

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement

par

Roland Amathieu

Le 21 Décembre 2012

Titre :

**Applications de la Métabolomique par Spectrométrie par
Résonance Magnétique Nucléaire du Proton dans les Maladies
Graves du Foie et leurs Complications**

Directeur de thèse : Pr Gilles Dhonneur

Co-Directeur de thèse : Pr Laurence Le Moyec

JURY

Dr Richard Moreau	- Rapporteur
Dr Christophe Junot	- Rapporteur
Pr Gilles Dhonneur	- Examineur
Pr Laurence Le Moyec	- Examineur
Pr Didier Payen	- Examineur
Dr Pierre Nahon	- Examineur

REMERCIEMENTS

Au Pr Laurence Le Moyec, pour ta patience, la qualité de ton enseignement et pour m'avoir initié à la recherche en métabolomique,

Au Pr Gilles Dhonneur, pour ton amitié, ta confiance et ton enseignement,

A mes autres Maitres, Pr Kamran Samii et Pr Didier Payen, qui m'ont fait profiter de leur savoir et m'ont donné le gout de la clinique et de la recherche,

Aux Drs Richard Moreau et Christophe Junot, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse,

A Pierre, pour tes conseils,

A Hakim et Walid, pour votre soutien permanent,

A Mohamed, pour tous les moments passés à essayer de m'expliquer les analyses multivariées,

A toute l'équipe du laboratoire pour leur gentillesse et leur aide,

A tous ceux qui m'ont soutenu pendant ces longues années de thèse,

A Jean-Christian, *In memorium*

A Antoine et Jules, mes petits lions,

A Valérie, pour tout.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
ABREVIATIONS	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
1 INTRODUCTION : CONCEPT ET DEFINITION DE LA METABOLOMIQUE	8
2 MATERIELS ET METHODES	12
2.1 TECHNIQUES UTILISEES EN METABOLOMIQUE	12
2.1.1 <i>Descriptions brèves des techniques</i>	12
2.1.1.1 Spectrométrie de masse	13
2.1.1.2 Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire	14
2.1.1.2.1 Principes physiques de la résonance magnétique nucléaire	14
2.1.1.2.2 Acquisition du signal en RMN	17
2.1.1.2.3 <i>In vivo</i> : la spectrométrie par résonance magnétique (SRM)	21
2.1.2 <i>Avantages et inconvénients des différentes techniques utilisées in vitro</i>	23
2.2 ANALYSE DES DONNEES EN METABOLOMIQUE	26
2.2.1 <i>Réalisation et traitement des spectres en RMN</i>	27
2.2.1.1 Identification des métabolites	30
2.2.1.2 Principaux métabolites indetifiables en RMN	32
2.2.1.3 STOCSY	34
2.2.2 <i>Analyses statistiques</i>	35
2.2.2.1 Analyses statistiques multivariées non supervisées	36
2.2.2.1.1 Analyse en composantes principales	36
2.2.2.1.2 Classification hiérarchique	36
2.2.2.2 Analyses statistiques multivariées supervisées	36
2.2.2.2.1 Régression par les moindres carrés et analyses discriminantes (PLS, PLS-DA, OPLS)	36
2.2.3 <i>Représentations visuelles : les cartes factorielles</i>	38
2.2.3.1 Cartes factorielles du poids des observations ou Score Plots	38
2.2.3.2 Carte factorielle du poids des variables ou Loading plot	39
2.2.4 <i>Validations des modèles</i>	41
2.3 REPRODUCTIBILITE DE LA RMN	41
3 ETAT DE L'ART	43
3.1 APPLICATIONS PRECLINIQUES DE LA METABOLOMIQUE PAR RMN DU PROTON	43

3.2	PASSAGE DE LA PAILLASSE AU LIT DU PATIENT	44
3.3	APPLICATIONS CLINIQUES DE LA METABOLOMIQUE PAR RMN DU PROTON	45
3.3.1	<i>Variations physiologiques du métabolome et influence environnementale</i>	46
3.3.2	<i>Erreurs innées de métabolisme</i>	47
3.3.3	<i>Cardiologies et maladies vasculaires</i>	49
3.3.3.1	Prédiction du risque cardiovasculaire.....	49
3.3.3.2	Diagnostic de la maladie coronarienne	50
3.3.4	<i>Néphrologie</i>	51
3.3.5	<i>Neurologie</i>	52
3.3.6	<i>Infectiologie</i>	53
3.3.7	<i>Cancérologie</i>	55
3.3.8	<i>Patients en états critiques</i>	56
3.4	APPLICATIONS DE LA METABOLOMIQUE DANS LES MALADIES DU FOIE	59
3.4.1	<i>Le foie et son métabolisme</i>	59
3.4.1.1	Organisation générale du foie	59
3.4.1.2	Activités métaboliques du foie	63
3.4.1.2.1	Métabolisme glucidique	63
3.4.1.2.2	Métabolisme protéique.....	65
3.4.1.2.3	Métabolisme lipidique.....	67
3.4.1.2.4	Métabolisme de la bile	69
3.4.1.2.5	Interdépendance des principaux métabolismes	72
3.4.1.2.6	Métabolisme des xénobiotiques	73
3.4.1.3	Modification de l'activité métabolique du foie dans les hépatopathies.....	75
3.4.1.3.1	Modifications anatomopathologiques : de la fibrose à la cirrhose	75
3.4.1.3.2	Modifications fonctionnelles.....	78
3.4.1.3.3	Anomalies du métabolisme des glucides.....	79
3.4.1.3.4	Anomalies du métabolisme des acides aminés	79
3.4.1.3.5	Anomalies du métabolisme des lipides	80
3.4.1.3.6	Anomalies de l'uréogénèse	80
3.5	APPLICATIONS DE LA METABOLOMIQUE DANS LES ATTEINTES HEPATIQUES.....	81
3.5.1	<i>Les atteintes aiguës non-médicamenteuses du foie</i>	82
3.5.2	<i>Atteintes médicamenteuses du Foie</i>	83
3.5.3	<i>Applications dans les maladies chroniques du foie</i>	86
3.5.3.1	Approche diagnostique et physiopathologique des hépatopathies	86
3.5.3.2	Evaluation de la gravité et complications des hépatopathies et des cirrhoses	87
3.5.3.3	Différences entre les étiologies des hépatopathies.....	89
3.5.4	<i>Applications dans les cancers hépatobiliaires</i>	94
3.5.4.1	Différenciation tissu tumoral et tissu sain	94

3.5.4.2	Diagnostic du CHC et du cholangiocarcinome: recherche de biomarqueurs	95
3.5.4.3	Evaluation de la réponse thérapeutique	96
3.5.5	<i>Application en transplantation hépatique</i>	101
4	PRESENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE : METABOLOMIQUE PAR RMN DU PROTON, CIRRHOSE ALCOOLIQUE ET COMPLICATIONS	104
4.1	RATIONNEL DE LA RECHERCHE	104
4.2	TRAVAUX DE RECHERCHE	107
4.2.1	<i>Evaluation des modifications métaboliques chez les patients cirrhotiques présentant une insuffisance hépatocellulaire chronique de gravité différente évaluée par le score de MELD (Publié Journal of Proteome Research, Juillet 2011)</i>	107
4.2.2	<i>Empreinte métabolique des patients cirrhotiques d'origine alcoolique présentant un carcinome hépatocellulaire (Accepté Clinical Cancer Research)</i>	116
4.2.3	<i>Profils métaboliques des patients cirrhotiques présentant une insuffisance hépatocellulaire aigüe (soumis)</i>	149
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	177
6	REFERENCES	180

