



**HAL**  
open science

## Métabolomique et imagerie TEP-FDG des cancers du sein

D. Chardin, T. Pourcher, J. Gal, C. Bailleux, J.M. Guignonis, J. Darcourt, L. Arnould, O. Humbert

► **To cite this version:**

D. Chardin, T. Pourcher, J. Gal, C. Bailleux, J.M. Guignonis, et al.. Métabolomique et imagerie TEP-FDG des cancers du sein. Médecine Nucléaire - Imagerie Fonctionnelle et Métabolique, 2021, 45 (1), pp.4-12. 10.1016/j.mednuc.2020.03.002 . cea-03610644

**HAL Id: cea-03610644**

**<https://cea.hal.science/cea-03610644>**

Submitted on 13 Feb 2023

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

## **Métabolomique et imagerie TEP-FDG des cancers du sein.**

### **Metabolomics and FDG PET-CT in breast cancer**

David Chardin<sup>1</sup>, Thierry Pourcher<sup>2</sup>, Jocelyn Gal<sup>3</sup>, Caroline Bailleux<sup>4</sup>, Jean Marie Guignonis<sup>2</sup>,  
Jacques Darcourt<sup>1</sup>, Laurent Arnould<sup>5</sup>, Olivier Humbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre Antoine Lacassagne, service de Médecine Nucléaire, 33 avenue de Valombrose  
06189 Nice - <sup>2</sup>CEA, Université de Nice, Laboratoire TIRO, UMRE 4320, 06189 Nice -

<sup>3</sup>Centre Antoine Lacassagne, Unité de Biostatistique, 33 avenue de Valombrose 06189 Nice -

<sup>4</sup>Centre Antoine Lacassagne, service Oncologie, 33 avenue de Valombrose 06189 Nice -

<sup>5</sup>Centre Georges François Leclerc, département de biologie et pathologie des tumeurs , 1 Rue  
du Professeur Marion 21000 Dijon.

**Auteur correspondant**      David CHARDIN  
  
chardindj@gmail.com

## Résumé

Le métabolisme tumoral est étroitement lié à la tumorigenèse et varie selon le phénotype tumoral. Les techniques de métabolomique peuvent fournir des données quantitatives concernant un grand nombre de métabolites et permettent l'analyse de nombreuses voies métaboliques intriquées. La tomographie par émission (TEP) de positons au  $^{18}\text{F}$ -fluorodéoxyglucose (FDG) permet une mesure *in vivo* de l'avidité cellulaire en glucose. L'objectif de ce travail était de rechercher et comprendre les corrélations existantes entre données de métabolomique et intensité de captation du FDG dans le cadre du cancer du sein.

70 échantillons tumoraux provenant de patientes présentant un cancer du sein et pour lesquelles les résultats d'une TEP-FDG préthérapeutique étaient disponibles ont été analysés selon un protocole de métabolomique, non ciblée par chromatographie liquide et couplée à une spectrométrie de masse. Les échantillons ont été séparés en deux groupes selon l'intensité de fixation tumorale du FDG en prenant la valeur médiane de la SUV<sub>max</sub> pour dichotomiser. 854 métabolites ont été identifiés. Une analyse discriminante des moindres carrés partiels et une analyse de classification supervisée ont permis de créer un modèle permettant de prédire l'avidité en FDG à partir des données de métabolomique avec une précision de 0,73 à 0,77. Les métabolites corrélés à l'intensité de fixation du FDG étaient, entre autres, la glutathione, des acides aminés tels que le glutamate, la proline ou la tyrosine, l'acetyl-carnitine, des métabolites de la voie de la kynurinine et des polyamines telles que la N1,N12-diacetylspermine. Ces métabolites ont déjà été rapportés comme marqueurs de l'agressivité tumorale. Une corrélation directe entre avidité en FDG et glycolyse n'a pas pu être mise en évidence, cependant de nombreux signes indirects montraient une plus forte activité glycolytique dans les tumeurs avides en FDG. L'analyse de métabolites inconnus, mise en évidence par cette approche, pourrait permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs d'intérêt.

*FDG, Métabolomique, Cancer du Sein*

## **Abstract**

Cancer metabolism is an essential aspect of tumorigenesis, as cancer cells have increased energy requirements in comparison to normal cells. Metabolomic techniques can provide quantitative data for a large number of small molecules in tissues and enable the analysis of multiple intricate metabolic pathways. Positron emission tomography (PET) using  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucose (FDG) enables in vivo analysis of glycolysis and is widely used in oncology. High tumor FDG uptake is a prognostic factor in breast cancer and has been associated with tumor aggressiveness. 70 breast cancer samples obtained from untreated patients who had undergone FDG-PET imagery were analyzed through an untargeted metabolomic approach using liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS) to study possible correlations between metabolomic data and FDG uptake. Tumors were split into two groups depending on avidity for FDG as measured with PET. The Compound Discoverer 4.0 software enabled identification of 854 metabolites. PLS-DA based models predicted FDG uptake with an accuracy ranging from 0,73 to 0,77. Selected metabolites varied depending on the use of scaling or log transformation. Metabolites correlated with tumor FDG uptake were, among others, glutathione, amino-acids such as glutamate, proline or tyrosine, L-acetylcarnitine, metabolites from the kynurenine pathway such as L-kynurenine or formyl-kynurenine and polyamines such as N1,N12-diacetylspermine or N1-acetylspermine. These metabolites have been previously shown to reflect cancer aggressiveness. The correlation between the glycolytic pathway activation and tumor FDG uptake could not be directly assessed but indirect signs showed a higher glycolytic activity in tumours presenting a higher FDG uptake. Studying new metabolites identified through this process could enable a better understanding of tumor metabolism and identification of new biomarkers.

***FDG, Metabolomics, Breast Cancer***

## **Introduction**

De nombreuses études ont montré que le métabolisme tumoral est différent du métabolisme des tissus sains. La reprogrammation du métabolisme dans le cadre du cancer est un processus complexe, non encore complètement élucidé, impliquant des mutations, des modifications épigénétiques et l'influence du micro-environnement [1].

L'une des différences les plus connues entre le métabolisme tumoral et le métabolisme des tissus sains a été mise en évidence par O. Warburg dans les années 1920 et est nommée « l'effet Warburg » [2]. Cet effet correspond au fait que les cellules tumorales utilisent préférentiellement la glycolyse suivie de la fermentation lactique plutôt que la phosphorylation oxydative comme voie énergétique et ce indépendamment de la disponibilité en oxygène ou des autres substrats énergétiques. Ce phénomène est appelé « Effet Warburg » ou « glycolyse aérobie »[3].

Les mécanismes à l'origine de l'effet Warburg ne sont pas encore complètement élucidés. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les bénéfices potentiels de l'hyperactivation de la glycolyse aérobie et la formation de lactates pour les cellules tumorales malgré le faible rendement énergétique de cette voie métabolique, mais aucune n'a été confirmée [4].

Ce faible rendement énergétique implique une forte consommation de glucose. Pour faciliter le passage intra-cellulaire du glucose, les cellules tumorales expriment un grand nombre de transporteurs membranaires du glucose (GLUT) et ce même en situation de jeûne et d'insulinémie faible. Cette caractéristique est ce qui a permis l'essor de la tomographie par émission de positons (TEP) TEP-TDM au  $^{18}\text{F}$ -deoxyglucose-6-phosphate (FDG) en

cancérologie [5], notamment dans le cadre du cancer du sein [6]. Celle-ci permet de mesurer in vivo l'absorption cellulaire de glucose [7].

Compte-tenu des connaissances concernant l'effet Warburg, il est globalement admis que la captation tumorale du FDG est corrélée à l'activité glycolytique tumorale, bien que ceci n'ait jamais été démontré expérimentalement. Par ailleurs, l'intensité de captation tumorale du FDG est un facteur pronostic connu pour de nombreux cancers, notamment le cancer du sein[8].

La captation tumorale du FDG est hétérogène. Elle varie selon le type tumoral et entre différentes lésions métastatiques chez un même patient. Ceci est particulièrement vrai dans le cadre du cancer du sein [9]. D'autres voies métaboliques que la glycolyse aérobie sont vraisemblablement activées au sein du tissu tumoral et on peut supposer que les tumeurs présentant une faible avidité pour le FDG utilisent d'autres substrats énergétiques tels que les acides gras ou la glutamine plutôt que le glucose.

La métabolomique est une nouvelle approche permettant de quantifier un grand nombre de métabolites dans un fluide ou un tissu par le biais d'analyses en spectrométrie de masse [10]. Elle permet ainsi d'étudier l'état d'activation d'un grand nombre de voies métaboliques par le biais d'analyses statistiques et par confrontation à des bases de données. Les données de métabolomique ont l'avantage de refléter la dernière étape des différentes cascades de signaux exercés sur les tissus. Cette approche a notamment déjà apporté des résultats pertinents dans le cadre du cancer du sein [11].

L'objectif de ce travail a été de rechercher des corrélations entre des données de

métabolomique et l'intensité de captation tumorale du FDG puis analyser les métabolites corrélés afin d'identifier des facteurs pronostiques et des radiopharmaceutiques potentiellement utiles en cas de faible captation du FDG.

## **2 Matériel et méthodes**

### **2.1 Population de l'étude**

Cette étude a porté sur des échantillons tumoraux prélevés chez 70 patientes atteintes de cancers du sein au stade localisé avec ou sans extension ganglionnaire loco-régionale, présentant une indication de traitement néoadjuvant. Ces patientes ont été incluses de manière prospective au centre de cancérologie de Dijon entre novembre 2006 et novembre 2013. Pour chaque patiente, le poids et la taille ont été recueillis, ainsi que les antécédents familiaux néoplasiques, les antécédents obstétricaux et le statut ménopausique. Le stade tumoral, le grade histologique et le phénotype tumoral ont également été recueillis.

### **2.2 Mesure de la captation tumorale du <sup>18</sup>F-deoxyglucose-6-phosphate**

Une TEP-TDM au <sup>18</sup>FDG a été réalisée avant tout traitement pour les 70 patientes incluses, en moyenne 14 ( $\pm 10$ ) jours après la biopsie.

Deux systèmes TEP-TDM ont été utilisés : un système Gemini GXL entre novembre 2006 et décembre 2010 et un système Gemini TF PET-CT entre décembre 2010 et décembre 2013 (Philips Medical Systems, Eindhoven, Pays Bas). Les patientes avaient comme instruction de jeuner au moins 6 h avant l'injection intra-veineuse de 5 MBq/kg de FDG pour les examens réalisés sur le système Gemini GXL et de 3 MBq/kg pour les examens réalisés sur le système Gemini TF. L'acquisition TEP-TDM a été réalisée 60 min après injection. Les images TEP ont été corrigées de la décroissance radioactive, de la diffusion, des coïncidences fortuites et

de l'atténuation avant la reconstruction par algorithme itératif : 3D-RAMLA (GEMINI GXL) ou 3D OSEM (GEMINI TF).

