cliniques aux données métabolomiques. Les valeurs de fixation de ^{18}F -FDG sont exprimées en terme de *Standardized Uptake Value* (SUV). Le SUV correspond à la valeur mesurée divisée par la dose injectée et la masse corporelle. Il a été rapporté, dans nombre de pathologies cancéreuses, que la diminution de la fixation ^{18}F -FDG est un marqueur pronostique indiquant une bonne réponse au traitement (Weber, 2005).

A ces données viennent s'ajouter les données cliniques du stade de la pathologie (1 à 4) et de la réponse au traitement (1 pour rémission partielle et 2 pour rémission complète lors des analyses PLS suivantes).

Patient	Sexe	Année naissance	Masse échantillon	Stade	Evolution	SUV (foie)	SUV (biop)	SUV (biop) normalisé	SUV (biop) maximal	SUV (biop) max normalisé	Masse totale
2	H	1973	22.1	1	3	2.15	9	4.2	10	4.7	6
3	H	1961	33.8	1	3	2.4	14	5.8	14	5.8	8
4	H	1964	19.5	1	2	1.9	10	5.3	10	5.3	10.5
6	H	1986	24.6			2.4	17.5	7.3	22	9.2	12.5
12	H	1939	18.9		2	1.85	7	3.8	7	3.8	5
15	H	1964	23.5	2	2	1.95	8	4.1	10	5.1	9
19	F	1976	22.2	2	2	1.95	10.5	5.4	10.5	5.4	10
23	M	1987	20		2	1.75	13	7.4	14.5	8.3	10
28	F	1970	32.2	2	2	2.95	13.5	4.6	17	5.8	10
35	M	1963	25.2	2	3	1.5	11	7.3	13	8.7	17
Moyenne			24.2			2.08	11.35	5.52	12.8	6.21	9.8
Médiane			22.85			1.95	10.75	5.35	11.75	5.6	10

Tableau 12 : Données TEP ^{18}F FDG de Standardized Uptake Value (SUV).

L'analyse PLS, dans le cas général, ne nécessite aucunement une contrainte Y de type binaire. Ce vecteur peut être compris comme une suite de valeurs discrètes. Il va de soi, lors de l'élaboration de ce type de modèle, que la validation statistique résultante nécessite un nombre important de cas et, qu'en l'occurrence, les analyses menées sur la population étudiée seront dans un premier temps descriptives. Dans un second temps, afin de conforter les valeurs statistiques des modèles, des groupes de patients ont été établis en fonction de la moyenne et/ou de la médiane de chaque valeur de TEP (SUV de la biopsie, SUV normalisé, SUV maximal) avec, pour objectif de définir des sous-groupes dont la population n'est pas trop déséquilibrée, mais tenant compte des cas extrêmes, se distinguant naturellement. Cette étape, bien que reposant sur une classification arbitraire des cas, permettra de vérifier si les liens entre le métabolome des lymphomes et les données de fixation en ^{18}F -FDG sont statistiquement probants en tenant compte des limites statistiques liées au nombre restreint de cas étudiés. Ces modèles binaires sont des modèles d'analyse discriminante en régression linéaire au moindre carré (PLS-DA)

3.3.3. RESULTATS

Le résultat obtenu pour l'analyse du SUV de la biopsie est présenté Figure 67. On note que le positionnement des cas dans l'espace PLS 2D généré reflète assez fidèlement les valeurs de SUV enregistrées avec les cas extrêmes tels que le cas 06 présent à l'extrême droite de la

distribution et ayant le SUV le plus important. Le relatif mélange des cas représentés en noir et vert est potentiellement lié au faible écart de SUV noté (entre 7 et 11), alors que pour les cas en rouge on note des SUV supérieurs à 13. Seul le cas 03 avec un SUV important est localisé de façon atypique, du moins suivant la composante PLS 1 (influencé principalement par la teneur en Phosphocholine (δ 3.23). Le modèle ainsi généré est relativement fort statistiquement ($Q^2=0.33$). Néanmoins, la technique utilisée ne permet pas d'obtenir une validation par permutation circulaire probante, compte tenu du nombre de cas.

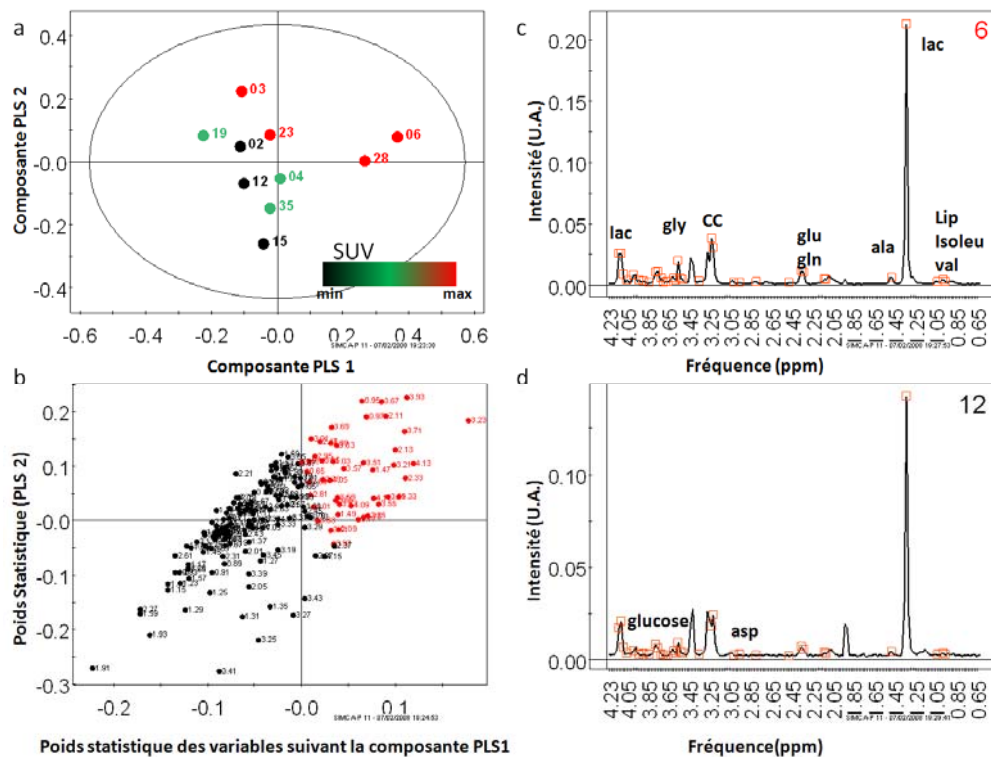


Figure 67 : Modèle PLS en fonction de la valeur réelle de SUV de la biopsie (a). Les points rouges dans le graphique de contribution métabolique (b) correspondent aux repères rouge sur les spectres individuels (c et d).

Afin de renforcer le modèle statistique un seuil a été fixé en fonction de la distribution des valeurs de SUV relevées. Un premier groupe comprend les cas avec un SUV supérieur à 13, et un second groupe ceux avec un SUV plus faible, inférieur de 11. Le modèle généré lors de la comparaison avec le SUV de la biopsie est un modèle à cinq composantes PLS-DA statistiquement fort ($R^2=0.83$ et $Q^2=0.93$). Le nombre de composantes déterminées par permutation circulaire est élevé compte tenu de la population analysée. Une analyse de la sur-modélisation confirme cette impression. La réduction du nombre de composantes à deux ou trois conduit à un modèle permettant une classification relativement robuste (respectivement $Q^2=0.23$ et $Q^2=0.64$) sans entraîner une sur-modélisation trop importante. On note une

prédominance importante du métabolisme lipidique pour les cas avec un SUV inférieur à 13. Le métabolisme lié à la choline est, quant à lui, fortement amplifié dans les cas présentant un fort score SUV, de même que les métabolites associés au métabolisme anaérobie (alanine et lactate). Enfin on relève une contribution non négligeable du glutamate lorsque le score SUV est important (Figure 68).

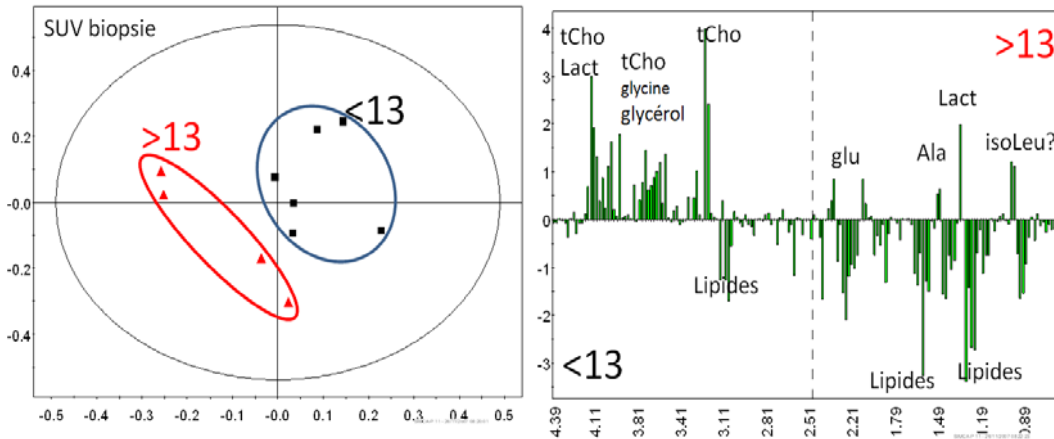


Figure 68 : Modèle PL-DAS en fonction du SUV relevé au niveau de la biopsie. (Seuil fixé à 13 pour la détermination des groupes)

Un second modèle, reposant sur les données du SUV normalisées est généré (Figure 69).

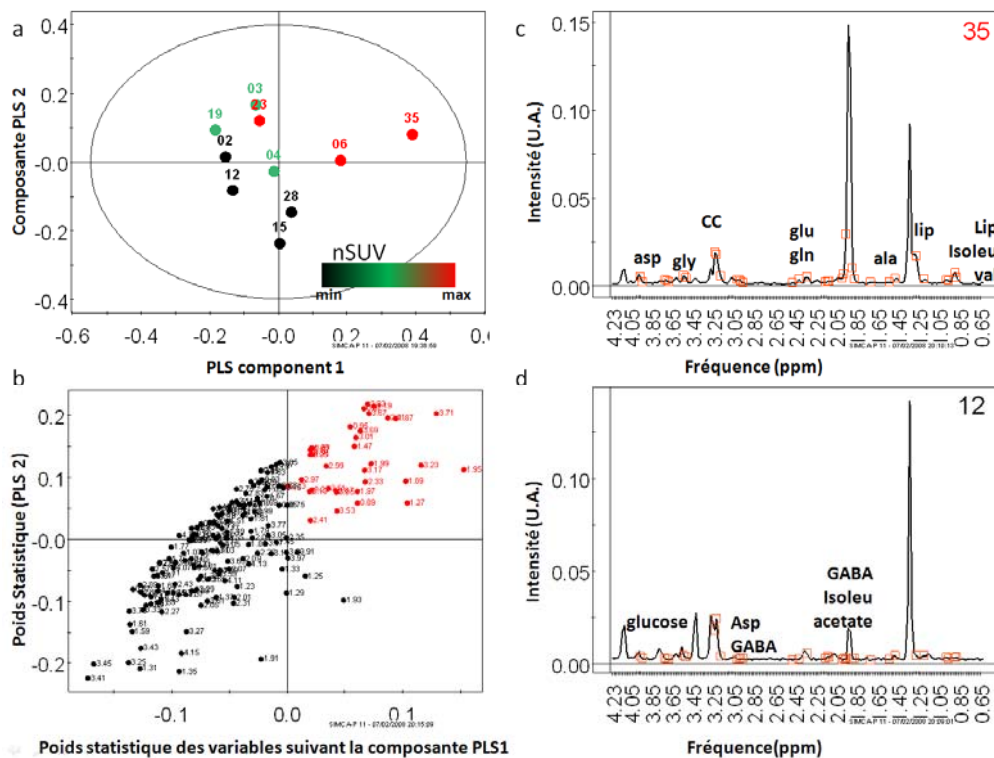


Figure 69 : Modèle PLS en fonction de la valeur normalisée de SUV de la biopsie (a). Les points rouges dans le graphique de contribution métabolique (b) correspondent aux repères rouge sur les spectres individuels (c et d).

A nouveau, on note que le positionnement des cas dans l'espace PLS 2D généré reflète assez fidèlement les valeurs de SUV normalisées enregistrées. Cependant les cas avec un SUV important (SUV normalisé supérieur à 7) présente une distribution spatiale assez étendue. De plus le cas extrême de la distribution (35) « atypique » dont la valeur normalisée de SUV importante est principalement liée à la fixation relativement faible au niveau du foie. Enfin, ce modèle présente une valeur de Q^2 négative lors de la génération du modèle reflétant potentiellement le fait que le modèle soit non prédictif. Afin de vérifier cette hypothèse, un modèle binaire sur les bases des valeurs de SUV normalisé, avec un seuil médian fixé à 5.5, est généré (Figure 70).

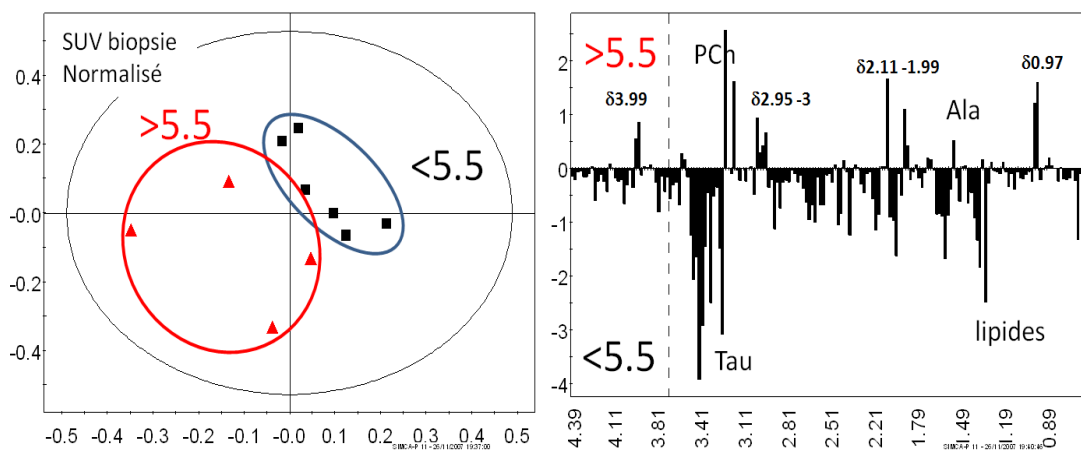


Figure 70 : Modèle PLS-DA en fonction du SUV relevé au niveau de la biopsie normalisée par le SUV du foie. (Seuil fixé à 5.5 pour la détermination des groupes, à partir de la moyenne)

Le modèle PLS-DA reposant sur le SUV normalisé de la biopsie est considéré comme totalement non prédictif. Les trois premières composantes PLS générées ne permettent pas d'obtenir une valeur de Q^2 positive. C'est uniquement à partir de la quatrième composante PLS que le Q^2 devient significatif. Compte tenu du faible nombre de cas étudiés, cette analyse n'a cependant plus de sens statistique. Il apparaît néanmoins intéressant de regarder quels sont les métabolites les plus influents pour classer les lymphomes hogkiniens en fonction du SUV normalisé de la biopsie

Il semble, compte tenu des modèles présentés précédemment, que la normalisation du SUV de la biopsie par le SUV du foie entraîne une dégradation du modèle statistique métabolique. Il convient néanmoins de rester prudent compte tenu de la très faible population étudiée. Il apparaît d'après la Figure 70, qu'une valeur de SUV normalisé élevée puisse être rattachée à une augmentation du métabolisme de la choline, plus spécifiquement de la phosphocholine. On note aussi une augmentation relative de la concentration en l'alanine et

lactate (partiellement dissimulée par la composante lipidique). On observe également une corrélation entre une valeur de SUV faible et une concentration en lipides élevée. L'ensemble de ces paramètres sont en faveur d'un métabolisme accéléré (*turn over* membranaire, métabolisme anaérobie) lorsque le SUV augmente.

Un nouveau modèle basé sur les valeurs maximales de SUV relevées dans les LH est généré (Figure 71).

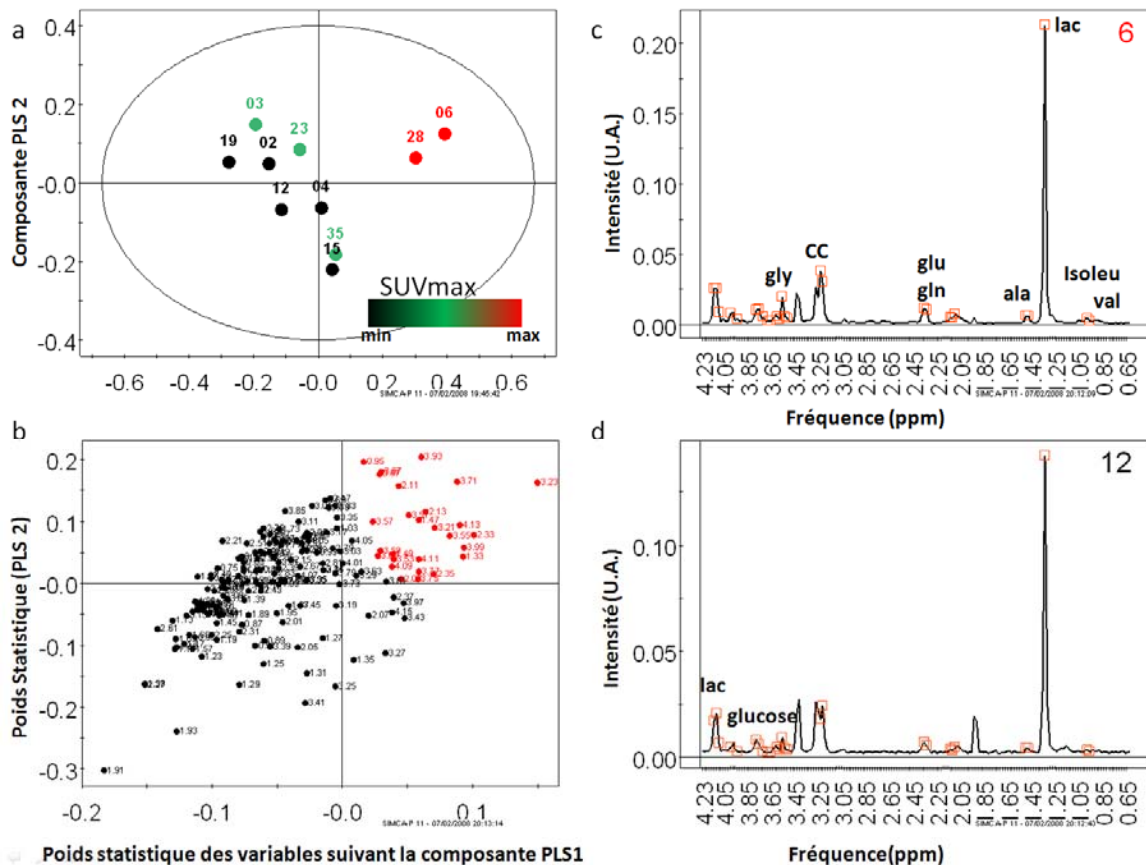


Figure 71 : Modèle PLS en fonction de la valeur maximale de SUV de la biopsie (a). Les points rouges dans le graphique de contribution métabolique (b) correspondent aux repères rouge sur les spectres individuels (c et d).

Ce modèle est un modèle à quatre composantes PLS. A nouveau le nombre important de composantes compte tenu de la faible population entraîne un fort risque de surestimation. La réduction du nombre de composantes à deux permet l'élaboration d'un modèle statistiquement fort ($Q^2=0.51$).

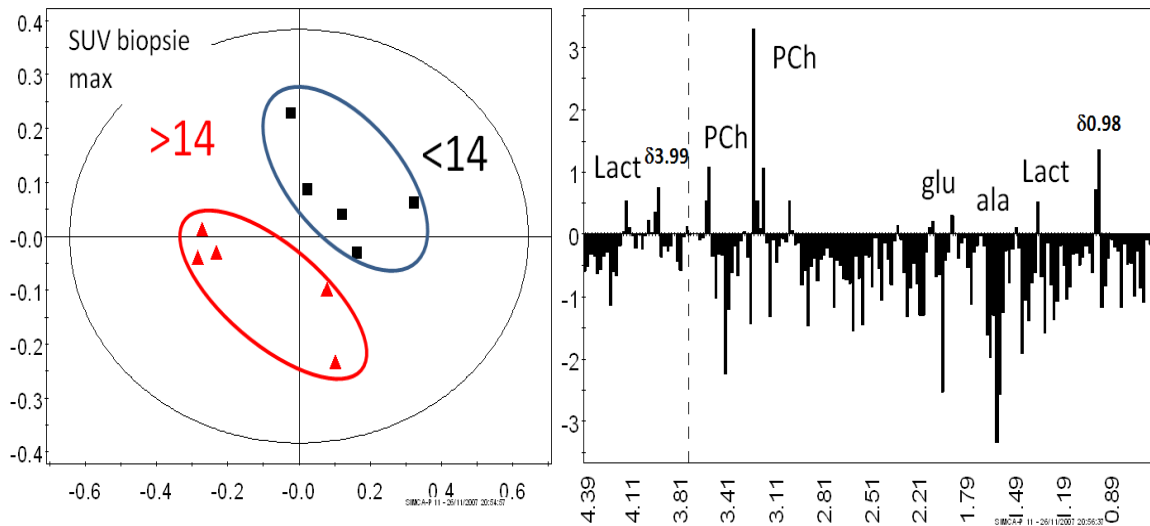


Figure 72 : Modèle PLS en fonction du SUV maximal relevé au niveau de la biopsie. (Seuil fixé à 14 pour la détermination des groupes)

La classification obtenue est probante. Les métabolites sous-jacents sont principalement le phosphocholine et la lactate. On voit également apparaître le glutamate ainsi que l'alanine. En observant en détail la distribution des cas dans l'espace PLS 2D, on note que les cas placés à l'extrême droite de la distribution sont les cas avec le SUV maximal le plus important. En se focalisant sur la contribution de ces cas (Figure 73) la contribution de la phosphocholine, du lactate, de l'alanine et du glutamate est renforcée.

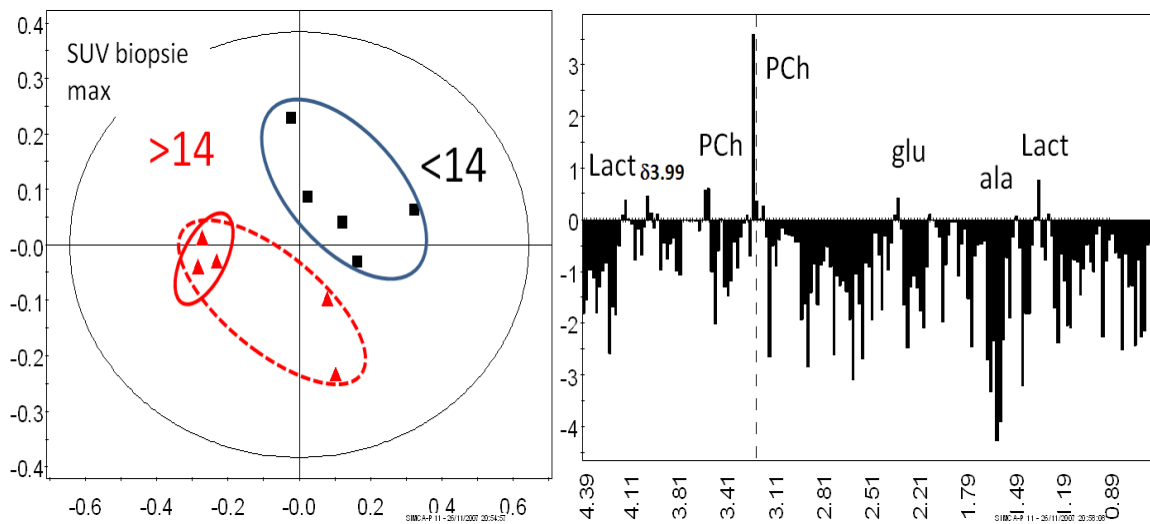


Figure 73 : Modèle PLS en fonction du SUV maximal relevé au niveau de la biopsie. (Seuil fixé à 14 pour la détermination des groupes). La contribution est donnée pour les lymphomes hogkiniens présentant le plus fort SUV max (cercle plein rouge).

La normalisation de la valeur du SUV maximal de la biopsie, en regroupant les cas en fonction de la valeur médiane du SUV normalisé, conduit à un regroupement des cas identiques à celui obtenu pour le SUV maximal de la biopsie. En classifiant ces cas en fonction des valeurs

extrêmes de SUV maximal normalisé, on obtient un échantillonnage similaire à celui obtenu pour le SUV normalisé de la biopsie.

3.3.4. RESULTATS SECONDAIRES

Un dernier modèle est construit à partir des données TEP sur la base de la masse totale. Les données sont regroupées en trois classes compte tenu des masses relevées : supérieures à 12, comprises entre 12 et 7 et inférieures à 7.

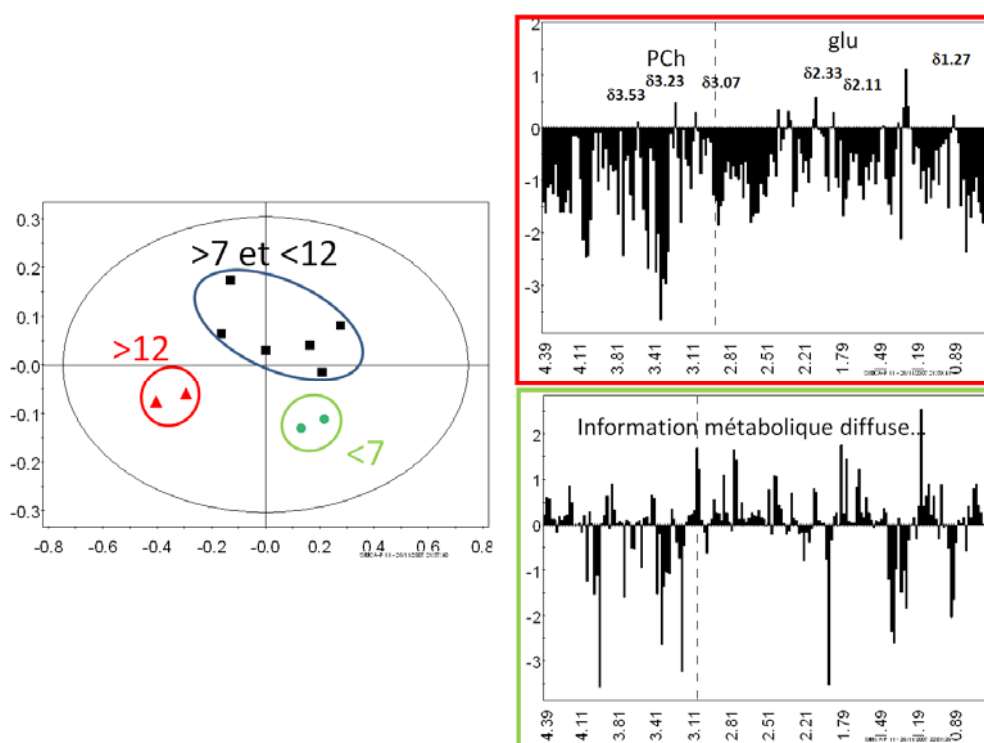


Figure 74 : Modèle PLS en fonction de la masse relevée. La contribution métabolique est donnée pour les lymphomes hogkiniens présentant la masse la plus importante (cercle plein rouge) et la plus faible (cercle plein vert).

Le modèle généré est un modèle à six composantes PLS qui s'avère, lors de la procédure de surestimation, largement surdimensionné. Le modèle ramené à deux composantes est un modèle statistiquement faible ($Q^2=0.05$). Néanmoins la classification obtenue (Figure 74) semble montrer que seuls les cas de masses importantes présentent des profils métaboliques avec des modifications reproductibles. En effet, on note, pour ces cas, une prédominance relative de la phosphocholine, du glutamate et de quelques autres variables. Dans le cas des lymphomes non hogkiniens de masse faible, les informations métaboliques sont diffuses et non interprétables. Il semble n'y avoir aucune cohérence dans le métabolome de ces cas.

Deux autres modèles PLS ont été établis en fonction des données cliniques, à savoir le

stade d'évolution et la réponse au traitement de ces cas de lymphomes hogkinien. Lorsque la contrainte d'analyse est fixée par le stade de la pathologie, seul un partitionnement des données regroupant d'une part les cas avec un stade 4, et, d'autre part, les cas avec un stade 1, 2 ou 3, permet d'obtenir un modèle quelque peu prédictif ($Q^2=0.1$ avec deux composantes PLS). L'ensemble des autres regroupements possibles conduit à des modèles non prédictifs.

En se basant sur la réponse au traitement, le modèle obtenu est un modèle à deux composantes PLS, relativement prédictif ($Q^2=0.38$), dont les résultats sont présentés Figure 75.