ABREVIATIONS

RMN : Spectrométrie par Résonance Magnétique *in vitro*

SRM : Spectrométrie par Résonance Magnétique *in vivo*

¹H : hydrogène ou proton

³¹P : phosphore

¹³C : carbone

M : mole/L

ARN : Acide Ribonucléique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

SM : Spectrométrie de Masse

CL-SM : chromatographie en phase liquide couplée à la SM

CG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

1D : une dimension

2D : deux dimensions

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill

COSY : Correlation Spectroscopy

TOCSY : Total Spectroscopy Correlation

STOCSY : Statistical Total Correlation Spectroscopy

S-DOSY : Statitical diffusion-ordered spectroscopy

HR-MAS : High Resolution Magic Angle Spinning

Da : Dalton

MHz : MegaHertz

ppm : parties par millions

pH : potentiel hydrogène

ACP : Analyse en Composantes Principales

PLS : Partial Least Squares

PLS-DA : Partial Least Squares-Discriminant Analysis

OPLS : Orthogonal Partial Least Squares

OSC : Orthogonal Signal Correction

R² : variance explicative

Q² : prédictibilité

EIM : Erreurs innées du métabolisme

TMA : Triméthyl Amine

TMAO : triméthylamine-N-oxide

TSP : l'acide TrimethylSilylPropionate

LCR : Liquide CéphaloRachidien

AG : Acide Gras

TG : Triglycéride

VLDL : Very Low Density Lipoproteine

LDL : Low Density Lipoproteine

HDL : High Density Lipoproteine

ALAT : Alanine-Amino-Tranférase

ADH : Alcool Déshydrogénase

PC : phosphocholine

GPC : glycerophosphocholine

GPE : glycerophosphorylethanolamine

PE : phosphoethanolamine

VHC : Virus de l'hépatite C

VHB : virus de l'hépatite B

EHM : encéphalopathie hépatique minimale

CHC : carcinome hépatocellulaire

CPRE : CholangioPancréaticographie Rétrograde per-Endoscopique

NASH : Non-Alchoolic Steatotic Hepatitis

MELD : Mayo clinic End Liver Disease score

ACLF : Acute on Chronic Liver Failure

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Les techniques « Omiques ».....	9
Figure 2 : Intérêt de la métabolomique dans l'étude d'un système biologique.....	10
Figure 3: Métabolomique, du patient à l'analyse.....	13
Figure 4 : Principes de la RMN.....	16
Figure 5 : Exemple d'acquisition de spectres avec une séquence d'impulsion simple après suppression de l'eau.....	17
Figure 6: Sequence d'acquisition simple après suppression de l'eau et CPMG.....	18
Figure 7 : Acquisition en 2 dimensions TOCSY.....	20
Figure 8 : Analyse du métabolome sérique.....	25
Figure 9 : Réalignement des spectres.....	28
Figure 10 : Découpage des spectres.....	29
Figure 11 : Spectre d'urine et principaux métabolites.....	31
Figure 12 : STOCSY.....	35
Figure 13 : Exemple de Carte « score plot ».....	39
Figure 14 : Exemple de « Loading plot ».....	40
Figure 15 : Champs d'applications de la métabolomique chez l'homme.....	46
Figure 16 : Fish Odor Syndrome.....	49
Figure 17 : Organisation générale du foie.....	60
Figure 18 : Organisation d'un acinus.....	61
Figure 19 : Organisation Cellulaire.....	63
Figure 20 : Voies de la glycolyse et de la néoglucogenèse.....	65
Figure 21: Métabolisme des acides aminés et cycle de Krebs.....	66
Figure 22: Cycle de l'urée.....	67
Figure 23 : Métabolisme des lipides.....	69
Figure 24: Métabolisme de la Bilirubine.....	71
Figure 25: Synthèse des voies métaboliques.....	72
Figure 26 : Aspect macroscopique du foie sain et du foie cirrhotique.....	77
Figure 27 : Aspect microscopique du foie sain et du foie cirrhotique.....	78

Tableaux

Tableau 1: Principaux métabolites détectables en ^{31}P SRM et rôles.....	22
Tableau 2: Principaux métabolites détectables en ^1H SRM.....	23
Tableau 3 : Avantages et Inconvénients des différentes techniques d'analyse <i>in vitro</i>	24
Tableau 4 : Principales étapes de l'analyse des données en métabolomique.....	30
Tableau 5 : Exemples de métabolites détectés en RMN.....	33
Tableau 6: Atteintes aiguës du foie et pharmacométabolomique.....	85
Tableau 7: Atteintes chroniques du foie <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	91
Tableau 8 : Atteintes tumorales du Foie <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	98
Tableau 9 : Transplantation hépatique.....	103

1 INTRODUCTION : Concept et Définition de la métabolomique

Les techniques « omiques » permettant l'exploration des systèmes biologiques existent depuis plusieurs décennies, mais leurs applications tant fondamentales que cliniques se sont considérablement développées ces dernières années. Elles visent à mieux comprendre les mécanismes de la biologie sous l'angle des systèmes. Les principales techniques « omiques » sont la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique (Figure 1). Elles font, pour chacune d'entre elles, appel à des technologies différentes.

La métabolomique (ou métabonomique) est l'analyse qualitative et quantitative de la réponse métabolique du système vivant à des stimuli physiopathologiques, pharmacologiques ou à des modifications génétiques. Cette définition a été établie par l'équipe de J.K. Nicholson et désigne l'analyse qualitative et quantitative de l'ensemble des métabolites, composant le métabolome, présents dans un liquide ou un tissu biologique, *ex vivo* ou *in vivo*, à un moment donné^{1,2}.

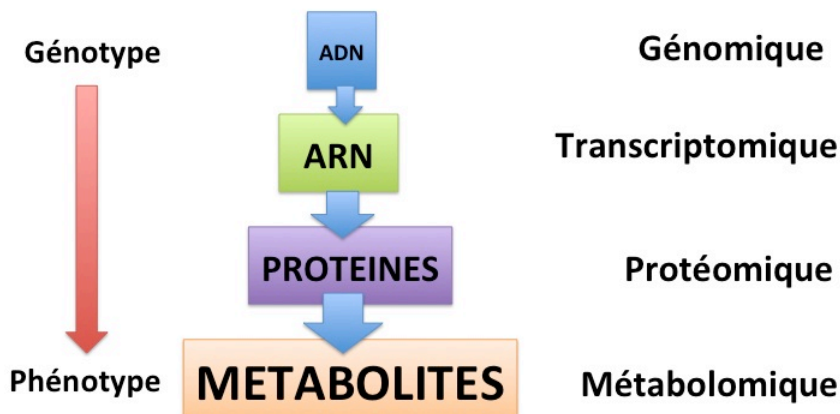


Figure 1 : Les techniques « Omiques »

Représentation des techniques « omiques » et leurs correspondances en fonction de la composante étudiée.

La métabolomique est un outil analytique qui utilise des méthodes d'analyses multiparamétriques comme la spectrométrie par résonance nucléaire magnétique *in vitro* (RMN), *in vivo* (SRM) ou la spectrométrie de masse *in vitro* (SM) associées à une analyse statistique multivariée complexe.

La métabolomique permet d'établir : (a) des profils métaboliques, lesquels mesurent un sous-ensemble d'un profil complet avec quantification des métabolites ³, (b) des empreintes métaboliques ; cela correspond à l'étude quantitative d'un groupe de métabolites, connu ou non, associé à une voie métabolique particulière ^{4, 5} ou (c) une analyse ciblée, souvent isotopique, qui se limite à une partie précise du métabolome avec l'analyse de quelques métabolites impliqués dans une voie biochimique spécifique ⁶ et enfin (d) l'existence de nouveaux marqueurs biologiques ou biomarqueurs directement ou indirectement en rapport avec une maladie ou la réponse au traitement d'une maladie.