La captation tumorale a été quantifiée relativement par la mesure de la  $SUV_{max}$  (Maximal Standard Uptake Value) selon la formule suivante :

$$SUV_{max} = \frac{\text{Activité dans le voxel le plus intense de la tumeur (KBq.g}^{-1}\text{)} \times \text{Masse totale (g)}}{\text{Activité injectée (KBq)}}$$

Les patientes ont ensuite été séparées en deux groupes selon les valeurs de SUV mesurées : un groupe « tumeur peu avide en FDG » correspondant aux tumeurs présentant une valeur de  $SUV_{max}$  inférieure à la médiane et un groupe « tumeur avide en FDG » correspondant aux tumeurs présentant une valeur de  $SUV_{max}$  supérieure à la médiane.

### **2.3 Biopsies**

Lors de la biopsie pré-thérapeutique sous contrôle échographique, 1 à 3 carottes complémentaires de tissu ont été prélevées. Les échantillons tumoraux ont été congelés et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'aux analyses.

### **2.4 Préparation des échantillons**

Afin d'extraire les métabolites du tissu tumoral, chaque échantillon a été plongé encore congelé dans un tube Eppendorf contenant 1 mL de méthanol puis broyé manuellement avec un piston. Les tubes ont ensuite été placés dans un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  durant au moins 12h. Le lendemain les tubes ont été centrifugés à 13000 rpm pendant 15 min puis les surnageants ont été extraits et placés dans un nouveau tube. Le méthanol a été évaporé en utilisant un speed-Vac pendant 10 heures. Une fois séchés, les échantillons ont été conservés dans un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse de spectrométrie de masse couplée à la

chromatographie liquide (CL-SM). Avant cette analyse, les métabolites ont été re-suspendus dans 100 µl d'un mélange 50% acétonitrile/ 50% eau, compatible avec l'analyse CL-SM.

## **2.5 Analyses de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (CL-SM)**

La quantification des différents métabolites a été réalisée en spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phases liquide.

L'étape de chromatographie liquide a été réalisée avec un système DIONEX Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific). L'analyse de spectrométrie de masse était réalisée sur un système Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Scientific) avec une source d'ionisation de type électro-ébulseur chauffé (HESI II), en mode positif (tension de pulvérisation à 3800 V) et négatif (tension de pulvérisation à 2500 V). Les paramètres détaillés sont décrits en annexe.

## **2.5 Traitement informatique des données de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide**

Les données de spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide ont été traitées avec le logiciel Compound Discoverer (Version 3.0, ThermoFischer). Les données issues des modes d'ionisation positifs et négatifs ont été traitées séparément. Les paramètres utilisés sont décrits en **annexe**.

Les résultats obtenus en mode positif et négatif ont été combinés. Quand un métabolite était identifié dans les deux modes, le mode permettant d'obtenir l'intensité moyenne la plus élevée a été privilégié.

Les pics correspondant à des contaminants d'origine pharmacologique, tels que la Lidocaïne, ont été supprimés avant les analyses statistiques.

## **2.6 Préparation des données**

Les intensités de pics ont été normalisées en fonction de la somme de l'intensité des pics pour chaque échantillon. Ce mode de normalisation suppose que le courant ionique total est équivalent pour chaque échantillon.

Les données ont été centrées et réduites selon deux méthodes avant les analyses par classification : une réduction classique, par rapport à l'écart type de chaque variable, une réduction selon Pareto, par rapport à la racine carré de l'écart type de chaque variable. La réduction classique permet d'égaliser l'importance de chaque. Elle présente l'inconvénient d'être plus sensible aux erreurs de mesure. La méthode de Pareto limite l'impact des métabolites de grande intensité sur la classification tout en préservant la structure des données [12].

## **2.7 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel MetaboAnalyst (Version 4.0, <https://www.metaboanalyst.ca/>).

## **2.8 Analyses par classification non supervisée**

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée. Cette analyse permet de rechercher des groupes d'échantillons présentant des caractéristiques similaires sans prendre en compte d'a priori concernant la classification. On peut ainsi avoir une vue globale des résultats et identifier d'éventuels échantillons à caractéristiques aberrantes.

## **2.9 Analyses par classifications supervisées**

Une analyse discriminante des moindres carrés partiels a été réalisée pour évaluer si les données de métabolomique peuvent prédire l'avidité en FDG des tumeurs. Cette méthode, fréquemment utilisée en métabolomique, recherche des métabolites permettant de regrouper les échantillons selon les groupes définis par l'utilisateur. Elle attribue pour cela un poids à chaque métabolite et crée un modèle prédictif. Ce modèle prédictif peut être étoffé en augmentant le nombre de composantes explicatives. Cette méthode présente l'avantage d'être simple et validée.

Les métabolites présentant un poids important dans les modèles prédictifs établis ont fait l'objet d'analyses univariées.

## **2.10 Analyses univariées**

Pour chaque métabolite identifié, un test t a été réalisé pour comparer les moyennes d'intensité dans le groupe « peu avide en FDG » et le groupe « avide en FDG ». Des analyses par courbe sensibilité/spécificité ont également été réalisées.

Les métabolites présentant des différences statistiquement significatives ont été testées dans une seconde base de données de métabolomique portant sur 30 patientes prises en charge pour des tumeurs du sein pour lesquelles des données de TEP-TDM au <sup>18</sup>F<sup>18</sup>FDG réalisées avant tout traitement étaient disponibles.

## **2.11 Validations de l'identification des métabolites d'intérêts**

Les métabolites d'intérêts issus des analyses statistiques ont été validés en termes de spectres de masses de premier ordre (MS1) et de second ordre (MS2) par comparaison des spectres obtenus avec ceux des bases de données METLIN. Le MS1 correspond au spectre de masse issu du premier analyseur du spectromètre de masse en tandem, il contient les pics correspondants au métabolite d'intérêt sous différentes formes d'ionisation avec son profil isotopique. Le MS2 correspond au spectre de masse issu du second analyseur et contient les pics correspondants aux fragments obtenus après passage du métabolite dans la chambre de collision. Si plusieurs métabolites peuvent être isobares, leurs fragments respectifs sont susceptibles de présenter des masses différentes ce qui permet de les différencier.

## **3 Résultats**

### **3.1 Caractéristiques des patientes incluses**

Les caractéristiques des patientes incluses sont résumées dans le **tableau 1**. La plupart des patientes présentaient des tumeurs de stade II (taille tumorale entre 2 et 5 cm ou atteinte ganglionnaire régionale).

### **3.2 Mesure de la captation tumorale du Fluorodoxyglucose**

Les valeurs de  $SUV_{max}$  des tumeurs ont pu être mesurées à partir de TEP-TDM au  $^{18}FDG$  pour les 70 patientes. Un exemple de segmentation est présenté dans la **figure 1**. La valeur médiane de la  $SUV_{max}$  était de 6,78 (min 1,7 - max 50,5).

La  $SUV_{max}$  n'était pas statistiquement associée à l'âge, à l'indice de masse corporelle, aux antécédents de grossesse, au statut ménopausique, à la taille tumorale ( $p = 0,169$ ) ou au stade N.

Une  $SUV_{max}$  tumorale élevée était significativement associée à un grade histologique de Scarff Bloom Richardson élevé (SBR) ( $p = 0,0017$ ), au nombre de mitoses ( $p = 0,0036$ ), au nombre d'atypies cellulaire ( $p = 0,016$ ), et au phénotype tumoral ( $p = 6E-05$  après analyse de variance).

La  $SUV_{max}$  était plus faible pour les phénotypes « luminaux » (moyenne = 6,3), intermédiaire (moyenne = 7,78) pour les phénotypes « HER2 positifs » et plus élevées pour les phénotypes « triples négatifs » (moyenne = 16,24), ce qui concorde avec les résultats déjà rapportés dans la littérature [9]

### **3.3 Métabolites identifiés**

L'utilisation du logiciel « Compound Discoverer » après analyse de CL-SM a permis d'individualiser 3940 pics dont 345 correspondaient à des métabolites identifiés non redondants en mode négatif et 7775 pics dont 625 correspondaient à des métabolites identifiés non redondants en mode positif. La combinaison des deux bases a permis de conserver 854 pics correspondant à des métabolites uniques.

Les pics correspondant à la 3-hydroxylidocaine, au bisoprolol, au bromazepam, au citalopram, à la codeine, à l'hydrochlorothiazide, à l'hydroxyfentanyl, à l'irbesartan, à la lidocaine, à la lidocaine n-oxide, à la morphine, au nebivolol, au nordiazepam, à la norfentanyl, à la norlidocaine, à l'ohmefentanyl, à l'olanzapine, à l'omega-hydroxynorfentanyl, à l'omeprazole sulphone, à l'oxazepam, au paracetamol, au propranolol, au tetrazepam, au valsartan et au zolpidem ont été supprimés car considérés comme des contaminants d'origine pharmacologique.

### **3.4 Analyse en composantes principales (non-supervisée)**

Les résultats de l'analyse en composantes principales sont présentés dans la **figure 2**. L'analyse a révélé qu'il existait une variabilité lot à lot dans nos données, avec une séparation entre deux groupes de 20 et 50 échantillons. Ces deux groupes ont fait l'objet de deux analyses CL-SM séparées, ce qui a pu entraîner les variations observées. Il n'a pas été mis en évidence d'échantillon présentant des caractéristiques aberrantes.

### **3.5 Prédiction de la captation du FDG par méthodes de classification supervisée**

Les performances de l'analyse discriminante des moindres carrés partiels sont présentées dans la **figure 3**. Les meilleures performances étaient obtenues avec des modèles à 3 composantes explicatives. La **figure 4** représente la projection des échantillons en fonction des valeurs des deux premières composantes des modèles.

Les 20 métabolites présentant les poids les plus importants pour la première composante de chaque modèle sont présentés dans la **figure 5**. La N1,N12-diacetylspermine et la proline avaient les poids les plus importants en fonction du type de réduction utilisée.

### **3.6 Analyses comparatives univariées**

Les analyses univariées réalisées ont montré que la N1,N12-diacetylspermine présente une forte association statistique ( $p = 1,17E-7$ ) et un fort pouvoir prédictif pour l'intensité de fixation du FDG (aire sous la courbe sensibilité/spécificité : 0,83). La N1-acetylspermine, la forme mono-acétylée, présente également une forte association statistique ( $p = 1,7E-5$ ). Ces résultats n'ont pas été vérifiés sur des données de métabolomique concernant 30 patientes niçoises prises en charge pour des cancers du sein et ayant eu un examen TEP-TDM au

<sup>18</sup>FDG avant traitement. On ne notait que des taux non significativement plus élevés de N1,N12-diacetylspermine pour les tumeurs « avides en FDG » ( $p=0,21$ ).

