

**METABOLOMIQUE PAR
SPECTROSCOPIE RMN
HRMAS APPLIQUEE EN
CANCEROLOGIE**

PLAN

INTRODUCTION

1. SPECTROSCOPIE RMN HRMAS

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL EN METABOLOMIQUE

3. EXEMPLES D'APPLICATIONS

→ Adénocarcinomes coliques

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

PLAN

INTRODUCTION

1. SPECTROSCOPIE RMN HRMAS

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL EN METABOLOMIQUE

3. EXEMPLES D'APPLICATIONS

→ Adénocarcinomes coliques

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

INTRODUCTION

- Cancer : première cause de décès en France

Développement de la **Recherche oncologique** (diagnostic, thérapeutique)

- Données IGR 2005 concernant l'incidence :

Premier rang chez la femme : **cancer du sein**

Premier rang chez l'homme : **cancer de la prostate**

- Données IGR 2006 concernant la mortalité (type de cancer) :

Premier rang chez la femme : **cancer du sein**

Premier rang chez l'homme : **cancer du poumon**

- Diagnostic du cancer :

Référence : examen anatomopathologique

Nouveaux outils diagnostiques : « Omiques » (Biologie intégrative) :

Génomique, Transcriptomique, Protéomique et **METABOLOMIQUE**

Données IGR 2005 concernant l'incidence des cancers

• Nouveaux cas de cancers chez l'homme

- Cancer de la Prostate : 62 000,
- Cancer du Poumon : 24 000,
- **Cancer du Colon-rectum : 20 000,**
- Cancer de la sphère ORL (Bouche, pharynx, larynx) :13 000,
- Cancer de la Vessie : 8 000,
- Lymphome non Hodgkin : 5 500,
- Cancer du Rein : 5 400,
- Cancer du Foie : 5 100,
- Cancer de l'Estomac : 4 400.

• Nouveaux cas de cancers chez la femme

- Cancer du Sein : 50 000,
- **Cancer du Colon-rectum : 17 500,**
- Cancer du Poumon : 6 700,
- Cancer Corps utérin : 5 800,
- Mélanome : 4 700,
- **Cancer de l'Ovaire : 4 700,**
- Cancer du Col de l'utérus : 4 100.

Données IGR 2006 concernant la mortalité par type de cancer

• Nombre de décès par cancer chez l'homme

- Cancer du Poumon : 22 000,
- Cancer de la Prostate : 8 900,
- **Cancer du Colon-rectum : 8 700,**
- Cancer du Foie : 5 500,
- Cancer de la sphère ORL (Bouche, pharynx, larynx) : 4 700,
- Cancer du Pancréas : 4 300,
- Cancer de la Vessie : 3 500,
- Cancer de l'Œsophage : 3 100,
- Cancer de l'Estomac : 3 000.

• Nombre de décès par cancer chez la femme

- Cancer du Sein : 11 500,
- **Cancer du Colon-rectum : 7 700,**
- Cancer du Poumon : 6 300,
- Cancer du Pancréas : 4 000,
- **Cancer de l'Ovaire : 3 400,**
- Leucémies : 2 400,
- Cancer du Foie : 1 900,
- Lymphome non Hodgkin : 1 900,
- Cancer de l'Estomac : 1 700.

METABOLOMIQUE

- Définition :

Analyse qualitative et quantitative du métabolome qui représente le résultat des réactions métaboliques se déroulant au sein d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe.

Sous-ensemble des « Omiques », résultat d'une cascade d'évènements post-génomiques.

But général : identification, mesure et interprétation de la concentration des métabolites responsables d'un comportement biologique.

Métabolites explorés (PM < 1 kDa) : résultante de l'effet des **gènes** et de l'**environnement**.

- Techniques analytiques :

- GC, LC ou GC-MS, LC-MS,
- Spectroscopie RMN en milieu liquide,
- **Spectroscopie RMN HRMAS.**

PLAN

INTRODUCTION

1. SPECTROSCOPIE RMN HRMAS

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL EN METABOLOMIQUE

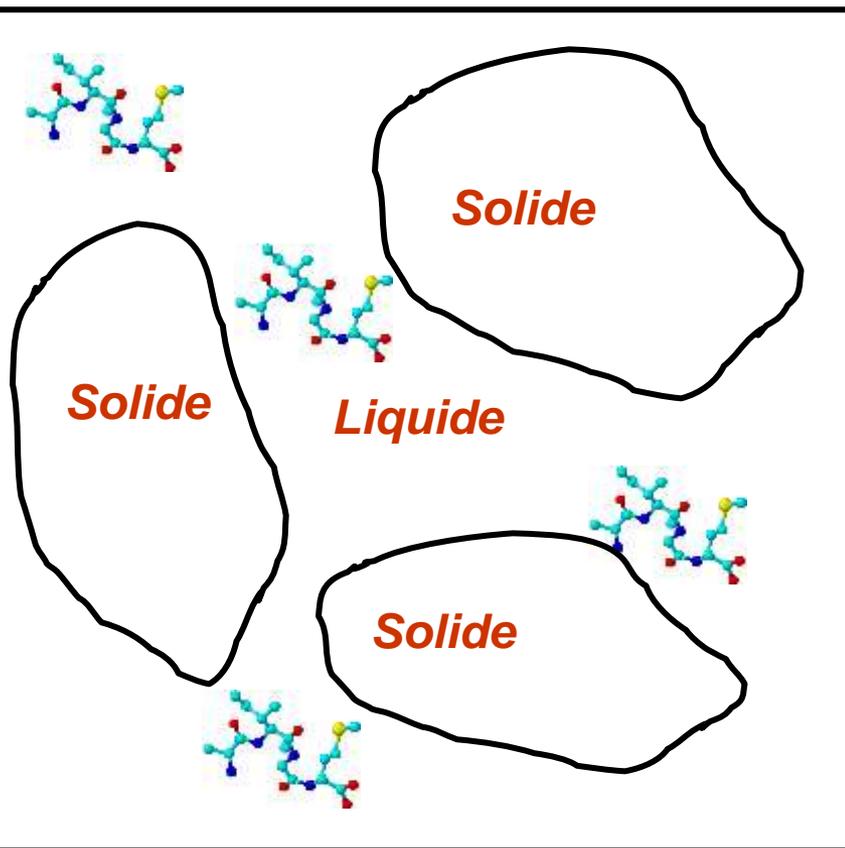
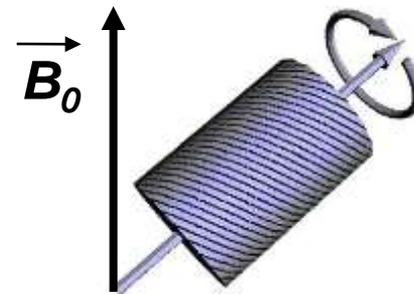
3. EXEMPLES D'APPLICATIONS

→ Adénocarcinomes coliques

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Définition de la Spectroscopie RMN HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning)

- Etude de composés mobiles (métabolites) au sein de milieux hétérogènes (tissus)
- Interaction principale : Distribution des susceptibilités magnétiques
- Interaction supprimée grâce à la rotation de l'échantillon à l'angle magique ($54,7^\circ$)



Lippens, G., Bourdonneau, M., Dhalluin, C., Warrass, R., Richert, T., Seetharaman, C., Boutillon, C. & Piotto, M. (1999), *Curr. Org. Chem.*, 3, 147.