Il existe des interdépendances entre le génome, le transcriptome, le protéome et le métabolome humain. De même, il existe de nombreuses influences externes qui peuvent modifier de façon transitoire ou permanente chacune des composantes : du génome au métabolome. Ces influences externes concernent l'environnement (alimentation, température extérieure, hygrométrie, exposition solaire...) ou d'autres facteurs tels que le stress ou l'effort physique (Figure 2). Les maladies, la réponse thérapeutique bonne ou mauvaise à un médicament peuvent être une conséquence de la modification du génome, du transcriptome, du protéome et/ou du métabolome.

Les différentes techniques « omiques » peuvent permettre d'obtenir des informations physiopathologiques ou d'avoir un outil permettant de faire le diagnostic, d'évaluer sa gravité ou de cibler le traitement.

L'intérêt de la métabolomique dans ce domaine est de pouvoir obtenir des informations sur l'ensemble des modifications, qu'elles soient physiologiques, pathologiques, ou bien qu'elles soient la conséquence d'une influence externe inhabituelle. Dans des situations pathologiques comme une défaillance d'organe ou une intoxication, les modifications induites du métabolisme sont responsables des variations de composition des liquides biologiques. L'approche métabolomique peut permettre de déterminer un profil métabolique spécifique de ces modifications du métabolisme.

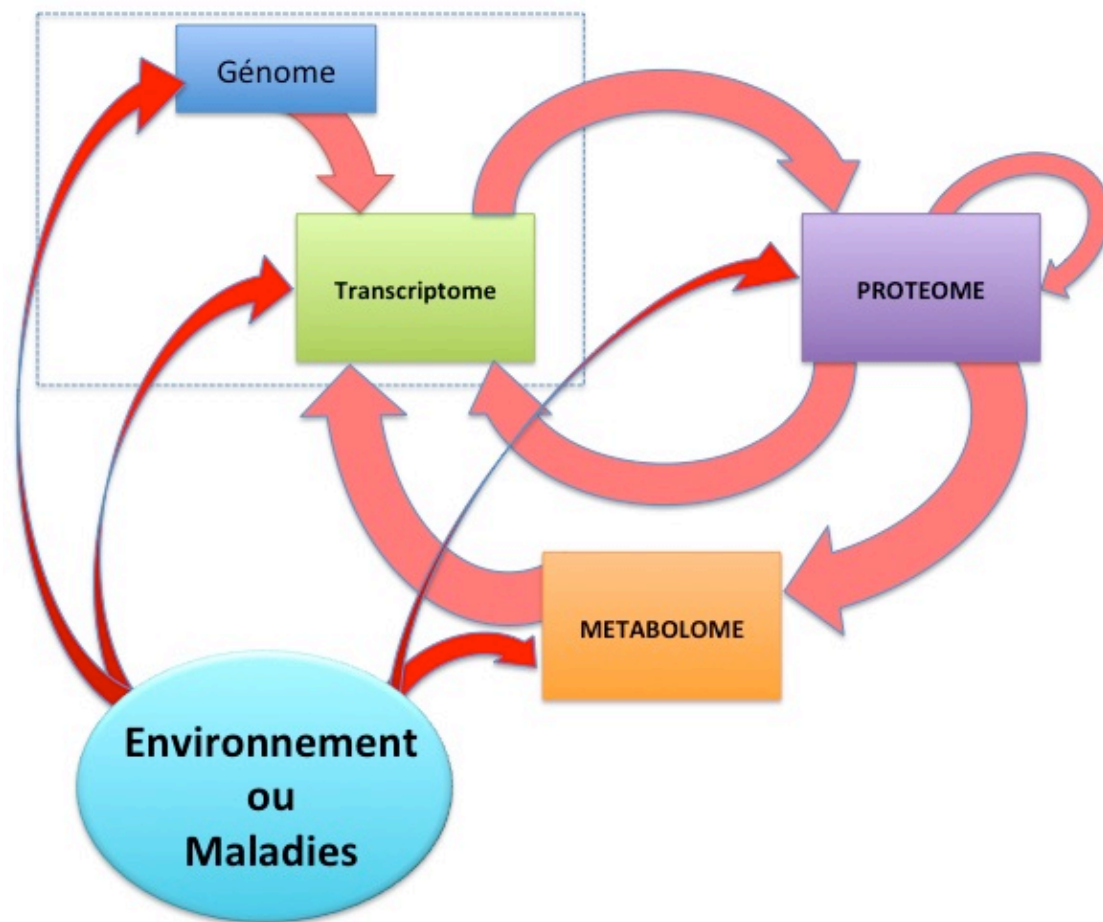


Figure 2 : Intérêt de la métabolomique dans l'étude d'un système biologique

Du génome au métabolome : interrelations, influences entre les différentes étapes et influence de l'environnement ou des maladies.

La métabolomique permet une vue biochimique instantanée de l'état physiologique d'une cellule ou d'un organisme, ou une représentation d'un état physiopathologique secondaire à un dysfonctionnement cellulaire ou d'un organe, soit intrinsèque soit secondaire à une influence externe⁷⁻⁹.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Techniques utilisées en métabolomique

2.1.1 Descriptions brèves des techniques

Deux principales techniques analytiques permettent une analyse qualitative et/ou quantitative du métabolome : la spectrométrie de masse et la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire. L'utilisation standardisée de ces techniques pour la biologie et la biologie clinique est mise en place progressivement en ce qui concerne la préparation des échantillons, les types d'acquisition du signal et leur analyse ¹⁰.

Du patient à l'obtention du métabolome, la méthode générale est la même quelle que soit la technique utilisée : prélèvement de l'échantillon, conservation le plus souvent à -80°C, préparation de l'échantillon pour l'acquisition, acquisition et traitement du signal, analyses statistiques et identification des métabolites (Figure 3)^{11,12}.