Plusieurs métabolites issus du métabolisme du tryptophane présentent également une association statistique avec l'intensité de fixation du FDG. En effet, les taux de L-kynurenine ( $p = 1,7E-5$ ), d'acide kynurenique ( $p=1,1E-4$ ) et de L-formyl-kynurenine ( $p = 4E-3$ ) sont plus élevés dans les tumeurs « avides en FDG » que dans les tumeurs « peu avides ». Ceci a également été constaté sous forme de tendance concernant la L-kynurenine dans la seconde cohorte ( $p=0,15$ ).

Par ailleurs, certains acides aminés comme le Glutamate et la Proline sont significativement plus élevés dans les tumeurs « avides en FDG » ( $p= 0,002$  et  $0,003$  respectivement). De même, la glutathione, un dérivé du glutamate impliqué dans la réponse au stress oxydatif, était non significativement augmentée dans les tumeurs « avides en FDG » (glutathione oxydée :  $p= 0,06$ ). Ceci a également été constaté dans la seconde cohorte ( $p= 0,02$  et  $0,04$  respectivement).

Enfin, l'acetyl-carnitine et certains acides aminés acétylés comme la N-acetyl-alanine sont significativement plus élevés dans les tumeurs « avides en FDG » ( $p= 0,02$  et  $0,006$  respectivement). Ceci a également été constaté dans la seconde cohorte ( $p= 0,015$ ).

Les analyses univariées n'ont pas montré d'association statistique significative entre l'avidité en FDG et les métabolites de la voie de la glycolyse.

### **3 Discussion**

#### **3.1 Métabolisme énergétique**

La glycolyse n'a pas pu être directement explorée car un nombre insuffisant de métabolites de cette voie a été identifié dans nos données. Ceci peut être dû à la fragilité relative des petites molécules polaires que sont les sucres comparativement aux molécules plus robustes que sont, par exemple, les acides aminés. Les tumeurs étudiées n'ayant pas été analysées immédiatement après prélèvement, les sucres ont pu être dégradés.

On peut également supposer que l'absence de résultats significatifs pour cette voie soit lié à l'absence de goulot d'étranglement au cours du métabolisme glucidique. Les métabolites pour lesquels des différences significatives ont pu être mises en évidence peuvent représenter les produits de réactions enzymatiques ou transports sur ou sous-exprimés en fonction de l'activité tumorale mais pour lesquels la suite de la cascade enzymatique est relativement moins exprimée, entraînant une accumulation de produit à une étape de la chaîne. Si l'ensemble de la voie de la glycolyse aérobie est suractivé et que le lactate ainsi formé est éliminé du tissu tumoral, les quantités de métabolites au sein de la tumeur peuvent être faibles, ce qui expliquerai nos résultats.

#### **3.2 Voies métaboliques d'intérêt**

Plusieurs métabolites d'intérêt ont pu être mis en évidence par notre approche. Ceux-ci présentent des liens plus ou moins étroits avec la glycolyse, résumés dans la **figure 6**.

La glutathione est un tripeptide dérivant du glutamate, de la glycine et de la cystéine jouant un rôle clé dans la réponse au stress oxydatif. La glutathione sous forme oxydée peut participer à la prédiction de l'avidité en FDG et est plus élevée dans les tumeurs « avides en FDG ». Ces

résultats sont concordants avec des résultats rapportés concernant des niveaux élevés de glutathione dans des tumeurs du sein comparativement aux tissus sains [13]. Une augmentation du rapport glutathione oxydé/glutathione réduite a également été rapportée dans les tumeurs du sein, ce qui peut expliquer l'importance de la glutathione oxydée dans notre modèle [14]. Un haut niveau de glutathione oxydée peut refléter une production importante de dérivés réactifs de l'oxygène qui contribue à la prolifération tumorale, à une modification du métabolisme tumoral et des signaux cellulaires ainsi qu'aux mécanismes de résistance [15]. Des résultats discordants ont été rapportés concernant la corrélation entre les taux de glutathione et des facteurs pronostiques. Nos résultats suggèrent plutôt une corrélation positive entre agressivité tumorale et taux de glutathione oxydée.

Il existe une relation connue entre le stress oxydatif et le catabolisme des polyamines dont les produits finaux sont la N1,N12-diacetylspermine et la N1-acetylspermine [16]. Celles-ci peuvent participer à la prédiction de l'avidité en FDG et sont plus élevées dans les tumeurs «avidées en FDG». Des analyses complémentaires de nos données ont pu montrer que le taux de N1,N12-diacetylspermine est associé à d'autres critères pronostiques comme le grade SBR ( $p = 0,018$ ), le taux d'atypies cellulaires ( $p = 0,018$ ) et le taux de mitoses ( $p=0,083$ ).

La N1-acetylspermine et la N1,N12-diacetylspermine sont des produits de l'acétylation de la spermine et de la N1-acetylspermine par la Spermine/Spermidine Acetyl Transferase (SSAT), une enzyme limitante du catabolisme des polyamines. Elles sont également des substrats de la Polyamine Oxidase (PAO), une seconde enzyme du catabolisme des polyamines. Des taux plus élevés de SSAT et moins élevés de PAO ont été rapportés dans des tumeurs du sein comparativement au tissu mammaire non tumoral. Une association a également été mise en évidence avec des facteurs pronostiques comme le grade histologique ou la taille tumorale

[17]. Ainsi, si l'intensité de captation tumorale du FDG est considérée comme un marqueur d'agressivité tumorale, ces résultats sont cohérents avec les observations précédemment rapportées. Paradoxalement, il a été rapporté que l'activation de SSAT et l'inhibition de PAO induit une diminution de la prolifération cellulaire au niveau de cellules de cancers colorectaux et d'hépatocarcinomes [18]. Le rôle des polyamines dans la tumorigénèse reste incomplètement élucidé.

Le glutamate et la proline peuvent participer à la prédiction de l'avidité en FDG et sont plus élevés dans les tumeurs « avides en FDG », ceci peut être dû à une activité plus importante de l'axe glutamine-proline. Cette augmentation d'activité a déjà été rapportée dans des tumeurs du sein plus agressives comparativement à des tumeurs moins agressives [19] et peut être dû à des besoins plus importants en acides aminés protéinogènes dans les tumeurs à prolifération rapide. Probablement pour les mêmes raisons, la Tyrosine et la N-acétyl-méthionine sont plus élevées dans les tumeurs « avides en FDG » que dans les tumeurs « peu avides en FDG ».

La L-acétylcarnitine peut participer à la prédiction de l'avidité en FDG et est plus élevée dans les tumeurs « avides en FDG » que dans les tumeurs « peu avides en FDG ». Ceci peut être expliqué par une hyperactivation du cycle de la carnitine en réponse à l'acidification du milieu due à la glycolyse aérobie et à la production de lactate [20].

Des métabolites issus du métabolisme du tryptophane, notamment la L-kynurenine, peuvent participer à la prédiction de l'avidité en FDG et sont plus élevés dans les tumeurs « avides en FDG ». L'hyperactivation de l'axe de la kynurenine a été rapportée comme un mécanisme d'échappement tumoral au système immunitaire et il a été montré que cet axe était plus actif dans les tumeurs du sein plus agressives [21]. Des traitements visant à inhiber la première

enzyme de l'axe de la kynurenine, IDO-1 sont actuellement en phase de test. Si ces traitements s'avèrent efficaces, une  $SUV_{max}$  élevée pourrait être un facteur prédictif de sensibilité tumorale.

### **3.3 Limites de l'étude**

#### **3.3.1 Biais lié à une variabilité lot à lot**

Les ACP ont montré la présence d'une variabilité lot à lot dans nos données. Cette variabilité pourrait être due au changement de colonne de chromatographie entre les passages de ces deux lots d'échantillons. L'utilisation de standards internes au cours des analyses CL-SM aurait pu limiter cette variabilité. Celle-ci peut représenter un biais de confusion dans nos résultats. Certains résultats ont pu être validés en confrontant nos résultats à une seconde base de données et ne sont donc probablement pas le résultat de cette variabilité. Cependant, cette seconde base étant de plus petite taille, il n'a pas été possible de valider tous nos résultats. On peut espérer que le fait que les deux classes étudiées aient été présentes dans des proportions équivalentes dans les deux lots présents limite l'influence de cette variabilité lot à lot.

#### **3.3.2 Données manquantes concernant les apports exogènes**

Les données de métabolomique traduisent l'influence de facteurs endogènes et exogènes sur les processus cellulaires. Les données concernant le régime alimentaire ou les prises médicamenteuses des patientes étudiées n'étaient pas disponibles pour cette étude. Il aurait été préférable de pouvoir confronter les données de métabolomique à ces informations. La tangeritine présente, par exemple, une association statistique avec l'avidité en FDG. Il s'agit d'un métabolite présent dans de nombreux fruits et légumes et pour lequel des propriétés cytostatiques ont été rapportées dans le cadre du cancer du sein [22]. Elle est désormais proposée sous forme de complément alimentaire. Paradoxalement, les taux étaient plus élevés

dans les tumeurs « très avides en FDG ». Ce résultat est difficilement interprétable en l'absence d'information concernant les apports exogènes des patientes en tangeritine.

### **3.3.3 Complexité des données**

Le métabolome représente un vaste réseau de molécules interconnectées par le biais d'enzymes. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à une portion de ce vaste réseau. Bien qu'il existe désormais des outils informatiques permettant de mieux appréhender ces données, leur interprétation reste complexe, notamment car certaines petites molécules et enzymes ne sont pas encore connues. De plus, chaque petite molécule peut à la fois être produit et substrat de plusieurs enzymes dans ce réseau et il peut être difficile d'interpréter les mécanismes à l'origine des variations observées. Des analyses supplémentaires de protéomique pourraient permettre de confirmer ou infirmer les hypothèses émises à partir des données de métabolomique.

## **4 Conclusions et perspectives**

La métabolomique offre accès à un grand nombre de données intégrant l'influence de l'ensemble des facteurs internes et externes modifiant les processus cellulaires. La compréhension des phénomènes complexes influençant ces données nécessite des transformations de données et des approches statistiques innovantes.

Notre approche n'a pas permis de mettre en évidence de corrélations entre la glycolyse et l'avidité tumorale en FDG. Ceci pourrait être dû à la dégradation précoce de ces métabolites fragiles dans le tissu tumoral.

Cependant, il existe des corrélations entre d'autres métabolites et l'avidité tumorale en FDG dans le cadre du cancer du sein. La valeur pronostique de certains de ces métabolites a déjà été rapportée dans la littérature. Certains métabolites corrélés à l'avidité tumorale en FDG sont pour l'instant inconnus ou peu étudiés. L'étude de ces métabolites pourrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques dans le cadre du cancer du sein.