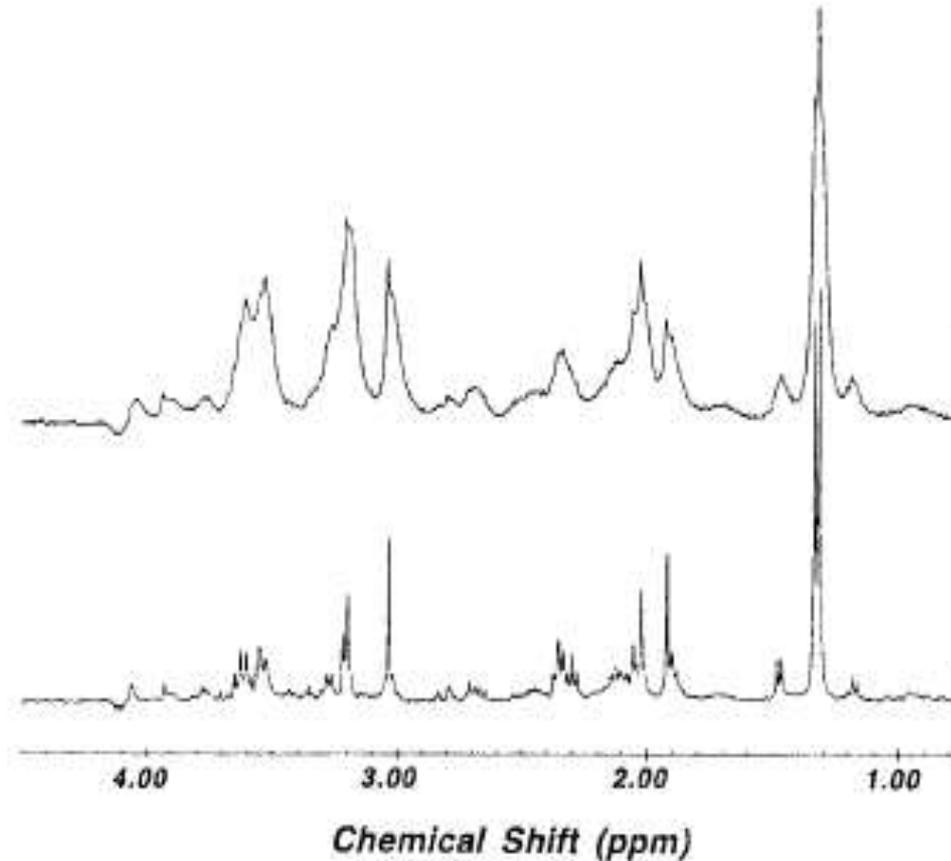
Effet de la rotation à l'angle magique

Spectre RMN ^1H de tissu cérébral de singe

Spectre en condition
statique



Spectre en condition
MAS



Avantages de la Spectroscopie RMN HRMAS

1. Conservation de l'intégrité du tissu biologique

Haute Résolution → Détection des métabolites **directement** au sein de tissus intacts, pas de processus d'extraction (RMN liquide) ni de transformation (MS).

2. Préparation facile et très rapide

3. Absence de dégradation du tissu pendant l'acquisition

4. Mesures réalisables sur de faibles quantités pondérales

5. Possibilité de quantification absolue des métabolites

6. Méthode accessible et peu coûteuse

PLAN

INTRODUCTION

1. SPECTROSCOPIE RMN HRMAS

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL EN METABOLOMIQUE

3. EXEMPLES D'APPLICATIONS

→ Adénocarcinomes coliques

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

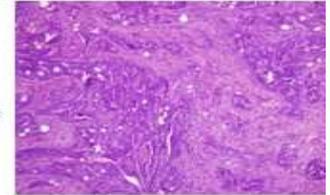
Collecte des échantillons



Surgical operation:
Snap-freezing of
sample in liquid N₂

Histopathology
department

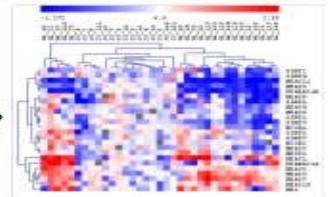
Histopathological
Analysis/Diagnosis



HRMAS samples
(+ Mirror piece)
Storage -80°C
(Tumor bank)



Biomolecular samples
Storage -80°C
(Tumor bank)



Rest of the sample:
Storage -80°C
(Tumor bank)



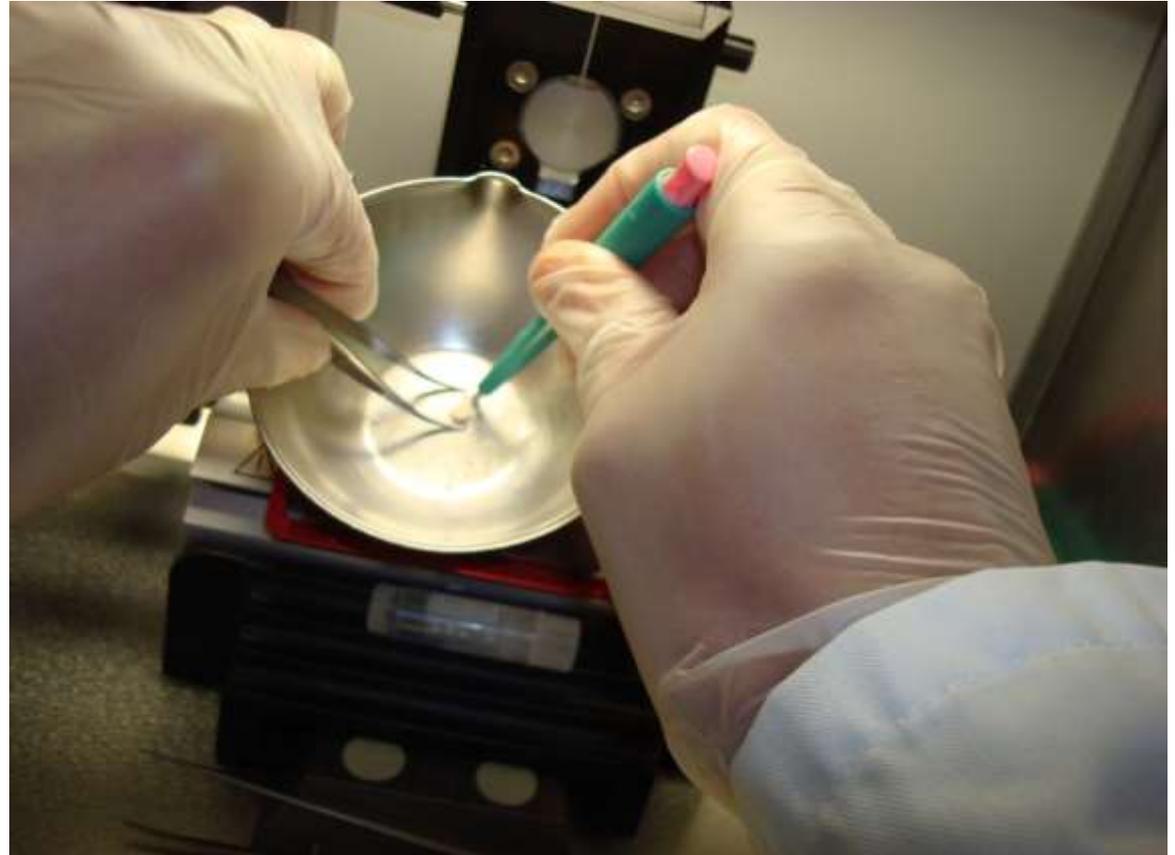
Préparation des échantillons (- 20°C)