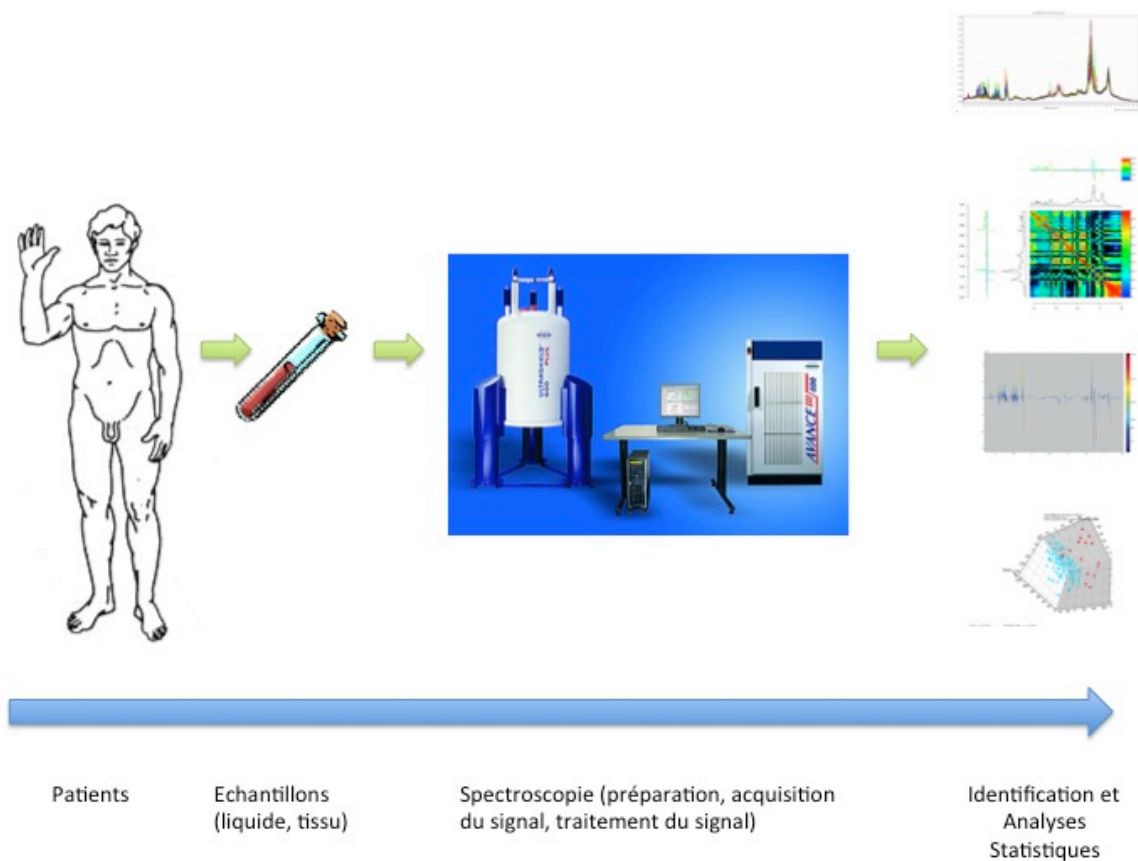


Figure 3: Métabolomique, du patient à l'analyse

Chemin simplifié de l'échantillon, du patient à l'analyse finale. Les échantillons sont prélevés puis conservés à -80°C avant l'acquisition des spectres. Les spectres sont ensuite analysés.

2.1.1.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse basée sur la séparation des ions, atomes et molécules en fonction de leur masse. La limite de détection des différents composés est de l'ordre de 10^{-9} M, ce qui en fait la technique de choix pour les molécules présentes en très faible concentration dans un liquide. C'est la technique la plus utilisée en métabolomique.

Dans un échantillon biologique, les molécules sont initialement séparées puis ionisées et détectées selon leur rapport masse sur charge. L'ionisation de l'ensemble des molécules d'un même échantillon n'est cependant pas toujours possible de manière directe.

Une étape de séparation préalable des molécules est souvent nécessaire, en particulier lors de l'analyse de milieux biologiques complexes. Elle peut être réalisée par chromatographie en phase liquide ou en phase gazeuse.

Différentes variantes de la SM existent en fonction du type de composé que l'on veut analyser. Ces différences concernent le mode d'injection, d'ionisation et/ou le type d'analyseur utilisé, ainsi que l'utilisation simultanée ou non de plusieurs spectromètres dits en « tandem ». Pour la métabolomique, les méthodes les plus couramment utilisées sont la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (« high performance liquid chromatography – mass spectrometry / mass spectrometry », HPLC-MS/MS), chromatographie à ultra-haute pression (UHPLC, de l'anglais ultra-high pressure liquid chromatography) couplée à la spectrométrie de masse, la chromatographie liquide à polarité de phase inversée (RPLC : reverse phase liquid chromatography) couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution, basée sur l'utilisation d'analyseurs à temps de vol (TOF, de l'anglais time of flight).

Les principales limites de la SM sont la destruction de l'échantillon et la faible reproductibilité de la quantification des métabolites.

2.1.1.2 Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire de haute résolution

2.1.1.2.1 Principes physiques de la résonance magnétique nucléaire

Le principe de la résonance magnétique nucléaire repose sur les propriétés magnétiques de certains noyaux d'atomes tels que le proton (^1H), le carbone (^{13}C), le phosphore (^{31}P) ou le fluor (^{19}F). Elle a initialement été utilisée en chimie pour étudier la structure de molécules ou en physique pour en étudier la conformation spatiale. Elle utilise pour cela un matériel onéreux composé d'un aimant supraconducteur permettant de générer des champs magnétiques très puissants. Lorsque son utilisation est pratiquée en

laboratoire sur du matériel biologique *in vitro*, nous parlerons de RMN. Lorsqu'elle utilise le matériel médical d'imagerie par résonance nucléaire (IRM), nous parlerons de SRM (spectrométrie par résonance magnétique), qui est donc réalisée *in vivo*. L'intensité des champs magnétiques utilisés en RMN est supérieure à celle utilisée en SRM du fait d'un problème technique d'orientation des champs magnétiques (horizontaux en SRM). En SRM, la résolution spectrale est donc inférieure à la RMN.

En RMN des liquides biologiques, la quantité nécessaire de liquide à analyser est de l'ordre de 500µL. Une nouvelle génération de microsonde a permis de diviser par 10 la quantité nécessaire. En RMN des tissus biologiques la quantité nécessaire est de l'ordre du milligramme. Dans les deux cas, aucune préparation spécifique n'est nécessaire avant l'analyse. La limite de détection pour les différents métabolites est au mieux de l'ordre de 10^{-5} M.

Le noyau le plus utilisé et le plus sensible est le proton. Il est présent dans toutes les molécules organiques et dans l'eau qui est présente dans toutes les cellules. Lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique, les protons (Figure 4 A) s'alignent dans une direction imposée par ce champ. L'application d'un second champ magnétique pendant un court instant, dans une direction perpendiculaire mais de même fréquence déplace cet équilibre (Figure 4B). A l'interruption du second champ magnétique, les protons reprennent leur position initiale dans le premier champ en émettant une énergie à une fréquence identique, c'est le phénomène de résonance (Figure 4C). La fréquence de ce signal est très faiblement modifiée en fonction de l'environnement, c'est-à-dire de la position du proton dans la molécule, de ses différentes liaisons chimiques avec les autres molécules ainsi que de la présence d'autres protons à proximité (Figure 4D). Ces modifications du signal émis sont

analysées en fréquence (Figure 4E) grâce à une transformée de Fourier dans un spectre (Figure 4F).

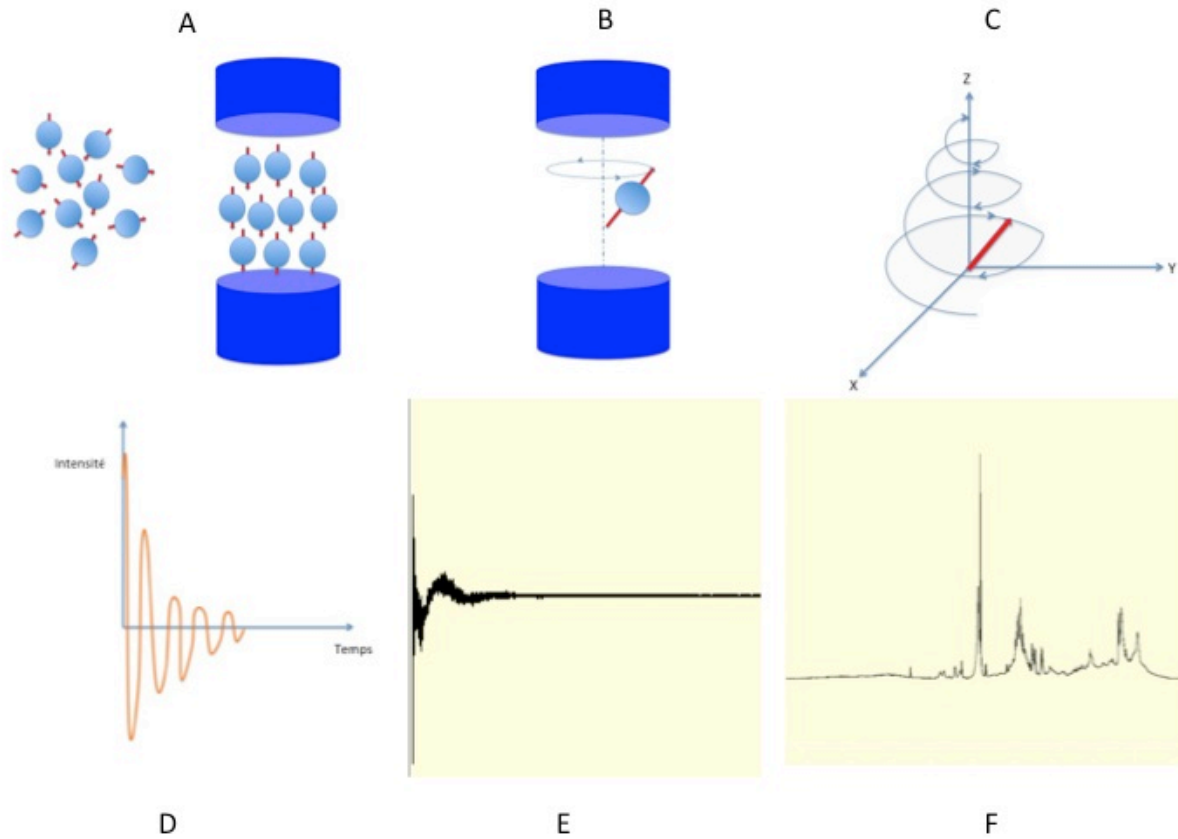


Figure 4 : Principes de la RMN

A : Orientation des protons dans le champ magnétique B : Application d'un second champ magnétique. C : Retour à l'équilibre D : Exemple de signal émis par un proton. E : Exemple de signaux émis par l'ensemble des protons d'un composé biologique et E : spectre final.