Par ailleurs, l'utilisation de la mesure in vivo de l'avidité tumorale en FDG, comme outil de classification des échantillons dans le cadre des études de métabolomique visant à rechercher des biomarqueurs, offre une alternative à la comparaison « tissus sains », « tissus malades » permettant d'éviter des prélèvements invasifs chez des patients indemnes. Cette approche pourrait être employée pour d'autres types de cancer.

## **BIBLIOGRAPHIE :**

1. De Nicola GM, Cantley LC. Cancer's Fuel Choice: New Flavors for a Picky Eater. *Mol. Cell* 2015;60:514–23.
2. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 1927;8:519–30.
3. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009;324:1029–33.
4. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* 2016;41:211–8.
5. Brown RS, Leung JY, Fisher SJ, et al. Intratumoral distribution of tritiated-FDG in breast carcinoma: correlation between Glut-1 expression and FDG uptake. *J. Nucl. Med.* 1996;37:1042–7.
6. Groheux D, Hindié E, Salaün PY. Cancers du sein. *Médecine Nucléaire* 2019;43:85–103.
7. Gallagher BM, Fowler JS, Gutterson NI, et al. Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [<sup>18</sup>F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Nucl. Med.* 1978;19:1154–61.
8. Diao W, Tian F, Jia Z. The prognostic value of SUVmax measuring on primary lesion

and ALN by 18F-FDG PET or PET/CT in patients with breast cancer. *Eur J Radiol* 2018;105:1–7.

9. García Vicente AM, Soriano Castrejón Á, León Martín A, et al. Molecular subtypes of breast cancer: metabolic correlation with 18F-FDG PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40:1304–11.
10. Courant F, Antignac J-P, Dervilly-Pinel G, et al. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics* 2014;14:2369–88.
11. McCartney A, Vignoli A, Biganzoli L, et al. Metabolomics in breast cancer: A decade in review. *Cancer Treat. Rev.* 2018;67:88–96.
12. Berg RA van den, Hoefsloot HC, Westerhuis JA, et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 2006;7:142.
13. Gamcsik MP, Kasibhatla MS, Teeter SD, et al. Glutathione Levels in Human Tumors. *Biomarkers* 2012;17:671–91.
14. Perquin M, Oster T, Maul A, et al. The glutathione-related detoxification system is increased in human breast cancer in correlation with clinical and histopathological features. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001;127:368–74.
15. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, et al. Reactive oxygen species and cancer

paradox: To promote or to suppress? Free Radical Biology and Medicine 2017;104:144–64.

16. Casero RA, Stewart TM, Pegg AE. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. Nat Rev Cancer 2018;18:681–95.
17. Wallace HM, Duthie J, Evans DM, et al. Alterations in Polyamine Catabolic Enzymes in Human Breast Cancer Tissue. Clin Cancer Res 2000;6:3657–61.
18. Wang C, Ruan P, Zhao Y, et al. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase regulates cell growth and metastasis via AKT/ $\beta$ -catenin signaling pathways in hepatocellular and colorectal carcinoma cells. Oncotarget 2016;8:1092–1109.
19. Craze ML, Cheung H, Jewa N, et al. MYC regulation of glutamine–proline regulatory axis is key in luminal B breast cancer. Br J Cancer 2018;118:258–65.
20. Melone MAB, Valentino A, Margarucci S, et al. The carnitine system and cancer metabolic plasticity. Cell Death & Disease 2018;9:228.
21. Heng B, Lim CK, Lovejoy DB, et al. Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. Oncotarget 2015;7:6506–20.
22. Morley KL, Ferguson PJ, Koropatnick J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. Cancer Lett. 2007;251:168–78.

## Figure 1

Exemple de mesure de la SUV. Tumeurs des quadrants externes du sein gauche. Les contours de la région d'intérêt sont délimités en bleu. A) : Image de tomographie par émission de positons - B) : Image fusionnée de la tomographie par émission de positons et de la Tomodensitométrie - C) : Image de tomodensitométrie.

*An example of  $SUV_{max}$  measurement. This example concerns a tumor of the upper quadrants of the left breast. The region of interest is delineated in blue. A) : Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography image, B) : Hybrid PET-CT image, C) : Computed Tomography image.*

## Figure 2

Résultats des analyses en composantes principales. Projection des échantillons selon les axes des 2 premières composantes principales. Les zones rouges et vertes représentent les intervalles de confiance à 95% des groupes « peu avides en FDG » et « très avides en FDG » respectivement. A) : Données centrées, B) : Données centrées et réduites avec la méthode Autoscaling. Avec cette analyse, les patients sont regroupés sans prendre en compte le groupe d'avidité en FDG. Seules les données de métabolomique sont prises en compte. Nous pouvons voir que les patientes ne sont pas spontanément regroupées en groupes d'avidité en FDG différente. Il semble exister deux groupes, indépendants de l'avidité en FDG. Ceci peut être expliqué par une variabilité lot à lot (avec 2 lots de patientes). Les deux types de réductions sont à l'origine de résultats similaires.

*Principal Component Analysis results. Projection of the samples on the first 2 principal components. The red and green regions represent the 95% confidence intervals for the « low FDG uptake » and « high FDG uptake » groups of patients. A) : Mean centered and Autoscaled data, B) : Mean centered and Pareto-scaled data. In this analysis samples are grouped into clusters without taking into account the FDG uptake. We can see that patients are not*

*spontaneously clustered into groups with different FDG uptakes. Patients seem to be separated into two groups, independently of FDG uptake, which can be due to a batch effect in this case. The two different scaling techniques produce the same results.*

### **Figure 3**

Performances des analyses discriminantes des moindres carrés (PLSDA). Représentation des performances des modèles issus des analyses PLSDA pour différencier les groupes « peu avides en FDG » et « très avides en FDG » en fonction du nombre de composants utilisés. Les barres bleues, roses et bleues claires représentent la précision, le R<sup>2</sup> et le Q<sup>2</sup> respectivement. Les étoiles rouges indiquent le Q<sup>2</sup> le plus élevée. A) : Données centrées, B) : Données centrées et réduites avec la méthode Autoscaling. Avec cette analyse le but est de créer un modèle regroupant les patientes en groupes d'avidité en FDG à partir des données de métabolomique. Le R<sup>2</sup> est le coefficient de détermination du modèle. Il indique à quel point le modèle explique correctement la séparation des groupes. La précision correspond au pourcentage de patientes bien classées après validation croisée. Le Q<sup>2</sup> indique à quel point la classification est robuste. Il peut varier de -1 à 1. Dans notre cas le Q<sup>2</sup> est positif mais faible. Ceci peut être due au faible nombre de patientes incluses.

*Performance of Partial Least Square Discriminant Analysis (PLSDA) based models. Representation of Accuracy (dark blue), R<sup>2</sup> (pink) and Q<sup>2</sup> (light blue) depending of the number of components included in the model. Red stars indicate the highest Q<sup>2</sup>. A) : Mean centered and Autoscaled data, B) : Mean centered and Pareto-scaled data. In this analysis samples are grouped into clusters taking into account the FDG uptake. The R<sup>2</sup> represents the fit of the model. Here, the model is well fitted with the Autoscaled data while the fitting is weaker with the Pareto-scaled data. The Accuracy represents the percentage of samples that are correctly classified after cross validation. Here the accuracy varies between 0.75 and 0.8. The Q<sup>2</sup>*

*represents the confidence with which the samples are classified, it can vary from -1 to 1. Here the Q2 is positive but weak. This low value can be due to the relatively low number of samples and the fact that the FDG uptake is reduced to two groups.*

#### **Figure 4**

Projection des échantillons selon les axes des deux principales composantes. Les points rouges correspondent aux tumeurs du groupe « peu avides en FDG », les points verts correspondent aux tumeurs du groupe « très avides en FDG ». A) : Données centrées et réduites avec la méthode Autoscaling, B) : Données centrées et réduites avec la méthode Pareto. La qualité de la séparation des groupes est liée au R2. Dans notre cas il existe une séparation imparfaite des groupes. Celle-ci est meilleur avec les données réduites par Autoscaling qu'avec la méthode de Pareto.

*PLSDA projections. Projection of the samples on the first 2 principal components. A) : Mean centered and Autoscaled data, B) : Mean centered and Pareto-scaled data. The separation of the data is linked to the model. If the model is well fitted, the data will be well separated. We can see that an imperfect separation is made between the two groups. The separation is better with the autoscaled data compared to the Pareto scaled data.*

#### **Figure 5**

20 Métabolites ayant les plus grands poids dans les modèles issus des analyses PLSDA. A) : Données centrées et réduites avec la méthode Autoscaling et B) : Données centrées et réduites avec la méthode Pareto. La réduction par Autoscaling permet aux métabolites de faibles intensités d'avoir un poids équivalent aux métabolites de fortes intensités. Ici par exemple, la N1,N12-diacetyl-spermine, un métabolite de faible intensité, a un poids élevé. La méthode de Pareto ne réduit que partiellement la différence entre les métabolites de faibles et de fortes

intensités. Ainsi les métabolites de fortes intensités auront tendance à avoir un poids plus élevé. Dans notre cas, avec la méthode de Pareto, bien que la N1,N12-diacetyl-spermine garde un poids élevé, la Proline, un métabolite de forte intensité, a le poids le plus élevé.