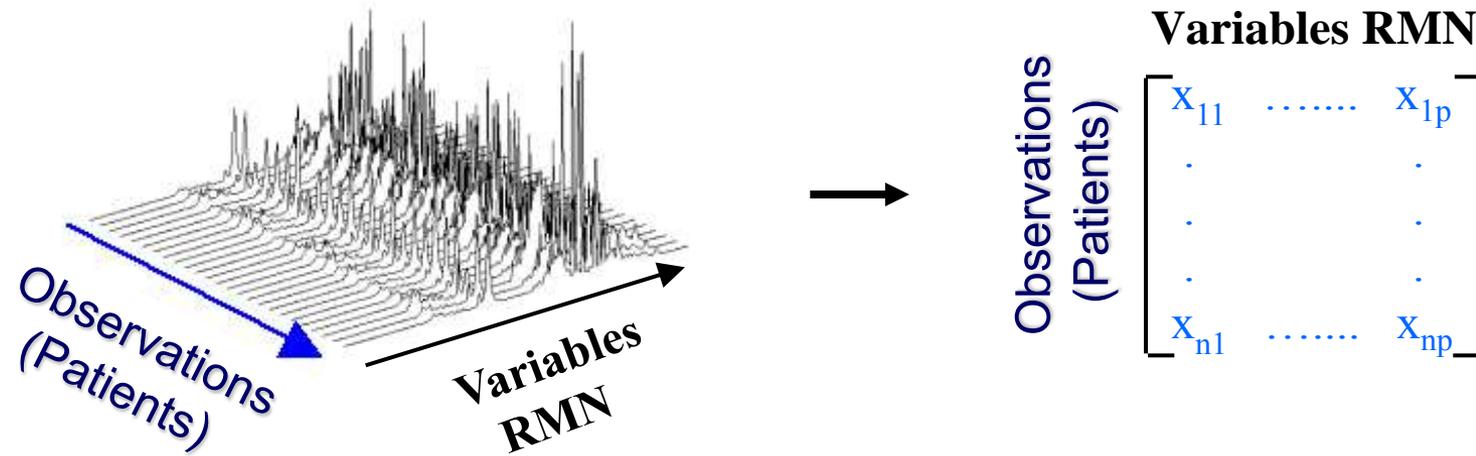
Objectif:
Réduire au maximum l'évolution des métabolites au sein de l'échantillon avant analyse spectroscopique.

Préparation des échantillons (2)

Utilisation d'un
emporte-pièce
(biopsy punch)



Analyse des données (1) : Numérisation des données



- Chaque échantillon : représenté par un ensemble de p variables $\{x_{ij}\}$ ($p=421$).
- Chaque échantillon peut donc être représenté par ses coordonnées $\{x_{ij}\}$ dans un espace contenant p dimensions.

Analyse des données (2) : Analyse statistique multivariée

- Méthodes “non supervisées” (ACP) :

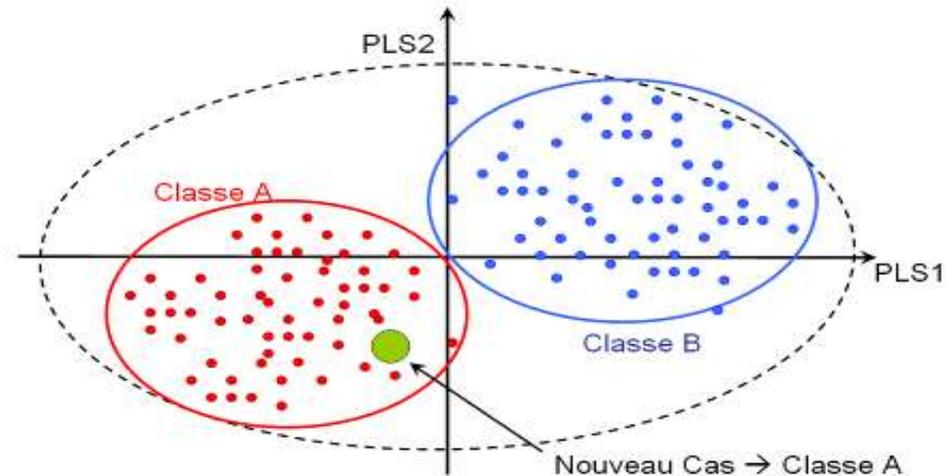
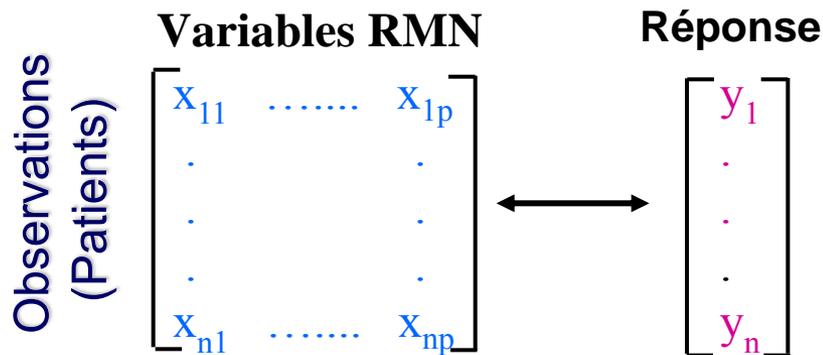
Pas d'a priori. Maximum de variance.

- Méthodes “supervisées” (régression PLS) :

Classification préalable des échantillons → modèle statistique.

- Critères de classification possibles dans le cas des biopsies :

- Diagnostic histopathologique,
- Devenir clinique des patients, ...



N.B. : Autres méthodes multivariées (HCA, KNN, PNN, etc...)

PLAN

INTRODUCTION

1. SPECTROSCOPIE RMN HRMAS

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL EN METABOLOMIQUE

3. EXEMPLES D'APPLICATIONS

→ **Adénocarcinomes coliques**

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Etude Métabolomique de biopsies coliques humaines : tissu sain versus cancer (Adénocarcinomes)

Metabolomics (2009) 5:292–301

DOI 10.1007/s11306-008-0151-1

ORIGINAL ARTICLE

Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning ^1H magnetic resonance spectroscopy

**M. Piotto · F.-M. Moussallieh · B. Dillmann ·
A. Imperiale · A. Neuville · C. Brigand · J.-P. Bellocq ·
K. Elbayed · I. J. Namer**

Received: 21 October 2008 / Accepted: 10 December 2008 / Published online: 24 December 2008

© Springer Science+Business Media, LLC 2008

INTRODUCTION

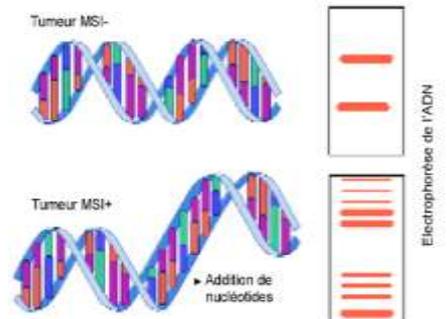
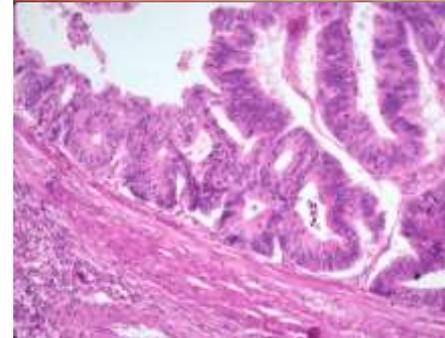
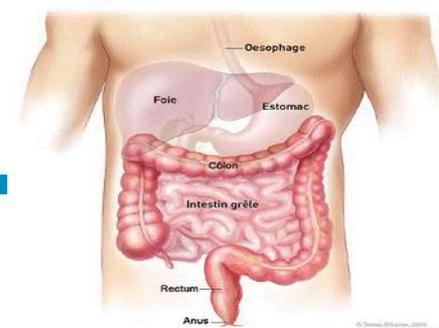
- Cancer colorectal (CCR) : l'une des formes de cancer les plus léthales dans les pays industrialisés.
- Forme de CCR la plus fréquente : l'**Adénocarcinome** (épithélium glandulaire de la muqueuse colorectale).

- **Critères pronostiques des patients :**

- Stade clinique,
- Type histologique, grade tumoral (TNM),
- Oncogènes (p53, KRAS), marqueurs moléculaires (MSI).