L'eau est un composé majeur de l'organisme. Elle représente 99% de la composition des liquides biologiques. Sans la suppression du signal de l'eau, seule la résonance de l'eau serait visible sur les spectres. Il est donc nécessaire de supprimer son signal en faveur des protons des autres molécules. C'est l'objectif de la séquence de présaturation. Son principe est d'empêcher que les protons de l'eau n'entrent en résonance lors de l'application du second champ magnétique. Une fois le signal de l'eau supprimé, différentes séquences d'acquisition à une ou deux dimensions sont possibles pour obtenir des spectres.

2.1.1.2.2 Acquisition du signal en RMN

Au sein des techniques d'acquisition la séquence en impulsion simple après suppression de l'eau est la plus courante (Figure 5). Elle permet d'obtenir les résonances des molécules composées de protons et à concentration suffisante présents dans le liquide biologique.

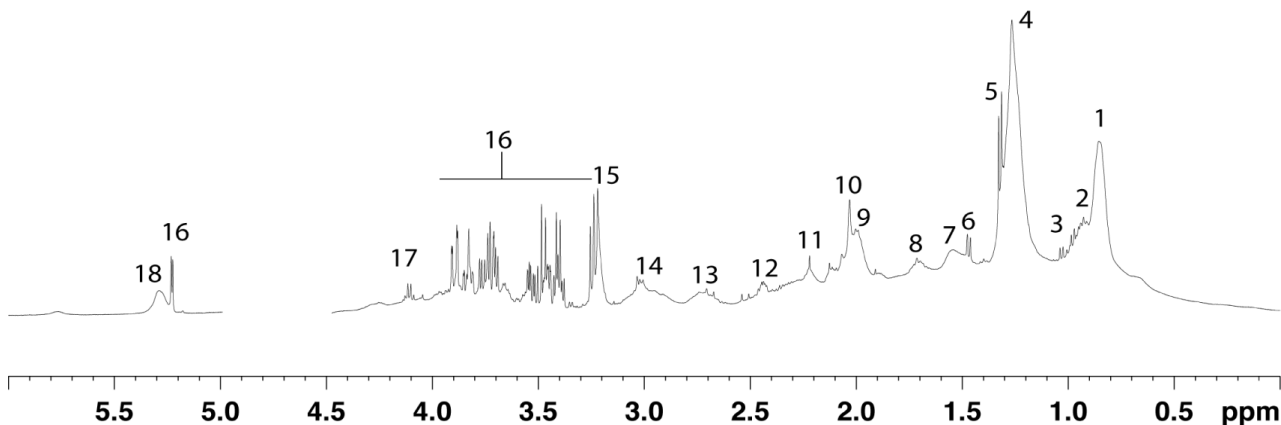


Figure 5 : Exemple d'acquisition de spectres avec une séquence d'impulsion simple après suppression de l'eau

Spectre ^1H NMR (500 MHz) avec une acquisition simple (séquence 1D-NOESY) de la région comprise entre 0 et 6 ppm du sérum d'un patient présentant une cirrhose ; la région comprise entre 4.5 and 5.0 ppm correspond à la région de l'eau qui a été supprimée.

1: AG ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 2: Isoleucine; 3: Valine; 4: AG ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 5: Lactate; 6: Alanine; 7: AG ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 8: AG ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$); 9: AG ($=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 10: Acetyl signals from α 1-acid glycoprotein; 11: AG ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 12: Glutamine; 13: AG ($=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$); 14: Albumin lysyl; 15: Choline; 16: Glucose; 17: Lactate; 18: AG ($-\text{CH}=\text{CH}-$)

Cependant, les molécules de très grande taille, comme les protéines ou les lipides, présentent un retour à l'équilibre trop lent pour être détectées dans les mêmes expériences que les petites molécules. Leurs signaux larges (basses résolutions) vont se superposer aux signaux des plus petites molécules. Cela peut rendre difficile la quantification des métabolites et l'interprétation du spectre. Plusieurs types de séquence d'acquisition ont été décrites pour diminuer ce signal comme la CPMG (Figure 6) ou la séquence de diffusion.

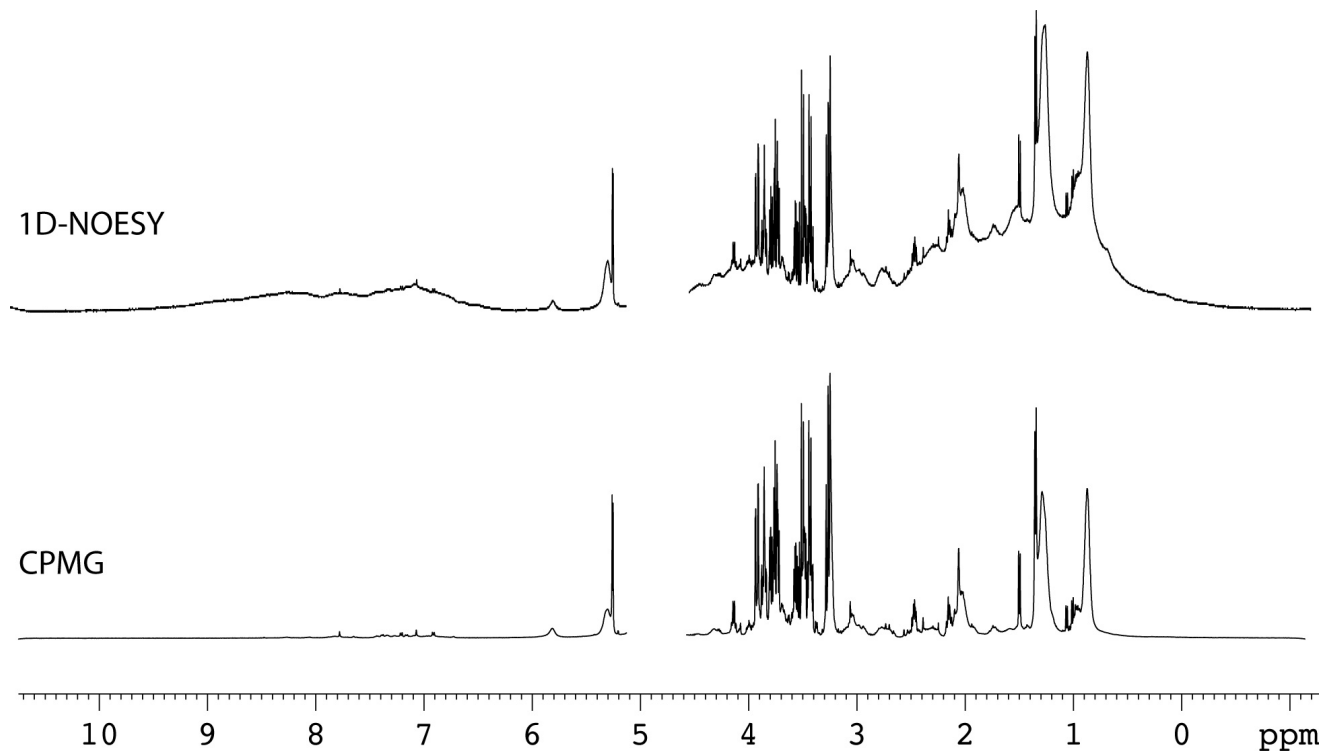


Figure 6: Séquence d'acquisition simple après suppression de l'eau et CPMG

Exemple de séquence d'acquisition simple après suppression de l'eau (1D-NOESY) et de séquence CPMG à partir du même échantillon de sérum d'un patient cirrhotique (données personnelles).