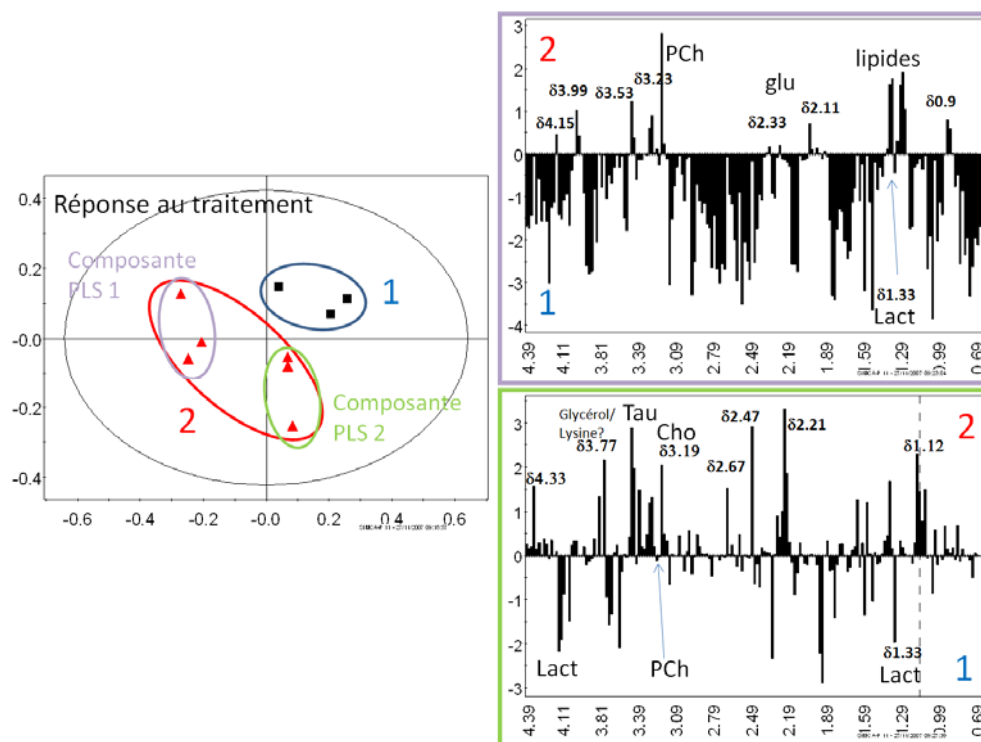


Figure 75 : Modèle PLS en fonction de la réponse au traitement. Les graphiques de contribution métabolique (partie droite) correspondent respectivement à la composante PLS 1 (en haut) et la composante PLS 2 (en bas)

La projection des cas analysés dans l'espace 2D des composantes PLS démontre une variabilité au sein des cas (2). Au nombre de six, ces cas se subdivisent en deux sous-groupes dont la différenciation par rapport au groupe (1) dépend respectivement de la composante PLS 1, et de la composante PLS 2. Dans le cas où la composante PLS 1 est prédominante, les métabolites principaux impliqués dans la différenciation sont la phosphocholine, le glutamate, les lipides. On note que la concentration du lactate est en diminution pour les cas (2). Dans le cas où la composante PLS 2 est dominante, les métabolites les plus influents sont la Tau, la choline, le glycérol et/ou la lysine, et probablement les lipides. Comme pour le cas précédent on note une diminution de la concentration en lactate. Enfin, contrairement au cas lié à la composante PLS 1, la phosphocholine semble ici être peu influente ($\delta 3.23$), voire diminuer ($\delta 3.57$ et 4.18).

3.3.5. LYMPHOMES HODGKINIENS COMPARES AU LYMPHOMES NON HODGKINIENS

Parallèlement à cette première étude prospective, un ensemble de 43 enregistrements RMN HRMAS ont été réalisés sur un groupe de 41 patients (2 cas présentant suffisamment de matériel biologique ont donné lieu à deux enregistrements HRMAS). Sur ces 43 enregistrements, 15 se sont révélés inexploitable pour une étude métabolomique compte tenu de la forte proportion de lipides au sein des échantillons. Les cas analysés comprenaient vingt lymphomes hodgkiniens et huit lymphomes non hodgkiniens.

Une première approche ACP a pu mettre en évidence une variabilité du métabolome au sein de l'ensemble des lymphomes, supérieure à la variabilité induite par les deux types de pathologie étudiée (lymphomes hodgkiniens comparé aux lymphomes non hodgkiniens). Sur la base d'une analyse en composante principale, sans contrainte de classification, les échantillons des deux groupes n'ont pu être séparés.

Cette observation conforte le choix des analyses de type ciblées, avec contraintes et hypothèses de classification *a priori*, lors de comparaison de diverses pathologies. Dans un second temps une analyse PLS est menée sur le même jeu de données (Figure 76).

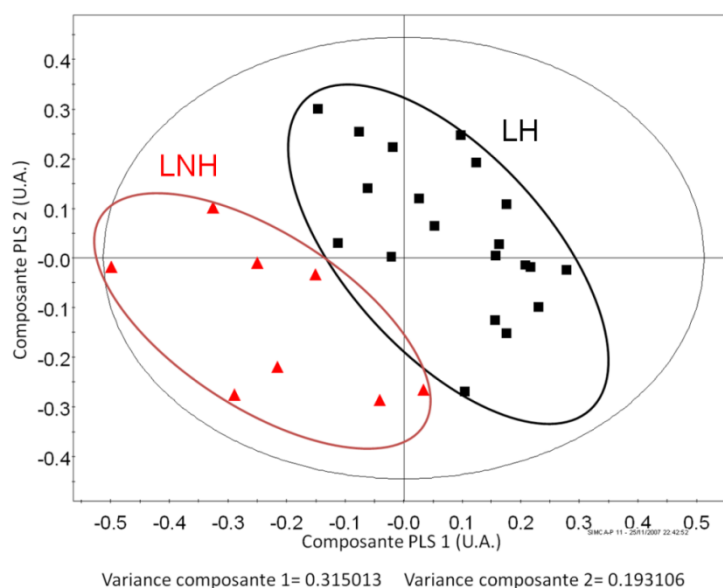


Figure 76 : Analyse PLS : lymphomes non hodgkiniens par rapport aux lymphomes hodgkiniens. $R^2X=51\%$ et $Q^2Y=0.46$.

Le modèle obtenu permet une classification des lymphomes non hodgkiniens et des lymphomes hodgkiniens avec deux composantes PLS ($Q^2=0.46$). Une analyse des variables impliquées dans l'élaboration est donnée (Figure 77 et Figure 78)

La contribution métabolique des lymphomes non hodgkiniens (Figure 77) est principalement

liée au métabolisme lipidique (on retrouve la quasi-totalité des fréquences de résonance associées aux lipides).

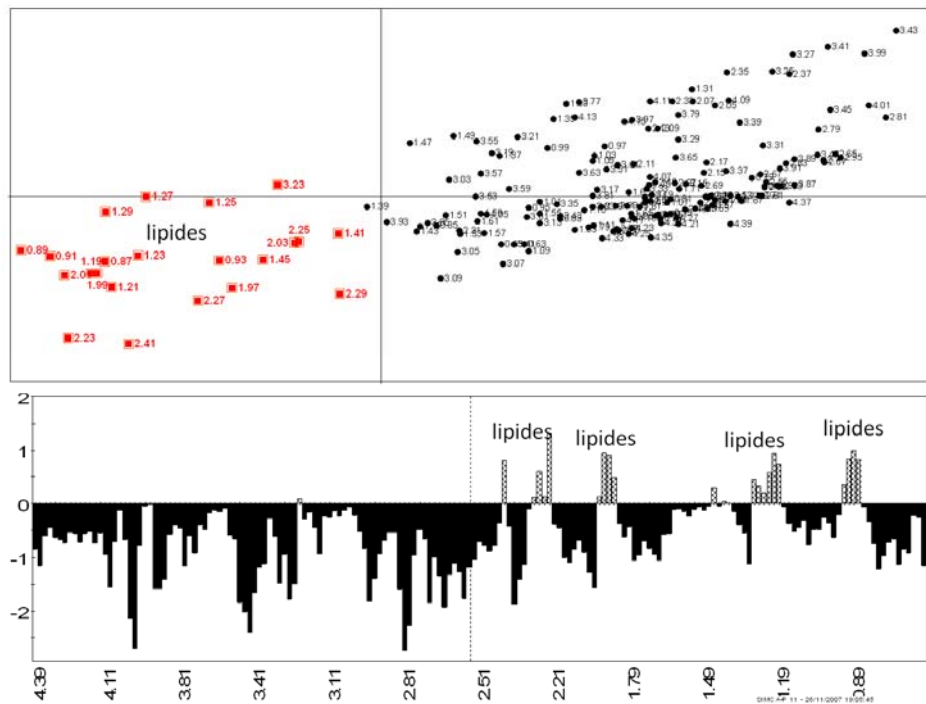


Figure 77 : Principales contributions métaboliques des LNH : $\delta 0.87$ à 0.93 , $\delta 1.19$ à 1.29 , $\delta 1.41$ et 1.45 , $\delta 1.97$ à 2.03 , $\delta 2.23$ à 2.29 , $\delta 2.41$ et 3.23 . Les points en rouge sur la figure du haut correspondent aux intervalles grisés sur la figure du bas.

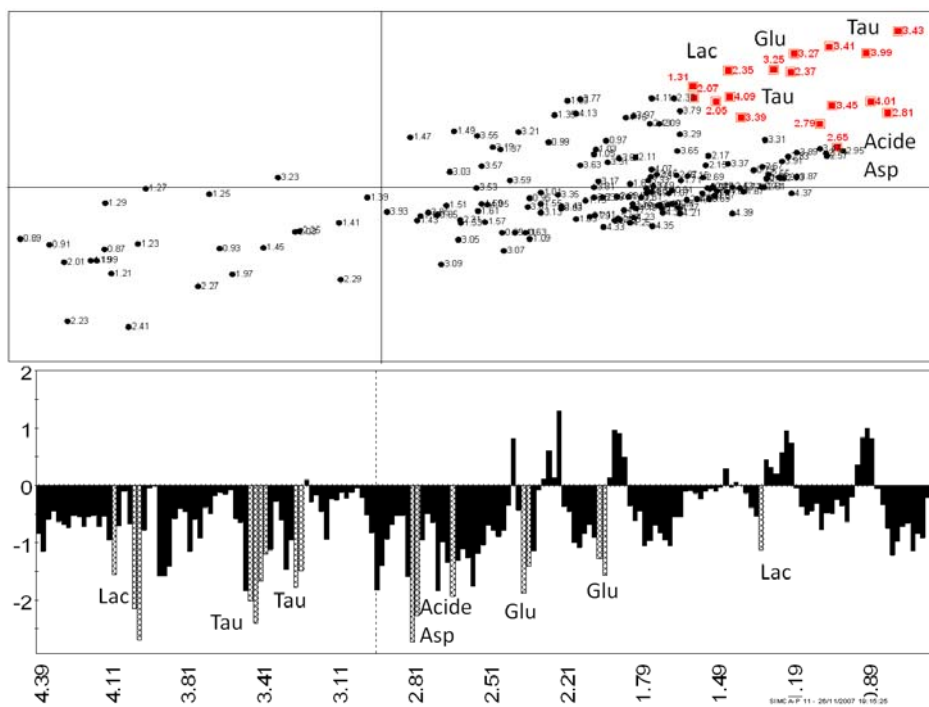


Figure 78 : Principales contributions métaboliques de LH : $\delta 1.31$ à 1.33 , $\delta 2.07$, $\delta 2.33$ et 2.37 , $\delta 3.25$ à 3.27 , $\delta 3.41$ à 3.43 , $\delta 3.77$, $\delta 3.99$ à 4.01 et $\delta 4.09$ à 4.11 . Les points en rouge sur la figure du haut correspondent aux intervalles grisés sur la figure du bas.

Le métabolome des lymphomes hogkiniens (Figure 78) est caractérisé par la présence de lactate (δ 1.31 et δ 4.11), probablement du glutamate (δ 2.07, δ 2.33 à 2.37, 3.77), de la taurine (δ 3.25 et 3.42) et une contribution non identifiée à 4ppm qui peut être, soit la sérine (manque les contributions à 3.94 et 3.97), soit l'asparagine (manque les contributions à 3ppm), ou encore le phénylalanine (absence des contributions à 3.12, 3.3 ppm).

3.3.6. CONCLUSIONS

Concernant la maladie de Hodgkin, les analyses HRMAS-RMN couplées au ^{18}F -FDG-TEP-TDM suggèrent qu'une fixation glucosée intense signifie une prolifération cellulaire accrue, principalement couplée à un métabolisme anaérobie. Ceux-ci sont mis en évidence par l'augmentation de différents métabolites couplée à un SUV élevé. On note ainsi une augmentation du glucose, comme attendu, ainsi que de la choline (choline, phosphocholine) marquant l'activité cellulaire accrue et une prédominance du métabolisme anaérobie marquée par l'augmentation des lactates et de l'alanine.

Ces interprétations restent cependant préliminaires compte tenu du faible nombre de cas étudiés. De plus, il apparaît, au vu des profils de contributions métaboliques (Figure 77 et Figure 78), couplés à la forte dispersion des contributions métaboliques liées aux lymphomes hodgliniens, que la différence de population entre les deux groupes analysés (8 par rapport à 20) induise une prédominance de la variance interne aux lymphomes hodgliniens.

Par ailleurs, l'emploi de séquences RMN plus adapté à la nature fortement lipidique des échantillons, comme pour les neuroblastomes, permettrait peut être de mettre en évidence d'autres voies métaboliques différentes entre les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens. Enfin, l'augmentation du nombre de cas étudiés, dans le cas de l'étude principale mettant en correspondance les données du ^{18}F -FDG avec les données métaboliques, ou dans le cas de l'étude secondaire comparant les profils métaboliques de lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens est essentielle.

CHAPITRE IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

4.1. RATIONNEL DU PROJET.

La genèse de cette thèse trouve ses fondements dans un besoin flagrant d'outils de caractérisation des pathologies cancéreuses. Ces outils doivent avoir pour but d'établir un diagnostic plus fin mais aussi, et surtout, d'apporter de nouveaux facteurs pronostiques en vue d'adapter au mieux les traitements à chaque cas. L'individualisation du traitement, adapté au mieux à chaque patient, passe par une meilleure caractérisation du phénotype, au sens large, lié à cette pathologie, mais aussi aux diverses sous-entités pathologiques.

La métabolomique est un outil récent, aujourd'hui en plein essor, qui mêle diverses techniques d'analyses telles que la MS et la spectroscopie de RMN, couplées à des méthodes statistiques évoluées afin d'extraire les informations métaboliques pertinentes permettant de caractériser les systèmes biologiques. C'est donc naturellement que l'approche métabolomique s'est imposée comme une technique de choix pour répondre à cette problématique initiale : comment affiner le diagnostic et caractériser au mieux les tumeurs cérébrales ?

Ainsi, l'objectif principal de cette thèse était l'étude du métabolome des tumeurs cérébrales, dans le but d'explorer son potentiel dans l'évaluation du diagnostic et du pronostic de cette pathologie.

4.2. RESULTATS.

Les premiers résultats obtenus lors de l'étude sur les oligodendrogliomes ont permis de conforter nos hypothèses de départ sur le potentiel de la métabolomique à faire face à notre

problématique. En plus de permettre une caractérisation des sous groupes d'oligodendrogliomes en rapport avec leur grade de malignité, l'approche métabolomique nous a permis de bâtir un modèle lié aux modifications du métabolisme corrélées avec la progression de la pathologie. La pertinence de notre approche se trouve encore renforcée au vue de la riche bibliographie attenante au sujet (métabolomique et oncologie) apparue entre le début de nos travaux et la rédaction de cette thèse (Burns et al., 2004; Claudino et al., 2007; Davis and Hord, 2005; Davis and Milner, 2004; Denkert et al., 2006; Fan et al., 2006; Fan et al., 2004; Go et al., 2003; Griffin and Kauppinen, 2007b; Griffiths and Stubbs, 2003; Jordan and Cheng, 2007; Morvan and Demidem, 2007; Nicosia et al., 2003; Wheatley, 2005). Ainsi, l'étude des processus biologiques mis en jeux lors de l'évolution d'une pathologie cancéreuse, en se reposant sur l'analyse des produits finaux que sont les métabolites apparaît comme une approche d'avenir. La transition d'un grade de malignité à un stade plus élevé est probablement un processus continu. C'est pourquoi une caractérisation sur une échelle fractionnée en étapes successives, comme le propose la classification de l'OMS sur les bases morphométriques, reflètera probablement de manière moins fidèle l'évolution de la tumorigénèse qu'un suivi des modifications métaboliques induites (Kros, 2007).

Les études préliminaires, sur les lymphomes et neuroblastomes, que nous avons pu mener conjointement, ont-elles aussi permis d'obtenir des résultats probant en mettant en corrélations les données issues de l'analyse du métabolome avec d'autres facteurs pronostiques habituellement utilisés en clinique.

4.2. METHODOLOGIE MISE EN ŒUVRE : AVANTAGES ET LIMITES DU PROJET

Nous avons pu, tout au long de ce travail, mettre en avant les raisons qui nous ont poussé à privilégier une approche analytique basée sur la technique de RMN HRMAS pour l'étude du métabolome des tumeurs. Ce choix nous a permis de répondre aux principales critiques soulevées quant à la représentativité du métabolome des échantillons analysés vis-à-vis de la pathologie étudiée, grâce, notamment, au caractère non sélectif de la méthode et à l'extrême simplicité dans la préparation des échantillons biologiques comparativement aux autres techniques, telles que la SRM des liquides ou la MS. D'un point de vue purement pratique, la limitation du temps de préparation des échantillons biologiques est un critère prépondérant dans l'optique d'une étude métabolomique, qui plus est, si celle-ci doit répondre aux exigences du milieu clinique. De plus la technique RMN HRMAS permet de ne pas dénaturer l'échantillon au cours de l'analyse, contrairement à la RMN « classique » qui nécessite l'extraction en milieu liquide des métabolites, ou de la MS qui détruit l'échantillon. Ainsi la RMN HRMAS permet de multiplier les analyses sur le même échantillon, à

condition de stopper la dégradation métabolique (par conservation à basse température par exemple). De plus, la RMN a démontrée lors d'études réalisées par le consortium COMET une très bonne reproductibilité inter et intra laboratoires, ce qui est essentiel dans une optique de comparaison des profils métaboliques sur un nombre important d'échantillons. Ces avantages sont prépondérants compte tenu des perspectives envisagées lors de l'élaboration de ce projet.

D'un point de vue méthodologique, la difficulté inhérente à la réalisation d'une étude métabolomique sur du tissu biologique nous a conduit à mettre en œuvre une série de protocoles afin de standardiser les manipulations et d'atteindre un seuil qualitatif adéquat. Ainsi les protocoles cliniques mis en œuvre dans nos études, grâce à une interaction constante avec les équipes médicales des services de chirurgie et d'anatomie pathologique, ont permis d'obtenir un contrôle maximal sur l'échantillon, allant du choix de la pièce opératoire aux paramètres de conditionnement et conservation, en passant par le contrôle du délai d'ischémie de chaque échantillon. Chaque pièce opératoire répond donc à un cahier des charges précis, garantissant une traçabilité complète ainsi qu'une conservation optimale de son métabolome pour une meilleure représentativité du système biologique au temps « t » correspondant au moment précis de l'exercice. Ces étapes, essentielles, ne font l'objet de quasiment aucune publication dans le cadre précis de la métabolomique et ces points ne sont que rarement, ou partiellement, abordés. Seuls quelques articles se sont proposés d'étudier l'effet de la conservation des échantillons avant l'étude de leur métabolome et à notre connaissance aucun article ne fait référence aux divers paramètres de prélèvement des pièces opératoires.

Enfin, l'approche statistique de nos études nous a confronté à un vaste panel de techniques d'analyses, dérivant souvent de méthodes employées dans les milieux financiers et précédemment adaptées pour l'analyse des données issues des « omiques » plus ancien (génomique, transcriptomique, protéomique). Rapidement les techniques de reconnaissance d'empreinte (*pattern recognition*), couplée aux méthodes de réduction de dimensionnalité, sont apparues comme les plus intéressantes pour notre problématique. Deux approches, reposant sur un formalisme similaires mais diamétralement opposées d'un point de vue conceptuel, nous sont apparues comme étant les plus propices à répondre à nos attentes : d'une part, l'ACP, permettant l'analyse de données non supervisée, et d'autre part l'analyse PLS, pour l'analyse de données avec contraintes (supervisée). De ces deux techniques, l'analyse PLS a rapidement prouvé sa supériorité pour l'analyse de modifications biologiques « fines », comme la différenciation de sous-groupes en fonction de la malignité au sein d'une même entité tumoral (*i.e.* oligodendrogliomes), ou lorsque les modifications métaboliques étudiées peuvent être reliées à autre paramètre clinique (*i.e.* fixation de traceur en PET). Toutefois, l'ACP reste indispensable lorsque qu'aucune contrainte *a priori* ne peut être définie.

Néanmoins l'expérience acquise au court de ces trois années nous a permis de dégager un certains nombre de critiques, d'un point de vue méthodologique et pratique, quant à la réalisation

d'une étude par RMN HRMAS sur du tissu biologique qu'il convient de corriger lors des études futures.

Au premier lieu de ceux-ci apparaît la faiblesse statistique dû au nombre de cas étudié. Cette remarque s'applique aujourd'hui à la quasi-totalité des références relevées en métabolomique et constitue le principal frein à son essor. En effet, seules quelques rares publications, majoritairement effectuées en RMN liquide, sur des échantillons d'urine, font preuve d'un nombre de cas statistiquement probants (1310 cas pour cette étude sur le rat portant sur la toxicité (Holmes et al., 2001), ou encore environ 800 cas répartis sur des populations de trois pays (Dumas et al., 2006)).

Le deuxième biais important, que nous avons abordé précédemment, concerne la logistique nécessaire au contrôle parfait de l'échantillon entre l'opération du patient et la fin de l'examen RMN HRMAS. Bien que les protocoles mis en œuvre aient été élaborés de sorte à limiter toute dégradation ou évolution métabolique entre les phases initiales et finales de l'analyse, un nombre non négligeable de zones d'ombres apparaît au cours de ce processus. Les progrès enregistrés par la mise en place des protocoles cités précédemment sont importants mais certains points restent aujourd'hui encore critiques. En effet, bien que les délais d'ischémies soient contrôlés et réduits au strict minimum il apparaît comme difficilement réalisable de quantifier les modifications métaboliques liés à ce laps de temps compte tenu des cinétiques extrêmement rapides des réactions métaboliques. A l'autre bout du processus d'analyse, l'évolution métabolique au cours de l'acquisition RMN HRMAS est souvent un paramètre dont il n'est pas tenu compte et il n'est pas rare de noter des températures d'enregistrement de l'ordre de 20°C, voire supérieures. L'ensemble des enregistrements de nos études ont été réalisés à une température de 3°C, et l'équilibre métabolique au cours du temps s'est avéré satisfaisant, tout du moins pour la réalisation d'études statistiques sur des données 1D. Néanmoins il apparaît que même à ces températures proches de 0°C, le métabolisme ne soit pas parfaitement stoppé et que ces points restent à explorer.

Enfin, un troisième point important concerne l'analyse biochimique ainsi que l'analyse statistique. Ce point est directement lié à la sensibilité et à l'identification métabolique permises par la méthode. En effet, nous avons pu voir que le principal frein à l'emploi de la RMN HRMAS pour l'analyse métabolomique reste sa faible sensibilité, surtout en comparaison avec la MS. Ce point est à mettre en parallèle avec la difficulté pour déterminer quels sont les métabolites mis en jeu au sortir des analyses statistiques. Le recouvrement des signaux lié à la faible fenêtre spectrale utile en RMN HRMAS du proton représente aujourd'hui une limite importante lors de l'analyse statistique des données.

4.4. PERSPECTIVES.

Les travaux exploratoires entrepris dans le cadre de cette thèse ont ainsi permis de démontrer la possibilité d'appliquer la métabolomique pour l'étude des pathologies cancéreuses, et plus particulièrement des tumeurs cérébrales. Les travaux de validation statistique des résultats préliminaires exposés dans cette thèse nécessiteront l'acquisition d'un grand nombre de profils métaboliques et donc la constitution d'une « base de données métaboliques ».

Comme nous avons pu le voir, appliquer un protocole de métabolomique par RMN HRMAS sur des échantillons de tissus à grande échelle, tout en conservant un contrôle optimal sur les échantillons implique néanmoins une infrastructure importante, implantée au plus près des patients et des praticiens hospitaliers. Cet objectif a donné lieu à la mise en place d'un projet nommé CARMen (CANCérologie RMN), labélisé par le pôle innovations thérapeutiques d'Alsace le 20 décembre 2006, conduisant à l'implantation du premier spectromètre RMN HRMAS en milieu clinique à l'Hôpital de Hautepierre, inauguré en octobre 2007.

L'objectif général de ce projet est d'étendre l'expérience acquise durant cette thèse à tous les domaines de la cancérologie où il existe, soit une dissociation entre le diagnostic histopathologique de la tumeur et le devenir du patient, soit une discordance à la réponse thérapeutique pour un sous-type de tumeur. L'implantation d'un Spectromètre HRMAS dans le milieu hospitalier, au sein même du Service d'anatomie Pathologique où toute la logistique de la tumorotheque fonctionne depuis quelques années, est le seul moyen d'accéder rapidement et en toute sécurité à un grand nombre d'échantillons.

Ce projet est issu de l'étroite collaboration entre des équipes cliniques (Service de Biophysique et Médecine Nucléaire, Service d'Anatomie Pathologique, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Service de Neurochirurgie, Service de Pédiatrie 3, Département d'Hématologie et d'Oncologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg à l'Hôpital de Hautepierre), des équipes de recherche universitaires (Laboratoire RMN de la matière condensée - ULP/CNRS FRE 2446) ainsi que d'un partenaire industriel (Bruker BioSpin – Wissembourg).

D'une durée initiale de 3 ans, CARMen devra, à terme, permettre d'optimiser les processus d'acquisitions RMN HRMAS pour les rendre parfaitement compatibles avec une utilisation en routine clinique. Cette première phase permettra d'établir une base de données conséquente sur les métabolomes des tissus cancéreux (6000 échantillons), et aboutir sur un système quasi automatique d'acquisition des profils métaboliques. De plus ce projet devra répondre aux différents problèmes soulevés lors de ces travaux quant à la réalisation de protocole en métabolomique.

L'implantation d'un spectromètre RMN HRMAS et de l'infrastructure attenante à son

fonctionnement au cœur d'un hôpital apparaît comme une opportunité unique et un avantage prépondérant pour le maintien des critères de qualité des échantillons biologiques. Ce projet a pour objectif l'analyse de 6 000 échantillons sur cette période de 3 ans, apportant de fait la puissance statistique nécessaire à ce type d'étude. Par ailleurs, l'accès aux bases de données de la tumorotheque permettra de confronter les résultats de la métabolomique par RMN HRMAS aux résultats d'autres techniques telles que la biologie moléculaire ou l'anatomie pathologique. En parallèle de cet objectif principal, le projet a pour but de répondre de façon optimale aux diverses critiques que nous avons pu détailler au paragraphe 4.3. En effet, en plus d'augmenter de manière significative la population étudiée, CARMen visera à explorer les aspects méthodologiques de la métabolomique appliquée aux tissus biologiques en analysant par exemple la cinétique de dégradation métabolique de divers tissus biologiques. Ce projet inclut également une exploration et une implémentation de nouveaux outils statistiques, et/ou méthodologique pour l'acquisition RMN HRMAS, afin de répondre aux limites de la technique dans la phase d'identification métabolique.

En plus de l'étude du métabolome des tissus cancéreux, l'implantation du spectromètre RMN HRMAS à proximité des équipes médicales permet de tabler sur un champ d'application bien plus large. Ainsi, les techniques de métabolomique ont déjà pu faire preuve de leur efficacité dans d'autres domaines cliniques comme les problématiques de transplantation, les maladies neurodégénératives, les pathologies cardiaques, et bien d'autre comme nous avons pu le voir en introduction de ces travaux. Néanmoins, l'ensemble de ces études restes aujourd'hui limité à un faible nombre de cas étudiés du fait même de l'éloignement des structures hospitalières et des centres de recherche disposant des moyens techniques, scientifiques et humains capable de réaliser ces analyses. Le regroupement de l'ensemble de ces moyens au sein même d'une structure hospitalière devrait ainsi permettre de valider ou d'infirmer ces premières études, en se reposant sur un nombre largement supérieur de cas étudiés.

Enfin, parallèlement, l'exploration des réponses métaboliques à diverses thérapeutiques se présente comme des champs d'exploration prometteurs. Il existe un besoin important de trouver des modèles *in vitro*, ou par extension *ex vivo*, de toxicologie reproduisant avec fidélité les mécanismes *in vivo*. Il a ainsi été démontré que l'utilisation du tissu dans son intégralité, de manière non destructive, rend la technique RMN HRMAS particulièrement attractive pour ce type d'approche (Shockcor and Holmes, 2002). Dans cet article les auteurs évoquent un ensemble de 100 produits testés au travers de leurs effets métabolique sur les biofluides, et démontrent le potentiel de la RMN HRMAS dans ce cadre d'étude de toxicologie. Ainsi, cette référence montre que les résultats obtenus par application de la RMN HRMAS sont similaires à ceux obtenus par RMN sur les extraits tissulaires, et démontre même que les résultats de discrimination lors des études statistiques sont améliorés par utilisation de la RMN HRMAS. Les biomarqueurs de toxicité mis en évidence sont eux aussi identiques

et permettent aux auteurs de démontrer les avantages de la technique RMN HRMAS (facilité de préparation des échantillons, non sélectivité des métabolites analysés, ...) comparativement aux techniques classiques.