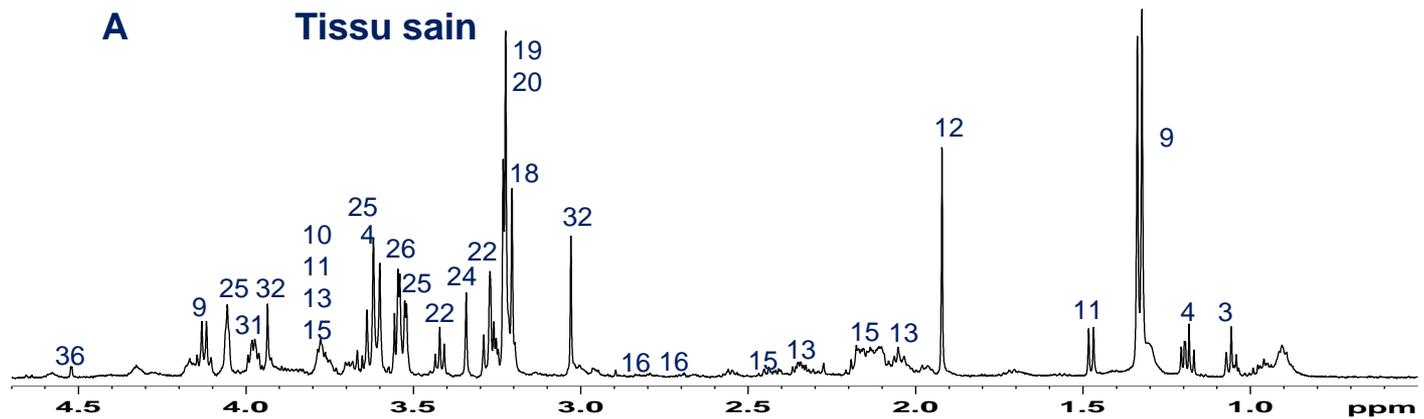
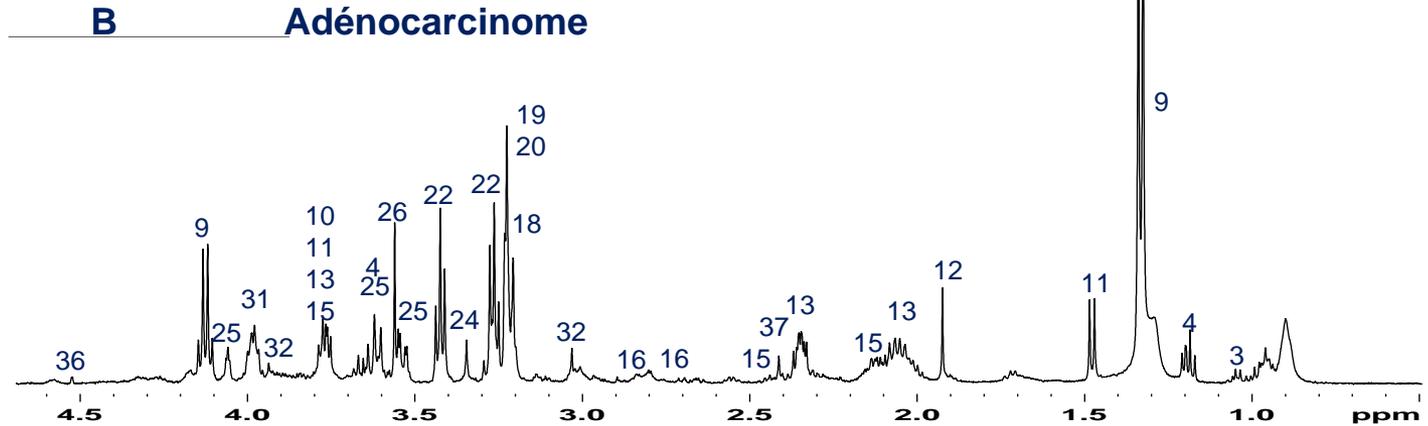
- **Question:**

Est-il possible de distinguer métaboliquement des biopsies tissulaires saines et adénocarcinomateuses?

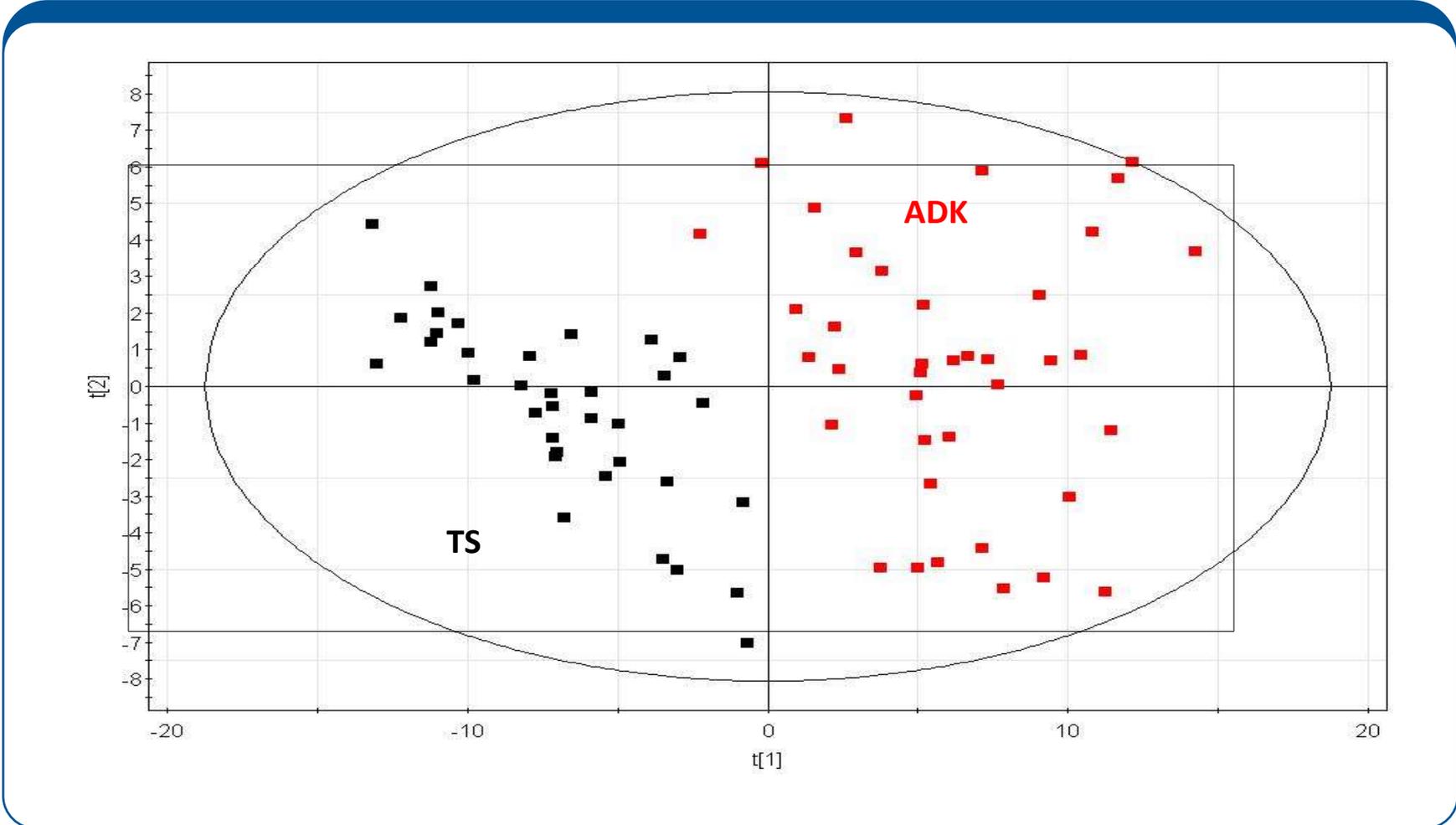


Etude Métabolomique de biopsies coliques humaines : tissu sain versus cancer (Adénocarcinome)