Les acquisitions en deux dimensions permettent d'avoir plus d'informations sur le contenu des liquides biologiques complexes, notamment du fait des superpositions de nombreux signaux de petites molécules. Les principales techniques utilisent les phénomènes de corrélation (« Correlation Spectroscopy », COSY)¹³, de corrélation à large distance (« Total Spectroscopy Correlation », TOCSY)¹⁴, et la *J-resolved* (Figure). Par

ailleurs, ce type d'acquisition se fait soit de façon « homonucléaire », c'est-à-dire sur le même type de noyau dans les deux dimensions, soit de façon « hétéronucléaire », c'est-à-dire sur deux types de noyaux différents pour chaque dimension (en ^1H - ^{13}C par exemple). Le temps d'acquisition pour les séquences classiques en deux dimensions est beaucoup plus long qu'avec les séquences en une dimension précédemment citées. Par contre, l'utilisation d'une sonde à très basse température (cryosonde) permet d'augmenter le rapport signal sur bruit et ainsi de diminuer le temps d'acquisition.

La plus ancienne des méthodes en deux dimensions est la *J-Resolved*. Elle est souvent utilisée pour les échantillons biologiques du fait de sa rapidité. Elle utilise une acquisition homonucléaire à partir du proton. Récemment se sont développées d'autres méthodes d'acquisition rapides, dites « ultra-fast », qui permettent en une seule impulsion d'obtenir un spectre en deux dimensions¹⁵⁻¹⁷.

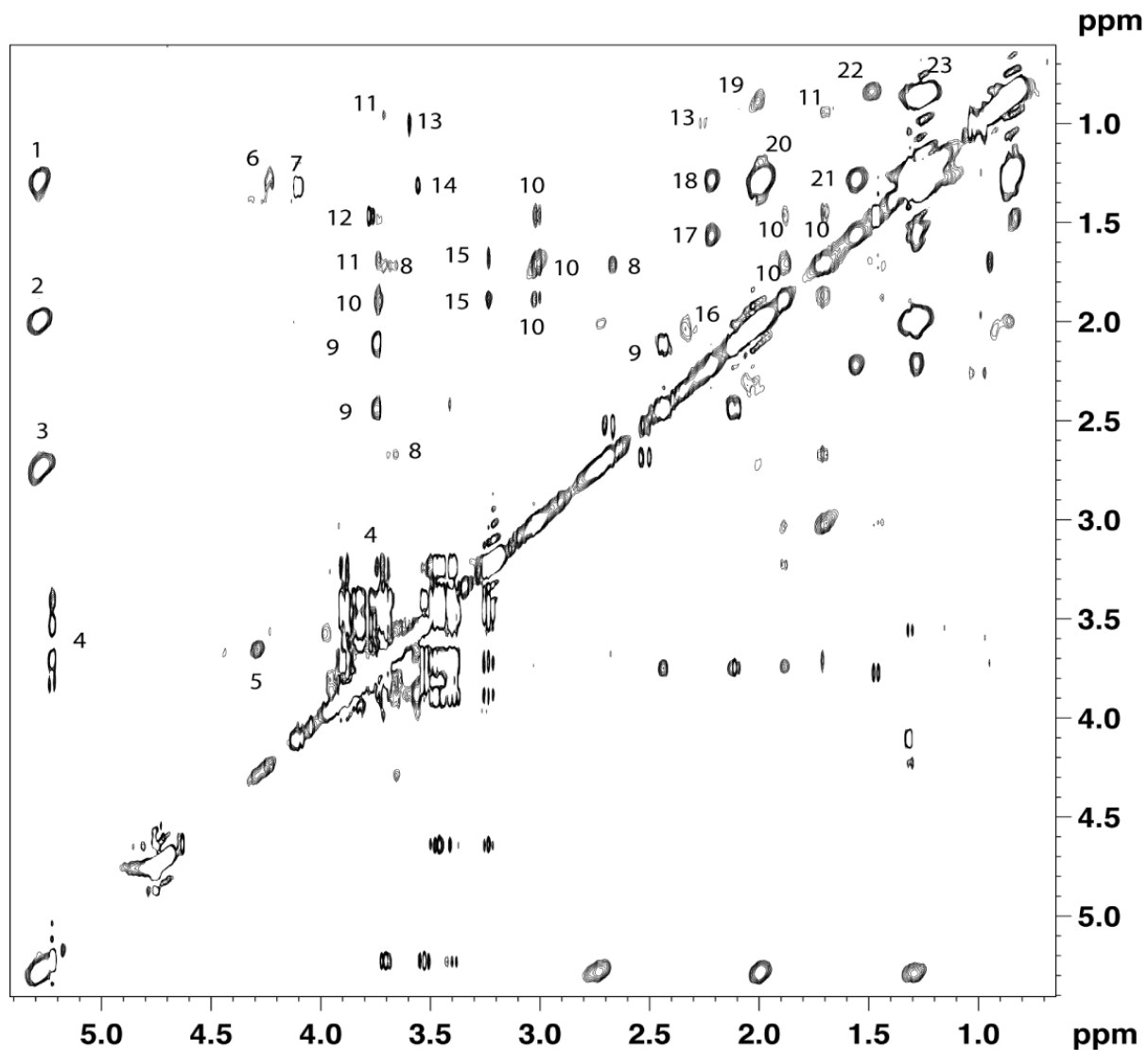


Figure 7 : Acquisition en 2 dimensions TOCSY

Spectre 1H-1H TOCSY 2D RMN du sérum du patient cirrhotique correspondant à la figure 5. La région présentée est comprise entre 0 et 5,5 ppm.

1: AG (-CH=CH- ; -CH₂-CH₂-CH₂-); 2: AG (-CH=CH- ; =CH-CH₂-CH₂-); 3: AG (-CH=CH- ; =CH-CH₂-CH=); 4: Glucose; 5: Choline; 6: Inconnu; 7: Lactate; 8: Inconnu; 9: Glutamine; 10: Lysine; 11: Leucine; 12: Alanine; 13: Valine; 14: Threonine; 15: Arginine; 16: Glutamate; 17: AG (-CH₂-CO- ; -CH₂-CH₂-CO-); 18: AG (-CH₂-CO- ; -CH₂-CH₂-CH₂-); 19: Isoleucine; 20: AG (=CH-CH₂-CH₂- ; -CH₂-CH₂-CH₂-); 21: AG (-CH₂-CH₂-CO- ; -CH₂-CH₂-CH₂-); 22: AG (-CH₂-CH₂-CH₃ ; -CH₂-CH₃); 23: AG (-CH₂-CH₂-CH₂- ; -CH₂-CH₃)

La RMN permet l'analyse des liquides et des tissus *in vitro* sans préparation préalable importante de l'échantillon et surtout sans le détruire, ce qui donne la possibilité de le réutiliser pour une nouvelle analyse, contrairement à la SM qui nécessite une

préparation de l'échantillon ce qui le rend ensuite inutilisable. La résolution des spectres pour l'analyse des tissus en RMN s'est de plus considérablement améliorée depuis la fin des années 90 avec l'utilisation d'une technique dérivée de la RMN des solides : l'HR-MAS (High Resolution-Magic Angle Spinning). L'utilisation d'une sonde spécifique avec une rotation de l'échantillon à l'angle magique de $54^{\circ}7$ permet d'obtenir un spectre de très grande résolution sur le tissu sans préparation préalable^{18,19}.