Il a aussi pu être montré que la technique RMN HRMAS peut être utilisée avec succès pour enregistrer les réponses de cellules et tissus à différentes thérapies, comme par exemple pour l'étude du thiazolidinedione (agent retirant les cellules du cycle cellulaire) dans le traitement des liposarcomes (Chen et al., 2002). Il a été montré que cet événement est associé à une accumulation de triglycérides et une augmentation du rapport entre la phosphatidylcholine et la PCh (PtdCho / PCh). Comme la RMN peut détecter cette dernière variable, il a été suggéré que la RMN pouvait être utilisée pour quantifier l'efficacité des traitements. Ce résultat indique que ce paramètre peut probablement servir comme un marqueur RMN détectable pour une thérapie efficace des liposarcomes. Ces quelques références ouvrent une brèche, et, les perspectives d'étude du métabolome de tissu pathologique, soumis à une radiothérapie ou à une chimiothérapie, semblent aujourd'hui importantes. Ces dernières années ont ainsi vu naître des regroupements de laboratoires universitaires et pharmacologiques (COMET, HUSERMET) en vue d'explorer la faisabilité d'études pharmacologiques sur des bases métabolomiques. Ces structures ont à ce jour réalisé des travaux permettant de démontrer la robustesse et la reproductibilité de telles études, posant ainsi les jalons pour la réalisation d'analyses en pharmaco-métabolomiques.

L'ensemble de ces applications, la masse d'échantillons disponibles, les moyens aujourd'hui mis en œuvre, laissent entrevoir un avenir prometteur pour l'implémentation de la spectrométrie RMN HRMAS dans le milieu clinique. L'apport de la métabolomique pour la compréhension des processus pathologiques ou l'étude de la réponse au traitement apparaît aujourd'hui comme incontournable. Si les résultats obtenus durant cette thèse ont permis de faciliter la création de ce pôle d'étude métabolomique en milieu clinique, il reste aujourd'hui une immense charge de travail afin de concrétiser les espoirs que suscitent actuellement la métabolomique.

REFERENCES

- Agulnik, M., and Mason, W.P. (2006). Recent advances in the treatment of oligodendrogliomas. *Current neurology and neuroscience reports* 6, 212-217.
- Al Banchaabouchi, M., Marescau, B., Possemiers, I., D'Hooge, R., Levillain, O., and De Deyn, P.P. (2000). NG, NG-dimethylarginine and NG, NG-dimethylarginine in renal insufficiency. *Pflugers Arch* 439, 524-531.
- Ala-Korpela, M., Hiltunen, Y., Jokisaari, J., Eskelinen, S., Kiviniity, K., Savolainen, M.J., and Kesaniemi, Y.A. (1993). A comparative study of ¹H NMR lineshape fitting analyses and biochemical lipid analyses of the lipoprotein fractions VLDL, LDL and HDL, and total human blood plasma. *NMR in biomedicine* 6, 225-233.
- Ala-Korpela, M., Posio, P., Mattila, S., Korhonen, A., and Williams, S.R. (1996). Absolute quantification of phospholipid metabolites in brain-tissue extracts by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of magnetic resonance* 113, 184-189.
- Alizadeh, A., Eisen, M., Botstein, D., Brown, P.O., and Staudt, L.M. (1998). Probing lymphocyte biology by genomic-scale gene expression analysis. *Journal of clinical immunology* 18, 373-379.
- Allen, J., Davey, H.M., Broadhurst, D., Heald, J.K., Rowland, J.J., Oliver, S.G., and Kell, D.B. (2003). High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nature biotechnology* 21, 692-696.
- Alter, O., Brown, P.O., and Botstein, D. (2000). Singular value decomposition for genome-wide expression data processing and modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10101-10106.
- Anderson, N.L., and Anderson, N.G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19, 1853-1861.
- Andrew, E.R., and Newing, R.A. (1958). The Narrowing of Nuclear Magnetic Resonance Spectra by Molecular Rotation in Solids. *The Proceedings of the Physical Society* 72, 13.
- Andrew, W.N., and Russell, J.M.-S. (2001). Temperature calibration of a high-resolution magic-angle spinning NMR probe for analysis of tissue samples. *Magnetic Resonance in Chemistry* 39, 4.
- Apostolova, L.G., and Thompson, P.M. (2007). Brain mapping as a tool to study neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 4, 387-400.
- Arus, C., Barany, M., Westler, W.M., and Markley, J.L. (1984). Proton nuclear magnetic resonance of human muscle extracts. *Clinical physiology and biochemistry* 2, 49-55.
- Aue, W.P., Bartholdi, E., and Ernst, R.R. (1976). Two-dimensional spectroscopy: application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* 64, 17.
- Bagatell, R., Rumcheva, P., London, W.B., Cohn, S.L., Look, A.T., Brodeur, G.M., Frantz, C., Joshi, V., Thorner, P., Rao, P.V., Castleberry, R., and Bowman, L.C. (2005). Outcomes of children with intermediate-risk neuroblastoma after treatment stratified by MYCN status and tumor cell ploidy. *J Clin Oncol* 23, 8819-8827.
- Bales, J.R., Higham, D.P., Howe, I., Nicholson, J.K., and Sadler, P.J. (1984). Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clinical chemistry* 30, 426-432.
- Baris, D., and Zahm, S.H. (2000). Epidemiology of lymphomas. *Current opinion in oncology* 12, 383-394.
- Barton, S.J., Howe, F.A., Tomlins, A.M., Cudlip, S.A., Nicholson, J.K., Bell, B.A., and Griffiths, J.R. (1999). Comparison of in vivo ¹H MRS of human brain tumours with ¹H HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples in vitro. *Magma (New York, N.Y)* 8, 121-128.
- Bathen, T.F., Jensen, L.R., Sitter, B., Fjosne, H.E., Halgunset, J., Axelson, D.E., Gribbestad, I.S., and Lundgren, S. (2007). MR-determined metabolic phenotype of breast cancer in prediction of lymphatic spread, grade, and hormone status. *Breast cancer research and treatment* 104, 181-189.
- Bax, A., and Davis, D.G. (1985). *J. Magn. Reson.* 65.
- Beckonert, O., Monnerjahn, J., Bonk, U., and Leibfritz, D. (2003). Visualizing metabolic changes in breast-cancer tissue using ¹H-NMR spectroscopy and self-organizing maps. *NMR in biomedicine* 16, 1-11.
- Behar, K.L., den Hollander, J.A., Stromski, M.E., Ogino, T., Shulman, R.G., Petroff, O.A., and Prichard, J.W. (1983). High-resolution ¹H nuclear magnetic resonance study of cerebral hypoxia in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 4945-4948.
- Behar, K.L., Rothman, D.L., Shulman, R.G., Petroff, O.A., and Prichard, J.W. (1984). Detection of cerebral lactate in vivo during hypoxemia by ¹H NMR at relatively low field strengths (1.9 T). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 2517-2519.
- Bell, E., Premkumar, R., Carr, J., Lu, X., Lovat, P.E., Kees, U.R., Lunec, J., and Tweddle, D.A. (2006). The role of MYCN in the failure of MYCN amplified neuroblastoma cell lines to G1 arrest after DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5, 2639-

2647.

- Bell, J.D., Brown, J.C., and Sadler, P.J. (1989). NMR studies of body fluids. *NMR in biomedicine* 2, 246-256.
- Bell, J.D., Lee, J.A., Lee, H.A., Sadler, P.J., Wilkie, D.R., and Woodham, R.H. (1991). Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochimica et biophysica acta* 1096, 101-107.
- Bell, J.D., Sadler, P.J., Macleod, A.F., Turner, P.R., and La Ville, A. (1987). ¹H NMR studies of human blood plasma. Assignment of resonances for lipoproteins. *FEBS letters* 219, 239-243.
- Bertram, H.C., Hoppe, C., Petersen, B.O., Duus, J.O., Molgaard, C., and Michaelsen, K.F. (2007a). An NMR-based metabonomic investigation on effects of milk and meat protein diets given to 8-year-old boys. *The British journal of nutrition* 97, 758-763.
- Bertram, H.C., Malmendal, A., Petersen, B.O., Madsen, J.C., Pedersen, H., Nielsen, N.C., Hoppe, C., Molgaard, C., Michaelsen, K.F., and Duus, J.O. (2007b). Effect of magnetic field strength on NMR-based metabonomic human urine data. Comparative study of 250, 400, 500, and 800 MHz. *Analytical chemistry* 79, 7110-7115.
- Bertram, H.C., rgen Jakobsen, H.J., and Nielsen, O.B. (2005). Origin of the high-frequency resonances in ¹H NMR spectra of muscle tissue: an in vitro slow magic-angle spinning study. pp. 3229-3234.
- Bicciato, S., Luchini, A., and Di Bello, C. (2003). PCA disjoint models for multiclass cancer analysis using gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 19, 571-578.
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., and Freedman, L.S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clone. *Cancer research* 38, 7.
- Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Sampas, N., Dougherty, E., Wang, E., Marincola, F., Gooden, C., Lueders, J., Glatfelter, A., Pollock, P., Carpten, J., Gillanders, E., Leja, D., Dietrich, K., Beaudry, C., Berens, M., Alberts, D., and Sondak, V. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406, 536-540.
- Bodenhausen, G., and Ruben, D.G. (1980). *Chem. Phys. Lett.* 69.
- Bollard, M.E., Garrod, S., Holmes, E., Lindon, J.C., Humpfer, E., Spraul, M., and Nicholson, J.K. (2000). High-resolution (¹H and (¹H-(¹³C) magic angle spinning NMR spectroscopy of rat liver. *Magn Reson Med* 44, 201-207.
- Bollard, M.E., Murray, A.J., Clarke, K., Nicholson, J.K., and Griffin, J.L. (2003). A study of metabolic compartmentation in the rat heart and cardiac mitochondria using high-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy. *FEBS letters* 553, 73-78.
- Bollard, M.E., Stanley, E.G., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., and Holmes, E. (2005). NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR in biomedicine* 18, 143-162.
- Bottomley, P.A., Edelstein, W.A., Foster, T.H., and Adams, W.A. (1985). In vivo solvent-suppressed localized hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy: a window to metabolism? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 2148-2152.
- Boulesteix, A.L., and Strimmer, K. (2007). Partial least squares: a versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data. *Briefings in bioinformatics* 8, 32-44.
- Brahimi-Horn, C., and Pouyssegur, J. (2006). The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bulletin du cancer* 93, E73-80.
- Brindle, J.T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J.K., Bethell, H.W., Clarke, S., Schofield, P.M., McKilligin, E., Mosedale, D.E., and Grainger, D.J. (2002). Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics. *Nature medicine* 8, 1439-1444.
- Brindle, J.T., Nicholson, J.K., Schofield, P.M., Grainger, D.J., and Holmes, E. (2003). Application of chemometrics to ¹H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *The Analyst* 128, 32-36.
- Brindle, K.M., Brown, F.F., Campbell, I.D., Grathwohl, C., and Kuchel, P.W. (1979). Application of spin-echo nuclear magnetic resonance to whole-cell systems. *Membrane transport. The Biochemical journal* 180, 37-44.
- Bulakbasi, N., Kocaoglu, M., Sanal, T.H., and Tayfun, C. (2007). Dysembryoplastic neuroepithelial tumors: proton MR spectroscopy, diffusion and perfusion characteristics. *Neuroradiology* 49, 805-812.
- Burgues, O., Navarro, S., Noguera, R., Pellin, A., Ruiz, A., Castel, V., and Llombart-Bosch, A. (2006). Prognostic value of the International Neuroblastoma Pathology Classification in Neuroblastoma (Schwannian stroma-poor) and comparison with other prognostic factors: a study of 182 cases from the Spanish Neuroblastoma Registry. *Virchows Arch* 449, 410-420.
- Burns, M.A., He, W., Wu, C.L., and Cheng, L.L. (2004). Quantitative pathology in tissue MR spectroscopy based human prostate metabolomics. *Technology in cancer research & treatment* 3, 591-598.
- Burns, M.A., Taylor, J.L., Wu, C.L., Zepeda, A.G., Bielecki, A., Cory, D., and Cheng, L.L. (2005). Reduction of spinning sidebands in proton NMR of human prostate tissue with slow high-resolution magic angle spinning. *Magn Reson Med* 54, 34-42.
- Burri, R., Bigler, P., Straehl, P., Posse, S., Colombo, J.P., and Herschkowitz, N. (1990). Brain development: ¹H magnetic

- resonance spectroscopy of rat brain extracts compared with chromatographic methods. *Neurochemical research* 15, 1009-1016.
- Buvat, I. (2007). Les limites du SUV / Understanding the limitations of SUV. *Médecine Nucléaire* 31, 7.
- Camicioli, R.M., Hanstock, C.C., Bouchard, T.P., Gee, M., Fisher, N.J., and Martin, W.R. (2007). Magnetic resonance spectroscopic evidence for presupplementary motor area neuronal dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22, 382-386.
- Carey, R.N., Wold, S., and Westgard, J.O. (1975). Principal component analysis: an alternative to "referee" methods in method comparison studies. *Analytical chemistry* 47, 1824-1829.
- Carrato-Monino, C., and Ariza, A. (2007). [Oligodendrogliomas: their morphological characteristics and molecular alterations]. *Revista de neurologia* 44, 353-359.
- Celda, B., Monleon, D., Martinez-Bisbal, M.C., Esteve, V., Martinez-Granados, B., Pinero, E., Ferrer, R., Piquer, J., Marti-Bonmati, L., and Cervera, J. (2006). MRS as endogenous molecular imaging for brain and prostate tumors: FP6 project "eTUMOR". *Advances in experimental medicine and biology* 587, 285-302.
- Cerdan, S., Parrilla, R., Santoro, J., and Rico, M. (1985). ¹H NMR detection of cerebral myo-inositol. *FEBS letters* 187, 167-172.
- Chen, J.H., Enloe, B.M., Fletcher, C.D., Cory, D.G., and Singer, S. (2001). Biochemical analysis using high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy distinguishes lipoma-like well-differentiated liposarcoma from normal fat. *Journal of the American Chemical Society* 123, 9200-9201.
- Chen, J.H., Enloe, B.M., Weybright, P., Campbell, N., Dorfman, D., Fletcher, C.D., Cory, D.G., and Singer, S. (2002). Biochemical correlates of thiazolidinedione-induced adipocyte differentiation by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 48, 602-610.
- Chen, J.H., Sambol, E.B., Kennealey, P.T., O'Connor, R.B., DeCarolis, P.L., Cory, D.G., and Singer, S. (2004). Water suppression without signal loss in HR-MAS ¹H NMR of cells and tissues. *J Magn Reson* 171, 143-150.
- Cheng, L.L., Anthony, D.C., Comite, A.R., Black, P.M., Tzika, A.A., and Gonzalez, R.G. (2000a). Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro-oncology* 2, 87-95.
- Cheng, L.L., Anthony, D.C., Comite, A.R., Black, P.M., Tzika, A.A., and Gonzalez, R.G. (2000b). Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro-oncol* 2, 87-95.
- Cheng, L.L., Burns, M.A., Taylor, J.L., He, W., Halpern, E.F., McDougal, W.S., and Wu, C.L. (2005). Metabolic Characterization of Human Prostate Cancer with Tissue Magnetic Resonance Spectroscopy. (American Association for Cancer Research).
- Cheng, L.L., Chang, I.W., Louis, D.N., and Gonzalez, R.G. (1998a). Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer research* 58, 1825-1832.
- Cheng, L.L., Chang, I.W., Smith, B.L., and Gonzalez, R.G. (1998b). Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson* 135, 194-202.
- Cheng, L.L., Lean, C.L., Bogdanova, A., Wright, S.C., Jr., Ackerman, J.L., Brady, T.J., and Garrido, L. (1996). Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn Reson Med* 36, 653-658.
- Cheng, L.L., Ma, M.J., Becerra, L., Ptak, T., Tracey, I., Lackner, A., and Gonzalez, R.G. (1997). Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6408-6413.
- Cheng, L.L., Newell, K., Mallory, A.E., Hyman, B.T., and Gonzalez, R.G. (2002). Quantification of neurons in Alzheimer and control brains with ex vivo high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy and stereology. *Magnetic resonance imaging* 20, 527-533.
- Cheng, L.L., Wu, C., Smith, M.R., and Gonzalez, R.G. (2001). Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS ¹H NMR spectroscopy at 9.4 T. *FEBS letters* 494, 112-116.
- Cho, Y.D., Choi, G.H., Lee, S.P., and Kim, J.K. (2003). (1)H-MRS metabolic patterns for distinguishing between meningiomas and other brain tumors. *Magnetic resonance imaging* 21, 663-672.
- Claudino, W.M., Quattrone, A., Biganzoli, L., Pestrin, M., Bertini, I., and Di Leo, A. (2007). Metabolomics: available results, current research projects in breast cancer, and future applications. *J Clin Oncol* 25, 2840-2846.
- Clottes, E. (2005). [Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy]. *Bulletin du cancer* 92, 119-127.
- Cohen, N., and Weller, R.O. (2007). *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System* (4th edition). *Neuropathol Appl Neurobiol*.
- Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., and Colgan, S.P. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer research* 62, 3387-3394.
- Corr, P. (2006). Imaging of neuro-AIDS. *Journal of psychosomatic research* 61, 295-299.

- Cushing, P., and Bailey, N.J. (1926). A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis book.
- Czernicki, Z., Horsztynski, D., Jankowski, W., Grieb, P., and Walecki, J. (2000). Malignancy of brain tumors evaluated by proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) in vitro. *Acta neurochirurgica* 76, 17-20.
- Daumas-Duport, C. (1994). Histoprognosis of gliomas. *Advances and technical standards in neurosurgery* 21, 43-76.
- Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., and Fallet-Bianco, C. (2000). [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Annales de pathologie* 20, 413-428.
- Daumas-Duport, C., Koziak, M., Miquel, C., Nataf, F., Jouvett, A., and Varlet, P. (2005). [Reappraisal of the Sainte-Anne Hospital classification of oligodendrogliomas in view of retrospective studies]. *Neuro-Chirurgie* 51, 247-253.
- Daumas-Duport, C., Scheithauer, B.W., Chodkiewicz, J.P., Laws, E.R., Jr., and Vedrenne, C. (1988). Dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a surgically curable tumor of young patients with intractable partial seizures. Report of thirty-nine cases. *Neurosurgery* 23, 545-556.
- Davis, C.D., and Hord, N.G. (2005). Nutritional "omics" technologies for elucidating the role(s) of bioactive food components in colon cancer prevention. *The Journal of nutrition* 135, 2694-2697.
- Davis, C.D., and Milner, J. (2004). Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. *Mutation research* 551, 51-64.
- Delikatny, E.J., Russell, P., Hunter, J.C., Hancock, R., Atkinson, K.H., van Haaften-Day, C., and Mountford, C.E. (1993). Proton MR and human cervical neoplasia: ex vivo spectroscopy allows distinction of invasive carcinoma of the cervix from carcinoma in situ and other preinvasive lesions. *Radiology* 188, 791-796.
- Deming, S.N. (1986). Chemometrics: an overview. *Clinical chemistry* 32, 1702-1706.
- Denkert, C., Budczies, J., Kind, T., Weichert, W., Tablack, P., Sehoul, J., Niesporek, S., Kongseng, D., Dietel, M., and Fiehn, O. (2006). Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors. *Cancer research* 66, 10795-10804.
- Deprez, S., Sweatman, B.C., Connor, S.C., Haselden, J.N., and Waterfield, C.J. (2002). Optimisation of collection, storage and preparation of rat plasma for 1H NMR spectroscopic analysis in toxicology studies to determine inherent variation in biochemical profiles. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 30, 1297-1310.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y.A., and Trent, J.M. (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature genetics* 14, 457-460.
- Diehl, V. (2007). Hodgkin's disease--from pathology specimen to cure. *The New England journal of medicine* 357, 1968-1971.
- Duarte, I.F., Stanley, E.G., Holmes, E., Lindon, J.C., Gil, A.M., Tang, H., Ferdinand, R., McKee, C.G., Nicholson, J.K., Vilca-Melendez, H., Heaton, N., and Murphy, G.M. (2005). Metabolic assessment of human liver transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy. *Analytical chemistry* 77, 5570-5578.
- Dumas, M.E., Maibaum, E.C., Teague, C., Ueshima, H., Zhou, B., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Stampler, J., Elliott, P., Chan, Q., and Holmes, E. (2006). Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Analytical chemistry* 78, 2199-2208.
- Dunn, W.B., Bailey, N.J., and Johnson, H.E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *The Analyst* 130, 606-625.
- Dunne, V.G., Bhattachayya, S., Besser, M., Rae, C., and Griffin, J.L. (2005). Metabolites from cerebrospinal fluid in aneurysmal subarachnoid haemorrhage correlate with vasospasm and clinical outcome: a pattern-recognition 1H NMR study. *NMR in biomedicine* 18, 24-33.
- Ebbels, T.M., Keun, H.C., Beckonert, O.P., Bollard, M.E., Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2007). Prediction and Classification of Drug Toxicity Using Probabilistic Modeling of Temporal Metabolic Data: The Consortium on Metabonomic Toxicology Screening Approach. *Journal of proteome research* 6, 4407-4422.
- Ekstrand, K.E., Dixon, R.L., Raben, M., and Ferree, C.R. (1977). Proton NMR relaxation times in the peripheral blood of cancer patients. *Physics in medicine and biology* 22, 925-931.
- Eriksson, L., Antti, H., Gottfries, J., Holmes, E., Johansson, E., Lindgren, F., Long, I., Lundstedt, T., Trygg, J., and Wold, S. (2004). Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabolomics (gpm). *Analytical and bioanalytical chemistry* 380, 419-429.
- Eugene, M., Le Moyec, L., de Certaines, J., Desruennes, M., Le Rumeur, E., Frayssé, J.B., and Cabrol, C. (1991). Lipoproteins in heart transplantation: proton magnetic resonance spectroscopy of plasma. *Magn Reson Med* 18, 93-101.
- Fan, T. (1996). Metabolite profiling by one- and twodimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog NMR Spectrosc* 28.
- Fan, T.W., Higashi, R.M., and Lane, A.N. (1986). Monitoring of hypoxic metabolism in superfused plant tissues by in vivo 1H NMR. *Archives of biochemistry and biophysics* 251, 674-687.
- Fan, T.W., Higashi, R.M., and Lane, A.N. (2006). Integrating metabolomics and transcriptomics for probing SE anticancer

mechanisms. *Drug metabolism reviews* 38, 707-732.

Fan, T.W., Lane, A.N., and Higashi, R.M. (2004). The promise of metabolomics in cancer molecular therapeutics. *Current opinion in molecular therapeutics* 6, 584-592.

Fellenberg, K., Hauser, N.C., Brors, B., Neutzner, A., Hoheisel, J.D., and Vingron, M. (2001). Correspondence analysis applied to microarray data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10781-10786.

Fiehn, O. (2002). Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology* 48, 155-171.

Fiehn, O., Kloska, S., and Altmann, T. (2001). Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Current opinion in biotechnology* 12, 82-86.

Flcury, A., Menegoz, F., Grosclaude, P., Daures, J.P., Henry-Amar, M., Raverdy, N., Schaffer, P., Poisson, M., and Delattre, J.Y. (1997). Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France. *Cancer* 79, 1195-1202.

Florian, C.L., Preece, N.E., Bhakoo, K.K., Williams, S.R., and Noble, M. (1995a). Characteristic metabolic profiles revealed by ¹H NMR spectroscopy for three types of human brain and nervous system tumours. *NMR in biomedicine* 8, 253-264.

Florian, C.L., Preece, N.E., Bhakoo, K.K., Williams, S.R., and Noble, M.D. (1995b). Cell type-specific fingerprinting of meningioma and meningeal cells by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer research* 55, 420-427.

Fossel, E.T., Carr, J.M., and McDonagh, J. (1986). Detection of malignant tumors. Water-suppressed proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma. *The New England journal of medicine* 315, 1369-1376.

Foxall, P.J., Bewley, S., Neild, G.H., Rodeck, C.H., and Nicholson, J.K. (1995). Analysis of fetal and neonatal urine using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Archives of disease in childhood* 73, F153-157.

Foxall, P.J., Mellotte, G.J., Bending, M.R., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (1993a). NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of renal transplant function. *Kidney international* 43, 234-245.

Foxall, P.J., Parkinson, J.A., Sadler, I.H., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (1993b). Analysis of biological fluids using 600 MHz proton NMR spectroscopy: application of homonuclear two-dimensional J-resolved spectroscopy to urine and blood plasma for spectral simplification and assignment. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 11, 21-31.

Foxall, P.J., Spraul, M., Farrant, R.D., Lindon, L.C., Neild, G.H., and Nicholson, J.K. (1993c). 750 MHz ¹H-NMR spectroscopy of human blood plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 11, 267-276.

Fris, M., Tessem, M.B., Cejkova, J., and Midelfart, A. (2006). The effect of single and repeated UVB radiation on rabbit cornea. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 244, 1680-1687.

Fulham, M.J., Melisi, J.W., Nishimiya, J., Dwyer, A.J., and Di Chiro, G. (1993). Neuroimaging of juvenile pilocytic astrocytomas: An enigma. *Radiology* 189, 5.

Galanaud, D., Chinot, O., Metellus, P., and Cozzone, P. (2005). [Magnetic resonance spectroscopy in gliomas]. *Bulletin du cancer* 92, 327-331.

Garrod, A.E. (1902). The Incidence of Alkaptonuria: A Study. in *Chemical Individuality*. *Lancet Oncol* ii, 4.

Garrod, S., Humpfer, E., Spraul, M., Connor, S.C., Polley, S., Connelly, J., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., and Holmes, E. (1999). High-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopic studies on intact rat renal cortex and medulla. *Magn Reson Med* 41, 1108-1118.

Garrod, S., Humpfer, E., Connor, S.C., Connelly, J.C., Spraul, M., Nicholson, J.K., and Holmes, E. (2001). High-resolution (¹H) NMR and magic angle spinning NMR spectroscopic investigation of the biochemical effects of 2-bromoethanamine in intact renal and hepatic tissue. *Magn Reson Med* 45, 781-790.

Gartland, K.P., Beddell, C.R., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (1991). Application of pattern recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Molecular pharmacology* 39, 629-642.

Gartland, K.P., Bonner, F.W., Timbrell, J.A., and Nicholson, J.K. (1989). Biochemical characterisation of para-aminophenol-induced nephrotoxic lesions in the F344 rat. *Archives of toxicology* 63, 97-106.

Gartland, K.P., Sanins, S.M., Nicholson, J.K., Sweatman, B.C., Beddell, C.R., and Lindon, J.C. (1990). Pattern recognition analysis of high resolution ¹H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR in biomedicine* 3, 166-172.

Gasteiger, J. (2006). Chemoinformatics: a new field with a long tradition. *Analytical and bioanalytical chemistry* 384, 57-64.

German, J.B., Gillies, L.A., Smilowitz, J.T., Zivkovic, A.M., and Watkins, S.M. (2007). Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Current opinion in lipidology* 18, 66-71.

Giannini, C., Scheithauer, B.W., Weaver, A.L., Burger, P.C., Kros, J.M., Mork, S., Graeber, M.B., Bauserman, S., Buckner, J.C., Burton, J., Riepe, R., Tazelaar, H.D., Nascimento, A.G., Crotty, T., Keeney, G.L., Pernicone, P., and Altermatt, H. (2001). Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60, 248-262.

Gidman, E., Goodacre, R., Emmett, B., Smith, A.R., and Gwynn-Jones, D. (2003). Investigating plant-plant interference by metabolic fingerprinting. *Phytochemistry* 63, 705-710.