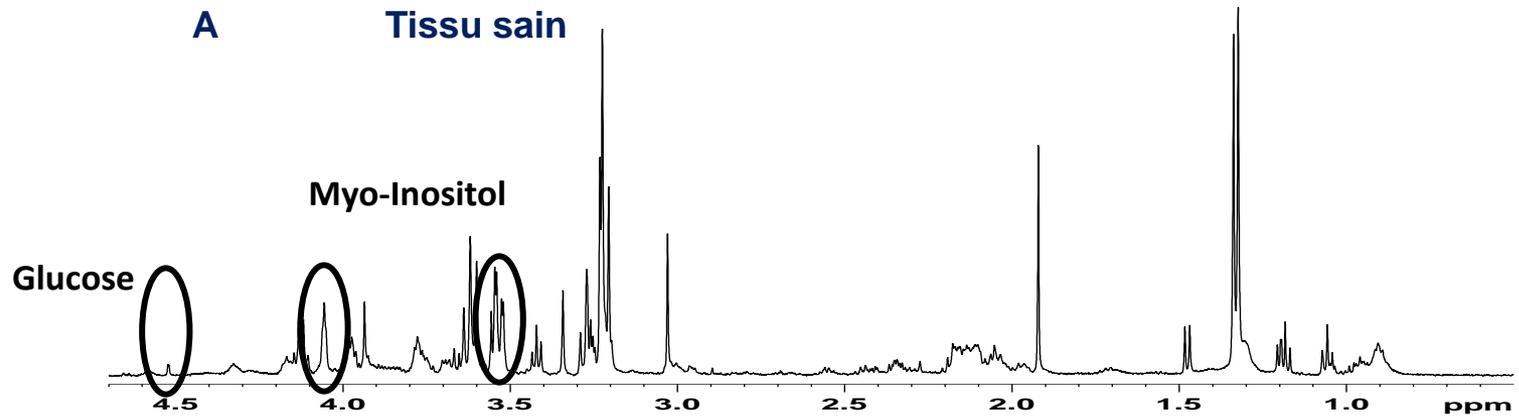
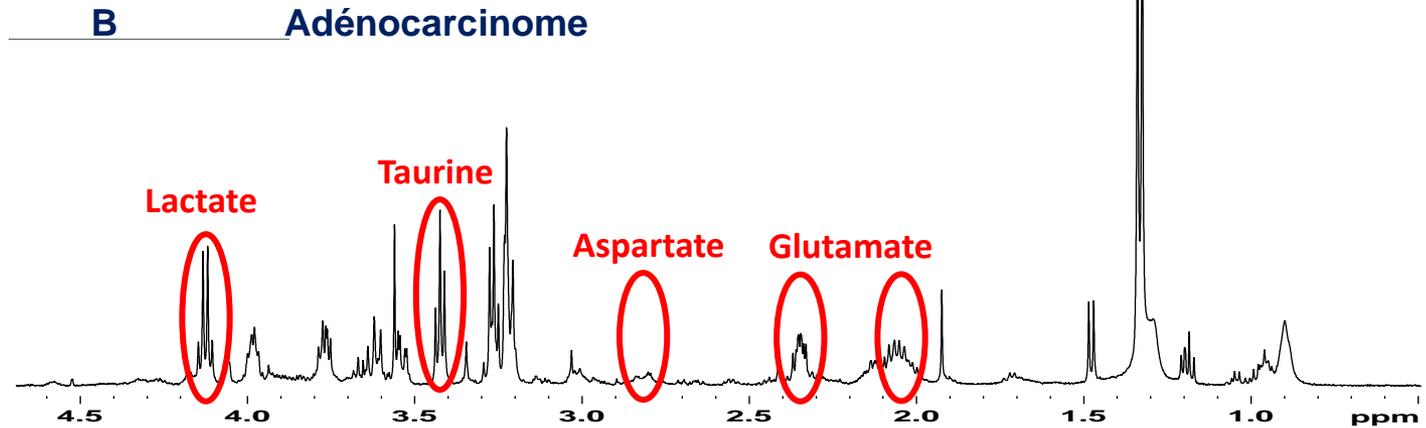
Spectres RMN ^1H représentatifs



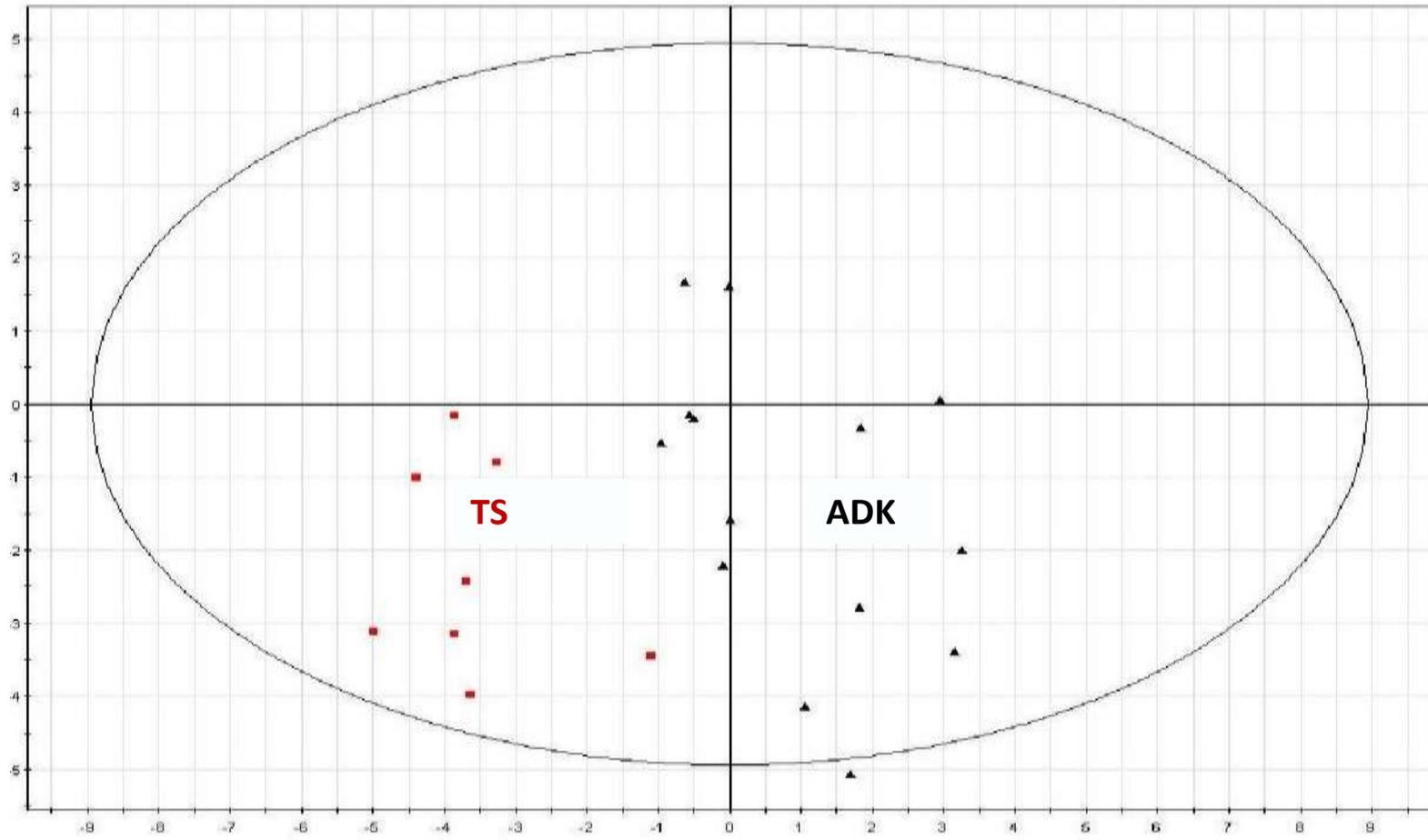
Analyse (PLS-DA) d'échantillons issus de biopsies coliques : Séparation entre groupe sain et tumoral selon le profil métabolique



Analyse (PLS-DA) d'échantillons issus de biopsies coliques : Principaux Métabolites discriminants



Validation du modèle précédent : classification en aveugle de nouveaux échantillons (N=22)



CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

- **Très bonne discrimination** possible entre **biopsies tumorales** et **biopsies saines** sur la base de leur **profil métabolique**.
- **Marqueurs métaboliques d'ADK** : **Taurine, Glutamate, Aspartate, (Lactate)**.
- **Myo-inositol** et **Glucose** = signature du **tissu colique sain**.
- **Modèle** statistique basé sur le **diagnostic anatomopathologique** (T Vs TS).
- **Autres modèles** basés sur différents critères :
 - **Anatomopathologiques** (TNM),
 - **Cliniques** : marqueurs d'évolution défavorable du patient (métastase précoce /rechute locale),
 - **Marqueurs moléculaires** (MSI + Vs MSI -), etc...
- **Validation** du modèle statistique : **EXAMEN EXTEMPORANE**.