*20 most important metabolites for each PLSDA based models. Values represent the weights of each metabolite in the first component of each model. A) : Mean centered and Autoscaled data, B) : Mean centered and Pareto-scaled data. Autoscaling enables features of small intensities to have equivalent weights compared to features of high intensities. Here for example a feature of low intensity, N1,N12-diacetyl-spermine has the highest weight. Pareto-scaling partially reduces the difference between high intensity features and small intensity features, therefore high intensity features still tend to have higher weights than low intensity features. Here for example, while N1,N12-diacetyl-spermine still has a high weight, Proline, a high intensity feature has the highest weight.*

## **Figure 6**

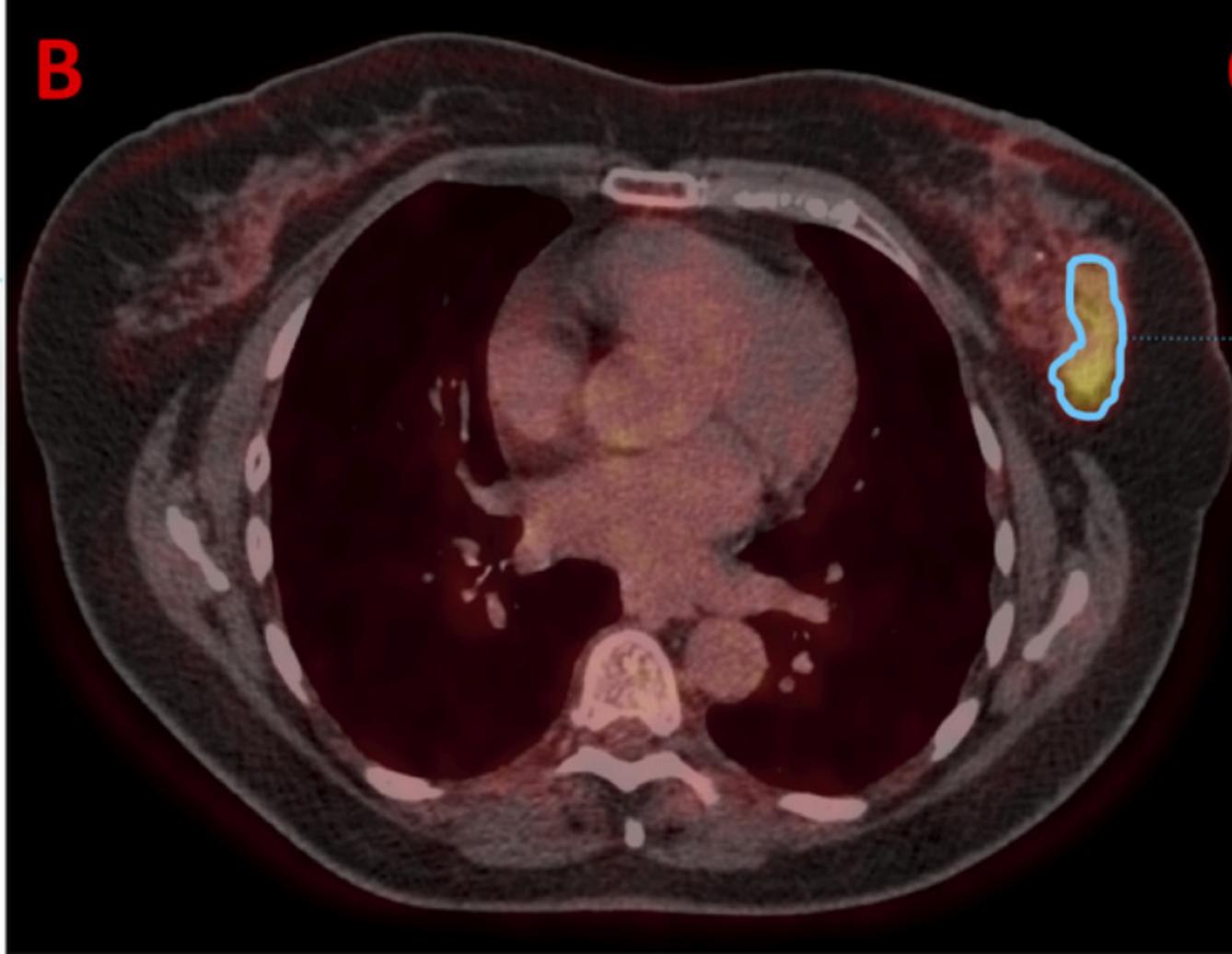
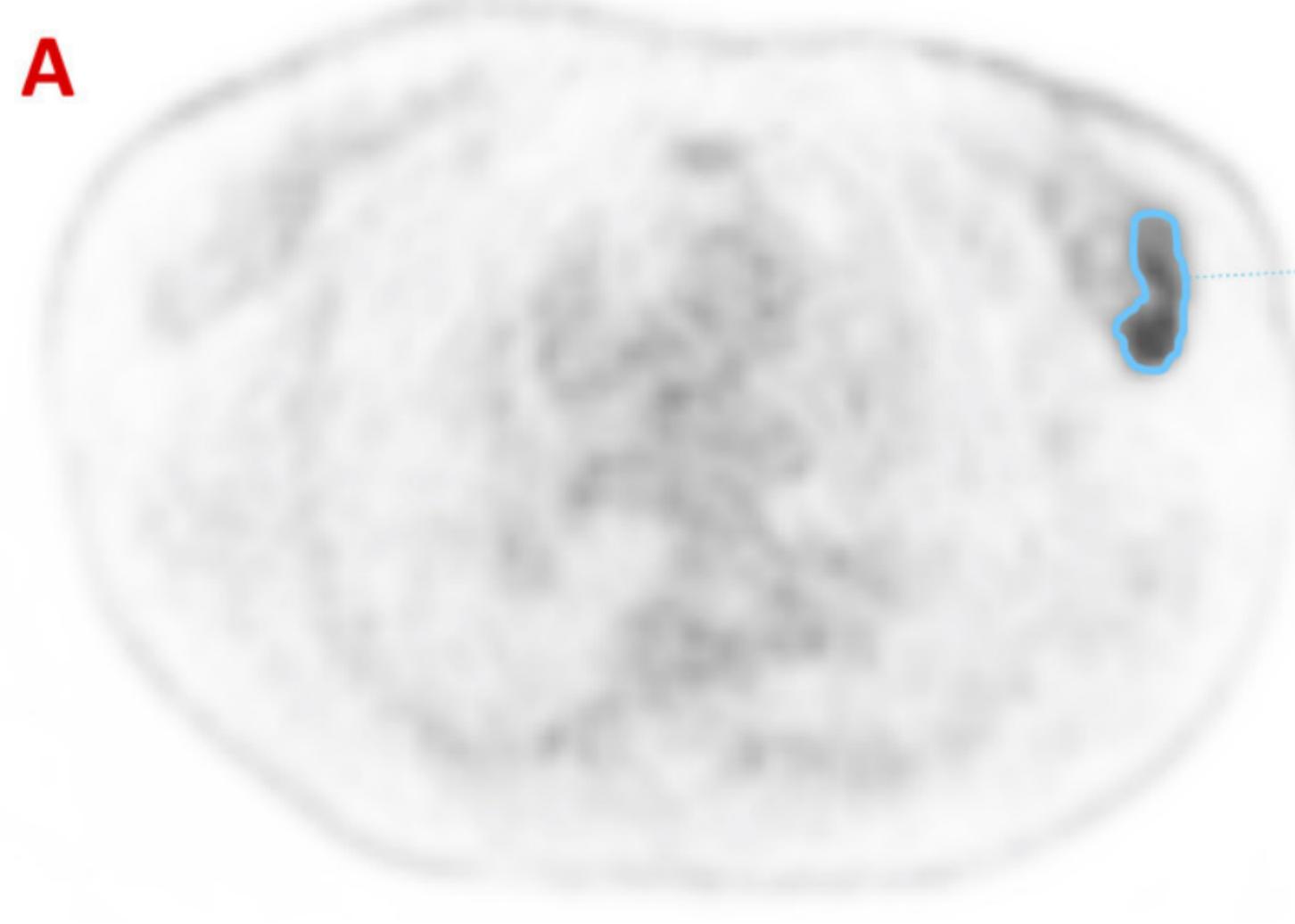
Schémas simplifié des différentes voies métaboliques mentionnées. Les valeurs des métabolites d'intérêt sont représentées sous formes de boîtes à moustaches. Les boites bleus correspondent au groupe des tumeurs à faible avidité en FDG et les boites oranges correspondent au groupe des tumeurs à forte avidité en FDG. Les métabolites sont représentés au sein des voies métaboliques ayant des altérations en lien avec l'avidité en FDG.

*A simplified view of the discussed metabolic pathways. Metabolites of interest are represented using box-plots. Blue boxes represent low FDG uptake tumors and orange boxes represent high FDG uptake tumors. Metabolites are represented within the energetic pathways considered to be altered depending on FDG uptake.*

## **Table 1**

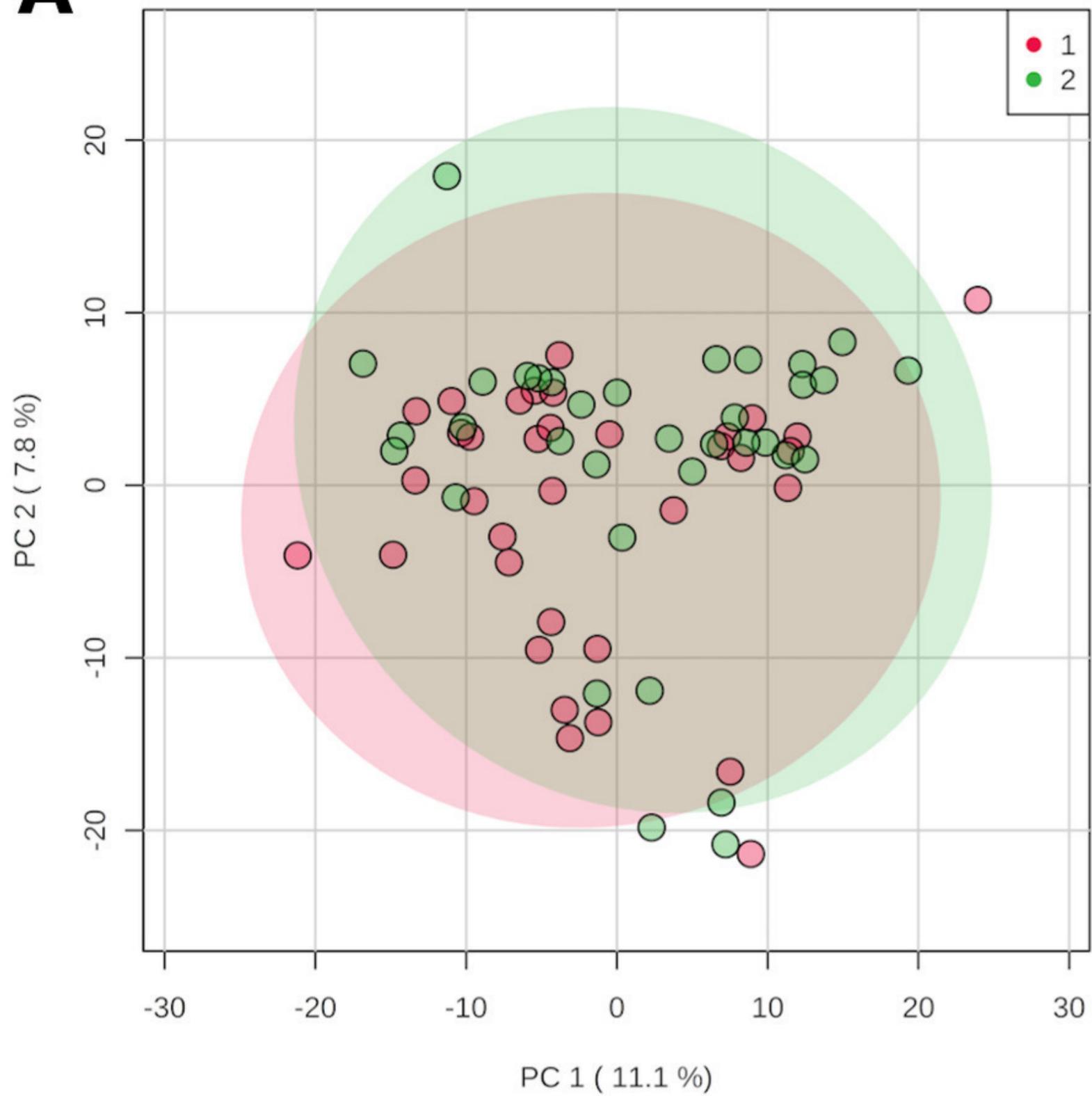
Principales caractéristiques des patientes incluses. L'âge, le poids, la taille et l'indice de masse corporelle sont exprimé sous forme de moyenne et des extrêmes.