2.1.1.2.3 *In vivo* : la spectrométrie par résonance magnétique (SRM)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la spectrométrie par résonance magnétique (SRM) utilisent un matériel identique. Grace à une méthode d'acquisition du signal différente, la SRM permet d'identifier des molécules contenues dans un volume parfaitement défini et localisé d'un organisme.

La limite de détection et la résolution spatiale de la SRM sont des facteurs limitants de son utilisation du fait de la force des champs magnétiques utilisés (typiquement 1,5 à 2 Tesla) et du fait qu'il s'agit de tissus et non pas de solutions. Cependant, l'utilisation en parallèle de la RMN sur un liquide biologique, un tissu ou des cellules, permettant l'utilisation de champs magnétiques beaucoup plus intenses (typiquement 11 à 15 Tesla), permet de compléter des données partiellement obtenues *in vivo*. Autrement dit, certaines résonances sont superposées *in vivo* et les séparations des différents pics peuvent être effectuées *in vitro*. De plus, des résonances sont non détectables *in vivo* et le sont *in vitro*.

Seuls les composés dont la concentration est de l'ordre du millimolaire peuvent être détectés *in vivo*. Comme pour la RMN, les intensités des différentes résonances obtenues sont proportionnelles à la concentration du métabolite. Même si la plupart des études reportent, pour des raisons de simplicité technique, les résultats de la quantification

relative des métabolites sous la forme d'un rapport ²⁰, il est possible d'obtenir des quantifications absolues en déterminant l'aire sous la courbe des métabolites et en la convertissant en concentration, à condition de disposer de systèmes de calibration.

2.1.1.2.3.1 SRM du phosphore

Les spectres obtenus en SRM du phosphore (³¹P SRM) détectent le phosphore inorganique et les composés contenant ³¹P (ATP, Phosphodiesters, Phosphomonoesters créatine phosphate, glucose phosphate) et fournissent des informations sur le statut énergétique, le métabolisme membranaire et le métabolisme du glucose. Les principaux métabolites détectés en ³¹P SRM sont synthétisés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Principaux métabolites détectables en ³¹P SRM et rôles

Métabolites	δ (ppm)	Rôles
Phosphomonoesters	+6,5	Anabolisme membranaire
Phosphodiesters	+2,6	Catabolisme membranaire
Phosphate inorganique	+4,9	Calcul pH intracellulaire – Statut énergétique
Créatine Phosphate	0	Statut énergétique
ATP	-2,7 ; -7,8 ; -16,3	Statut énergétique

2.1.1.2.3.2 SRM du proton

Les principaux métabolites détectables en ¹H SRM sont énumérés dans le Tableau 2.

L'utilisation la plus fréquente de la SRM du proton concerne l'exploration cérébrale. Dans l'exploration de pathologies hépatiques, l'acquisition des spectres en ¹H SRM est relativement difficile *in vivo* du fait de la grande teneur en eau et graisse du foie et des mouvements abdominaux secondaires à la ventilation, empêchant une bonne suppression de l'eau.

Tableau 2: Principaux métabolites détectables en ¹H SRM

Métabolites	δ (ppm)	Exemples d'utilisation en neurologie
N-acétylaspartate	2	↓ lors des souffrances neuronales
Créatine/Phosphocréatine	3	Pic de Référence. Marqueur du métabolisme énergétique
Choline	3,2	Marqueur du métabolisme des membranes cellulaires (synthèse et dégradation)
Glutamate/glutamine	2,1 à 2,5	↑ dans l'encéphalopathie hépatique
Myo-inositol	3,6	↓ dans l'encéphalopathie herpétique
Lipides	0,9 à 1,3	↑ dans les tumeurs nécrotiques
Succinate	2,4	Détecté dans les abcès à pyogène
Acétate	1,9	Détecté dans les abcès
Alanine	1,5	Détecté dans les méningiomes ou les abcès
Lactate	1,33	↑ lors de souffrance cellulaire

2.1.1.2.3.3 SRM du Carbone

Les données sont difficiles à obtenir *in vivo* avec le ¹³C du fait de sa faible abondance naturelle (<1%) et de sa faible sensibilité. Les études utilisant le ¹³C utilisent donc préférentiellement des marquages isotopiques au ¹³C.

A part quelques exceptions, les études en SRM ont des populations dépassant rarement 50 patients. La faible taille des populations et leur hétérogénéité rendent difficile, pour le moment, les interprétations des conclusions et la pertinence des applications cliniques de ces techniques.

2.1.2 Avantages et inconvénients des différentes techniques utilisées *in vitro*

La RMN et la SM présentent des avantages et des inconvénients (Tableau 3).

La CL-MS permet d'avoir la plus grande vision du métabolome mais la quantification des métabolites est parfois difficile, contrairement à la CG-MS. Ces deux techniques sont donc souvent utilisées conjointement afin de profiter des avantages de l'une et de l'autre.

Elles ont une limite de détection inférieure à celle de la RMN. Les inconvénients majeurs de la SM sont la nécessité d'une préparation longue de l'échantillon et l'absence de possibilité de réutilisation de celui-ci contrairement à la RMN.

En ce qui concerne l'exploration du métabolome, chacune des techniques permet la détection d'un nombre plus ou moins important de métabolites (Figure 8).

Tableau 3 : Avantages et Inconvénients des différentes techniques d'analyse *in vitro*

Technologie	Avantages	Inconvénients
RMN	Quantification possible Rapidité Possibilité de réutilisation de l'échantillon Brièveté de préparation de l'échantillon Applicable à tous les types d'échantillons biologiques (liquides ou tissus) Possibilité d'identification de nouveaux métabolites	Limite de détection de l'ordre du μM Coût du spectromètre important Pas de détection possible des composés inorganiques Pas de détection possible des composés sans proton Nécessité d'un volume d'échantillon d'au moins 0,1ml
CG-MS	Coût faible Quantitatif Volume d'échantillon nécessaire faible Limite de détection de l'ordre du nM Détection des composés organiques Détection des composés inorganiques Excellente reproductibilité	Echantillon non réutilisable Préparation fastidieuse de l'échantillon Lenteur du processus Identification difficile de nouveaux métabolites
CL-MS	Limite de détection la plus faible de toutes les techniques Détection des composés organiques Détection des composés inorganiques Quantité d'échantillon très faible Détection du plus grand nombre de métabolites	Echantillon non réutilisable Coût du spectromètre important Nécessite une préparation de l'échantillon Reproductibilité médiocre Identification difficile de nouveaux métabolites

En RMN, les métabolites identifiables ont un poids moléculaire inférieur à 1500 Da. Les plus grosses molécules, les hormones et certains peptides ne sont, quant à eux, pas visibles. Le principal inconvénient de la RMN est la limite de détection, comme déjà évoqué ci-dessus. En effet, la limite de détection de la RMN est comprise entre 1 et 10 μM en ^1H RMN à 500 MHz. Elle est moindre avec la nouvelle génération de spectromètres, avec des champs magnétiques de plus grande intensité et avec l'utilisation de sondes cryogéniques.

Cette limite de détection de la RMN est souvent décriée mais n'est pas un réel problème pour l'analyse des composés endogènes ; en effet, la plupart de ces composés ont

une concentration de l'ordre du milli-molaire dans les liquides biologiques ou les tissus, ce qui permet d'obtenir un profil des composés accumulés de qualité suffisante pour la détection de déviations anormales des voies métaboliques. En revanche, pour les xénobiotiques, cette limite de détection de la RMN peut être insuffisante.