Vers un “métabotypage” en temps réel de biopsies coliques

Piotto et al. *Journal of Medical Case Reports* 2012, **6**:22
<http://www.jmedicalcasereports.com/content/6/1/22>



CASE REPORT

Open Access

Towards real-time metabolic profiling of a biopsy specimen during a surgical operation by ^1H high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance: a case report

Martial Piotto¹, François-Marie Moussallieh^{2,3}, Agnès Neuville⁴, Jean-Pierre Bellocq⁴, Karim Elbayed² and Izzie Jacques Namer^{3,5*}

Vers un “métabotypage” en temps réel de biopsies coliques

- **Objectif :**

Simuler les possibilités d'analyse “extemporanée” de biopsies coliques au cours d'une opération chirurgicale.

- **Question :**

Est-il possible de fournir en temps réel une information fiable au chirurgien concernant la nature du tissu prélevé (T Vs TS)?

- **Protocole :**

Biopsies coliques (n=9) prélevées chez une patiente

Biopsies prélevées à différents endroits de la tumeur et au voisinage

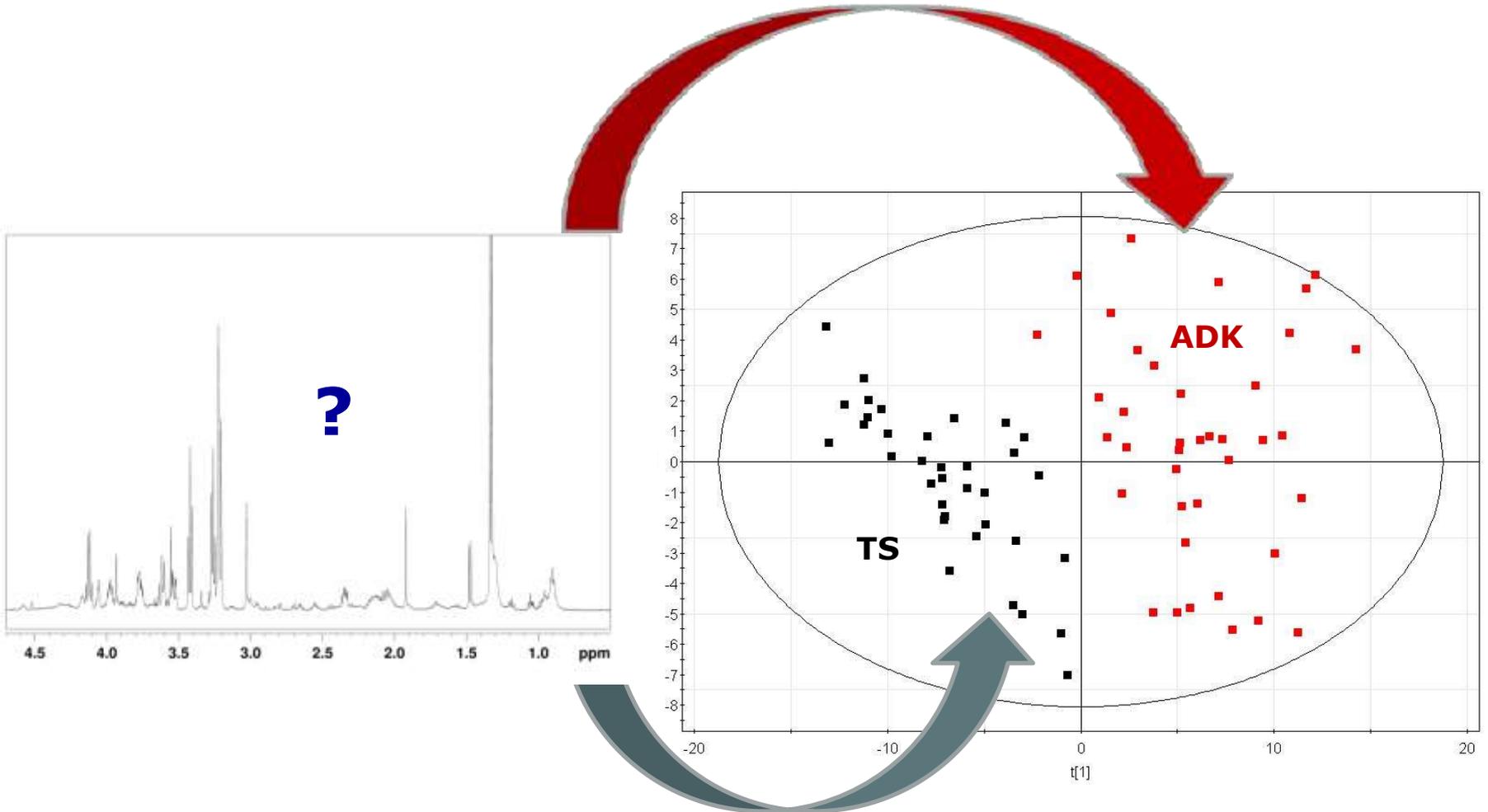
Analyse métabolique “en temps réel”

Analyse histopathologique en parallèle (pièces miroirs)

Protocole d'étude

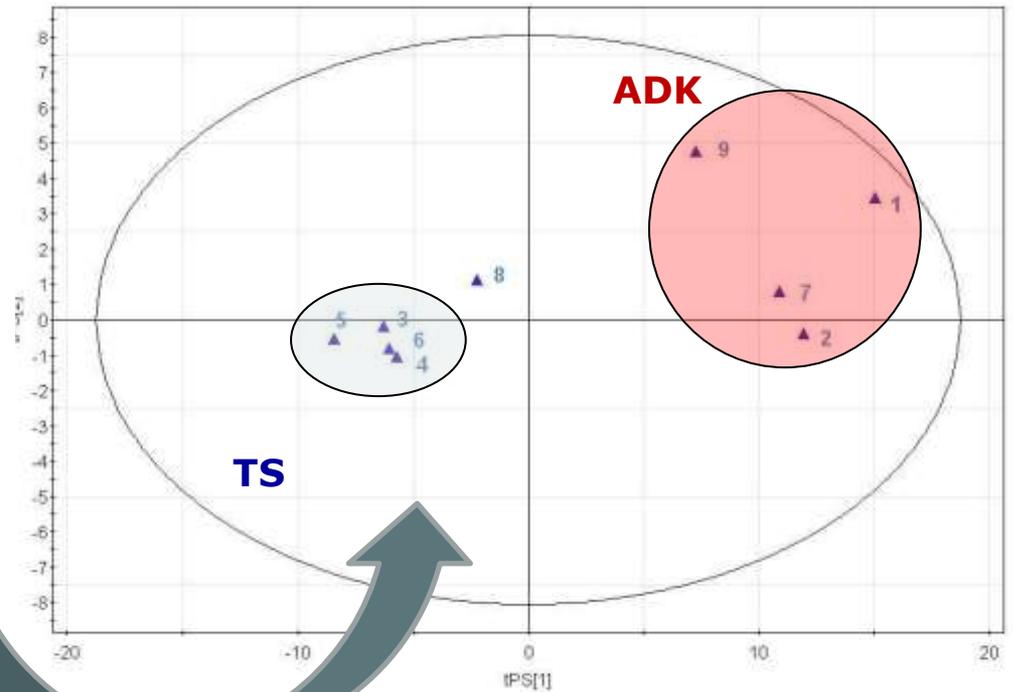
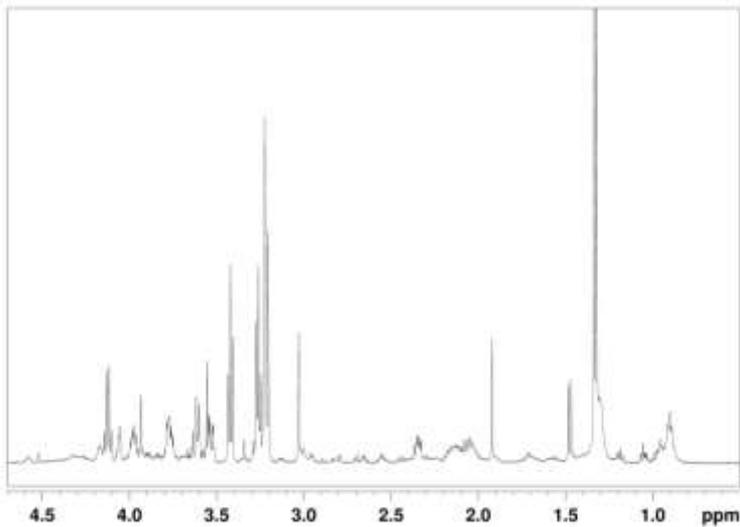
9 biopsies sélectionnées par l'Anatomo-pathologiste