- Gilles, F.H., Tavaré, C.J., Leviton, A., Hedley-Whyte, E.T., Sotrel, A., Adelman, L., Davis, R.L., and Rorke, L.B. (2004). Prognostic limitations of the Daumas-Duport grading scheme in infratentorial neuroglial tumors in children. *Pediatr Dev Pathol* 7, 138-147.
- Gillies, R.J., and Morse, D.L. (2005). In vivo magnetic resonance spectroscopy in cancer. *Annual review of biomedical engineering* 7, 287-326.
- Glassbrook, N., and Ryals, J. (2001). A systematic approach to biochemical profiling. *Current opinion in plant biology* 4, 186-190.
- Go, V.L., Butrum, R.R., and Wong, D.A. (2003). Diet, nutrition, and cancer prevention: the postgenomic era. *The Journal of nutrition* 133, 3830S-3836S.
- Goodacre, R. (2005a). Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *J Exp Bot* 56, 245-254.
- Goodacre, R. (2005b). Metabolomics – the way forward. *Metabolomics* 1, 2.
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W.B., Harrigan, G.G., and Kell, D.B. (2004). Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in biotechnology* 22, 245-252.
- Govindaraju, V., Young, K., and Maudsley, A.A. (2000). Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR in biomedicine* 13, 129-153.
- Graca, G., Duarte, I.F., Goodfellow, B.J., Barros, A.S., Carreira, I.M., Couceiro, A.B., Spraul, M., and Gil, A.M. (2007). Potential of NMR Spectroscopy for the Study of Human Amniotic Fluid. *Analytical chemistry* 79, 8367-8375.
- Gribbestad, I.S., Petersen, S.B., Fjosne, H.E., Kvinnsland, S., and Krane, J. (1994). ¹H NMR spectroscopic characterization of perchloric acid extracts from breast carcinomas and non-involved breast tissue. *NMR in biomedicine* 7, 181-194.
- Gribbestad, I.S., Sitter, B., Lundgren, S., Krane, J., and Axelson, D. (1999). Metabolite composition in breast tumors examined by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anticancer research* 19, 1737-1746.
- Griffin, J.L. (2003). Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Current opinion in chemical biology* 7, 648-654.
- Griffin, J.L. (2004). Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes? *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 359, 857-871.
- Griffin, J.L. (2006). The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 361, 147-161.
- Griffin, J.L., Blenkinsop, C., Valonen, P.K., Caldas, C., and Kauppinen, R.A. (2006). High-resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy and reverse transcription-PCR analysis of apoptosis in a rat glioma. *Analytical chemistry* 78, 1546-1552.
- Griffin, J.L., Bollard, M., Nicholson, J.K., and Bhakoo, K. (2002). Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS (1)H NMR spectroscopy. *NMR in biomedicine* 15, 375-384.
- Griffin, J.L., and Bollard, M.E. (2004). Metabonomics: its potential as a tool in toxicology for safety assessment and data integration. *Current drug metabolism* 5, 389-398.
- Griffin, J.L., and Corcoran, O. (2005). High-resolution magic-angle spinning ¹³C NMR spectroscopy of cerebral tissue. *Magma (New York, N.Y)* 18, 51-56.
- Griffin, J.L., and Kauppinen, R.A. (2007a). A metabolomics perspective of human brain tumours. *The FEBS journal* 274, 1132-1139.
- Griffin, J.L., and Kauppinen, R.A. (2007b). Tumour metabolomics in animal models of human cancer. *Journal of proteome research* 6, 498-505.
- Griffin, J.L., Keun, H., Richter, C., Moskau, D., Rae, C., and Nicholson, J.K. (2003a). Compartmentation of metabolism probed by [2-¹³C]alanine: improved ¹³C NMR sensitivity using a CryoProbe detects evidence of a glial metabolite. *Neurochemistry international* 42, 93-99.
- Griffin, J.L., Pole, J.C., Nicholson, J.K., and Carmichael, P.L. (2003b). Cellular environment of metabolites and a metabonomic study of tamoxifen in endometrial cells using gradient high resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta* 1619, 151-158.
- Griffin, J.L., and Shockcor, J.P. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 4, 551-561.
- Griffin, J.L., Walker, L.A., Garrod, S., Holmes, E., Shore, R.F., and Nicholson, J.K. (2000). NMR spectroscopy based metabonomic studies on the comparative biochemistry of the kidney and urine of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), white toothed shrew (*Crocidura suaveolens*) and the laboratory rat. *Comparative biochemistry and physiology* 127, 357-367.
- Griffin, J.L., Williams, H.J., Sang, E., and Nicholson, J.K. (2001). Abnormal lipid profile of dystrophic cardiac tissue as demonstrated by one- and two-dimensional magic-angle spinning (1)H NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 46, 249-255.
- Griffiths, J.R., and Stubbs, M. (2003). Opportunities for studying cancer by metabolomics: preliminary observations on tumors deficient in hypoxia-inducible factor 1. *Advances in enzyme regulation* 43, 67-76.
- Griffiths, J.R., Tate, A.R., Howe, F.A., and Stubbs, M. (2002). Magnetic Resonance Spectroscopy of cancer-practicalities of

- multi-centre trials and early results in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer* 38, 2085-2093.
- Grivet, J.P., Delort, A.M., and Portais, J.C. (2003). NMR and microbiology: from physiology to metabolomics. *Biochimie* 85, 823-840.
- Hagberg, G. (1998). From magnetic resonance spectroscopy to classification of tumors. A review of pattern recognition methods. *NMR in biomedicine* 11, 148-156.
- Hammen, T., Schwarz, M., Doelken, M., Kerling, F., Engelhorn, T., Stadlbauer, A., Ganslandt, O., Nimsy, C., Doerfler, A., and Stefan, H. (2007). 1H-MR spectroscopy indicates severity markers in temporal lobe epilepsy: correlations between metabolic alterations, seizures, and epileptic discharges in EEG. *Epilepsia* 48, 263-269.
- Hanstock, C.C., Rothman, D.L., Prichard, J.W., Jue, T., and Shulman, R.G. (1988). Spatially localized 1H NMR spectra of metabolites in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 1821-1825.
- Harrigan, G.G. (2006). Metabolic profiling--IBC's inaugural meeting. Using metabolomics to accelerate drug discovery and development. 14-15 November 2005, Durham, NC, USA. *IDrugs* 9, 28-31.
- Harrigan, G.G., and Yates, L.A. (2006). High-throughput screening, metabolomics and drug discovery. *IDrugs* 9, 188-192.
- Hartmann, C., and von Deimling, A. (2005). Oligodendrogliomas: impact of molecular genetics on treatment. *Neurology India* 53, 140-148.
- Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindstrom, L.H., and Iyo, M. (2005). Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29, 767-769.
- Hazany, S., Hesselink, J.R., Healy, J.F., and Imbesi, S.G. (2007). Utilization of glutamate/creatine ratios for proton spectroscopic diagnosis of meningiomas. *Neuroradiology* 49, 121-127.
- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H.I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15178-15183.
- Herring, F.G., Phillips, P.S., Pritchard, H., Silver, H., and Whittal, K.P. (1990). The proton NMR of blood plasma and the test for cancer. *Magn Reson Med* 16, 35-48.
- Hicks, J. (2003). Genome, proteome, and metabolome: where are we going? *Ultrastructural pathology* 27, 289-294.
- Hiltunen, Y., Ala-Korpela, M., Jokisaari, J., Eskelinen, S., and Kiviniitty, K. (1992). Proton nuclear magnetic resonance lineshape studies on human blood plasma lipids from newborn infants, healthy adults, and adults with tumors. *Magn Reson Med* 26, 89-99.
- Hines, A., Oladiran, G.S., Bignell, J.P., Stentford, G.D., and Viant, M.R. (2007). Direct sampling of organisms from the field and knowledge of their phenotype: key recommendations for environmental metabolomics. *Environmental science & technology* 41, 3375-3381.
- Hockel, M., Schlenger, K., Aral, B., Mitze, M., Schaffer, U., and Vaupel, P. (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer research* 56, 4509-4515.
- Hockel, M., Schlenger, K., Hockel, S., and Vaupel, P. (1999). Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer research* 59, 4525-4528.
- Hockel, M., and Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 93, 266-276.
- Hodavance, M.S., Ralston, S.L., and Pelczer, I. (2007). Beyond blood sugar: the potential of NMR-based metabolomics for type 2 human diabetes, and the horse as a possible model. *Analytical and bioanalytical chemistry* 387, 533-537.
- Hollywood, K., Brison, D.R., and Goodacre, R. (2006). Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* 6, 4716-4723.
- Holmes, E., and Antti, H. (2002). Chemometric contributions to the evolution of metabolomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *The Analyst* 127, 1549-1557.
- Holmes, E., Bonner, F.W., Sweatman, B.C., Lindon, J.C., Beddell, C.R., Rahr, E., and Nicholson, J.K. (1992). Nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression of and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury(II) chloride and 2-bromoethanamine. *Molecular pharmacology* 42, 922-930.
- Holmes, E., Foxall, P.J., and Nicholson, J.K. (1990). Proton NMR analysis of plasma from renal failure patients: evaluation of sample preparation and spectral-editing methods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 8, 955-958.
- Holmes, E., Foxall, P.J., Nicholson, J.K., Neild, G.H., Brown, S.M., Beddell, C.R., Sweatman, B.C., Rahr, E., Lindon, J.C., Spraul, M., and et al. (1994). Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of 1H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Analytical biochemistry* 220, 284-296.
- Holmes, E., Foxall, P.J., Spraul, M., Farrant, R.D., Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (1997). 750 MHz 1H NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 15, 1647-1659.

- Holmes, E., Nicholls, A.W., Lindon, J.C., Ramos, S., Spraul, M., Neidig, P., Connor, S.C., Connelly, J., Damment, S.J., Haselden, J., and Nicholson, J.K. (1998a). Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ¹H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *NMR in biomedicine* 11, 235-244.
- Holmes, E., Nicholson, J.K., Nicholls, A.W., Lindon, J.C., Connor, S.C., Polley, S., and Connelly, J. (1998b). The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine. *Chemomet & Intel Lab Systems*. 44, 10.
- Holmes, E., Nicholson, J.K., and Tranter, G. (2001). Metabonomic characterization of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks. *Chemical research in toxicology* 14, 182-191.
- Holmes, E., Tsang, T.M., Huang, J.T., Leweke, F.M., Koethe, D., Gerth, C.W., Nolden, B.M., Gross, S., Schreiber, D., Nicholson, J.K., and Bahn, S. (2006a). Metabolic Profiling of CSF: Evidence That Early Intervention May Impact on Disease Progression and Outcome in Schizophrenia. *PLoS Med* 3.
- Holmes, E., Tsang, T.M., and Tabrizi, S.J. (2003). The Application of NMR-Based Metabonomics in Neurological Disorders. pp. 358-372.
- Holmes, E., Tsang, T.M., and Tabrizi, S.J. (2006b). The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. *NeuroRx* 3, 358-372.
- Holowenko, D., Peeling, J., and Sutherland, G. (1992). ¹H NMR properties of N-acetylaspartylglutamate in extracts of nervous tissue of the rat. *NMR in biomedicine* 5, 43-47.
- Holter, N.S., Mitra, M., Maritan, A., Cieplak, M., Banavar, J.R., and Fedoroff, N.V. (2000). Fundamental patterns underlying gene expression profiles: simplicity from complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8409-8414.
- Howe, F.A., Maxwell, R.J., Saunders, D.E., Brown, M.M., and Griffiths, J.R. (1993). Proton spectroscopy in vivo. *Magnetic resonance quarterly* 9, 31-59.
- Howe, F.A., and Opstad, K.S. (2003a). ¹H MR spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR in biomedicine* 16, 123-131.
- Howe, F.A., and Opstad, K.S. (2003b). ¹H MR spectroscopy of brain tumours and masses. pp. 123-131.
- Hu, F., Furihata, K., Kato, Y., and Tanokura, M. (2007). Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 4307-4311.
- Huang, S., Yang, H., and Zhuang, H. (2006). Initial diagnosis and treatment follow up of neuroblastoma invasion of inferior vena cava with I-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy. *Clinical nuclear medicine* 31, 718-720.
- Huang, Y., Lisboa, P.J., and El-Deredy, W. (2003). Tumour grading from magnetic resonance spectroscopy: a comparison of feature extraction with variable selection. *Statistics in medicine* 22, 147-164.
- Huhn, S.D., Szabo, C.M., Gass, J.H., and Manzi, A.E. (2004). Metabolic profiling of normal and hypertensive rat kidney tissues by hrMAS-NMR spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry* 378, 1511-1519.
- Humpfer, E., Spraul, M., Nicholls, A.W., Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (1997). Direct observation of resolved intracellular and extracellular water signals in intact human red blood cells using ¹H MAS NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 38, 334-336.
- Hwang, J.-H., Egnaczyk, G.F., Ballard, E., Dunn, R.S., Holland, S.K., Ball Jr., W.S., and Iaconetta, G. (1998). Proton MR spectroscopic characteristics of pediatric pilocytic astrocytomas. *American Journal of Neuroradiology* 19, 5.
- Ilias, I., and Pacak, K. (2005). Diagnosis and management of tumors of the adrenal medulla. *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung* 37, 717-721.
- James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly reviews of biophysics* 30, 279-331.
- Jewett, M.C., Hofmann, G., and Nielsen, J. (2006). Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. *Current opinion in biotechnology* 17, 191-197.
- Jordan, K.W., and Cheng, L.L. (2007). NMR-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer. *Expert review of proteomics* 4, 389-400.
- Jordan, K.W., He, W., Halpern, E.F., Wu, C.-L., and Cheng, L.L. (2007). Evaluation of Tissue Metabolites with High Resolution Magic Angle Spinning MR Spectroscopy Human After Three-Year Storage at -80 °C Prostate Samples. *Biomarker Insights* 2, 8.
- Joshi, V.V., Cantor, A.B., Althuler, G., Larkin, E.W., Neill, J.S., Shuster, J.J., Holbrook, C.T., Hayes, F.A., Nitschke, R., Duncan, M.H., and et al. (1992). Age-linked prognostic categorization based on a new histologic grading system of neuroblastomas. A clinicopathologic study of 211 cases from the Pediatric Oncology Group. *Cancer* 69, 2197-2211.
- Kaplan, O., van Zijl, P.C., and Cohen, J.S. (1990). Information from combined ¹H and ³¹P NMR studies of cell extracts: differences in metabolism between drug-sensitive and drug-resistant MCF-7 human breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 169, 383-390.
- Katzenstein, H.M., Bowman, L.C., Brodeur, G.M., Thorner, P.S., Joshi, V.V., Smith, E.I., Look, A.T., Rowe, S.T., Nash, M.B., Holbrook, T., Alvarado, C., Rao, P.V., Castleberry, R.P., and Cohn, S.L. (1998). Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric oncology group

- experience—a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol* 16, 2007-2017.
- Katzenstein, H.M., and Cohn, S.L. (1998). Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Current opinion in oncology* 10, 43-51.
- Katzenstein, H.M., Cohn, S.L., Shore, R.M., Bardo, D.M., Haut, P.R., Olszewski, M., Schmoltdt, J., Liu, D., Rademaker, A.W., and Kletzel, M. (2004). Scintigraphic response by 123I-metaiodobenzylguanidine scan correlates with event-free survival in high-risk neuroblastoma. *J Clin Oncol* 22, 3909-3915.
- Kell, D.B. (2004). Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current opinion in microbiology* 7, 296-307.
- Kell, D.B. (2005). Metabolomics, machine learning and modelling: towards an understanding of the language of cells. *Biochemical Society transactions* 33, 520-524.
- Kell, D.B. (2006). Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug discovery today* 11, 1085-1092.
- Kell, D.B., Brown, M., Davey, H.M., Dunn, W.B., Spasic, I., and Oliver, S.G. (2005). Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nature reviews* 3, 557-565.
- Keun, H.C. (2006). Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharmacology & therapeutics* 109, 92-106.
- Keun, H.C., Beckonert, O., Griffin, J.L., Richter, C., Moskau, D., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (2002a). Cryogenic probe 13C NMR spectroscopy of urine for metabonomic studies. *Analytical chemistry* 74, 4588-4593.
- Keun, H.C., Ebbels, T.M., Antti, H., Bollard, M.E., Beckonert, O., Schlotterbeck, G., Senn, H., Niederhauser, U., Holmes, E., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (2002b). Analytical reproducibility in (1)H NMR-based metabonomic urinalysis. *Chemical research in toxicology* 15, 1380-1386.
- Khan, S., Williamson, P., and Sutton, R. (1998). Meta-analyses and large randomized, controlled trials. *The New England journal of medicine* 338, 60-61; author reply 61-62.
- Kim, J.H. (2002). Bioinformatics and genomic medicine. *Genet Med* 4, 62S-65S.
- Kinoshita, Y., Kajiwara, H., Yokota, A., and Koga, Y. (1994). Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors: an in vitro study. *Neurosurgery* 35, 606-613; discussion 613-604.
- Kinoshita, Y., and Yokota, A. (1997). Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR in biomedicine* 10, 2-12.
- Kober, F., Caus, T., Riberi, A., Confort-Gouny, S., LeFur, Y., Izquierdo, M., Ranjeva, J.P., Viout, P., Mesana, T., Metras, D., Cozzzone, P.J., and Bernard, M. (2002). Objective and noninvasive metabolic characterization of donor hearts by phosphorous-31 magnetic resonance spectroscopy. *Transplantation* 74, 1752-1756.
- Koschny, R., Koschny, T., Froster, U.G., Krupp, W., and Zuber, M.A. (2002). Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer genetics and cytogenetics* 135, 147-159.
- Koschorek, F., Gremmel, H., Stelten, J., Offermann, W., Kruger, E., and Leibfritz, D. (1989). Characterization of CNS lesions by using high-resolution 1H MR spectroscopy of CSF: preliminary results. *Ajnr* 10, 523-527.
- Kotitschke, K., Jung, H., Nekolla, S., Haase, A., Bauer, A., and Bogdahn, U. (1994). High-resolution one- and two-dimensional 1H MRS of human brain tumor and normal glial cells. *NMR in biomedicine* 7, 111-120.
- Kriat, M., Vion-Dury, J., Confort-Gouny, S., Favre, R., Viout, P., Sciaky, M., Sari, H., and Cozzzone, P.J. (1993). Analysis of plasma lipids by NMR spectroscopy: application to modifications induced by malignant tumors. *Journal of lipid research* 34, 1009-1019.
- Kros, J.M. (2007). From expert opinion to evidence-based: changes in the gold standard of primary brain tumour diagnosis. *Journal of Pathology* 213, 3.
- Kuchel, P.W., Hunt, G.E., Johnson, G.F., Beilharz, G.R., Chapman, B.E., Jones, A.J., and Singh, B.S. (1984). Lithium, red blood cell choline and clinical state. A prospective study in manic-depressive patients. *Journal of affective disorders* 6, 83-94.
- Kuesel, A.C., Donnelly, S.M., Halliday, W., Sutherland, G.R., and Smith, I.C. (1994). Mobile lipids and metabolic heterogeneity of brain tumours as detectable by ex vivo 1H MR spectroscopy. *NMR in biomedicine* 7, 172-180.
- Kurhanewicz, J., Swanson, M.G., Nelson, S.J., and Vigneron, D.B. (2002). Combined magnetic resonance imaging and spectroscopic imaging approach to molecular imaging of prostate cancer. *J Magn Reson Imaging* 16, 451-463.
- Kwock, L., Smith, J.K., Castillo, M., Ewend, M.G., Collichio, F., Morris, D.E., Bouldin, T.W., and Cush, S. (2006). Clinical role of proton magnetic resonance spectroscopy in oncology: brain, breast, and prostate cancer. *The lancet oncology* 7, 859-868.
- Lacey, M.E., Subramanian, R., Olson, D.L., Webb, A.G., and Sweedler, J.V. (1999). High-Resolution NMR Spectroscopy of Sample Volumes from 1 nL to 10 μ L. *Chemical reviews* 99, 3133-3152.
- Lancelot, N., Elbayed, K., Bianco, A., and Piotto, M. (2004). Measurement of scaled residual dipolar couplings in proteins using variable-angle sample spinning. *Journal of biomolecular NMR* 29, 259-269.
- Lantéri, P., and Longerey, R. (1998). La Chimométrie : Outils du XX siècle, méthode du XXI siècle ? *Analisis* 26, 3.
- Lauzier, M.C., Michaud, M.D., Dery, M.A., and Richard, D.E. (2006). [HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences]. *Bulletin du cancer* 93, 349-356.
- Lavine, B.K., and Workman, J., Jr. (2002). Chemometrics. *Analytical chemistry* 74, 2763-2769.

- Le Belle, J.E., Harris, N.G., Williams, S.R., and Bhakoo, K.K. (2002). A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ^1H -NMR spectroscopy. *NMR in biomedicine* 15, 37-44.
- Le Moyec, L., Pruna, A., Eugene, M., Bedrossian, J., Idatte, J.M., Huneau, J.F., and Tome, D. (1993). Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine and plasma in renal transplantation follow-up. *Nephron* 65, 433-439.
- Leclerc, X., Huisman, T.A., and Sorensen, A.G. (2002). The potential of proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) in the diagnosis and management of patients with brain tumors. *Current opinion in oncology* 14, 292-298.
- Lee, K.H., and Harrington, M.G. (1997). The assay development of a molecular marker for transmissible spongiform encephalopathies. *Electrophoresis* 18, 502-506.
- Lin, C.Y., Wu, H., Tjeerdema, R.S., and Viant, M.R. (2007). Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics* 3 12.
- Lindon, J.C., Holmes, E., Bollard, M.E., Stanley, E.G., and Nicholson, J.K. (2004a). Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* 9, 1-31.
- Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2003a). So what's the deal with metabonomics? *Analytical chemistry* 75, 384A-391A.
- Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2004b). Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert review of molecular diagnostics* 4, 189-199.
- Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2006). Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharmaceutical research* 23, 1075-1088.
- Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2007). Metabonomics in pharmaceutical R&D. *The FEBS journal* 274, 1140-1151.
- Lindon, J.C., Keun, H.C., Ebbels, T.M., Pearce, J.M., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2005). The Consortium for Metabonomic Toxicology (COMET): aims, activities and achievements. *Pharmacogenomics* 6, 691-699.
- Lindon, J.C., Nicholson, J.K., and Everett, J.R. (1999a). NMR spectroscopy of biofluids. *Ann. Rep. NMR Spectrosc.*(Ed. G.A. Webb) 38, 88.
- Lindon, J.C., Nicholson, J.K., and Everett, J.R. (1999b). NMR spectroscopy of biofluids. *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* (Ed. G.A. Webb) 38, 88
- Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., Antti, H., Bollard, M.E., Keun, H., Beckonert, O., Ebbels, T.M., Reilly, M.D., Robertson, D., Stevens, G.J., Luke, P., Breau, A.P., Cantor, G.H., Bible, R.H., Niederhauser, U., Senn, H., Schlotterbeck, G., Sidelmann, U.G., Laursen, S.M., Tymiak, A., Car, B.D., Lehman-McKeeman, L., Colet, J.M., Loukaci, A., and Thomas, C. (2003b). Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicology and applied pharmacology* 187, 137-146.
- Ling, M.F., and Brauer, M. (1991). ^1H NMR analyses of methyl group-containing metabolites in rat liver extracts--effects of starvation, anoxia, acute glycerol and carbon tetrachloride treatment and chronic ethanol administration on hepatic metabolism. *Physiological chemistry and physics and medical NMR* 23, 229-238.
- Liu, M., Tang, H., Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (2001). Recovery of underwater resonances by magnetization transferred NMR spectroscopy (RECUR-NMR). *J Magn Reson* 153, 133-137.
- London, W.B., Castleberry, R.P., Matthay, K.K., Look, A.T., Seeger, R.C., Shimada, H., Thorner, P., Brodeur, G., Maris, J.M., Reynolds, C.P., and Cohn, S.L. (2005). Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 23, 6459-6465.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114, 97-109.
- Lucas, L.H., Wilson, S.F., Lunte, C.E., and Larive, C.K. (2005). Concentration profiling in rat tissue by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy: investigation of a model drug. *Analytical chemistry* 77, 2978-2984.
- Lukes, D.J., Madhu, B., Kjellstrom, C., Gustavsson, M.L., Mjornstedt, L., Olausson, M., and Soussi, B. (2001). Decreasing ratios of phosphocreatine to beta-ATP correlates to progressive acute rejection in a concordant mouse heart to rat xenotransplantation model. *Scandinavian journal of immunology* 53, 171-175.
- Lyng, H., Sitter, B., Bathen, T.F., Jensen, L.R., Sundfor, K., Kristensen, G.B., and Gribbestad, I.S. (2007). Metabolic mapping by use of high-resolution magic angle spinning ^1H MR spectroscopy for assessment of apoptosis in cervical carcinomas. *BMC cancer* 7, 11.
- Mackinnon, W.B., Barry, P.A., Malycha, P.L., Gillett, D.J., Russell, P., Lean, C.L., Doran, S.T., Barraclough, B.H., Bilous, M., and Mountford, C.E. (1997). Fine-needle biopsy specimens of benign breast lesions distinguished from invasive cancer ex vivo with proton MR spectroscopy. *Radiology* 204, 661-666.
- Mahon, M.M., deSouza, N.M., Dina, R., Soutter, W.P., McIndoe, G.A., Williams, A.D., and Cox, I.J. (2004a). Preinvasive and invasive cervical cancer: an ex vivo proton magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy study. *NMR in biomedicine* 17, 144-153.
- Mahon, M.M., Williams, A.D., Soutter, W.P., Cox, I.J., McIndoe, G.A., Coutts, G.A., Dina, R., and deSouza, N.M. (2004b). ^1H magnetic resonance spectroscopy of invasive cervical cancer: an in vivo study with ex vivo corroboration. *NMR in*

biomedicine 17, 1-9.

Maiuri, F., Del Basso De Caro, M.L., Iaconetta, G., Peca, C., Esposito, M., and de Divitiis, E. (2006). Prognostic and survival-related factors in patients with well-differentiated oligodendrogliomas. *Zentralblatt für Neurochirurgie* 67, 204-209.

Maris, J.M. (2005). The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Current opinion in pediatrics* 17, 7-13.

Martin, R.W., Jachmann, R.C., Sakellariou, D., Nielsen, U.G., and Pines, A. (2005). High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Biological Tissues Using Projected Magic Angle Spinning. pp. 253-257.

Martinez-Bisbal, M.C., Marti-Bonmati, L., Piquer, J., Revert, A., Ferrer, P., Llacer, J.L., Piotta, M., Assemat, O., and Celda, B. (2004). ¹H and ¹³C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo ¹H MRS study of human high grade gliomas. *NMR in biomedicine* 17, 191-205.

Maurel, D., Mas, N., Roch, G., Boissin, J., and Arendt, J. (1992). Diurnal variations of urinary 6-sulphatoxymelatonin in male intact or ganglionectomized mink. *Journal of pineal research* 13, 117-123.

McKnight, T.R. (2004). Proton magnetic resonance spectroscopic evaluation of brain tumor metabolism. *Seminars in oncology* 31, 605-617.

Meisamy, S., Bolan, P.J., Baker, E.H., Bliss, R.L., Gulbahce, E., Everson, L.I., Nelson, M.T., and Garwood, M. (2004). Neoadjuvant chemotherapy of locally advanced breast cancer: Predicting response with in vivo H MR spectroscopy - A pilot study at 4 T. *Radiology* 233, 7.

Melendez, H.V., Ahmadi, D., Parkes, H.G., Rela, M., Murphy, G., and Heaton, N. (2001). Proton nuclear magnetic resonance analysis of hepatic bile from donors and recipients in human liver transplantation. *Transplantation* 72, 855-860.

Mendes, P. (2002). Emerging bioinformatics for the metabolome. *Briefings in bioinformatics* 3, 134-145.

Miller, R.W., Young, J.L., Jr., and Novakovic, B. (1995). Childhood cancer. *Cancer* 75, 395-405.

Millis, K., Weybright, P., Campbell, N., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D., Cory, D.G., and Singer, S. (1999). Classification of human liposarcoma and lipoma using ex vivo proton NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 41, 257-267.

Moeller, B.J., Richardson, R.A., and Dewhirst, M.W. (2007). Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer metastasis reviews* 26, 241-248.

Moka, D., Vorreuther, R., Schicha, H., Spraul, M., Humpfer, E., Lipinski, M., Foxall, P.J., Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (1998). Biochemical classification of kidney carcinoma biopsy samples using magic-angle-spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 17, 125-132.

Moka, D., Vorreuther, R., Schicha, H., Spraul, M., Lipinski, M., Foxall, P.J.D., Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (1997). Magic Angle Spinning Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Analysis of Intact Kidney Tissue Samples. *Analytical Communications* 34, 3.

Moller-Hartmann, W., Herminghaus, S., Krings, T., Marquardt, G., Lanfermann, H., Pilatus, U., and Zanella, F.E. (2002). Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions. *Neuroradiology* 44, 371-381.

Moonen, C.T., Liu, G., van Gelderen, P., and Sobering, G. (1992). A fast gradient-recalled MRI technique with increased sensitivity to dynamic susceptibility effects. *Magn Reson Med* 26, 184-189.

Morowitz, M., Shusterman, S., Mosse, Y., Hii, G., Winter, C.L., Khazi, D., Wang, Q., King, R., and Maris, J.M. (2003). Detection of single-copy chromosome 17q gain in human neuroblastomas using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 16, 1248-1256.

Morris, G.A., and Freeman, R. (1979). *J. Am. Chem. Soc.* 101.

Morrison, N., Cochrane, G., Faruque, N., Tatusova, T., Tateno, Y., Hancock, D., and Field, D. (2006). Concept of sample in OMICS technology. *Omics* 10, 127-137.

Morvan, D., and Demidem, A. (2007). Metabolomics by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of the response to chloroethylnitrosourea reveals drug efficacy and tumor adaptive metabolic pathways. *Cancer research* 67, 2150-2159.

Morvan, D., Demidem, A., Papon, J., De Latour, M., and Madelmont, J.C. (2002). Melanoma Tumors Acquire a New Phospholipid Metabolism Phenotype under Cystemustine As Revealed by High-Resolution Magic Angle Spinning Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Intact Tumor Samples 1.

Morvan, D., Demidem, A., Papon, J., and Madelmont, J.C. (2003). Quantitative HRMAS proton total correlation spectroscopy applied to cultured melanoma cells treated by chloroethyl nitrosourea: demonstration of phospholipid metabolism alterations. *Magn Reson Med* 49, 241-248.

Mountford, C.E., Delikatny, E.J., Dyne, M., Holmes, K.T., Mackinnon, W.B., Ford, R., Hunter, J.C., Truskett, I.D., and Russell, P. (1990). Uterine cervical punch biopsy specimens can be analyzed by ¹H MRS. *Magn Reson Med* 13, 324-331.

Mountford, C.E., Doran, S., Lean, C.L., and Russell, P. (2004). Proton MRS can determine the pathology of human cancers with a high level of accuracy. *Chemical reviews* 104, 3677-3704.