*Patient characteristics. Values are given as mean and ranges or absolute values.*

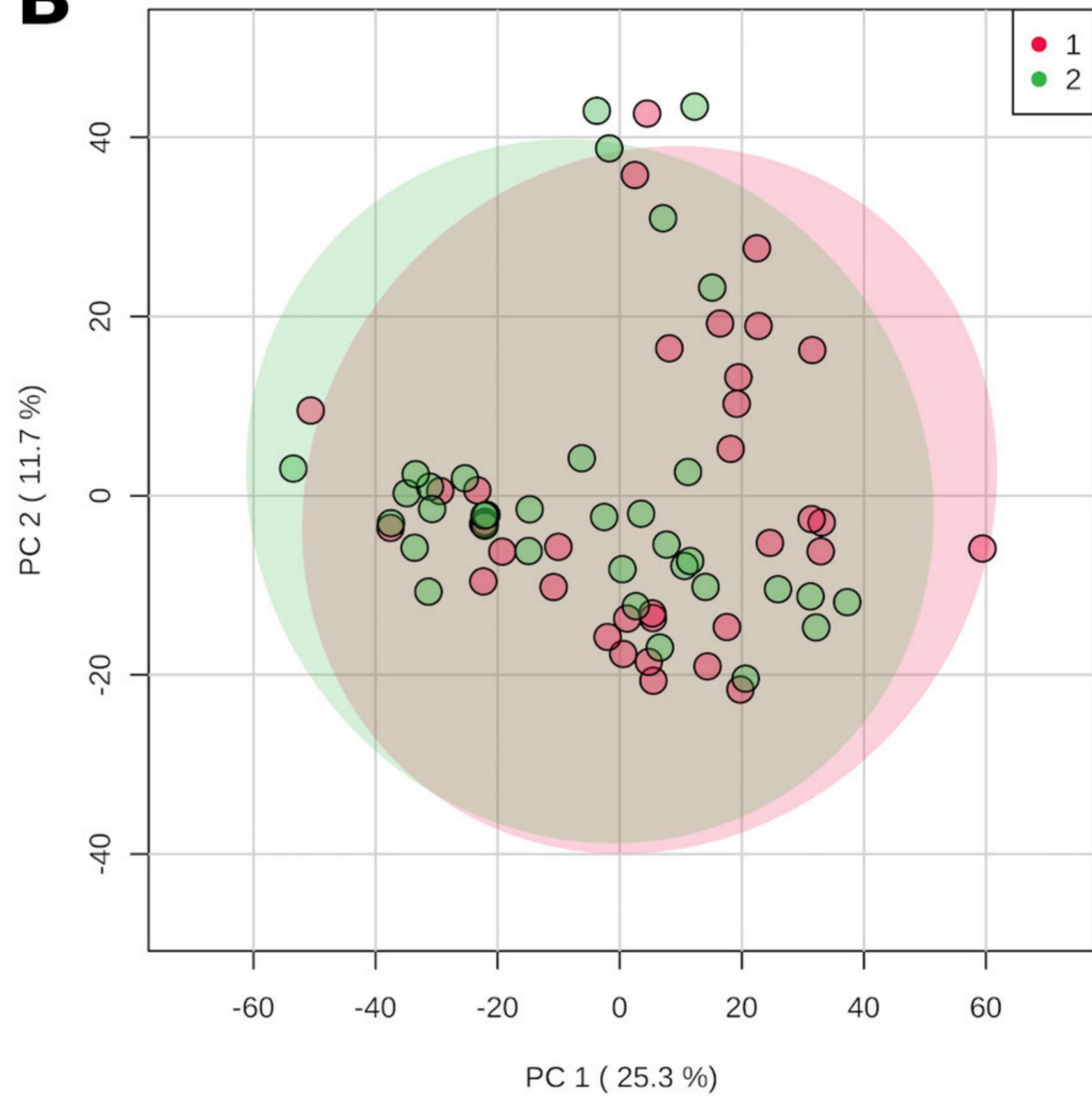


**A**

Scores Plot

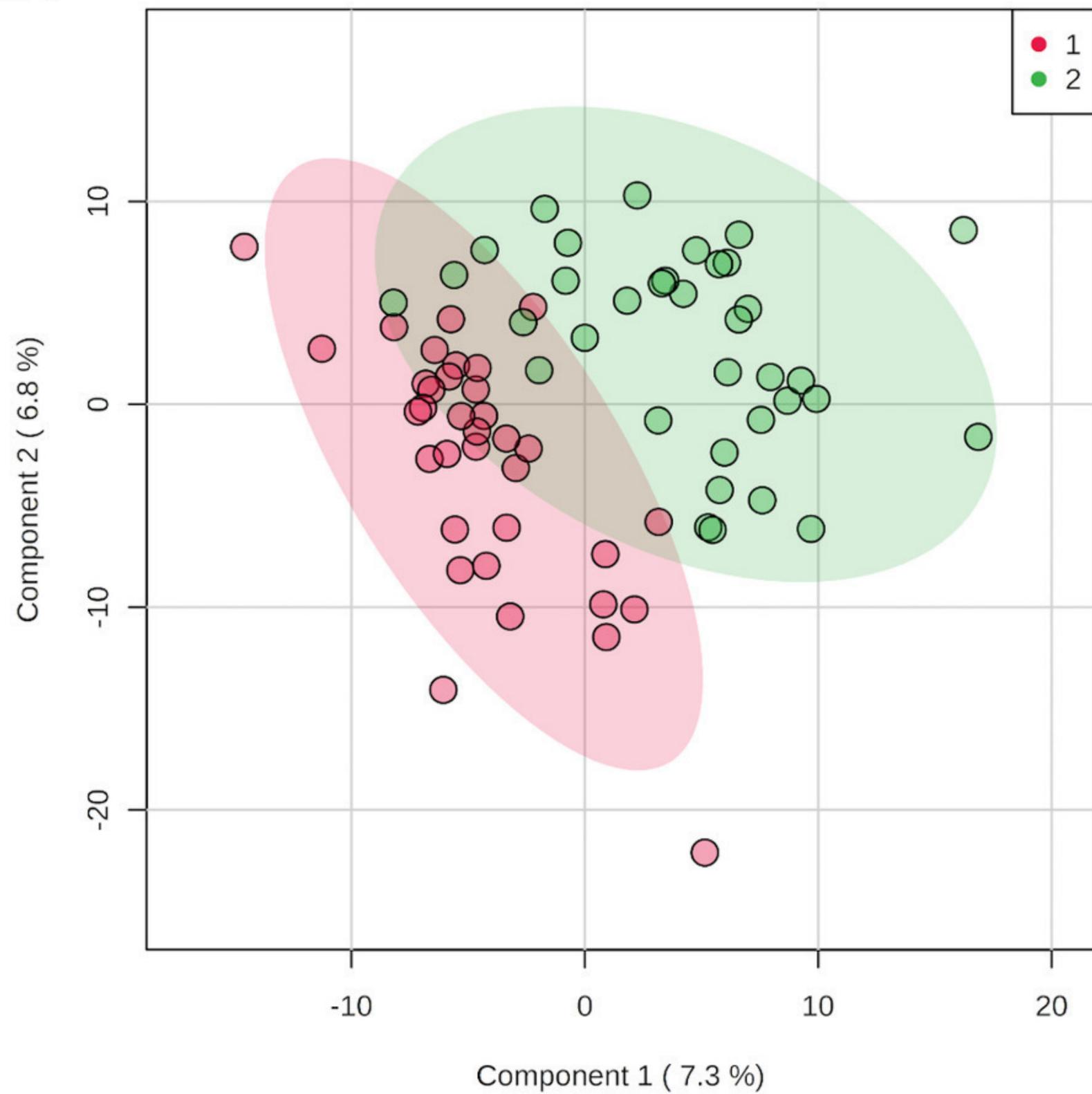