Analyse métabolique "en aveugle"



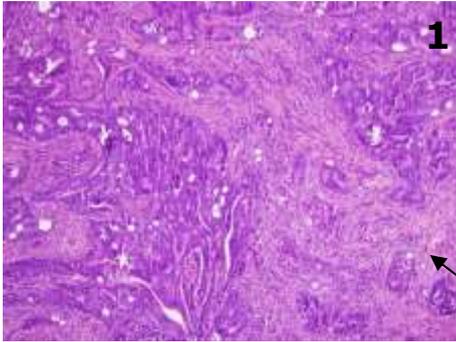
Résultats de la classification

9 spectres

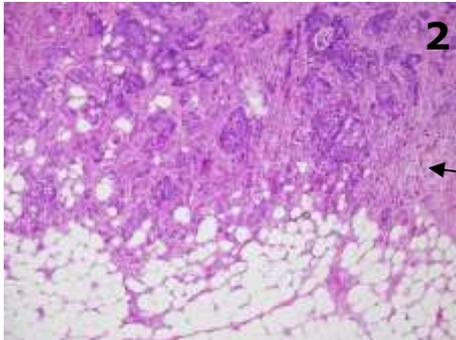


Analyse histopathologique

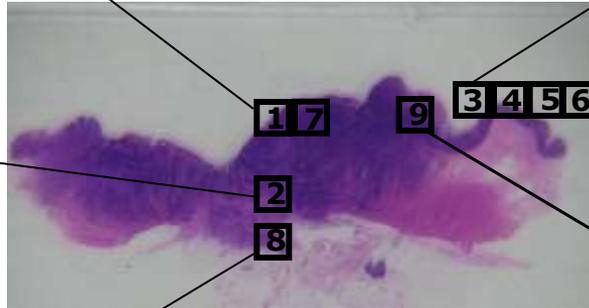
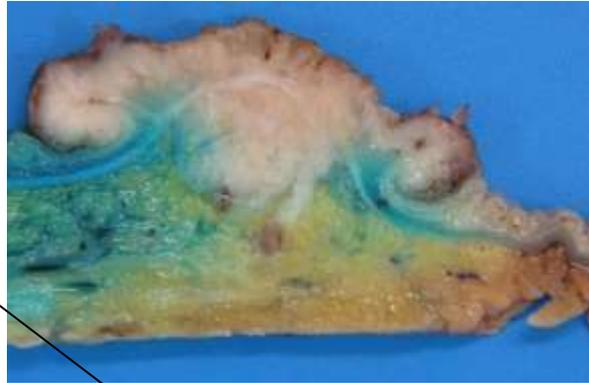
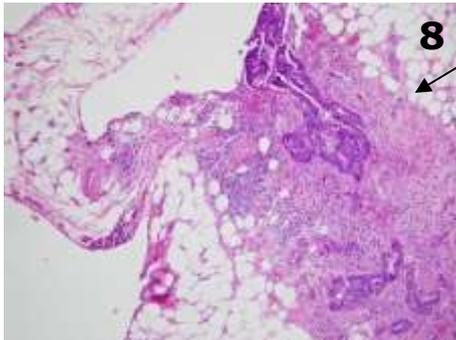
60% cellules tumorales



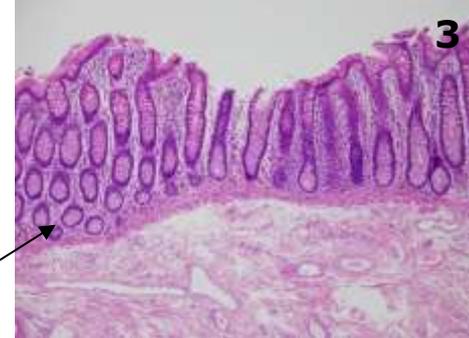
50% cellules tumorales



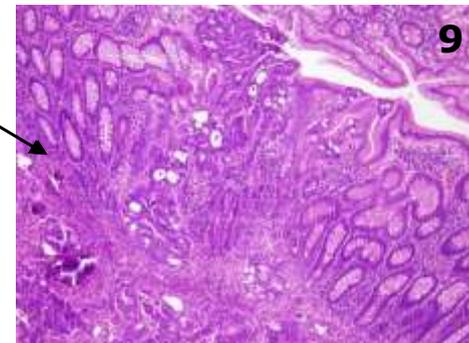
10% cellules tumorales



0% cellules tumorales

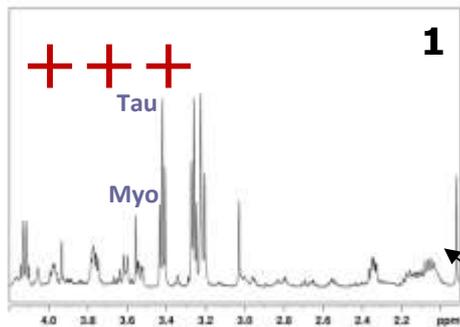


30% cellules tumorales

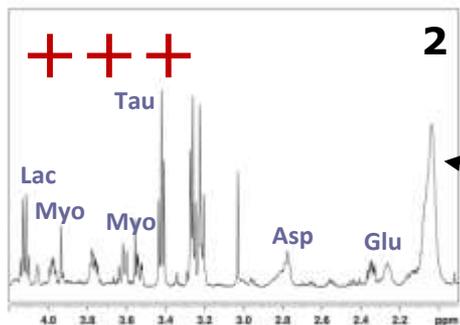


Analyse métabolique (RMN HRMAS)

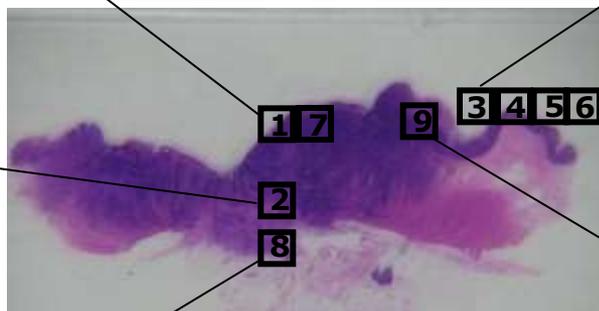
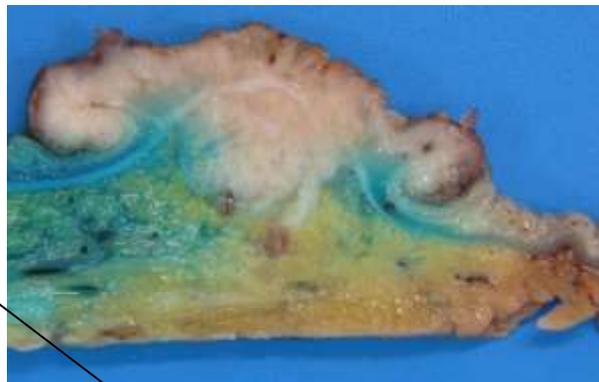
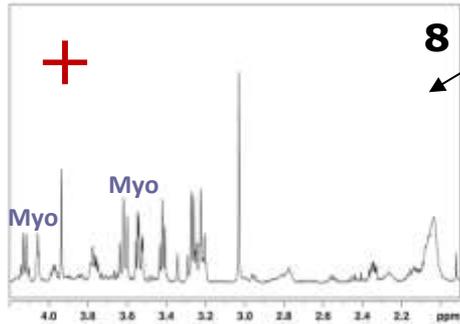
60% cellules tumorales