Mountford, C.E., Grossman, G., Reid, G., and Fox, R.M. (1982). Characterization of transformed cells and tumors by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer research* 42, 2270-2276.

- Mountford, C.E., Lean, C.L., Hancock, R., Dowd, S., Mackinnon, W.B., Tattersall, M.H., and Russell, P. (1993). Magnetic resonance spectroscopy detects cancer in draining lymph nodes. *Invasion & metastasis* 13, 57-71.
- Mountford, C.E., Saunders, J.K., May, G.L., Holmes, K.T., Williams, P.G., Fox, R.M., Tattersall, M.H., Barr, J.R., Russell, P., and Smith, I.C. (1986). Classification of human tumours by high-resolution magnetic resonance spectroscopy. *Lancet* 1, 651-653.
- Mountford, C.E., Somorjai, R.L., Malycha, P., Gluch, L., Lean, C., Russell, P., Barraclough, B., Gillett, D., Himmelreich, U., Dolenko, B., Nikulin, A.E., and Smith, I.C. (2001). Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy of fine-needle aspirates analysed using a statistical classification strategy. *The British journal of surgery* 88, 1234-1240.
- Mountford, C.E., Wright, L.C., Holmes, K.T., Mackinnon, W.B., Gregory, P., and Fox, R.M. (1984). High-resolution proton nuclear magnetic resonance analysis of metastatic cancer cells. *Science (New York, N.Y)* 226, 1415-1418.
- Murphy, P.S., Viviers, L., Abson, C., Rowland, I.J., Brada, M., Leach, M.O., and Dzik-Jurasz, A.S. (2004). Monitoring temozolomide treatment of low-grade glioma with proton magnetic resonance spectroscopy. *British journal of cancer* 90, 781-786.
- Myers, T.G., Anderson, N.L., Waltham, M., Li, G., Buolamwini, J.K., Scudiero, D.A., Paull, K.D., Sausville, E.A., and Weinstein, J.N. (1997). A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Electrophoresis* 18, 647-653.
- Nataf, F., Tucker, M.L., Varlet, P., Koziak, M., Beuvon, F., Dumas-Duport, C., and Roux, F.X. (2005). [Oligodendrogliomas: historical background of classifications]. *Neuro-Chirurgie* 51, 219-227.
- Nebert, D.W., and Vesell, E.S. (2006). Can personalized drug therapy be achieved? A closer look at pharmacometabonomics. *Trends in pharmacological sciences* 27, 580-586.
- Nelson, S.J. (2003). Multivoxel magnetic resonance spectroscopy of brain tumors. *Molecular cancer therapeutics* 2, 497-507.
- Nelson, T.R., Gillies, R.J., Powell, D.A., Schrader, M.C., Manchester, D.K., and Pretorius, D.H. (1987). High resolution proton NMR spectroscopy of human amniotic fluid. *Prenatal diagnosis* 7, 363-372.
- Nicholson, J., and Wilson, I. (1989). High Resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog NMR Spectroscop* 21, 12.
- Nicholson, J.K., Browning, S.W., Orloff, S.L., and McDougal, J.S. (1993). Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *Journal of immunological methods* 160, 215-218.
- Nicholson, J.K., Buckingham, M.J., and Sadler, P.J. (1983). High resolution ¹H n.m.r. studies of vertebrate blood and plasma. *The Biochemical journal* 211, 605-615.
- Nicholson, J.K., Connelly, J., Lindon, J.C., and Holmes, E. (2002). Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 1, 153-161.
- Nicholson, J.K., Foxall, P.J., Spraul, M., Farrant, R.D., and Lindon, J.C. (1995). 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Analytical chemistry* 67, 793-811.
- Nicholson, J.K., and Gartland, K.P. (1989). ¹H NMR studies on protein binding of histidine, tyrosine and phenylalanine in blood plasma. *NMR in biomedicine* 2, 77-82.
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 29, 1181-1189.
- Nicosia, S.V., Bai, W., Cheng, J.Q., Coppola, D., and Kruk, P.A. (2003). Oncogenic pathways implicated in ovarian epithelial cancer. *Hematology/oncology clinics of North America* 17, 927-943.
- Nishina, M., Hori, E., Matsushita, K., Takahashi, M., Kato, K., and Ohsaka, A. (1988). ¹H-NMR spectroscopic study of serums from patients with malaria. *Physiological chemistry and physics and medical NMR* 20, 269-271.
- Nobeli, I., and Thornton, J.M. (2006). A bioinformatician's view of the metabolome. *Bioessays* 28, 534-545.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005a). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathologica* 109, 93-108.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005b). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64, 479-489.
- Ohsaka, A., Yoshikawa, K., and Matuhasi, T. (1979). Detection by proton nuclear magnetic resonance of elevated lactate concentration in serums from patients with malignant tumors. *Japanese journal of medical science & biology* 32, 305-309.
- Okawa, E.R., Gotoh, T., Manne, J., Igarashi, J., Fujita, T., Silverman, K.A., Xiao, H., Mosse, Y.P., White, P.S., and Brodeur, G.M. (2007). Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene*.
- Oldiges, M., Lutz, S., Pflug, S., Schroer, K., Stein, N., and Wiendahl, C. (2007). Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Applied microbiology and biotechnology* 76, 495-511.
- Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., and Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology* 16, 373-378.
- Opstad, K.S., Provencher, S.W., Bell, B.A., Griffiths, J.R., and Howe, F.A. (2003). Detection of elevated glutathione in

- meningiomas by quantitative in vivo 1H MRS. *Magn Reson Med* 49, 632-637.
- Osada, T., Sakamoto, M., Ino, Y., Iwamatsu, A., Matsuno, Y., Muto, T., and Hirohashi, S. (1996). E-cadherin is involved in the intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (Baltimore, Md 24, 1460-1467.
- Paczkowska, A., Toczyłowska, B., Nyckowski, P., Patkowski, W., Kanski, A., Krawczyk, M., and Oldakowska-Jedynak, U. (2003). High-resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis of bile samples obtained from a patient after orthotopic liver transplantation: new perspectives. *Transplantation proceedings* 35, 2278-2280.
- Pearson, H. (2007). Meet the human metabolome. *Nature* 446, 8.
- Peeling, J., and Sutherland, G. (1992). High-resolution 1H NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. *Magn Reson Med* 24, 123-136.
- Peeling, J., and Sutherland, G. (1993). 1H magnetic resonance spectroscopy of extracts of human epileptic neocortex and hippocampus. *Neurology* 43, 589-594.
- Perez-Enciso, M., and Tenenhaus, M. (2003). Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. *Human genetics* 112, 581-592.
- Peuchmaur, M., d'Amore, E.S., Joshi, V.V., Hata, J., Roald, B., Dehner, L.P., Gerbing, R.B., Stram, D.O., Lukens, J.N., Matthay, K.K., and Shimada, H. (2003). Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 98, 2274-2281.
- Piotto, M., Elbayed, K., Wieruszkeski, J.M., and Lippens, G. (2005). Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe. *J Magn Reson* 173, 84-89.
- Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of biomolecular NMR* 2, 661-665.
- Pirzkall, A., Li, X., Oh, J., Chang, S., Berger, M.S., Larson, D.A., Verhey, L.J., Dillon, W.P., and Nelson, S.J. (2004). 3D MRSI for resected high-grade gliomas before RT: tumor extent according to metabolic activity in relation to MRI. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 59, 126-137.
- Pirzkall, A., McKnight, T.R., Graves, E.E., Carol, M.P., Sneed, P.K., Wara, W.W., Nelson, S.J., Verhey, L.J., and Larson, D.A. (2001). MR-spectroscopy guided target delineation for high-grade gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 50, 915-928.
- Pirzkall, A., Nelson, S.J., McKnight, T.R., Takahashi, M.M., Li, X., Graves, E.E., Verhey, L.J., Wara, W.W., Larson, D.A., and Sneed, P.K. (2002). Metabolic imaging of low-grade gliomas with three-dimensional magnetic resonance spectroscopy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 53, 1254-1264.
- Podo, F. (1999). Tumour phospholipid metabolism. *NMR in biomedicine* 12, 413-439.
- Podo, F., Carpinelli, G., Di Vito, M., Giannini, M., Proietti, E., Fiers, W., Gresser, I., and Belardelli, F. (1987). Nuclear magnetic resonance analysis of tumor necrosis factor-induced alterations of phospholipid metabolites and pH in Friend leukemia cell tumors and fibrosarcomas in mice. *Cancer research* 47, 6481-6489.
- Pont, H., Vion-Dury, J., Kriat, M., Mouly-Bandini, A., Sciaky, M., Viout, P., Confort-Gouny, S., Messana, T., Goudart, M., Monties, J.R., and et al. (1991). NMR spectroscopy of plasma during acute--rejection of transplanted hearts. *Lancet* 337, 792-793.
- Powell JJ, Gartland KPR, Nicholson JK, Ainley CC, and RPH., T. (1990). Bile, pancreatic juice and small bowel secretions contain endogenous metal binding ligands. *Gut* 31.
- Preul, M.C., Caramanos, Z., Leblanc, R., Villemure, J.G., and Arnold, D.L. (1998). Using pattern analysis of in vivo proton MRSI data to improve the diagnosis and surgical management of patients with brain tumors. *NMR in biomedicine* 11, 192-200.
- Raamsdonk, L.M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M.C., Berden, J.A., Brindle, K.M., Kell, D.B., Rowland, J.J., Westerhoff, H.V., van Dam, K., and Oliver, S.G. (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature biotechnology* 19, 45-50.
- Rabenstein, D.L. (1984). 1H NMR methods for the noninvasive study of metabolism and other processes involving small molecules in intact erythrocytes. *Journal of biochemical and biophysical methods* 9, 277-306.
- Ramadan, Z., Jacobs, D., Grigorov, M., and Kochhar, S. (2006). Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms
Talanta 68, 8.
- Ramshaw, I.A., Carlsen, S., Wang, H.C., and Badenoch-Jones, P. (1983). The use of cell fusion to analyse factors involved in tumour cell metastasis. *International journal of cancer* 32, 471-478.
- Ratai, E.M., Pilkenton, S., Lentz, M.R., Greco, J.B., Fuller, R.A., Kim, J.P., He, J., Cheng, L.L., and Gonzalez, R.G. (2005). Comparisons of brain metabolites observed by HRMAS 1H NMR of intact tissue and solution 1H NMR of tissue extracts in SIV-infected macaques. *NMR in biomedicine* 18, 242-251.
- Remy, C., Arus, C., Ziegler, A., Lai, E.S., Moreno, A., Le Fur, Y., and Decorps, M. (1994). In vivo, ex vivo, and in vitro one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of an intracerebral glioma in rat brain: assignment of resonances. *Journal of neurochemistry* 62, 166-179.

- Reo, N.V. (2002). NMR-based metabolomics. *Drug and chemical toxicology* 25, 375-382.
- Roberts, S.S., Mori, M., Pattee, P., Lapidus, J., Mathews, R., O'Malley, J.P., Hsieh, Y.C., Turner, M.A., and Wang, Z. (2004). GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 22, 7.
- Robertson, D.G. (2005). Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci* 85, 809-822.
- Roda, J.M., Pascual, J.M., Carceller, F., Gonzalez-Llanos, F., Perez-Higueras, A., Solivera, J., Barrios, L., and Cerdan, S. (2000). Nonhistological diagnosis of human cerebral tumors by ¹H magnetic resonance spectroscopy and amino acid analysis. *Clin Cancer Res* 6, 3983-3993.
- Rooney, O.M., Troke, J., Nicholson, J.K., and Griffin, J.L. (2003). High-resolution diffusion and relaxation-edited magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy of intact liver tissue. *Magn Reson Med* 50, 925-930.
- Ross, B., and Michaelis, T. (1994). Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic resonance quarterly* 10, 191-247.
- Ross, B.D., and Radda, G.K. (1983). Application of ³¹P n.m.r. to inborn errors of muscle metabolism. *Biochemical Society transactions* 11, 627-630.
- Roussel, R., Mentre, F., Bouchemal, N., Hadjadj, S., Lievre, M., Chatellier, G., Menard, J., Panhard, X., Le Henanff, A., Marre, M., and Le Moyec, L. (2007). NMR-based prediction of cardiovascular risk in diabetes. *Nature medicine* 13, 399-400.
- Rutter, A., Hugenholtz, H., Saunders, J.K., and Smith, I.C. (1995). Classification of brain tumors by ex vivo ¹H NMR spectroscopy. *Journal of neurochemistry* 64, 1655-1661.
- Sano, H., Bonadio, J., Gerbing, R.B., London, W.B., Matthay, K.K., Lukens, J.N., and Shimada, H. (2006). International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *Eur J Cancer* 42, 1113-1119.
- Schilling, F.H., Spix, C., Berthold, F., Erttmann, R., Fehse, N., Hero, B., Klein, G., Sander, J., Schwarz, K., Treuner, J., Zorn, U., and Michaelis, J. (2002). Neuroblastoma screening at one year of age. *The New England journal of medicine* 346, 1047-1053.
- Selinger, D.W., Wright, M.A., and Church, G.M. (2003). On the complete determination of biological systems. *Trends in biotechnology* 21, 251-254.
- Semenza, G.L. (2000). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35, 71-103.
- Serkova, N., Fuller, T.F., Klawitter, J., Freise, C.E., and Niemann, C.U. (2005). H-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. *Kidney international* 67, 1142-1151.
- Shah, N., Sattar, A., Benanti, M., Hollander, S., and Cheuck, L. (2006). Magnetic resonance spectroscopy as an imaging tool for cancer: a review of the literature. *The Journal of the American Osteopathic Association* 106, 23-27.
- Sharma, U., Mehta, A., Seenu, V., and Jagannathan, N.R. (2004). Biochemical characterization of metastatic lymph nodes of breast cancer patients by in vitro ¹H magnetic resonance spectroscopy: a pilot study. (Elsevier), pp. 697-706.
- Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., and Roald, B. (1999). Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 86, 349-363.
- Shockcor, J.P., and Holmes, E. (2002). Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis. *Current topics in medicinal chemistry* 2, 35-51.
- Silwood, C.J., Lynch, E., Claxson, A.W., and Grootveld, M.C. (2002). ¹H and (¹³C) NMR spectroscopic analysis of human saliva. *Journal of dental research* 81, 422-427.
- Simon, T., Hero, B., Hunneman, D.H., and Berthold, F. (2003). Tumour markers are poor predictors for relapse or progression in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 39, 1899-1903.
- Simpson, A.J., and Brown, S.A. (2005). Purge NMR: effective and easy solvent suppression. *J Magn Reson* 175, 340-346.
- Singh, H.K., Yachha, S.K., Saxena, R., Gupta, A., Nagana Gowda, G.A., Bhandari, M., and Khetrapal, C.L. (2003a). A new dimension of ¹H-NMR spectroscopy in assessment of liver graft dysfunction. *NMR in biomedicine* 16, 185-188.
- Singh, N., Avery, R.K., Munoz, P., Pruetz, T.L., Alexander, B., Jacobs, R., Tollemar, J.G., Dominguez, E.A., Yu, C.M., Paterson, D.L., Husain, S., Kusne, S., and Linden, P. (2003b). Trends in risk profiles for and mortality associated with invasive aspergillosis among liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* 36, 46-52.
- Sitter, B., Autti, T., Tyynela, J., Sonnewald, U., Bathen, T.F., Puranen, J., Santavuori, P., Haltia, M.J., Paetau, A., Polvikoski, T., Gribbestad, I.S., and Hakkinen, A.M. (2004a). High-resolution magic angle spinning and ¹H magnetic resonance spectroscopy reveal significantly altered neuronal metabolite profiles in CLN1 but not in CLN3. *Journal of neuroscience research* 77, 762-769.
- Sitter, B., Bathen, T., Hagen, B., Arentz, C., Skjeldestad, F.E., and Gribbestad, I.S. (2004b). Cervical cancer tissue characterized by high-resolution magic angle spinning MR spectroscopy. *Magma (New York, N.Y)* 16, 174-181.
- Sitter, B., Lundgren, S., Bathen, T.F., Halgunset, J., Fjosne, H.E., and Gribbestad, I.S. (2006). Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer tissue with clinical parameters. *NMR in biomedicine* 19, 30-40.
- Sitter, B., Sonnewald, U., Spraul, M., Fjosne, H.E., and Gribbestad, I.S. (2002). High-resolution magic angle spinning MRS of

breast cancer tissue. *NMR in biomedicine* 15, 327-337.

Song, L., Ara, T., Wu, H.W., Woo, C.W., Reynolds, C.P., Seeger, R.C., DeClerck, Y.A., Thiele, C.J., Sposto, R., and Metelitsa, L.S. (2007). Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *The Journal of clinical investigation* 117, 2702-2712.

Stahle, L., and Wold, S. (1986). On the use of some multivariate statistical methods in pharmacological research. *Journal of pharmacological methods* 16, 91-110.

Stanley, M.A. (2002). Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus research* 89, 241-248.

Steuer, R., Kurths, J., Fiehn, O., and Weckwerth, W. (2003a). Interpreting correlations in metabolomic networks. *Biochemical Society transactions* 31, 1476-1478.

Steuer, R., Kurths, J., Fiehn, O., and Weckwerth, W. (2003b). Observing and interpreting correlations in metabolomic networks. *Bioinformatics (Oxford, England)* 19, 1019-1026.

Strenger, V., Kerbl, R., Dornbusch, H.J., Ladenstein, R., Ambros, P.F., Ambros, I.M., and Urban, C. (2007). Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatric blood & cancer* 48, 504-509.

Sutton, L.N., Wehrli, S.L., Gennarelli, L., Wang, Z., Zimmerman, R., Bonner, K., and Rorke, L.B. (1994). High-resolution ¹H-magnetic resonance spectroscopy of pediatric posterior fossa tumors in vitro. *Journal of neurosurgery* 81, 443-448.

Swanson, M.G., Vigneron, D.B., Tabatabai, Z.L., Males, R.G., Schmitt, L., Carroll, P.R., James, J.K., Hurd, R.E., and Kurhanewicz, J. (2003). Proton HR-MAS spectroscopy and quantitative pathologic analysis of MRI/3D-MRSI-targeted postsurgical prostate tissues. *Magn Reson Med* 50, 944-954.

Swanson, M.G., Zektzer, A.S., Tabatabai, Z.L., Simko, J., Jarso, S., Keshari, K.R., Schmitt, L., Carroll, P.R., Shinohara, K., Vigneron, D.B., and Kurhanewicz, J. (2006). Quantitative analysis of prostate metabolites using ¹H HR-MAS spectroscopy. *Magn Reson Med* 55, 1257-1264.

Sweatman, B.C., Farrant, R.D., Holmes, E., Ghauri, F.Y., Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (1993). 600 MHz ¹H-NMR spectroscopy of human cerebrospinal fluid: effects of sample manipulation and assignment of resonances. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 11, 651-664.

Sze, D.Y., and Jardetzky, O. (1990). Determination of metabolite and nucleotide concentrations in proliferating lymphocytes by ¹H-NMR of acid extracts. *Biochimica et biophysica acta* 1054, 181-197.

Tamiya, T., Kinoshita, K., Ono, Y., Matsumoto, K., Furuta, T., and Ohmoto, T. (2000). Proton magnetic resonance spectroscopy reflects cellular proliferative activity in astrocytomas. *Neuroradiology* 42, 333-338.

Tanaka, T., Iehara, T., Sugimoto, T., Hamasaki, M., Teramukai, S., Tsuchida, Y., Kaneko, M., and Sawada, T. (2005). Diversity in neuroblastomas and discrimination of the risk to progress. *Cancer letters* 228, 267-270.

Tate, A.R., Foxall, P.J., Holmes, E., Moka, D., Spraul, M., Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (2000). Distinction between normal and renal cell carcinoma kidney cortical biopsy samples using pattern recognition of (¹H) magic angle spinning (MAS) NMR spectra. *NMR in biomedicine* 13, 64-71.

Tate, A.R., Griffiths, J.R., Martinez-Perez, I., Moreno, A., Barba, I., Cabanas, M.E., Watson, D., Alonso, J., Bartumeus, F., Isamat, F., Ferrer, I., Vila, F., Ferrer, E., Capdevila, A., and Arus, C. (1998). Towards a method for automated classification of ¹H MRS spectra from brain tumours. *NMR in biomedicine* 11, 177-191.

Tate, A.R., Majos, C., Moreno, A., Howe, F.A., Griffiths, J.R., and Arus, C. (2003). Automated classification of short echo time in vivo ¹H brain tumor spectra: a multicenter study. *Magn Reson Med* 49, 29-36.

Tate, A.R., Underwood, J., Acosta, D.M., Julia-Sape, M., Majos, C., Moreno-Torres, A., Howe, F.A., van der Graaf, M., Lefournier, V., Murphy, M.M., Loosemore, A., Ladroue, C., Wesseling, P., Luc Bosson, J., Cabanas, M.E., Simonetti, A.W., Gajewicz, W., Calvar, J., Capdevila, A., Wilkins, P.R., Bell, B.A., Remy, C., Heerschap, A., Watson, D., Griffiths, J.R., and Arus, C. (2006). Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using in vivo magnetic resonance single voxel spectra. *NMR in biomedicine* 19, 411-434.

Taylor, C.F. (2007). Progress in standards for reporting omics data. *Current opinion in drug discovery & development* 10, 254-263.

Taylor, J.L., Wu, C.L., Cory, D., Gonzalez, R.G., Bielecki, A., and Cheng, L.L. (2003). High-resolution magic angle spinning proton NMR analysis of human prostate tissue with slow spinning rates. *Magn Reson Med* 50, 627-632.

Teahan, O., Gamble, S., Holmes, E., Waxman, J., Nicholson, J.K., Bevan, C., and Keun, H.C. (2006). Impact of analytical bias in metabolomic studies of human blood serum and plasma. *Analytical chemistry* 78, 4307-4318.

Tenenhaus, M. (1998). La regression PLS.

Tessem, M.B., Midelfart, A., Cejkova, J., and Bathen, T.F. (2006a). Effect of UVA and UVB irradiation on the metabolic profile of rabbit cornea and lens analysed by HR-MAS ¹H NMR spectroscopy. *Ophthalmic research* 38, 105-114.

Tessem, M.B., Midelfart, A., Cejková, J., and Bathen, T.F. (2006b). Effect of UVA and UVB Irradiation on the Metabolic Profile of Rabbit Cornea and Lens Analysed by HR-MAS ¹H NMR Spectroscopy. pp. 105-114.

Tews, B., Felsberg, J., Hartmann, C., Kunitz, A., Hahn, M., Toedt, G., Neben, K., Hummerich, L., von Deimling, A., Reifenberger, G., and Lichter, P. (2006). Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *International journal of cancer* 119, 792-800.

- Thompson, P.M., Hayashi, K.M., Dutton, R.A., Chiang, M.C., Leow, A.D., Sowell, E.R., De Zubicaray, G., Becker, J.T., Lopez, O.L., Aizenstein, H.J., and Toga, A.W. (2007). Tracking Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1097, 183-214.
- Tobes, M.C., Sandford, J.J., Wieland, D.M., and Sisson, J.C. (1985). Effect of uptake-one inhibitors on the uptake of norepinephrine and metaiodobenzylguanidine. *J Nucl Med* 8, 10.
- Tomlins, A.M., Foxall, P.J., Lindon, J., Lynch, M.J., Spraul, M., Everett, J., and Nicholson, J. (1998a). High resolution magic angle spinning ¹H NMR analysis of intact prostatic hyperplastic and tumour tissues. *Anal. Comm.* 35, 2.
- Tomlins, A.M., Foxall, P.J., Lynch, M.J., Parkinson, J., Everett, J.R., and Nicholson, J.K. (1998b). High resolution ¹H NMR spectroscopic studies on dynamic biochemical processes in incubated human seminal fluid samples. *Biochimica et biophysica acta* 1379, 367-380.
- Tonini, G.P., Boni, L., Pession, A., Rogers, D., Iolascon, A., Basso, G., Cordero di Montezemolo, L., Casale, F., Pession, A., Perri, P., Mazzocco, K., Scaruffi, P., Lo Cunsolo, C., Marchese, N., Milanaccio, C., Conte, M., Bruzzi, P., and De Bernardi, B. (1997). MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children. *J Clin Oncol* 15, 85-93.
- Trygg, J., Holmes, E., and Lundstedt, T. (2007). Chemometrics in metabonomics. *Journal of proteome research* 6, 469-479.
- Trzcinska, A., and Litwinska, B. (2003). Association of EBV infection with lymphomas. *Acta microbiologica Polonica* 52, 191-194.
- Tsang, T.M., Griffin, J.L., Haselden, J., Fish, C., and Holmes, E. (2005). Metabolic characterization of distinct neuroanatomical regions in rats by magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 53, 1018-1024.
- Tugnoli, V., Mucci, A., Schenetti, L., Calabrese, C., Di Febo, G., Rossi, M.C., and Tosi, M.R. (2004). Molecular characterization of human gastric mucosa by HR-MAS magnetic resonance spectroscopy. *International journal of molecular medicine* 14, 1065-1071.
- Tugnoli, V., Mucci, A., Schenetti, L., Righi, V., Calabrese, C., Fabbri, A., Di Febo, G., and Tosi, M.R. (2006a). Ex vivo HR-MAS Magnetic Resonance Spectroscopy of human gastric adenocarcinomas: a comparison with healthy gastric mucosa. *Oncology reports* 16, 543-553.
- Tugnoli, V., Schenetti, L., Mucci, A., Parenti, F., Cagnoli, R., Righi, V., Trincherio, A., Nocetti, L., Toraci, C., Mavilla, L., Trentini, G., Zunarelli, E., and Tosi, M.R. (2006b). Ex vivo HR-MAS MRS of human meningiomas: a comparison with in vivo ¹H MR spectra. *International journal of molecular medicine* 18, 859-869.
- Tzika, A.A., Cheng, L.L., Goumnerova, L., Madsen, J.R., Zurakowski, D., Astrakas, L.G., Zarifi, M.K., Scott, R.M., Anthony, D.C., Gonzalez, R.G., and Black, P.M. (2002). Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy. *Journal of neurosurgery* 96, 1023-1031.
- Usenius, J.P. (1994). [Clinical suitability of brain tumor patients for single voxel protein MR spectroscopy]. *Rontgenpraxis; Zeitschrift fur radiologische Technik* 47, 201-203.
- Usenius, J.P., Kauppinen, R.A., Vainio, P.A., Hernesniemi, J.A., Vapalahti, M.P., Paljarvi, L.A., and Soimakallio, S. (1994). Quantitative metabolite patterns of human brain tumors: detection by ¹H NMR spectroscopy in vivo and in vitro. *Journal of computer assisted tomography* 18, 705-713.
- Valonen, P.K., Griffin, J.L., Lehtimaki, K.K., Liimatainen, T., Nicholson, J.K., Grohn, O.H., and Kauppinen, R.A. (2005). High-resolution magic-angle-spinning ¹H NMR spectroscopy reveals different responses in choline-containing metabolites upon gene therapy-induced programmed cell death in rat brain glioma. *NMR in biomedicine* 18, 252-259.
- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., and van der Werf, M.J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics* 7, 142.
- van der Greef, J. (2005). Systems biology, connectivity and the future of medicine. *IEE proceedings* 152, 174-178.
- van Ginneken, V., Verhey, E., Poelmann, R., Ramakers, R., van Dijk, K.W., Ham, L., Voshol, P., Havekes, L., Van Eck, M., and van der Greef, J. (2007). Metabolomics (liver and blood profiling) in a mouse model in response to fasting: A study of hepatic steatosis. *Biochimica et biophysica acta* 1771, 1263-1270.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup,

- L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooshep, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., and Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science* (New York, N.Y) 291, 1304-1351.
- Vercoutter-Edouart, A.S., Lemoine, J., Le Bourhis, X., Louis, H., Boilly, B., Nurcombe, V., Revillion, F., Peyrat, J.P., and Hondermarck, H. (2001). Proteomic analysis reveals that 14-3-3sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer research* 61, 76-80.
- Viant, M.R. (2003). Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. *Biochemical and biophysical research communications* 310, 943-948.
- Villas-Boas, S.G., and Bruheim, P. (2007). Cold glycerol-saline: the promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells. *Analytical biochemistry* 370, 87-97.
- Villas-Boas, S.G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J., and Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews* 24, 613-646.
- Walsh, M.C., Brennan, L., Malthouse, J.P., Roche, H.M., and Gibney, M.J. (2006). Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. *The American journal of clinical nutrition* 84, 531-539.
- Wang, Y., Bollard, M.E., Nicholson, J.K., and Holmes, E. (2006). Exploration of the direct metabolic effects of mercury II chloride on the kidney of Sprague-Dawley rats using high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy of intact tissue and pattern recognition. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 40, 375-381.
- Wang, Y., Holmes, E., Comelli, E.M., Fotopoulos, G., Dorta, G., Tang, H., Rantalainen, M.J., Lindon, J.C., Corthesy-Theulaz, I.E., Fay, L.B., Kochhar, S., and Nicholson, J.K. (2007). Topographical Variation in Metabolic Signatures of Human Gastrointestinal Biopsies Revealed by High-Resolution Magic-Angle Spinning (1)H NMR Spectroscopy. *Journal of proteome research* 6, 3944-3951.
- Wang, Y., Tang, H., Holmes, E., Lindon, J.C., Turini, M.E., Sprenger, N., Bergonzelli, G., Fay, L.B., Kochhar, S., and Nicholson, J.K. (2005). Biochemical characterization of rat intestine development using high-resolution magic-angle-spinning 1H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Journal of proteome research* 4, 1324-1329.
- Warren, K.E. (2004). NMR spectroscopy and pediatric brain tumors. *Oncologist* 9, 7.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., and Humphery-Smith, I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-1094.
- Waters, N.J., Garrod, S., Farrant, R.D., Haselden, J.N., Connor, S.C., Connelly, J., Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K. (2000). High-resolution magic angle spinning (1)H NMR spectroscopy of intact liver and kidney: optimization of sample preparation procedures and biochemical stability of tissue during spectral acquisition. *Analytical biochemistry* 282, 16-23.
- Webb-Robertson, B.J., Lowry, D.F., Jarman, K.H., Harbo, S.J., Meng, Q.R., Fuciarelli, A.F., Pounds, J.G., and Lee, K.M. (2005). A study of spectral integration and normalization in NMR-based metabolomic analyses. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 39, 830-836.
- Weber, W.A. (2005). Use of PET for monitoring cancer therapy and for predicting outcome. *J Nucl Med* 46, 983-995.
- Weckwerth, W., and Morgenthal, K. (2005). Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug discovery today* 10, 1551-1558.
- Wheatley, D.N. (2005). Arginine deprivation and metabolomics: important aspects of intermediary metabolism in relation to the differential sensitivity of normal and tumour cells. *Seminars in cancer biology* 15, 247-253.
- Williams, R.E., Lenz, E.M., Lowden, J.S., Rantalainen, M., and Wilson, I.D. (2005). The metabolomics of aging and development in the rat: an investigation into the effect of age on the profile of endogenous metabolites in the urine of male rats using 1H NMR and HPLC-TOF MS. *Molecular bioSystems* 1, 166-175.
- Wishart, D.S. (2005). Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. *Am J Transplant* 5, 2814-2820.
- Wishart, D.S. (2007). Proteomics and the human metabolome project. *Expert review of proteomics* 4, 333-335.
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C.,

- Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M.A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D.D., Wagner, J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G.E., Macinnis, G.D., Weljie, A.M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B.D., Vogel, H.J., and Querengesser, L. (2007). HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic acids research* 35, D521-526.
- Wold, S. (1991). Chemometrics, why, what and where to next? *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 9, 589-596.
- Wold, S., Hellberg, S., and Dunn, W.J., 3rd (1983). Computer methods for the assessment of toxicity. *Acta pharmacologica et toxicologica* 52 Suppl 2, 158-189.
- Wrench, M., Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Bondy, M., Berger, M., and Aldape, K.D. (2005). The molecular epidemiology of gliomas in adults. *Neurosurgical focus* 19, E5.
- Wu, C.L., Taylor, J.L., He, W., Zepeda, A.G., Halpern, E.F., Bielecki, A., Gonzalez, R.G., and Cheng, L.L. (2003). Proton high-resolution magic angle spinning NMR analysis of fresh and previously frozen tissue of human prostate. *Magn Reson Med* 50, 1307-1311.
- Wu, H., Zhang, X., Li, X., Li, Z., Liao, P., Li, W., Wu, Y., and Pei, F. (2006). Investigation on acute biochemical effects of Ce(NO₃)₃ on liver and kidney tissues by MAS 1H NMR spectroscopic-based metabonomic approach. *Journal of Rare Earths* 24 6.
- Yang, Y., Chen, L., Gao, H., Zeng, D., Yue, Y., Liu, M., Lei, H., Deng, F., and Ye, C. (2006). High-resolution magic-angle spinning (13)C spectroscopy of brain tissue at natural abundance. *Magn Reson Chem* 44, 263-268.
- Yeung, K.Y., and Ruzzo, W.L. (2001). Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 17, 763-774.