**B**

Scores Plot

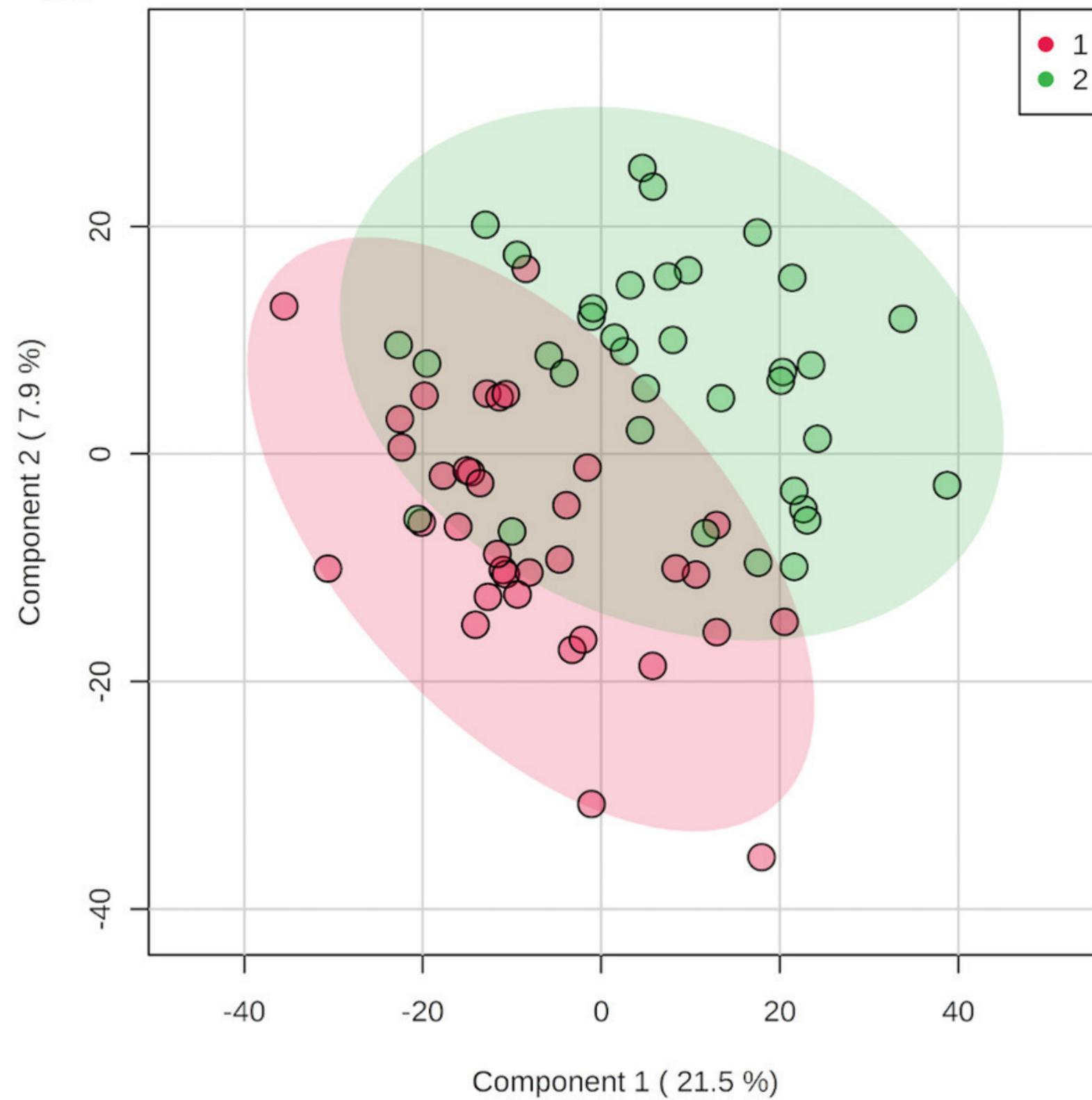


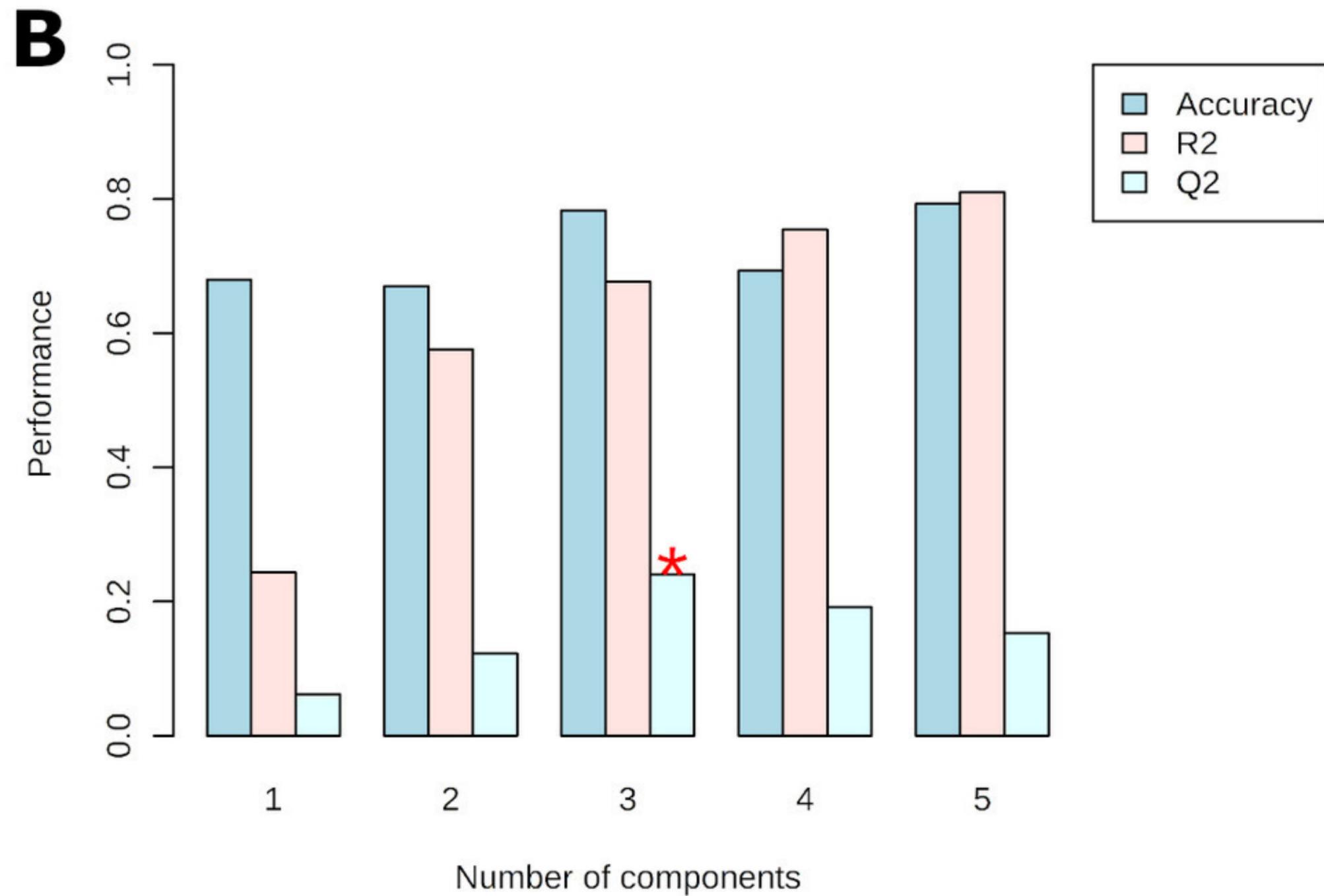
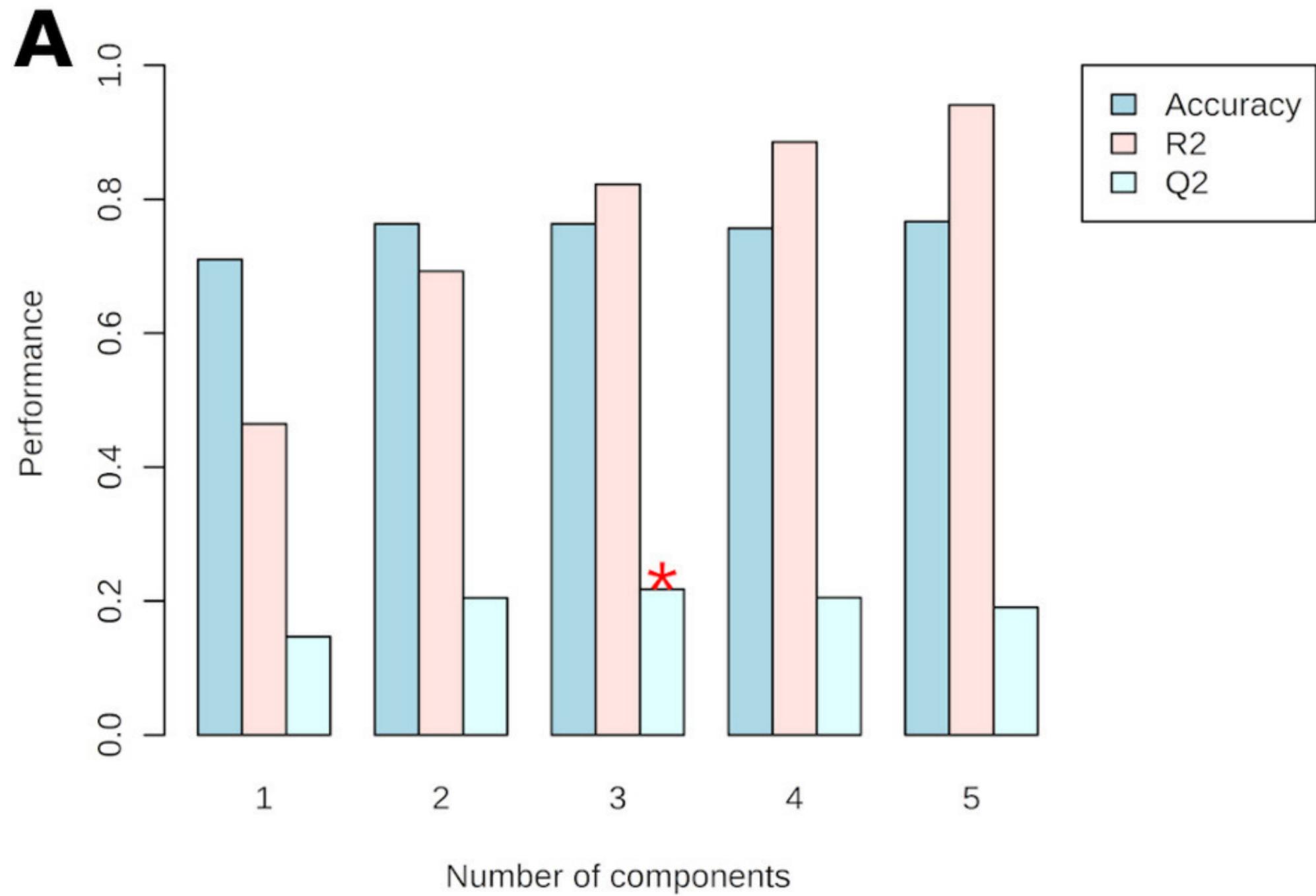
**A**