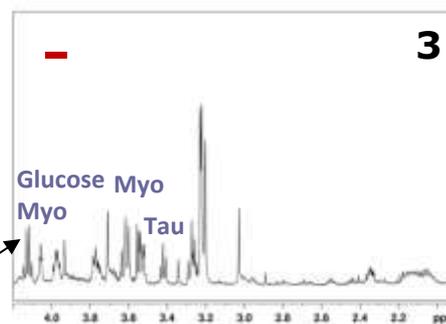
50% cellules tumorales



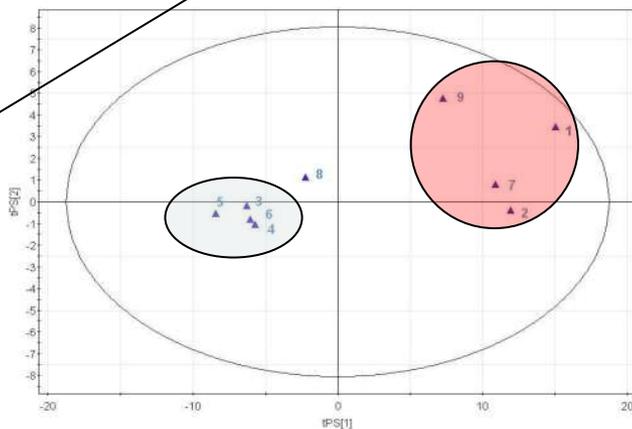
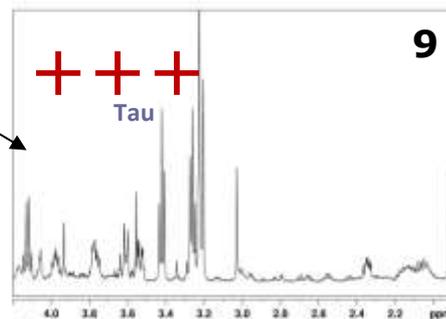
10% cellules tumorales



0% cellules tumorales



30% cellules tumorales



Durée Analyse
Métabolique : 17 mn

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

- **Très bonne discrimination** possible entre **biopsies tumorales** et **biopsies saines** uniquement sur la base de leur **profil métabolique**.
- **Très bonne concordance** entre données métaboliques et histopathologiques
→ **Qualité du modèle**.
- Modèle statistique basé sur le **diagnostic anatomopathologique** (T Vs TS)
→ Evaluation **extemporanée** possible des berges d'exérèse.
- Première tentative d'utilisation de l'**outil RMN HRMAS** dans un cadre clinique (complément de l'Anatomo-pathologie).
- **Poursuite de la Validation** du modèle statistique :
→ Effectifs plus conséquents,
→ Autres analyses en condition extemporanée.

PLAN

INTRODUCTION

1. SPECTROSCOPIE RMN HRMAS

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL EN METABOLOMIQUE

3. EXEMPLES D'APPLICATIONS

→ Adénocarcinomes coliques

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

CONCLUSION - PERSPECTIVES

- Discrimination **claire** entre échantillons tissulaires **sains** et **tumoraux**.
- **Corrélation des données métabolomiques à différents types de données :**
 - **Cliniques** (pronostic des patients), **anatomopathologiques**, etc...
- **Première démonstration de l'utilité clinique de l'outil HRMAS :**
 - Etude extemporanée dans le cas des **ADK coliques**,
 - Etude extemporanée dans le cas des **Gliomes**.
- **Etudes transversales** (Métabolomique, Génomique, Transcriptomique), à grande échelle, prospectives et multicentriques → **utilité clinique**.
- **Développements technologiques :**
 - Augmentation **sensibilité** → ↓ durée d'acquisition,
 - **Automatisation** (passeur d'échantillons, réglages) → ↑ débit analytique.



MEDICAL
NM R
METABOLOMICS
PLATFORM
of **S**TRASBOURG

PLATE-FORME MÉTABOLOMIQUE MÉDICALE *par RMN de* **STRASBOURG**



Collaborations en Cancérologie

- **Cerveau** (320 échantillons)
P. Kehrli, S. Froelich, D. Maitrot (Neurochirurgie)
N. Dali-Youcef, J. Auwerx (IGBMC)
G. Noël (CPS - Radiothérapie)
- **Colon** (162 échantillons)
C. Brigand (Chirurgie Générale)
- **Rein** (504 échantillons)
H. Lang (Urologie)
- **Neuroblastome** (27 échantillons)
P. Lutz (Onco-pédiatrie)
- **Surrénale** (66 échantillons)
P. Bachellier, B. Goichot (Chirurgie Endocrinologique, Médecine Interne)
- **Sein** (130 échantillons)
C. Mathelin (Sénologie)
- **Lymphome** (89 échantillons)
R. Herbrecht (Onco-hématologie)
- **Ovaire** (106 échantillons)
J.P. Bellocq, G. Lang-Averous (Anatomie Pathologique)
- **Modèles animaux de xénogreffe** (114 échantillons)
E. Guérin (Biologie Moléculaire), T. Massfelder (INSERM U727)

Projet CARMeN

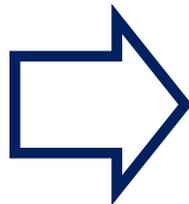
Historique



Service d'Anatomie Pathologique
Hôpital de Hautepierre

Labélisation : décembre 2006
Financement : septembre 2007
Installation : novembre 2007

Fonctionnement : janvier 2008



2617 échantillons analysés
en 3 ans (8462 heures
d'acquisitions)

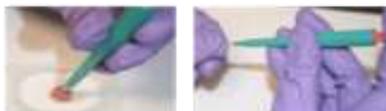


Projet ExtempoRMN (2013-2017)

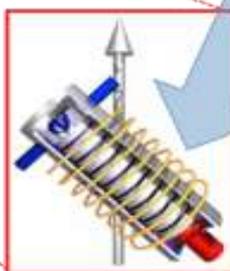
Recherche clinique : réponse dans les délais d'extemporané



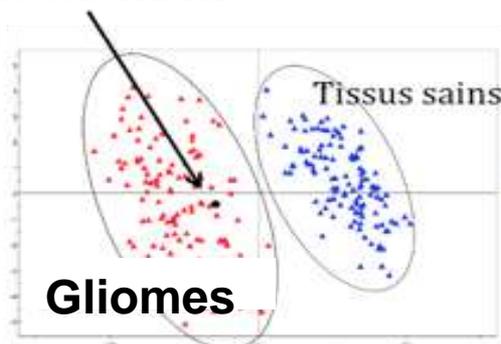
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
Système HRMAS-RMN 500 MHz



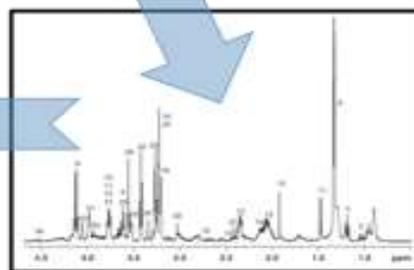
Préparation de l'échantillon
(2min)



Prédiction pour
le nouveau cas



Traitement du nouveau cas
dans le modèle statistique (5min)



Acquisition (20min)



Gliomes