ANNEXES

Toward Improved Grading of Malignancy in Oligodendrogliomas Using Metabolomics

G. Erb,^{1,2} K. Elbayed,² M. Piotto,^{2,3} J. Raya,² A. Neuville,⁴ M. Mohr,⁴ D. Mazitrot,⁵ P. Kehrl⁵ and I.J. Namer^{1*}

In spite of having been the object of considerable attention, the histopathological grading of oligodendrogliomas is still controversial. The determination of reliable biomarkers capable of improving the malignancy grading remains an essential step in working toward better therapeutic management of patients. Therefore the metabolome of 34 human brain biopsies, histopathologically classified as low-grade (LGO, $N = 10$) and high-grade (HGO, $N = 24$) oligodendrogliomas, was studied using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy (HRMAS NMR) and multivariate statistical analysis. The classification model obtained afforded a clear distinction between LGOs and HGOs and provided some useful insights into the different metabolic pathways that underlie malignancy grading. The analysis of the most discriminant metabolites in the model revealed the presence of tumoral hypoxia in HGOs. The statistical model was then used to study biopsy samples that were classified as intermediate oligodendrogliomas ($N = 6$) and glioblastomas (GBMs) ($N = 30$) by histopathology. The results revealed a gradient of tumoral hypoxia increasing in the following direction: LGOs, intermediate oligodendrogliomas, HGOs, and GBMs. Moreover upon analysis of the clinical evolution of the patients, the metabolic classification seems to provide a closer correlation with the actual patient evolution than the histopathological analysis. *Magn Reson Med* 57:000–000, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words:

Oligodendrogliomas represent 5% to 18% of adult gliomas and their clinical management is known to differ from other gliomas, especially regarding their sensitivity to radio- and chemotherapy (1). Most oligodendrogliomas grow slowly but inevitably evolve into a malignant form. The histopathological diagnosis of oligodendrogliomas and the correct grading of their malignancy are crucial steps to establish an accurate prognosis and to define the optimum surgical and therapeutic strategies, since they may trigger or delay radio- and chemotherapy. However, at the present time, the search for specific biomarkers to identify oligo-

dendrogliomas has not yet been successful (2,3). Despite improvements in the malignancy grading systems, no consensus has yet been found as to which morphological features constitute unambiguous criteria of malignancy (1,4–7). Using existing classifications methods, it is common to observe, on one hand, tumors classified as low-grade oligodendrogliomas (LGOs) with poor evolution and, on the other hand, tumor classified as high-grade oligodendrogliomas (HGOs) with relatively long survival time. These disagreements between the malignancy grading and the prognosis should be overcome. Therefore the determination of reliable biomarkers, such as 1p/19q loss, related to patient prognosis is essential for better therapeutic management of patients (8–10).

Metabolomic analysis aims at quantifying and identifying all metabolites in an organ or a tissue, at the cellular or even at the subcellular level (11–13). For most purposes, it is not necessary to quantify the absolute amounts of metabolites but only their relative ratios in pathologic and healthy situation. Metabolomic analyses result in the detection of almost 50 different metabolites in brain biopsies (14–19). In order to gain meaningful biological information from metabolic profiles, it is necessary to evaluate the data both statistically and bioinformatically to gain information on the underlying metabolic pathways via known or calculated biochemical networks (20,21).

PATIENTS AND METHODS

Patients

In this prospective study, 34 patients, histopathologically classified as LGOs (10 patients, seven men and three women; mean age = 48.5 ± 19.6 years) and HGOs (24 patients, 17 men and seven women; mean age = 44.6 ± 12.0 years), respectively, with grade II and III in the World Health Organization (WHO) classification, were studied. To evaluate the predictive properties of this statistical model, six intermediate cases of oligodendrogliomas (WHO grade II/III; five men and one woman; mean age = 37.7 ± 14.2 years) and 30 histopathologically classified glioblastomas (GBMs, WHO grade IV; 12 men and 18 women; mean age = 51.3 ± 19.6 years) were also included. The clinical follow-up of all the 70 patients was monitored using ¹H-MRSI (at 3-month intervals) and MRI (at 6-month intervals).

Sample Collection and Preparation

Resected tissue specimens were collected immediately after patient operation and were snap-frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C . For the high-resolution magic angle spinning (HRMAS) analysis, the amount of tumoral tissue used ranged from 12 to 40 mg. Each sample

¹Department of Biophysics and Nuclear Medicine, University Hospitals of Strasbourg, France

²Université Louis Pasteur (ULP)/Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) LC3-Unité Mixte de Recherche (UMR) 7177, Strasbourg, France

³Bruker Biospin, Wissembourg, France

⁴Department of Pathology, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France

⁵Department of Neurosurgery, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France

Grant sponsors: Bruker Biospin; Université Louis Pasteur (ULP); Hôpitaux Universitaires de Strasbourg; PHRC-03.

*Correspondence to: I.J. Namer, Department of Biophysics and Nuclear Medicine, University Hospitals of Strasbourg, Avenue Molière, Strasbourg, 67000, France. E-mail: lizzie.jacques.NAMER@chru-strasbourg.fr

Received 4 April 2007; revised 22 October 2007; accepted 24 October 2007. DOI 10.1002/mrm.21486

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

AQ: 1

AQ: 2

AQ: 3

AQ: 5

AQ: 3

was introduced into a 4-mm ZrO₂ rotor fitted with a 50- μ l cylindrical insert. A total of 10 μ l of D₂O were then added to the rotor to provide a lock frequency for the nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer. The exact weight of sample was determined by weighing the empty rotor and the rotor containing the biopsy. The rotor was stored back at -80°C until the time of HRMAS analysis. Before inserting the rotor into the NMR probe, the probe was precooled to 3°C. The whole HRMAS study was performed at 3°C and started immediately after the temperature inside the probe reached the equilibrium condition (5 min).

HRMAS NMR

HRMAS spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz. The instrument was equipped with a 4-mm triple resonance (¹H, ¹³C, ¹⁵N) gradient HRMAS probe. A Bruker Cooling Unit (BCU) was used to keep the sample temperature at 3°C. For all NMR experiments, samples were spun at 3 kHz in order to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest. One-dimensional (1D) ¹H spectra using water presaturation were acquired in 32 min and 128 scans. For each sample, spectra were also acquired using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence in order to attenuate the broader signals arising from the macromolecular tissue components such as the lipoproteins, thereby giving a clearer representation of the lower molecular weight components. 1D ¹H CPMG spectra were acquired using the following pulse sequence (relaxation delay 90°-(τ -180°- τ)_n-acquire FID) with $N = 40$ and using 128 transients. To decrease the effects of radio frequency field inhomogeneities (22,23) the CPMG pulses were synchronized with the sample spinning ($\tau = 333.33 \mu$ s). To assign all the resonances, 2D homonuclear ¹H-¹H and heteronuclear ¹H-¹³C experiments were recorded on three samples. 2D ¹H-¹H J-correlation spectra using a decoupling in the presence of scalar interactions (DIPSI)-2 mixing sequence were acquired with a 170-ms acquisition time, a 50-ms mixing time, a 6000-Hz spectral width, and a 1.5-s relaxation delay. A total of 16 transients were averaged for each of the 256 increments during t1, corresponding to a total acquisition time of 2 h. 2D ¹H-¹³C gradient heteronuclear single quantum correlation (g-HSQC) (24) experiments were acquired using a 170-ms acquisition time with globally optimized alternating phase rectangular pulse (GARP) ¹³C decoupling and a 1-s relaxation delay. A total of 256 transients were averaged for each of 256 t1 increments, corresponding to a total acquisition time of 21 h. To detect a possible degradation of the sample during the course of the NMR experiments, a control experiment consisting of a 1D ¹H HRMAS spectrum was recorded before and after each set of experiments and no metabolite degradation was detected. As a further proof of sample stability under the experimental conditions used, 1D ¹H spectra were recorded at 3°C on three different samples every hour during a 24-h period and no evolution of the spectra was observed.

Statistical Analysis

1D HRMAS NMR spectra were data reduced into 200 integral regions of 0.02 ppm width between 4.5 and 0.5 ppm

using the software program AMIX (Analysis of MIXtures version 2.5; Bruker Rheinstetten, Germany) and exported into SIMCA P (version 11.0; Umetrics AB, Umeå, Sweden) where partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was conducted. All analyses used Pareto scaling (scaling factor $1/\sqrt{SD}$) to accommodate the influence of metabolites present in both high and low concentrations in the model, but without emphasizing spectral noise. PLS-DA is a supervised analysis procedure (i.e., a method incorporating prior knowledge of class identity) that tries to maximize the separation between classes, rather than explaining the maximum variation in the data, or to construct statistical boundaries around each class.

PLS-DA was performed on the data to obtain a metabolic description of each oligodendroglioma type. To test the resulting supervised models, the class membership of every sample was iteratively predicted and the results were used to generate a measure of the goodness of the fit (Q^2) for the overall model. The theoretical maximum is 1 for a perfect prediction. In order for a PLS component to be considered significant, Q^2 must be significantly larger than zero and is generally considered as good when equal or superior to 0.5. This technique provides predictive capability and was used to model spectral changes in terms of metabolite variations. While Q^2 is related to the predictive power of the model for each data set, the predictive capability of the model was also calculated directly and represented as a percentage of success rate if the score/disease status was specified within a given limit (25,26).

The resulting statistical model can then be used to classify unknown samples and attribute them to a specific class of the model. Interpretation of the regression coefficients provides information on the most discriminant metabolites used in the model and gives some insight into the metabolic pathways involved.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, we have used a metabolomic approach in order to gain some insights into the mechanisms of increasing malignancy at the molecular level. Metabolomics is an elegant way to bridge the gap between clinical prognosis and the grading system. A total of 34 patients, histopathologically classified as follows: 10 LGOs (seven men and three women; mean age = 48.5 ± 19.6) and 24 HGOs (17 men and seven women; mean age = 44.6 ± 12.0), grade II and III in the WHO classification, respectively, were studied. Each sample was studied using HRMAS NMR spectroscopy, a technique that has recently demonstrated its potential for analyzing intact biological tissues (Fig. 1). To interpret this global metabolic information, the data were subjected to a multivariate statistical analysis using a supervised analysis procedure that makes use of the primary histological classification (LGO vs. HGO). The response variable set (Y-data) was created by indicating the classes of observations (LGO vs. HGO) in the training set and a PLS-DA model was fitted to the training set (200 variables per observation) X-matrices. PLS analysis is probably the least restrictive of the various multivariate extensions of the multiple linear regression models. Its flexibility allows it to be used for situations in which the use of traditional multivariate methods is severely limited,

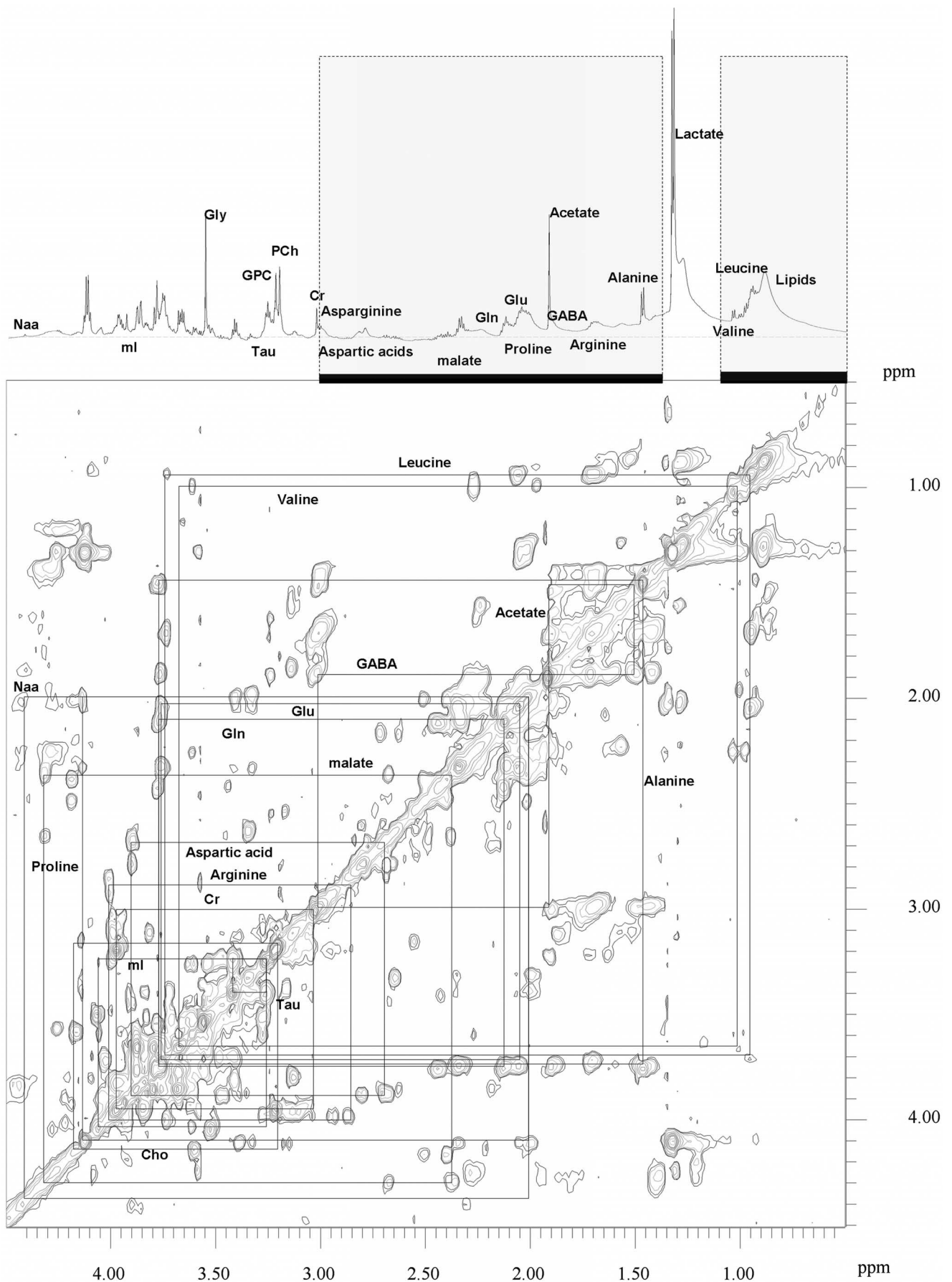


FIG. 1. 1D ^1H and 2D total correlation spectroscopy (TOCSY) HRMAS spectra of a brain tumor sample from a patient diagnosed as HGO. Partial metabolite assignments in the 4.5 to 0.5 ppm region are shown. The underlined part of the 1D spectrum corresponds to the spectral region used in the amino acid metabolism analysis. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

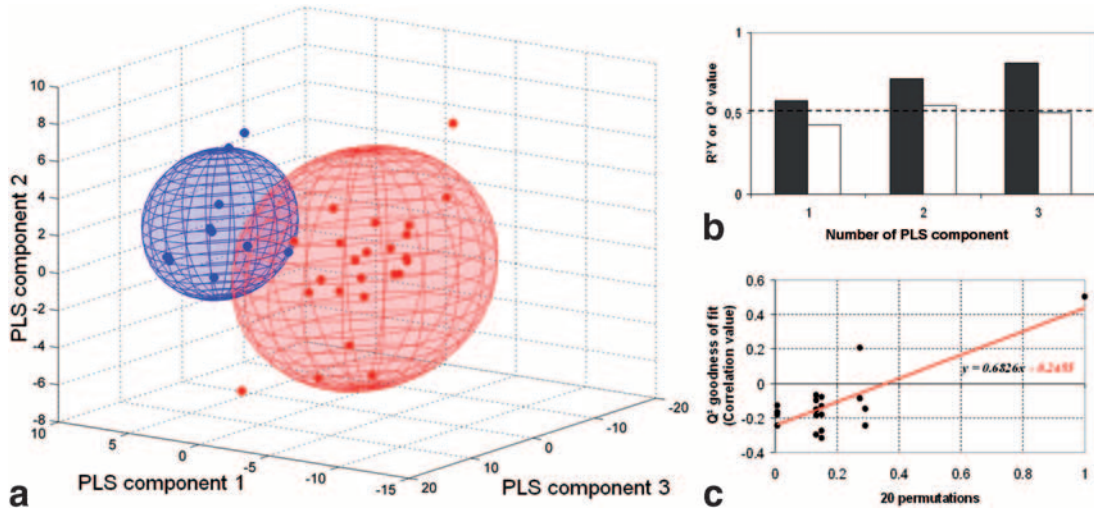


FIG. 2. Global spectral analysis. **a**: 3D plot showing the first three component of the PLS-DA computed on histopathologically classified LGOs (blue points) and HGOs (red points). The 95% confidence criteria volume ($1.96 \times \text{SD}$) for each group is represented. This model allows a clear separation, with only a small overlap of the LGO and HGO spatial distribution. **b**: PLS-DA is validated by a cumulative R²Y (black bar) equal to 0.81. The cumulative Q² (white bar) value obtained for three components, which is equal to 0.5, indicates a good predictivity for the model. **c**: Correlation coefficient between the original Y (histopathological classification hypothesis) and the permuted Y vs. the cumulative Q² represented by a regression line whose value is negative at the origin. This feature demonstrates that there is no overfit of the model.

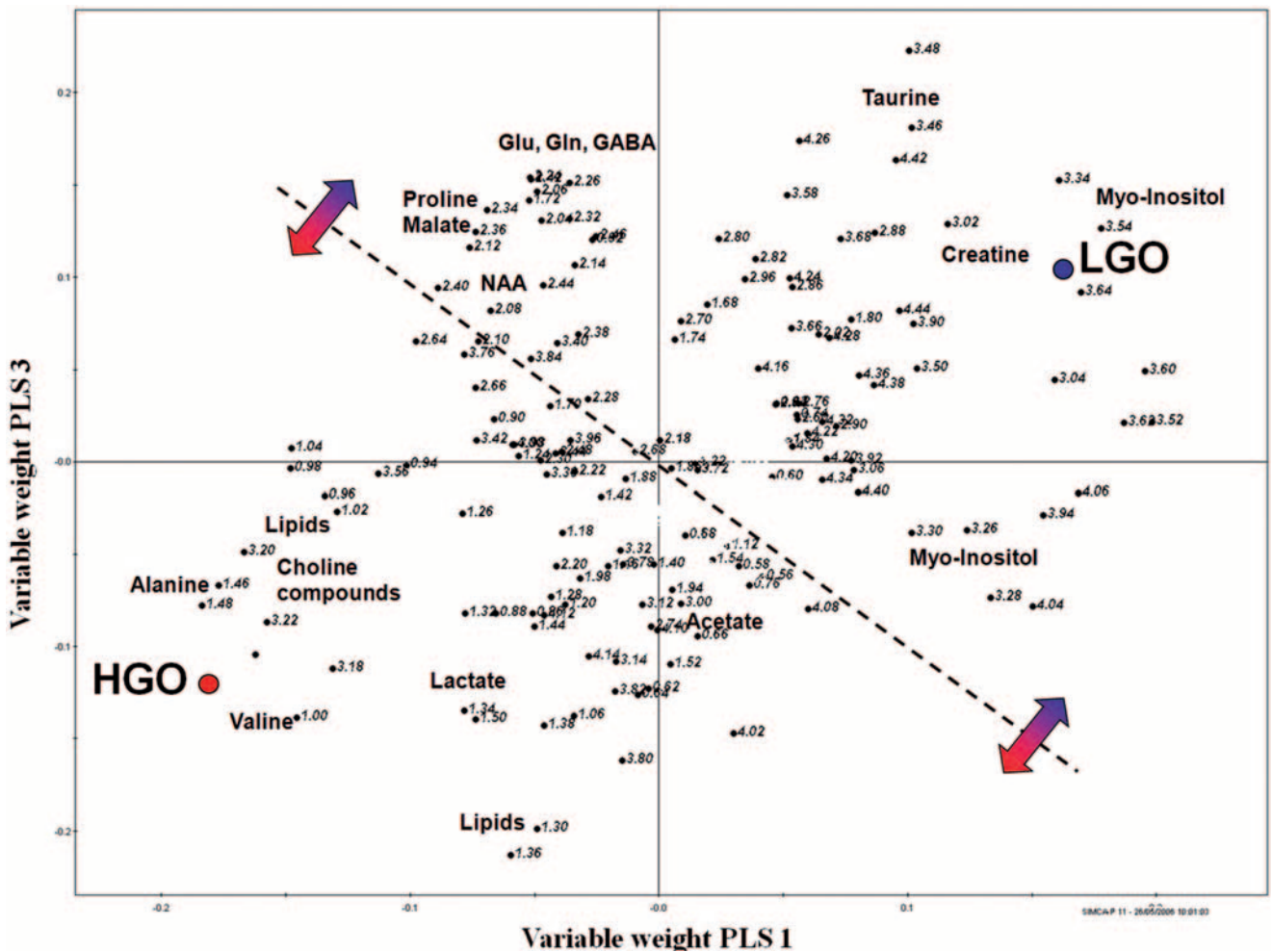


FIG. 3. Global variable weights in oligodendrogloma classification: Plot of PLS-DA weights showing the first and third components for LGOs (blue) vs. HGOs (red) classification. Each point (numerical value in ppm) represents a single bucket (i.e., 0.2-ppm interval) in the HRMAS NMR spectra, which is correlated to one or several metabolites. Most valuable buckets underlying this classification are displayed in the figure: alanine, lipids, valine, the total choline compounds, proline, myo-inositol, taurine, glutamine (Gln), glutamate (Glu), GABA, NAA, acetate, and creatine. Differences between LGOs and HGOs are given in terms of bucket weights in PLS components computation.

such as the case when there are fewer observations than predictor variables (21). This technique is a powerful tool that defines automatically the combination of metabolic variables that best describe the clustering in malignancy grading.

The results obtained using PLS-DA show a clear separation between LGOs and HGOs on the basis of the whole set of metabolic variables. The model generated with three significant PLS-components (determined by cross validation) had a cumulative fit to the Y-data (R^2Y) of 0.82 and a cumulative confidence criterion of prediction of 0.50 (Q^2) (Fig. 2). As the number of observations is limited, cross-validation was performed by first excluding a portion of the available data from the model training and then by predicting their classification using the model. This process was repeated until all the data were left out once. In our case, each patient was kept out of the model development and then classified using the model. This procedure was repeated for the whole series of patients and no misclassification of the LGO or HGO population was detected.

Although the direct identification of the metabolites is not necessary to achieve the classification, analyzing the different metabolites at the origin of the classification can lead to the detection of pathological biomarkers and to a better understanding of the tumoral metabolism. The most discriminant metabolites contributing to the model were found to be: alanine, lipids, valine, total choline compounds, proline, myoinositol, taurine, glutamine, glutamate, γ -aminobutyric acid (GABA), malate, N-acetyl-aspartate (NAA), acetate, and creatine (Fig. 3). In agreement with several publications discussing the fixation of fluorodeoxy-D-glucose in gliomas (27), our results show that glucose is not a discriminating biomarker between LGOs and HGOs. The lactate concentration or the total amount of

amino acids detected by HRMAS is also not statistically different between LGOs and HGOs. What is however clear is that HGOs show an increase of amino acid production via nonoxidative pathways, indicating that the energy metabolism shifts toward fermentative metabolism when the oligodendrogliomas evolve from a LGO to a HGO (28–30).

We then computed a new model focussed on the amino acid metabolism. This model included the most valuable metabolites described by the global model but excluded choline compounds (membrane turnover), myoinositol (glial metabolism), and creatine. To reduce the contribution of lipid signals that may obscure metabolite resonances, the model was built using the spectra resulting from a CPMG HRMAS experiment. The CPMG sequence is known for its ability to attenuate the contribution from molecules with a short T_2 relaxation time (i.e., the lipids). Using only the metabolites related to the amino acid metabolism (Fig. 1) with the goal of probing oxidative vs. nonoxidative amino acids production pathways, the metabolic clustering of LGO and HGO was maintained (Fig. 4): the model generated with four significant PLS-components had a cumulative fit to the Y-data (R^2Y) of 0.82 and a cumulative confidence criteria of prediction of 0.46 (Q^2), with only one HGO misclassified. As in the previous case, the classification was validated by circular validation.