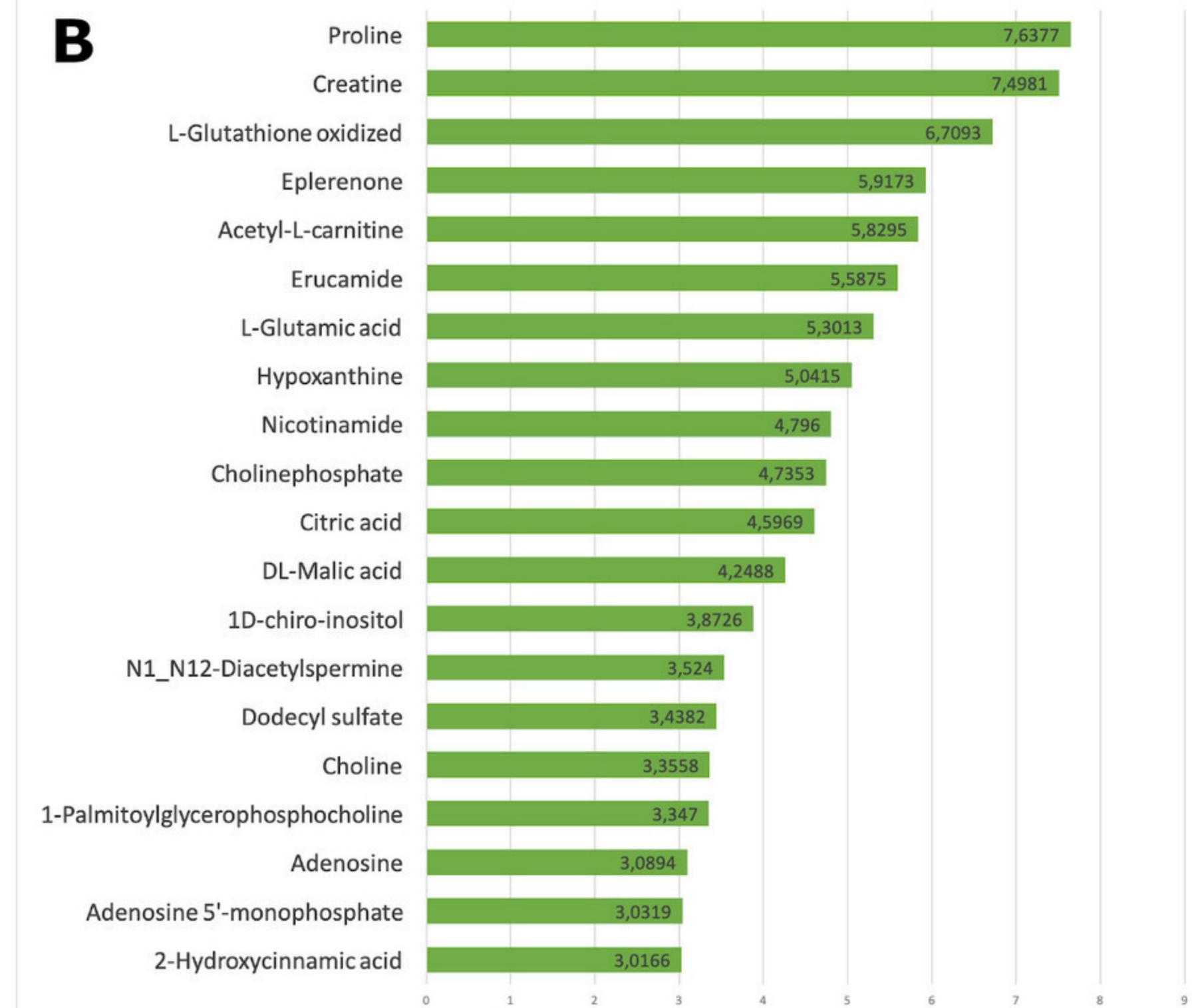
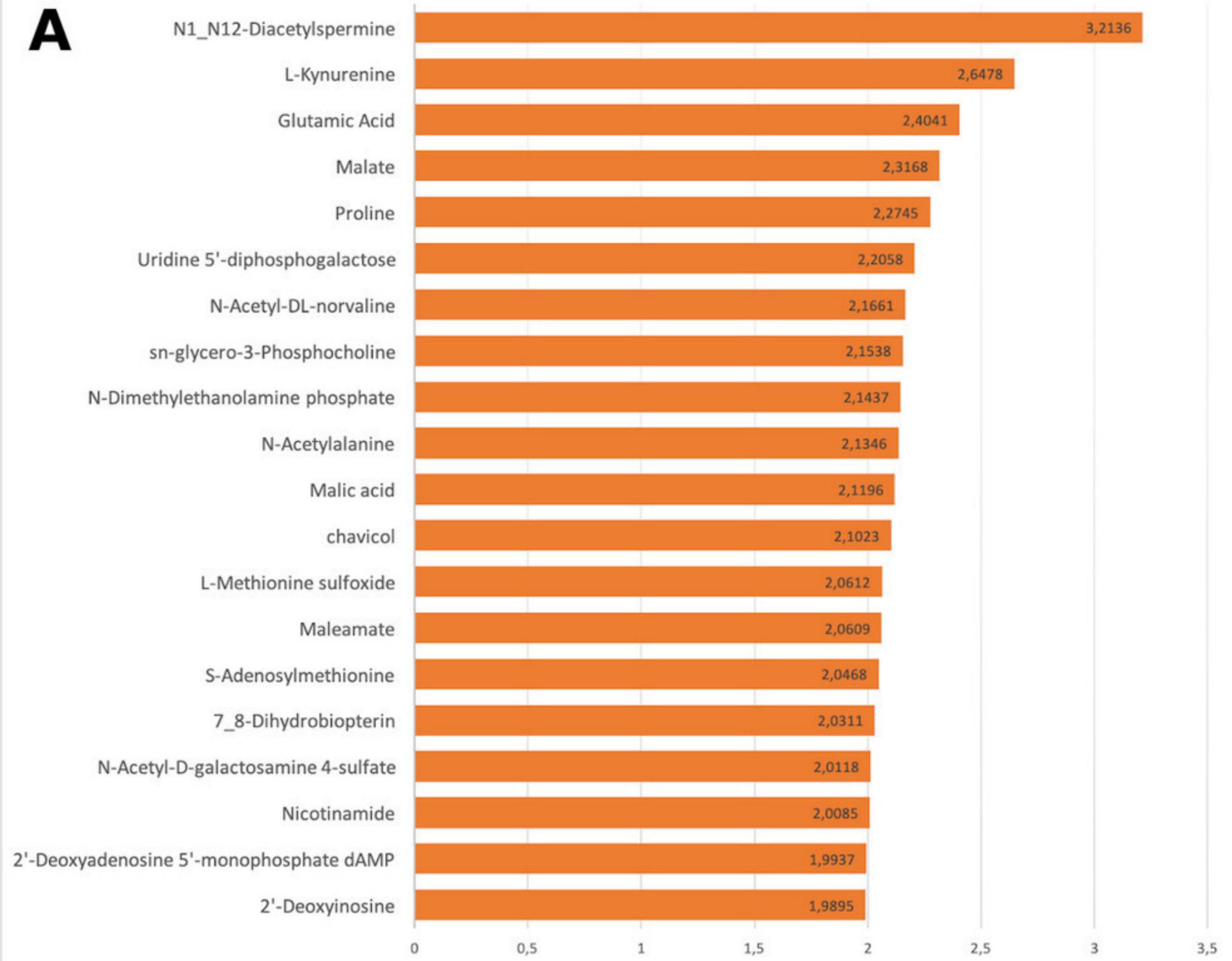
Scores Plot

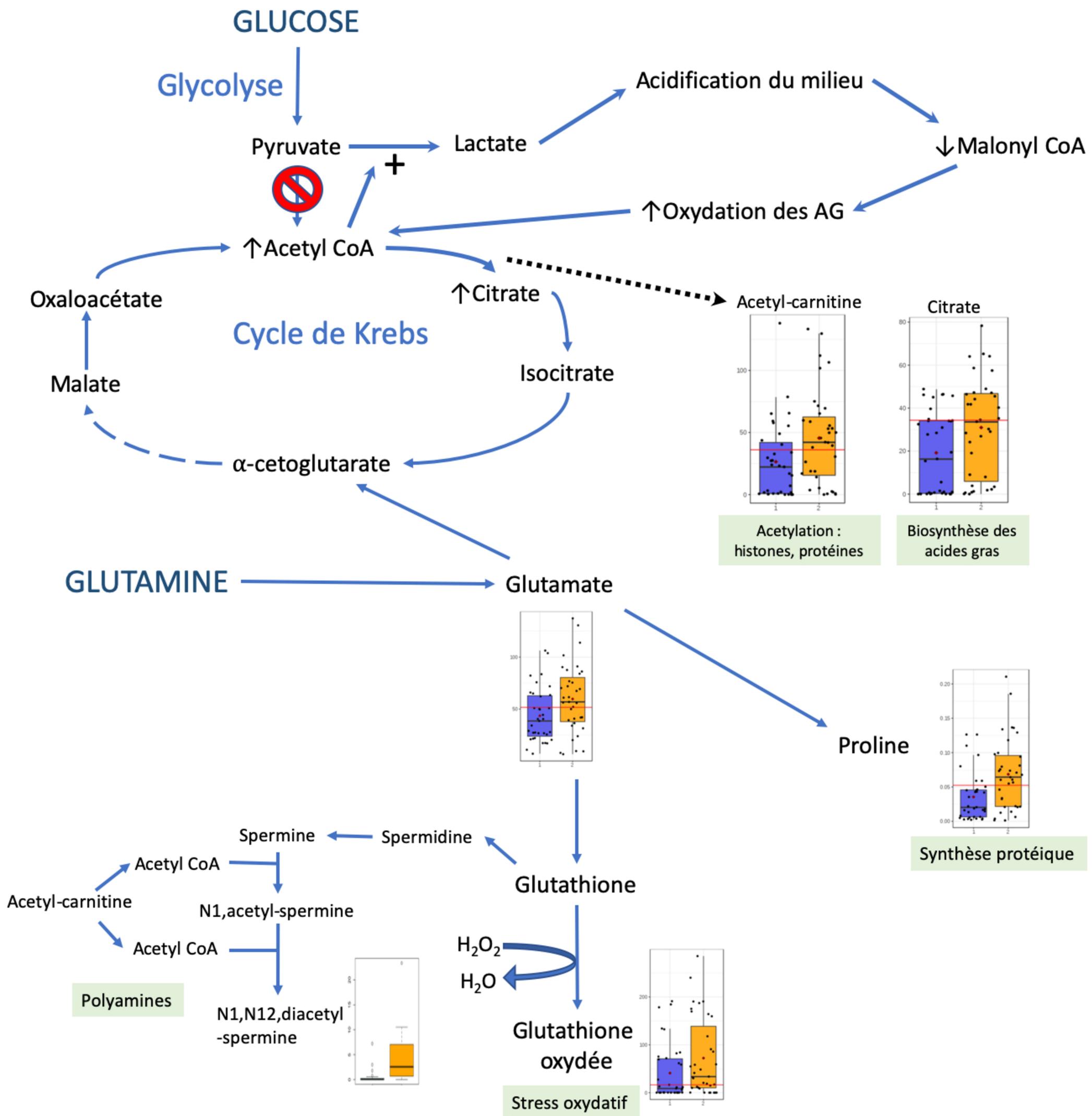
**B**

Scores Plot









**Tableau 1**

Caractéristique	
Age	48 (26-73)
Poids	65,6 (53-91)
Taille	161 (152-170)
Indice de Masse Corporelle	24,8 (18,8-41,4)
Au moins un antécédent de grossesse	59/70
Ménopause	30/70
Stade	I : 1 II : 65 III : 4
Stade T (taille tumorale)	1 (<2cm) : 3 2 (2-5 cm) : 60 3 (>5cm) : 7
Stade N (atteinte ganglionnaire)	0 : 21 1 : 48 2 : 1
Grade SBR	1 : 6 2 : 32 (Inconnu : 3) 3 : 29
Détail SBR : Mitoses	1 : 26 2 : 22 (Inconnu : 5) 3 : 17
Détail SBR : Architecture	1 : 0 2 : 16 (Inconnu : 5) 3 : 49
Détail SBR : Atypies	1 : 3 2 : 24 (Inconnu : 5) 3 : 38
Phénotype	Luminal : 32 HER2 + : 19 Triple Négatif : 19