As the model generated from the partial metabolic dataset had a cumulative fit to the Y-data and a cumulative confidence criteria of prediction similar to the one generated using the full metabolite set, it became clear that the distinction between LGOs and HGOs is principally due to the metabolites involved in amino acid metabolism. We observed that in HGO the alanine and the valine production, which are related to the anaerobic pathway, are increased whereas proline, glutamate, glutamine, GABA,

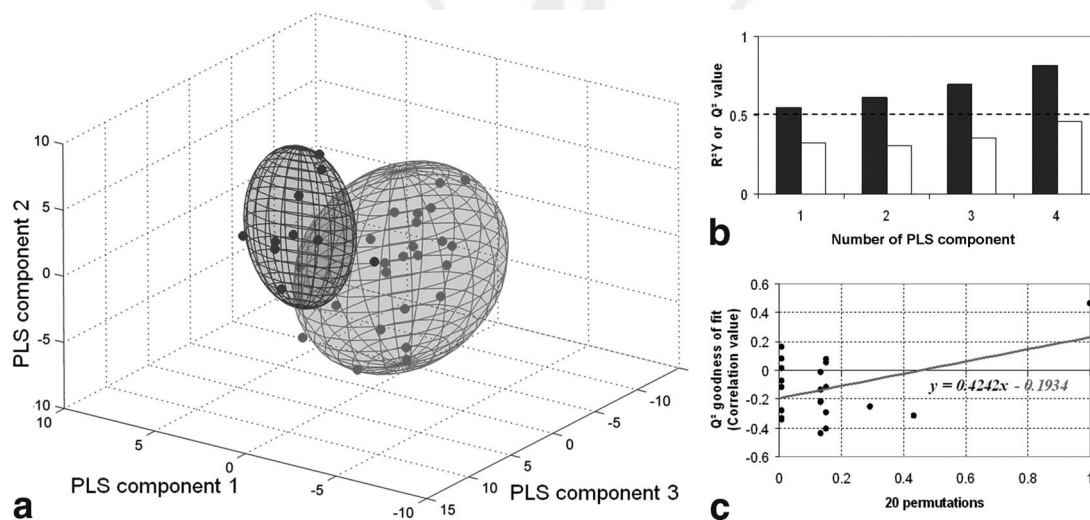


FIG. 4. Amino acid metabolism analysis. **a:** 3D plot showing the first three component of the PLS-DA computed using histopathologically-classified LGOs (blue points) and HGOs (red points) using only the NMR spectral region corresponding to the amino acid metabolism. The 95% confidence criteria volume ($1.96 \times SD$) for each group is represented. An efficient separation is also well achieved with this model, with only a small overlap of the LGO and the HGO spatial distribution. **b:** PLS-DA is validated by a cumulative R^2Y (black bar) equal to 0.81. The cumulative Q^2 (white bar) value is close to 0.5 and indicates a good predictability for the model. **c:** Correlation coefficient between the original Y (histopathological classification hypothesis) and the permuted Y vs. the cumulative Q^2 represented by a regression line whose value is negative at the origin. This feature demonstrates that there is no overfit of the model. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

and NAA, which are related to the Krebs pathway, are decreased. This metabolic shift toward fermentative metabolism clearly reflects tumor hypoxia in HGOs. Including information pertaining to the lipids, the choline compounds and myoinositol only slightly improved the classification.

To evaluate the predictive properties of this statistical model, six intermediate cases of oligodendrogliomas (WHO grade II/III; five men and one woman; mean age = 37.7 ± 14.2 years) and 30 histopathologically classified GBMs (WHO grade IV; 12 men and 18 women; mean age = 51.3 ± 19.6 years) were studied by metabolomics. The results revealed that the classification reflects a gradient of hypoxia increasing in the following direction: LGOs, HGOs, and GBMs. The intermediate grade II/III oligodendrogliomas cases occur, either in the LGO region or in the

border region between LGO and HGO (Fig. 5). A closer inspection of the data reveals that the metabolic model is not perfectly correlated with the histopathological grading. The classification obtained using the metabolic analysis probably reflects complex metabolic processes that correlate better with the patient's clinical course. Almost all GBMs have poor prognosis (survival time = 11 ± 9 months) and our metabolomic model reflects this fact by regrouping them on one extremity of the metabolic distribution. However, some GBM cases that are detected as metabolically close to HGOs or LGOs display a relative long survival time (22 ± 9 months). In the same way, intermediate oligodendroglioma cases present heterogeneous metabolic pattern correlated with clinical evolution: three cases that are metabolically close to HGOs and GBMs present bad prognosis with a very short recurrence period

F5

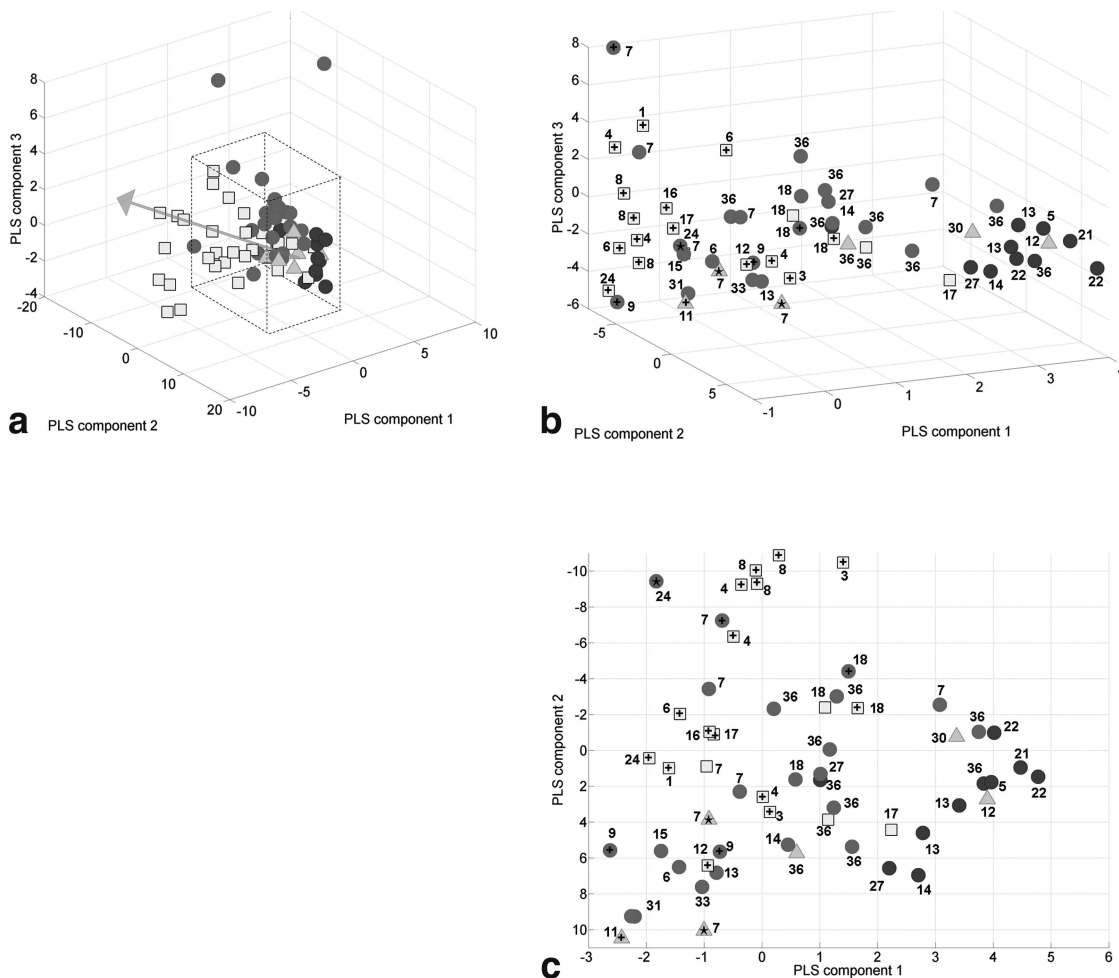


FIG. 5. Application of the statistical model to new histopathologically classified cases. **a:** 3D plot showing the first three components of the PLS-DA model computed with LGOs (blue dots) and HGOs (red dots) using only the NMR spectral region corresponding to the amino acid metabolism. Introduction of intermediate oligodendrogliomas (green triangles) and GBM cases (black squares) in the model shows a metabolic shift reflecting roughly the histopathological malignancy grading: LGOs (WHO grade II), intermediate cases of oligodendrogliomas (WHO grade II/III), HGOs (WHO grade III), and GBMs (WHO grade IV). The arrow indicates the apparent direction from the barycenter of the LGO distribution to the barycenter of the GBM distribution and corresponds to an increase in malignancy. **b,c:** Focusing on the overlapping region of the four groups (dashed box on Fig. 4a), we observe that the metabolomic classification seems to be better correlated to the clinical evolution than the histopathological grading. The numbers indicate the time elapsed (in months) since the initial diagnosis. Patient death is represented by (+) and tumor recurrence by (★). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

(7 months in two cases, and death after 11 months for the third one) and the three other cases close to LGOs present better prognosis (no tumor progression during clinical screening elapsed time, from 12 to 36 months).

CONCLUSIONS

The significance of the histopathological diagnosis is based largely on its ability to predict prognosis and its ability to predict the patient's response to different treatment modalities. However, in the case of gliomas, morphological criteria are probably insufficient. The present findings suggest that the metabolic information (the degree of tumor hypoxia) obtained at an early state of disease could be better correlated with the patient prognosis than the morphological criteria (28–30). This property should allow us to better understand variable clinical evolution and atypical cases. Moreover, the diagnosis of hypoxia is of direct clinical relevance to the successful treatment of cancer, in particular hypoxia in tumors can affect the outcome of chemotherapy and radiotherapy treatments.

In spite of the relatively short screening period of the patients (3 years), our observations suggest that a metabolomic study, associated with histopathology and molecular biology data, could become a reliable indicator of patient prognosis. Metabolomic data acquired on a larger population could therefore become an essential element for a better therapeutic management of the patient.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of Mrs. F. Ackermann in preparing the tumor samples is gratefully acknowledged. We also thank Dr. R. Kannan-Piotto for proofreading the manuscript. This study was approved by the Alsace Ethics Committee (no. 03/100, 09.12.2003).

REFERENCES

- Kleihues P, Cavenee WK. WHO international histopathological classification of CNS tumors. Pathology and genetics tumors of the nervous system. Lyon: IARC; 2000.
- Hoang-Xuan K, Aguirre-Cruz L, Mokhtari K, Marie Y, Sanson M. OLIG-1 and 2 gene expression and oligodendroglial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002;28:89–94.
- Burger P, Scheithauer B. Oligodendroglial neoplasms. Atlas of tumor pathology, Series 3, Fascicle 10. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1994. p 107–120.
- Earnest F III, Kernohan JW, Craig WM. Oligodendrogliomas; a review of 200 cases. *Arch Neurol Psychiatry* 1950;63:964–976.
- Smith MT, Ludwig CL, Godfrey AD, Armbrustmacher VW. Grading of oligodendrogliomas. *Cancer* 1983;52:2107–2114.
- Shaw EG, Scheithauer BW, O'Fallon JR, Tazelaar HD, Davis DH. Oligodendrogliomas: the Mayo Clinic experience. *J Neurosurg* 1992;76:428–434.
- Daumas-Duport C, Tucker ML, Kolles H, Cervera P, Beuvon F, Varlet P, Udo N, Koziak M, Chodkiewicz JP. Oligodendrogliomas. Part II: a new grading system based on morphological and imaging criteria. *J Neurooncol* 1997;34:61–78.
- Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K. Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol* 2004;16:607–613.
- Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994;145:1175–1190.
- Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol* 2001;159:779–786.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29:1181–1189.
- Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48:155–171.
- Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4:551–561.
- Griffin JL. Metabonomics: NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of body fluids and tissues for characterisation of xenobiotic toxicity and disease diagnosis. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:648–654.
- Martinez-Bisbal MC, Marti-Bonmati L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llacer JL, Piotto M, Assemat O, Celda B. 1H and 13C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo 1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR Biomed* 2004;17:191–205.
- Cheng LL, Chang IW, Louis DN, Gonzalez RG. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res* 1998;58:1825–1832.
- Cheng LL, Anthony DC, Comite AR, Black PM, Tzika AA, Gonzalez RG. Quantification of microheterogeneity in glioblastoma multiforme with ex vivo high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuro Oncol* 2000;2:87–95.
- Lehnhardt FG, Bock C, Rohn G, Ernestus RI, Hoehn M. Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a 1H NMR spectroscopic investigation. *NMR Biomed* 2005;18:371–382.
- Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed* 2000;13:129–153.
- Holmes E, Antti H. Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *Analyst* 2002;127:1549–1557.
- Kell DB, Brown M, Davey HM, Dunn WB, Spasic I, Oliver SG. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:557–565.
- Piotto M, Bourdonneau M, Furrer J, Bianco A, Raya J, Elbayed K. Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under magic angle spinning: effect of radial B1 inhomogeneities. *J Magn Reson* 2001;149:114–118.
- Elbayed K, Dillmann B, Raya J, Piotto M, Engelke F. Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *J Magn Reson* 2005;174:2–26.
- Davis AL, Keeler J, Laue ED, Moskau D. Experiments for recording pure absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *J Magn Reson* 1992;98:207–216.
- Fiehn O, Kristal B, van Ommen B, Sumner LW, Sansone SA, Taylor C, Hardy N, Kaddurah-Daouk R. Establishing reporting standards for metabolomic and metabonomic studies: a call for participation. *OMICS* 2006;10:158–163.
- Tenenhaus M. La régression PLS. Théorie et pratique. Paris: Technip; 1998.
- Giammarile F, Cinotti LE, Jouvét A, Ramackers JM, Saint Pierre G, Thiesse P, Jouanneau E, Guyotat J, Pelissou-Guyotat I, Setiey A, Honorat J, Le Bars D, Frappaz D. High and low grade oligodendrogliomas (ODG): correlation of amino-acid and glucose uptakes using PET and histological classifications. *J Neurooncol* 2004;68:263–274.
- Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38–47.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4:891–899.
- Costello LC, Franklin RB. "Why do tumour cells glycolyse?": from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem* 2005;280:1–8.



Metabolomic approach to Peripheral Neuroblastic Tumors: HRMAS NMR investigation



Journal:	<i>NMR in Biomedicine</i>
Manuscript ID:	NBM-08-0034
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	18-Feb-2008
Complete List of Authors:	Imperiale, Alessio; Biophysic and Nuclear Medicine, University Hospitals of Strasbourg Erb, Gilles; University of Louis Pasteur, ULP/CNRS 7177, Strasbourg; Biophysic and Nuclear Medicine, University Hospitals of Strasbourg Weingertner, Marie-Catherine; University of Louis Pasteur, ULP/CNRS 7177, Strasbourg El-Bayed, Karim; University of Louis Pasteur, ULP/CNRS 7177, Strasbourg Piotto, Martial; University of Louis Pasteur, ULP/CNRS 7177, Strasbourg; Bruker Biospin, Wissembourg Neuville, Agnès; Pathology, University Hospitals of Strasbourg Blondet, Cyrille; Biophysic and Nuclear Medicine, University Hospitals of Strasbourg Lutz, Patrick; Pediatric Oncology, University Hospitals of Bellocq, Jean-Pierre; Pathology from University Hospitals of Strasbourg Namer, Izzie; Biophysic and Nuclear Medicine, University Hospitals of Strasbourg
Keywords:	Neuroblastoma, High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy, magnetic resonance spectroscopy, Partial Least Square Regression discriminant analysis, gamma-aminobutyric acid



1
2
3
4
5
6
7
8
9

Metabolomic approach to Peripheral Neuroblastic Tumors: HRMAS NMR investigation

10 Alessio Imperiale¹, Gilles Erb^{1,2}, Marie-Catherine Weingertner², Karim El-Bayed², Martial Piotto^{2,3},
11 Agnès Neuville⁴, Cyrille Blondet¹, Patrick Lutz⁵, Jean-Pierre Bellocq⁴, Izzie-Jacques Namer¹
12
13
14

15 ¹ Biophysic and Nuclear Medicine, ⁴Pathology and ⁵Pediatric Oncology from University Hospitals of
16 Strasbourg, France
17

18 ² University of Louis Pasteur, ULP/CNRS 7177, Strasbourg, France
19

20 ³ Bruker Biospin, Wissembourg, France
21
22

23 Corresponding author : Alessio Imperiale, MD
24

25 Service de Biophysique et de Médecine Nucléaire
26

27 Hôpital de Hautepierre
28

29 1, Avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex, France
30

31 Tel : +33388116768
32

33 Fax : +33388128121
34

35 Email : alessio.imperiale@chru-strasbourg.fr
36
37
38
39

40 Short title: HRMAS in Peripheral Neuroblastic Tumors
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **List of abbreviations :**
4
5
6
7

8 NB : Neuroblastoma
9

10 GNB : Ganglioneuroblastoma
11

12 GN : ganglioneuroma
13

14 PNT : Peripheral Neuroblastic Tumors
15

16 HRMAS : ^1H high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy
17

18 MKI : mitosis-karyorrhexis index
19

20 ^{123}I -mIBG : ^{123}I -Metaiodobenzylguanidine
21

22 PLS-DA : Partial Least Square Regression Discriminant analysis
23

24 GABA : γ -aminobutyric acid
25

26 NAA : N-acetyl-aspartate
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

Abstract

Neuroblastoma (NB), one of the most common solid tumors of childhood, is grouped with ganglioneuroma (GN) and ganglioneuroblastoma (GNB) into the pathological category called Peripheral Neuroblastic Tumors (PNT). The aim of this preliminary study is to characterize by ^1H High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy (HRMAS) tumor intact samples obtained from a cohort of 14 patients affected by PNT. Relationships between HRMAS features and clinical patients data were also investigated. At our knowledge, this report represents the first in vitro metabolomic approach to PNT by HRMAS. PNT showed a metabolomic fingerprint characterized by active cholinergic metabolism but also by biochemical markers representative of fermentative processes. The abundance of amino acids resonance peaks identified on HRMAS spectra may suggest an increase in amino acids production via non-oxidative pathways. Lipids and others metabolites such as inositol, myoinositol, glycerol, γ -aminobutyric acid (GABA), N-acetyl-aspartate (NAA) and acetate were been detected, playing a complementary role in defining PNT metabolic profile. NB could be differentiated from GNB and GN by analyzing the combination of multiple HRMAS metabolic data. In addition, NB samples of children older or younger than one year showed different metabolic reality. Finally, tumor ^{123}I -mIBG uptake capacity seemed to reflect a particular metabolic status. In NB tissue samples resonance peaks of NAA and GABA/glutamate/glutamine complex were revealed by HRMAS spectra. In conclusion, our preliminary results suggest the existence of complex metabolic reality for PNT, probably influencing tumor behavior and related to some established clinical prognostic factors. However, the real impact of these interesting preliminary results should be assessed by long-term prospective studies of large cohort of patients.

Keywords: Neuroblastoma, High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy, magnetic resonance spectroscopy, Partial Least Square Regression discriminant analysis, γ -aminobutyric acid

INTRODUCTION

Neuroblastoma (NB), ganglioneuroblastoma (GNB) and ganglioneuroma (GN) are grouped into the same pathological category commonly called Peripheral Neuroblastic Tumors (PNT). Neuroblastoma is one of the most common solid tumors of early childhood. The disease originates where sympathetic nervous system tissue is present, i.e. adrenal medulla and all paraspinal sympathetic nodes in the neck, chest and pelvis [1-4]. The prognosis for patients with neuroblastoma is strictly influenced by several parameters at diagnosis, as disease clinical stage, patient age, and, in patients older than 1 year, regional lymph node involvement. Other potential prognostic variables include the site of the primary tumor, catecholamine metabolite excretion ratio and lactate dehydrogenase levels [5-6]. To increase the knowledge about close pathological mechanisms of the disease, and consequently to dispose of new and more effective therapeutic strategies, the new research directories are focalised on both tumor genetic and molecular basis of the disease. Thus, several cellular abnormalities have been explored in children affected by neuroblastoma, including tumor cell chromosome number, amplification of the *MYCN* oncogene, unbalanced 11q loss of heterozygosity, and loss of heterozygosity for chromosome 1p within tumor tissue [5].

The recent progress that has been made in in-vitro NMR analysis of tissue samples by technological development of ^1H high-resolution magic angle spinning spectroscopy NMR (HRMAS), allows real possibilities to define the metabolic phenotypes of cells, organs and tissues, in both normal and pathological conditions. Metabolic approach, using HRMAS, reflects cellular metabolic networks that are directly consequence of genetic information (Genome) and specific gene transcript regulation (Transcriptome) [7].

1
2
3 At present, in the attempt of defining tissue biochemical characteristics, several human
4 malignancies have been examined in gynecological, neurological and urological domains by
5 HRMAS with final promising results [8-10].
6
7

8
9
10 The aim of this preliminary study is to characterize by HRMAS tumor tissue intact samples
11 obtained from a cohort of patients affected by PNT at the time of primary staging evaluation.
12
13 In order to interpret the metabolic pattern directly linked to HRMAS spectra, the data were
14 subjected to a supervised multivariate statistical analysis, taking into account clinical
15 information as a priori constrains. Thus, relationships between HRMAS features and clinical
16 patients data were investigated. At our knowledge, this report represents the first in vitro
17 metabolomic approach to PNT by HRMAS.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **EXPERIMENTAL**

30 *Patients population*

31
32
33
34
35
36
37
38 Between January 1995 and December 2006, 54 consecutive new patients affected by PNT
39 were admitted to our Pediatric Onco-Hematologic Unit. Only 14 of them (11 men, 3 women;
40 median age: 10 months, age range: 0.3 - 182) were retrospectively selected for this
41 preliminary investigation according to the following criteria: 1- final diagnosis of PNT
42 reached on the basis of pathological criteria, 2- absence of both medical and surgical
43 treatment before obtaining tumor sample for HRMAS, 3- tumor tissue sample quantitatively
44 and qualitatively (viable tumor / necrosis ratio) adequate to perform a correct MR
45 spectrographic analysis, 4- tissue specimens collected immediately after prelevement and
46 snap-frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C , and 5- tissue samples without
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 pollution by histopathological fixing medium.

1
2
3 According to International Classification [11-12], tumor haematoxylin and eosin-stained
4 sections were classified into three categories: neuroblastomas (10 child),
5 ganglioneuroblastomas (3), ganglioneuromas (1).
6
7

8
9
10 Tumors in NB category were divided into undifferentiated (2) and poorly differentiated
11 subtypes (8). No differentiating NB was included. For GN and GNB categories, the degree of
12 cellular maturation was assessed and all tumors were classified as maturing. The mitosis-
13 karyorrhexis index (MKI) was recorded as morphologic indicator in NB category. Three MKI
14 classes (low, <2% or < 100/5000 mitotic and karyorrhectic cells; intermediate, 2-4% or 100-
15 200/5000 mitotic and karyorrhectic cells; high > 4% or > 200/5000 mitotic and
16 karyorrhectic cells) were defined. Thus, according to MKI, NBs were divided into two MKI
17 categories: low (7) and intermediate (3). No tumor with high MKI was included.
18
19

20
21
22 According to the International Neuroblastoma Staging System, 12, 1 and 1 patients were
23 classified as stage 1, 2A and 4, respectively [13]. No stage 3 patients were available. A risk-
24 based patients classification was made, according to clinical stage, age and tumor biology [4],
25 defining 12 and 2 patients as low-intermediate and high risk, respectively.
26
27

28
29
30 DNA index (DI) or tumor cell ploidy was determined. Data from only five primary tumours
31 were available. Among them, two NBs showed an aneuploid karyotype. The remaining 3
32 tumours (1 NB, 1 GN and 1 GNB) were classified as having a diploid karyotype.
33
34

35
36
37 MYCN gene amplification was determined by Southern analysis of gene copy number.
38 Tumors with cells containing ≥ 10 copies of MYCN were considered amplified. No
39 amplification of MYCN was showed among all 14 PNT selected.
40
41

42
43
44 Considering PNT site of primary development as a potential prognostic factor [5, 6], patients
45 were grouped according to primary tumor localisation (head-neck, 1; thorax, 5; abdomen-
46 pelvis, 8) and on the bases of adrenal or extra adrenal tumor origin (adrenal, 4; extra adrenal,
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
10).

1
2
3 All considered patients are still alive except for one child with stage IV NB died during
4 follow-up.
5

6
7
8 Seven of 15 children underwent ^{123}I -Metaiodobenzylguanidine (^{123}I -mIBG) scintigraphy
9 during primary staging. Whole body (WB) planar imaging and spots of head-neck, thorax,
10 abdomen and pelvis were obtained 4 and 24 h after intravenous injection of 74-111 MBq of
11 ^{123}I -mIBG (Mallinckrodt, France), by a conventional gamma camera. Scintigraphic images at
12 24 h were qualitatively (presence or absence of tracer uptake) and quantitatively interpreted
13 using region of interest (ROI) technique. Connected with tumor mass and upper mediastinum,
14 a standard elliptic ROI was drawn, taking care to avoid the heart and other localizations of
15 ^{123}I -mIBG physiological uptake and elimination. The tumoral ROI count value was
16 normalized to the mediastinal one and then used as quantitative parameter (T/M). According
17 to T/M index, children were divided in two groups, lesser or greater than T/M median value
18 (T/M_m).
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Table 1 summarizes clinical characteristics of patient cohort.
35
36
37
38

39 *Tissue samples collection and preparation* 40 41 42

43 Tumor dissected specimens were collected immediately after patient operation and were snap-
44 frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C . For the HRMAS analysis, the amount
45 of tumor tissue used ranged from 12 to 40 mg. Each sample was introduced into a 4mm ZrO_2
46 rotor fitted with a 50 μl cylindrical insert. 10 μl of D_2O were then added to the rotor to
47 provide a lock frequency for the NMR spectrometer. The exact weight of sample used was
48 determined by weighting the empty rotor and the rotor containing the biopsy. The rotor was
49 stored back at -80°C until the time of HRMAS analysis. Before inserting the rotor into the
50 NMR probe, the probe was pre-cooled to 3°C . The whole HRMAS study was performed at
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3°C and was started immediately after the temperature inside the probe reached the equilibrium condition (5min).

HRMASS: technical features

HRMAS spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz. The instrument was equipped with a 4mm triple resonance (^1H , ^{13}C , ^{15}N) gradient HRMAS probe. A Bruker Cooling Unit (BCU) was used to control the temperature at 3°C by cooling down the bearing air flowing into the probe. For all NMR experiments, samples were spun at 3 kHz in order to keep the rotation sidebands out of the spectral region of interest. Since the tissue is composed of high percentage of lipids and fat, the spectral contribution of low-molecular weight signals can be obscured. Therefore, spectra were acquired using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) pulse sequence for each sample in order to attenuate the broader signals arising from the macromolecular tissue components such as lipoproteins, thereby giving a clearer representation of the lower molecular weight components. A combination of water presaturation with the WATERGATE water suppression technique was used. Spectra were acquired using the following pulse sequence (relaxation delay–90°–(t–180°–t)n–acquire FID) with n=150 and 128 transients. The factor n was fixed to 150 after primary investigation for optimal lipids signal removal. In order to prevent the effects of the radio-frequency field homogeneities [14,15], the CPMG pulses were synchronized with the sample spinning ($t = 1/3000 = 333.33\mu\text{s}$). The FIDs were multiplied by an exponential weight function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. To overcome manipulator dependencies, automated correction of both phase and baseline parameters was used for NMR preprocessing. Expert verification of automated pre-processed data was although done. In order to assign all the resonances, two-dimensional

(2D) homonuclear ^1H - ^1H and heteronuclear ^1H - ^{13}C experiments were recorded on 3 samples. ^1H - ^1H J-correlation spectra using a “Decoupling In Presence of Scalar Interaction” (DIPSI-2) mixing sequence were acquired with a 170 ms acquisition time, a 50 ms mixing time, a 6000 Hz spectral width and a 1.5 s relaxation delay. Sixteen transients were averaged for each of the 256 increments during t_1 , corresponding to a total acquisition time of 2 h. Data were zero filled to a $2\text{k} * 512$ matrix and weighted with a shifted square sine bell function prior to Fourier transformation. ^1H - ^{13}C “gradient Heteronuclear Single Quantum Correlation” (g-HSQC) [16] experiments using echo–antiecho gradient selection for phase-sensitive detection were acquired using a 170 ms acquisition time with “Globally optimized Alternating phase Rectangular Pulses” (GARP) ^{13}C decoupling and a 1 s relaxation delay. A total of 256 transients were averaged for each of 256 t_1 increments, corresponding to a total acquisition time of 21 h. Two 1 ms sine-shaped gradient pulses of strength 40 and 10.05 G/cm were used in the experiment. Data were zero-filled to a $2\text{k} * 1\text{k}$ matrix and weighted with a shifted square sine bell function before Fourier transformation. In order to detect a possible degradation of the sample during the course of the MR experiments, a control experiment consisting of a HRMAS spectrum was recorded before and after each set of experiments. In our experiments, no metabolite degradation was detected. As a further proof of sample stability under the used experimental conditions, ^1H 1D spectra were recorded at 3°C on 3 different samples every hour during a 24 hour period, and no evolution of the spectra was observed.

Statistical Analysis

Partial Least Square Regression (PLS) statistical analysis was conducted on 1D HRMAS spectra preventively fractionated into 200 integral regions of 0.02 ppm width (ppm range: 4.5-

0.5) using AMIX software (Analysis of MIXtures, version 2.5, Bruker Rheinstetten, Germany) and exported into SIMCA P (version 11.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). To accommodate the influence of metabolites present in both high and low concentrations in the model, without emphasizing spectral noise, Pareto scaling (scaling factor $1/\sqrt{SD}$) was employed for all analyses.

PLS is a supervised analysis procedure incorporating prior knowledge of class identity trying to maximize the separation between groups, rather than explaining the maximum variation in the data. Thus, PLS was used to classify tissue samples according to the following ten variables defined as grouping factor: (1) patient age at diagnosis (< or > than 1 y), (2) stage of disease (stage 1 to IV), (3) tumor histology (NB, GNB or GN), (4) primary tumor localization (supra-diaphragmatic or infra-diaphragmatic), (5) primary tumor origin (adrenal or extra adrenal), (6) tumor differentiation or maturation, (7) MKI categories (low or intermediate), (8) patient risk-based category (low-intermediate or high risk), (9) DNA index (aneuploid or diploid karyotype), and (10) ^{123}I -mIBG tumoral uptake. No tumor showed MYCN amplification, thus MYCN was not included in statistical analysis. One child with unfavorable histology died during follow-up, consequently both Prognostic Histology and Survival status were not considered as independent variables in statistical process.

Interpretation of regression coefficients provides information about the most discriminant metabolites in each model and gives some insight into the metabolic pathways involved.

By PLS discriminant analysis (PLS-DA), the class membership of every sample was iteratively predicted, using the results to generate a goodness of fit measure (Q^2) for the overall model, where $Q^2 = (1 - \text{PRESS}/\text{SS})$. PRESS is the predicted squared sum of error and represents the squared differences between observed Y and predicted values when the samples are kept out, and SS is the residual sum of squares of the previous dimension. Even if the theoretical maximum is 1 for a perfect prediction, a $Q^2 \geq 0.5$ is generally considered as

1
2
3 good predictor for PLS components. Finally, a circular validation involving 20 permutations
4 was performed for each model. Model was considered as valid if the regression line obtained
5 by circular permutation showed negative slope and if the estimated Q^2 was lower than the
6 original one. The number of significant PLS component is sets to explain more than 95% of
7 the Y variance (R^2Y). For a reliable model, R^2Y value must be approached 1. The few number
8 of samples leads us to minimize the number of significant components in order to not
9 overestimate the model. This technique provides predictive capability and was used to model
10 spectral changes in terms of metabolites variations.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 RESULTS

25
26
27
28
29 PLS-DA was performed on the whole metabolic data detected by HRMAS analysis of tumor
30 samples, for a computation of a function yielding the optimal classification of observations
31 having as reference a grouping factor. The reduced number of sample argues to understand
32 this statistical analysis as a first step of screening PNT metabolism. Ten PLS-DA models were
33 fitted to HRMAS data according to the ten clinical variables selected as grouping factor.
34 Although clustering was visually done for all considered variables, an individual focus on
35 each generated model was done. Statistical significance was reached only for the following
36 three clinical variables: (1) histological tumor classification, (2) patient age at diagnosis and
37 (3) ^{123}I -mIBG scintigraphy results. Therefore, metabolites directly responsible of successful
38 clustering were further investigated.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53 Finally, we have assessed the metabolic profile of the only died patient with unfavorable
54 histology. Exclusive qualitative interpretation of results was done.
55
56
57
58
59

60 *PLS-DA results according to histological criteria*

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

According to histological results, primary tumors were divided in two categories: NB (11) and no-NB, the last including GNB (3) and GN (1). PLS-DA showed a separation between NB and no-NB on the basis of the whole set of metabolic variables. The model generated with two significant PLS-components (determined by cross validation) had a cumulative confidence criterion of prediction (Q^2) of 0.58 and a cumulative fit to the Y-data (R^2Y) of 0.82 (figure 1a).

The metabolic fingerprint related to histological classification is displayed on figure 1b. The variable weight distribution is well distributed along a diagonal axis, as for the correlated PLS classification. Metabolites lying on each side of this distribution are linked to this clustering. Summarizing, NB was metabolically characterized by a relative increase of lipids, cholesterol, lactate, alanine, isoleucine, leucine, valine, threonine, glutamate, glutamine, aspartate, asparagine, lysine, arginine, serine, histidine, phenylalanine, proline methionine, γ -aminobutyric acid (GABA), N-acetyl-aspartate (NAA) and acetate. Conversely, no-NB group showed a relatively higher abundance of choline, phosphocholine, glycerol-phosphocholine, glycine, tyrosine, myoinositol, and glycerol.

PLS-DA results according to patient age

Ten children with NB were considered for this analysis. According to patient age at diagnosis, two groups were defined taking as cut-off value the age of 12 months. Even in this case, PLS-DA showed statistically significant differences in metabolomic profile between children younger and older than one year. Model, generated with two significant PLS-components, had Q^2 of 0.80 and R^2Y of 0.91 (figure 2a). As in the previous case, the classification was validated by circular validation.

1
2
3 Discriminant metabolites in PNT samples obtained from children older than one year were
4 choline, phosphocholine, glycerol-phosphocholine, threonine, tyrosine, taurine, myoinositol,
5
6 α -glucose, NAA, and acetate. Younger children (< 1y) PNT samples were characterized by
7
8 the relatively greater abundance of lipids, cholesterol, alanine, leucine, isoleucine, glutamate,
9
10 glutamine, aspartate, asparagine, lysine, glycine, serine, phenylalanine, proline methionine,
11
12 glycerol, and GABA. Obtained results are represented in figure 2b.
13
14
15
16
17
18
19

20 *PLS-DA results according to 123 I-mIBG scintigraphy results*

21
22
23
24
25 Seven children underwent to scintigraphy were considered for this analysis. According to T/M
26
27 index, two groups were defined taking as cut-off value T/M_m . Significant difference was
28
29 showed by PLS-DA between the 2 groups of children. The cross validated model generated
30
31 with one significant PLS-component had Q^2 of 0.65 and R^2Y of 0.74.
32
33

34 Metabolomic profile of children affected by tumor showing $T/M > T/M_m$ was characterized
35
36 by lactate, alanine, choline, phosphocholine, glycerol-phosphocholine, valine, threonine,
37
38 glutamate, glutamine, arginine, glycine, phenylalanine, taurine, myoinositol, α -glucose, β -
39
40 glucose, glycerol, NAA, and acetate. Conversely, lipids, cholesterol, isoleucine, leucine,
41
42 aspartate, asparagines, methionine, hypotaurine, and GABA were highly represented in
43
44 samples coming from children affected by tumor showing $T/M < T/M_m$.
45
46
47
48
49

50
51 *Metabolic profile of died patient with unfavorable histology*

52
53
54
55 The numerical unbalance between two NB groups defined according to patient survival
56
57 (children alive or died) has not allowed assessing Q^2 and R^2Y . Nevertheless, a different
58
59 metabolic profile was observed between still alive children group and the only one died child
60

(Figure 3a). The last one, was characterized by relative higher concentration of choline compounds, NAA, taurine and creatine, and a relative diminution of glutamate and glutamine (Figure 3b).

DISCUSSION

NB is one of the most common and lethal pediatric extra cranial malignancies. This embryonic tumor arising anywhere from sympathetic nervous system from the pelvis to the neck, has high propensity to develop systemic metastases, specially to bone, bone marrow, lymph-nodes and liver. According to the International Neuroblastoma Pathology Classification, NB is grouped together with GNB and GN in Peripheral Neuroblastic Tumors (PNTs) category. The natural evolution of children affected from NB is highly variable, ranging from spontaneous regression or maturation into benign lesions to a dramatically rapid metastatic spread with related poor prognosis [1-6]. Nowadays, magnetic resonance imaging is routinely used as non-invasive imaging technique for assessing tumor extension with high anatomic resolution, either at primary staging and during follow-up [17]. Nevertheless, the sole morphological approach is inadequate, in particular for viable tumor assessment in residual mass after the completion of chemoradiation therapy. In order to select patient responding to conventional chemotherapy from the ones demanding for alternative therapeutic strategies, NB morpho-functional characterization is essential during earlier phases of the treatment. Growing number of scientific evidences shows the potential role of in-vivo ^1H -Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) in human and animal models of pediatric malignancies, in particular NB [18-21]. Spectroscopic approach offers not only the possibility to improve the diagnostic accuracy in differentiating normal tissue from malignancy by a direct comparison of NMR spectra, but also allows the investigators to

1
2
3 explore the metabolic reality of tumor tissue. MRS provides important biochemical
4 information related to the regulation of specific gene transcript eventually altered in tumor
5 genome. To gain that ends, conventional MRS techniques have been employed to analyze in
6 vivo patients with NB and ex vivo intact tissue samples. Unfortunately, the low achieved
7 spectral resolution, one of the most important MRS limiting factors, does not allow us the
8 differentiation of all the individual resonances of each molecule, so leading to metabolic
9 misinterpretation.

10
11 The recent developed MAS technology makes possible the acquisition of MR data on tiny
12 intact tissue specimen with improved spectral resolution and more accurate correlation
13 between biochemical cellular features and histopathologic tumor characteristics [8-10].

14
15 Our results showed a PNT metabolomic fingerprint characterized by active choline
16 metabolism (choline-containing compounds) but also by biochemical markers representative
17 of fermentative processes (lactate and glucose). The abundance of amino acids resonance
18 peaks identified on HRMAS spectra may suggest an increase in amino acids production via
19 non-oxidative pathways [22]. Lipids were also represented in HRMAS spectra. Metabolites
20 such as inositol, myoinositol, glycerol, GABA, NAA and acetate were also been detected,
21 playing a complementary role in defining PNT metabolic profile.

22
23 According to our preliminary results, NB could be differentiated from GNB and GN by
24 analyzing the combination of multiple metabolic data present on a small tissue sample
25 analyzed by HRMAS technique. Similarly, NB samples of children older or younger than one
26 year showed different metabolic reality. Finally, tumor ^{123}I -mIBG uptake capacity seemed to
27 reflect a particular metabolomic status. Although the direct identification of the metabolites is
28 not necessary to achieve the classification, the assessment of different metabolites responsible
29 of classification can lead to the detection of pathological biomarkers of tumor metabolism. It
30 is necessary to underline that the discriminant power of each metabolite is linked to its

1
2
3 relative difference in amount between groups (ie. NB and no-NB) for each considered clinical
4
5 variable (ie. histological classification). Therefore, a metabolite present in subtle
6
7 concentration in one group but completely absent in the other one will play a role in
8
9 discriminant analysis. Conversely, a metabolite detected in high concentration in both
10
11 diagnostic groups of each variable will be less significant in the clustering process
12
13 (inconsistent relative difference).
14
15

16
17 By using cell culture techniques, high-resolution in vitro MRS, and chromatographic
18
19 analyses, Florian et al. [23], determined the metabolic characteristics of three types of human
20
21 brain and nervous system tumors as meningiomas, neuroblastomas, and glioblastomas.
22
23 Common signals from leucine, isoleucine, valine, threonine, lactate, acetate, glutamate,
24
25 choline-containing compounds and glycine were detected. Our results corroborated data
26
27 reported by Florian and colleagues. Nevertheless, even if choline and choline-containing
28
29 compounds were largely represented in NB tissue, particularly in NB samples from children
30
31 older than one year, these metabolites seemed to be particularly abundant in GNB and GN,
32
33 playing a role in the statistical discriminant analysis previously performed. Larger cohort of
34
35 patients will be necessary to confirm this preliminary observation. To our knowledge, no data
36
37 concerning the metabolomic pattern of GNB and GN have at present been reported.
38
39

40
41 NAA resonance peaks were revealed by examining HRMAS NB spectra. NAA is generally
42
43 found in normal neuron and it has been reported as neural marker. The origin of NB from
44
45 primordial neural crest cells may explain the detection of NAA in NB samples. Signals of
46
47 GABA/glutamate/glutamine complex were also showed by HRMAS in NB tissue. A possible
48
49 explanation is that some human NB cell lines have neurotransmitter characteristics and they
50
51 are able to convert glutamate to GABA [24]. Roberts et al. [25] reported for the first time the
52
53 association between the GABAergic system and the clinical outcome in human model of NB.
54
55 Lower expression levels of GABAergic system genes were associated with older age at
56
57
58
59
60

1
2
3 diagnosis, suggesting that reduction of GABAergic gene expression may be predictor of
4 tumor aggressive behaviour. Thus, reduced inhibitory control exercised by GABA in
5 proliferation and differentiation of neuroblasts may play a role in NB development. In our
6 experience, NB samples from younger children (< 1y) were characterized from relatively
7 higher levels of GABA on HRMAS spectra. The effective relationship between the degree of
8 GABA concentration and patient age should be assessed in long-term prospective large cohort
9 studies. Thereafter, intracellular GABA level should be considered as a clinical marker
10 predictor of patient outcome.
11

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22 mIBG is a structural analogue of noradrenaline. Marked with ^{131}I , it was the first
23 radiopharmaceutical used for clinical imaging of chromaffin cells and adrenergic tissue. Its
24 cellular uptake is based on mechanism of catecholamines storage and reuptake, the so-called
25 Uptake-1 mechanism [26]. ^{123}I -mIBG scintigraphy is widely used for the management of
26 children with NB at primary staging and during follow-up. Nevertheless, some tumors do not
27 show radiotracer uptake, maybe due to cellular differentiation and uptake mechanisms
28 modifications. Among the seven patients underwent ^{123}I -mIBG scintigraphy, the ones
29 presenting higher tracer uptake ($T/M > T/M_m$) were mainly characterized by biochemical
30 markers of hypoxia and cellular proliferation like lactate, alanine, choline, phosphocholine
31 and glycerol-phosphocholine. GABA resonance was detected on HRMAS spectra of tumors
32 with lower tracer uptake. Although metabolic disparity has been showed between tumors with
33 different degree of radiotracer uptake, the exiguity of evaluated population does not allow
34 definitive conclusions.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53 The stage IV patient, older than one year at diagnosis, with poorly differentiated NB,
54 considered as high risk patient, having an unfavorable histology and died during follow-up,
55 was characterized by a distinct metabolic profile predominated by total choline compounds.
56
57
58
59
60 Prospective studies involving more patients with poor survival for statistical validation should

1
2
3 be performed to confirm this first attractive observation.
4

5
6 Although interesting preliminary results were obtained, the following limitations of our work
7
8 must be taken into account: (1) the retrospective character of this study including a limited
9
10 series of patients due to tissue samples pollution by histopathological fixing medium, (2)
11
12 selected patients essentially affected by stage I NB, (3) the lack of comparison between tumor
13
14 and normal tissue of the same embriogenetic origin as adrenal medulla or paraspinal
15
16 sympathetic nodes.
17

18
19 In conclusion, our preliminary results suggest the existence of complex metabolomic reality
20
21 for PNT influencing tumor behavior, and probably, related to some established clinical
22
23 prognostic factors.
24
25

26
27
28
29 **Acknowledgment:** The technical assistance of Mr J. Raya and Mrs. F. Ackermann is
30
31 gratefully acknowledged. This study has been supported by a grant from the Bruker Biospin,
32
33 the University Louis Pasteur (ULP) and the University Hospitals of Strasbourg.
34
35

36 37 38 39 40 41 **REFERENCES**

- 42
43
44
45 1. Miller RW, Young JL Jr, Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer*. 1995;75:395-405.
46
47 2. Grovas A, Fremgen A, Rauck A, Ruymann FB, Hutchinson CL, Winchester DP, Menck
48
49 HR. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United
50
51 States. *Cancer*. 1997;80:2321-32.
52
53 3. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB,
54
55 Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. International Neuroblastoma Pathology
56
57 Classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a
58
59 report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001;92:2451-61.
60
61 4. Goto S, Umehara S, Gerbing RB, Stram DO, Brodeur GM, Seeger RC, Lukens JN,
62
63 Matthay KK, Shimada H. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology

- Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001;92:2699-2708.
5. Cotteril SJ, Pearson ADJ, Pritchard J, Foot ABM, Roald B, Kohler JA, Imeson J. on behalf of the European Neuroblastoma Study Group (ENSG) and United Kingdom Children's Cancer Study Group. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *Eur J Cancer*. 2000;36:901-8.
 6. Adams GA, Shochat SJ, Smith EI, Shuster JJ, Joshi VV, Altshuler G, Hayes FA, Ntschke R, McWilliams N, Castelberry RP. Thoracic neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Surg*. 1993;28:372-7.
 7. Griffin JL, Shockor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:551-61.
 8. Mahon MM, deSouza NM, Dina R, Soutter WP, McIndoe GA, Williams AD, Cox JJ. Preinvasive and invasive cervical cancer: an ex vivo proton magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy study. *NMR Biomed*. 2004;17:144-53.
 9. Cheng LL, Chang I-W, Louis DN, Gonzales G. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimen. *Cancer Res*. 1998;58:1832-5.
 10. Cheng LL, Chang IW, Smith BL, Gonzalez RG. Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson*. 1998;135:194-202.
 11. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of Neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*. 1999;86:349-63.
 12. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer*. 1999;86:364-72.
 13. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group. *J Clin Oncol*. 1991;9:581-91.
 14. Elbayed K, Dillmann B, Raya J, Piotto M, Engelke F. Field modulation effects induced by sample spinning: application to high-resolution magic angle spinning NMR. *J Magn Reson*. 2005;174:2-26.

15. Piotto M, Bourdonneau M, Furrer J, Bianco A, Raja J, El Bayed K. Destruction of magnetization during TOCSY experiments performed under magic angle spinning: Effect of radial B1 inhomogeneities. *J Magn Reson.* 2001;149:114-8.
16. Davis, A.L., Keeler, J., Laue, E.D., Moskau, D. Experiments for recording Pure Absorption Heteronuclear Correlation Spectra Using Pulsed Field Gradients. *J Magn Reson.* 1992;98:207-16.
17. Hiorns MP, Owens CM. Radiology of neuroblastoma in children. *Eur Radiol.* 2001;11:2071-81.
18. Lindskog M, Kogner P, Ponthan F, Schweinhardt P, Sandstedt B, Heiden T, Helms G, Spenger C. Noninvasive estimation of tumor viability in a xenograft model of human neuroblastoma with proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS). *Br J Cancer.* 2003;88:478-85.
19. Vaidya SJ, GS Payne, Leach MO, Pinkerton CR. Potential role of magnetic resonance spectroscopy in assessment of tumor response in childhood cancer. *Eur J Cancer.* 2003;39:728-35.
20. Lindskog M, Spenger C, Jarvet J, Graslund A, Kogner P. Predicting resistance or response to chemotherapy by proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1457-66.
21. Lindskog M, Spenger C, Klason T, Jarvet J, Graslund A, Johnsen JJ, Ponthan F, Douglas L, Nordell B, Kogner P. Proton magnetic resonance spectroscopy in neuroblastoma: current status, prospects and limitations. *Cancer Lett.* 2005;228:247-55.
22. Erb G, El Bayed K, Piotto M, Raya J, Neuville A, Mohr M, Maitrot D, Kehrl P, Namer JJ. Toward improved grading in oligodendrogliomas using metabolomics. *NMR Biomed.* 2008 (in press).
23. Florian CL, Preece NE, Bhakoo KK, Williams SR, Noble M. Characteristic metabolic profiles revealed by 1H NMR spectroscopy for three types of human brain and nervous system tumours. *NMR Biomed.* 1995;8:253-64.
24. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 1978;38 :3751-7.
25. Roberts SS, Mori M, Pattee P, Lapidus J, Mathews R, O'Malley JP, Hsieh YC, Turner MA, Wang Z, et al. GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2004;22:4127-34.
26. Tobes MC, Sandford JJ, Wieland DM, Sisson JC. Effect of Uptake-One inhibitors on the uptake of norepinephrine and metaiodobenzylguanidine. *J Nucl Med.* 1985;8:897-907.

TABLE 1. Summary of Patient Population Clinical Characteristics

Pt no.	Sex (M/F)	Age at diagnosis (months)	Disease Stage (I – IV)	Tumor Histology (NB/GNB/ GN)	Primary tumor Localization (HN/TH/AP)	Primary tumor origin (Adr/ExAdr)	Tumor differentiation or maturation	MKI (1 – 3)	Pt risk class (Low-Intermediate / High)	Prognostic Histology (Fa/U)	MYCN (Am/NAm)	Plidity (An/Di)	¹²⁵ I-mIBG T/M ratio	Survival status (A/D)
1	M	4	I	NB	HN	ExAdr	poorly diff	1	Low-Intermediate	Fa	NA	*	5.44	A
2	M	8	I	NB	AP	Adr	poorly diff	1	Low-Intermediate	Fa	NA	*	7.28	A
3	M	45	I	GNB	TH	ExAdr	maturing		Low-Intermediate	Fa	NA	*	1.45	A
4	M	0.5	I	NB	AP	ExAdr	undifferentiated	1	Low-Intermediate	Fa	NA	*	4.95	A
5	M	18	I	NB	TH	ExAdr	poorly diff	1	Low-Intermediate	Fa	NA	An	*	A
6	F	18	I	NB	AP	Adr	poorly diff	2	Low-Intermediate	Fa	NA	Di	4.48	A
7	F	3	I	NB	AP	Adr	poorly diff	2	Low-Intermediate	Fa	NA	Di	*	A
8	M	0.3	I	NB	AP	ExAdr	undifferentiated	1	Low-Intermediate	Fa	NA	An	*	A
9	M	182	IV	NB	AP	ExAdr	poorly diff	1	High	U	NA	*	*	D
10	F	41	I	GN	AP	ExAdr	maturing		Low-Intermediate	Fa	NA	Di	*	A
11	M	18	I	GNB	TH	ExAdr	maturing		Low-Intermediate	Fa	NA	Di	*	A
12	M	67	IIA	GNB	TH	ExAdr	maturing		High	Fa	NA	*	2.6	A
13	M	2	I	NB	AP	Adr	poorly diff	1	Low-Intermediate	Fa	NA	*	*	A
14	M	10	I	NB	TH	ExAdr	poorly diff	2	Low-Intermediate	Fa	NA	*	4.08	A

Pt : patient, NB : neuroblastoma, GNB : ganglioneuroblastoma, GN : ganglioneuroma, HN : head-neck, TH : thorax, AP : abdomino-pelvis, Adr : adrenal, ExAdr : extra adrenal, diff : differentiated, MKI : mitosis-karyorhexis index, MKI 1 : low, MKI 2 : intermediate, MKI 3 : high, Fa : favorable histology, U : unfavorable histology, Am : amplified, NAm : not amplified, An : aneuploid, Di : diploid, mIBG : metiodobenzylguanidine, T/M : tumor – mediastinum ratio, A : alive, D : died, * : not available

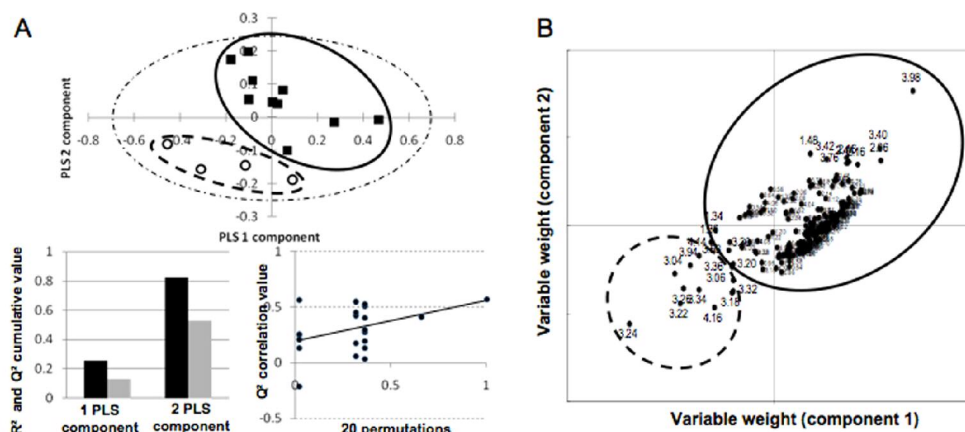


FIGURE 1. (A) 2D plot showing the first two components of PLS-DA performed according to histopathological criteria. NB and no-NB (including GNB et GN) are represented by black squares and white dots, respectively. PLS-DA is validated by a cumulative R^2Y value (black bar) equal to 0.83. Q^2 value (gray bar) is superior to 0.5, indicating a good predictivity for the model. Regression line represents the correlation coefficient between original Y (histopathological classification) and permuted Y versus the cumulative Q^2 . Negative slope of regression line suggests there is no model overfit. **(B)** Plot of PLS-DA variable weight distribution showing the metabolic fingerprint related to histological criteria. Filled line circle and dotted line circle shows the metabolites linked to NB and no-NB, respectively. Each point (numerical value in ppm) represents a single bucket (0.02 ppm interval in HRMAS spectra) correlated to one or several metabolites.

150x66mm (300 x 300 DPI)

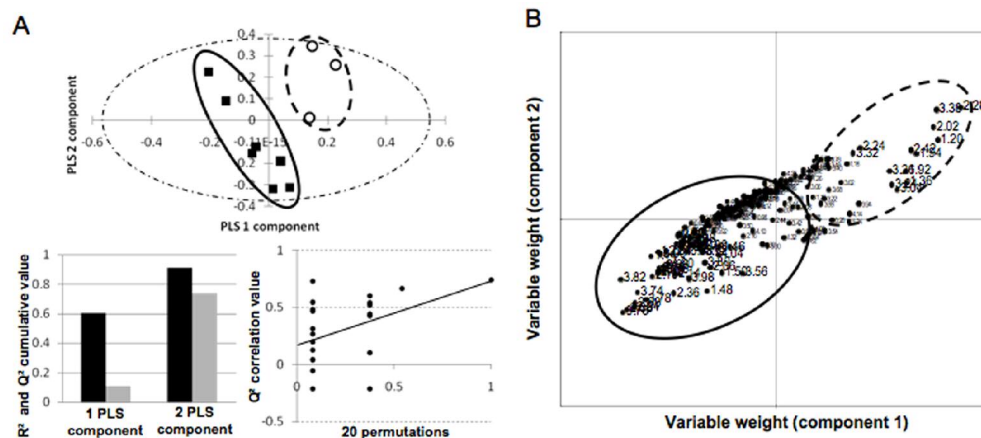


FIGURE 2. (A) 2D plot showing the first two components of PLS-DA performed according to patient age criteria, including only children with NB. Children younger and older than 1 year are represented by black squares and white dots, respectively. PLS-DA is validated by a cumulative R²Y value (black bar) equal to 0.91. Q² value (gray bar) is superior to 0.5, indicating a good predictivity for the model. Negative slope of regression line suggests there is no model overfit. **(B)** Plot of PLS-DA variable weight distribution showing the metabolic fingerprint related to patient age at diagnosis. Filled line circle and dotted line circle shows the metabolites linked to children younger and older than 1 year, respectively. Each point (numerical value in ppm) represents a single bucket (0.02 ppm interval in HRMAS spectra) correlated to one or several metabolites.

150x67mm (300 x 300 DPI)

Résumé : *La métabolomique est un outil récent, aujourd'hui en plein essor, qui se définit comme étant l'étude de l'ensemble des petites molécules ; les métabolites, produites par un organisme sous différentes conditions. Son application à la problématique du cancer consiste en l'étude des perturbations métaboliques liées au processus oncologique. La métabolomique mêle diverses techniques d'analyses telles que la spectroscopie de masse et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), couplées à des méthodes statistiques évoluées afin d'extraire les informations métaboliques pertinentes permettant de caractériser les systèmes biologiques. La spectrométrie RMN haute résolution en rotation à l'angle magique (HRMAS) est la technique que nous avons choisie pour l'étude du métabolome des tumeurs car elle regroupe un nombre important d'avantages (simplicité de préparation des échantillons, la reproductibilité intra et inter laboratoire et le cout relativement modeste de fonctionnement).*

L'étude principale réalisée dans le cadre de cette thèse a porté sur les tumeurs cérébrales. Une centaine de tumeurs ont ainsi été analysé et leur métabolome caractérisé. L'analyse effectuée s'est focalisé sur la problématique du « grading de malignité » des tumeurs cérébrales, principalement sur les gliomes. Ainsi une forte corrélation a été trouvé entre les profils métabolique des gliomes (glioblastome, oligodendrogliome) et l'évolution clinique des patients. L'approche métabolomique pour l'étude des tumeurs, d'un point de vue diagnostic et pronostic, semble aujourd'hui prometteuse. De plus l'étude des profils métaboliques, devrait, à terme, permettre une meilleure compréhension des perturbations métaboliques lié à la pathologie, et potentiellement, conduire à la mise en place de traitements individualisés parfaitement adaptés à chaque patient.

Néanmoins, une étape de validation de ces premières observations est aujourd'hui indispensable. C'est pourquoi ces travaux ont accompagné l'installation du premier spectromètre RMN HRMAS dans le milieu clinique en novembre 2007 dans le cadre du projet CARMeN. L'objectif général de ce projet est, maintenant, d'étendre l'expérience acquise durant cette thèse à tous les domaines de la cancérologie où il existe, soit une dissociation entre le diagnostic histopathologique de la tumeur et le devenir du patient, soit une discordance à la réponse thérapeutique pour un sous-type de tumeur.

Abstract : *Metabolomics is a new fast growing field with the aim of studying all the small molecules produced (under different conditions and times in their life cycles) in a biological system known as metabolites. Applying the metabolomics to the cancer's problematic will be resumed in the identification of metabolic perturbation linked to oncological pathology. The metabolomics is the result of coupling analytical techniques such as mass spectrometry or nuclear magnetic resonance spectroscopy to specific statistical methods in order to identify metabolic information able to characterize the being state of the biological system. The high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR is the technique we choose for studying tumour as it deals great advantages (easiness in sample preparation, the inter et intra laboratory reproducibility and the moderate cost per sample).*

The principal study carried out within the framework of this thesis related to the cerebral tumours. Almost one hundred tumours were analyzed and their metabolome were characterized. The analysis carried out was focused on the problem of the " malignancy grading " of the cerebral tumours, mainly on the gliomas. Thus, a correlation was found between metabolic profile of the gliomas (glioblastomas, oligodendrogliomas) and the clinical evolution of the related patients. The use of metabolomics for tumour studying seems promising today on its diagnosis and prognosis capabilities. Moreover, the study of metabolic profile, should, in the near futur, allow a better comprehension of the metabolic disturbances related to pathology, and potentially, lead to the installation of individualized treatments perfectly adapted to each patient.

Nevertheless, a stage of validation for those observations is necessary. In order to achieve this goal, the CARMeN project, started in november 2007, consisting in the installation of the first clinical HRMAS NMR spectrometer, was done. The main aim of this project is to extend our experience to all the fields of the cancerology where, a dissociation between the histopathologic diagnosis and the patient outcome, or a discordance between the therapeutic response for a sub-type of tumour exist.