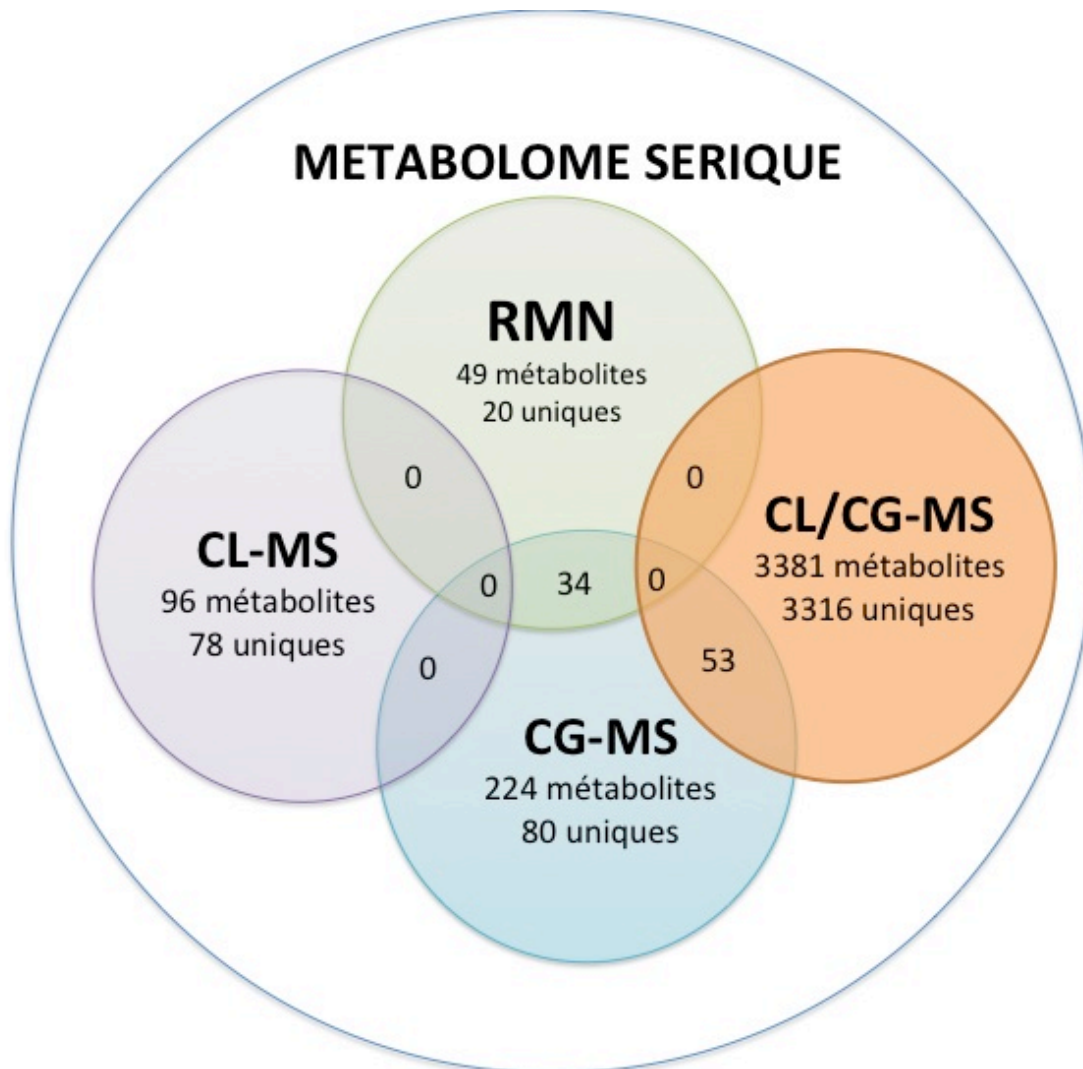


Figure 8 : Analyse du métabolome sérique

Représentation schématique, pour chaque technique, du nombre global de composés détectés dans le sérum, du nombre de composés détectés uniquement par une technique seule, et du nombre de composés détectés en commun pour les différentes techniques. Les différentes techniques analytiques : Chromatographie Liquide (CL), Chromatographie gazeuse (CG), l'association des deux techniques (CL/CG) et la RMN permettent d'identifier plus de 4000 métabolites. Adapté d'après ²¹

Elle ne permet pas la détection de nombreux petits peptides ou hormones.

En pratique, il convient surtout de ne pas opposer ces techniques. Chacune apporte des informations différentes qui sont le plus souvent complémentaires. L'association des deux plateformes peut permettre d'identifier et de définir de nombreuses voies métaboliques. Cependant, à l'heure actuelle, peu d'équipes encore ont travaillé en utilisant ces méthodes de façon concomitante.

2.2 Analyse des données en métabolomique

Les spectres obtenus en métabolomique, soit directement pour la SM, soit après transformation du signal en RMN, correspondent à des centaines de milliers de données par échantillon. L'analyse de ces données nécessite d'utiliser des outils mathématiques et statistiques adaptés à cette quantité de données. Deux approches sont possibles *in fine* dans l'analyse des données. La première est la chimiométrie. Elle permet la classification des différents échantillons sur la base des profils métaboliques et la création de modèles statistiques. Elle permet la recherche de biomarqueurs ou de profils correspondant à un groupe ou un autre.

La seconde approche est fonctionnelle. Elle correspond à une analyse des différents réseaux métaboliques ou plus particulièrement à la fluxomique lorsqu'elle est appliquée spécifiquement à la métabolomique associée à un marquage isotopique comme le ^{13}C par exemple. Elle permet ainsi d'obtenir des cartes représentant la distribution quantitative des flux dans un réseau métabolique du système biologique étudié ²². Elle peut être appliquée à toutes les approches « omiques ». Elle permet l'approche quantitative des réponses adaptatives entre les différences approches « omiques ».

Les données obtenues en RMN ou en SM sont bien trop nombreuses pour faire appel aux méthodes usuelles d'analyses univariées et de représentations statistiques.

Les 3 principales étapes permettant l'analyse des données communes à la RMN et la SM sont résumées dans le Tableau 4.

2.2.1 Réalisation et traitement des spectres en RMN

Après l'acquisition des données RMN et l'obtention d'un spectre, 3 étapes majeures sont nécessaires pour obtenir des résultats interprétables²³.

L'obtention du spectre passe d'abord par une transformation mathématique du signal recueilli en utilisant une transformée de Fourier (Figure 4E et F) ; puis le signal subit ensuite d'autres transformations. La première étape est le phasage, qui correspond le plus souvent à une correction manuelle de la phase sur l'ensemble des spectres obtenus. Elle est suivie par la correction de la ligne de base qui utilise une méthode mathématique permettant d'homogénéiser la base des signaux entre les différents échantillons en ramenant les lignes de base des signaux à zéro, afin de permettre d'intégrer de façon fiable les aires des signaux. Une fois la correction de ligne de base effectuée, les spectres doivent être calibrés car l'échelle est relative puis sont alignés. Cet alignement corrige des variations de déplacement chimique dues à des propriétés physicochimiques variables des échantillons (pH le plus souvent). Une condition importante pour la bonne réalisation de l'analyse est un alignement parfait des spectres. Il existe des variations des déplacements chimiques de certains métabolites, y compris dans les zones physiologiques de pH. Des méthodes de réaligement des différentes parties des spectres sont alors nécessaires (Figure 9)^{24, 25}. Enfin, une segmentation de l'ensemble du spectre en « bucket » de largeur fixe est pratiquée suivie d'une intégration pour chaque « bucket ». Les zones non intéressantes des spectres ainsi découpés peuvent être éliminées de l'analyse comme l'eau

ou l'urée (Figure 10).

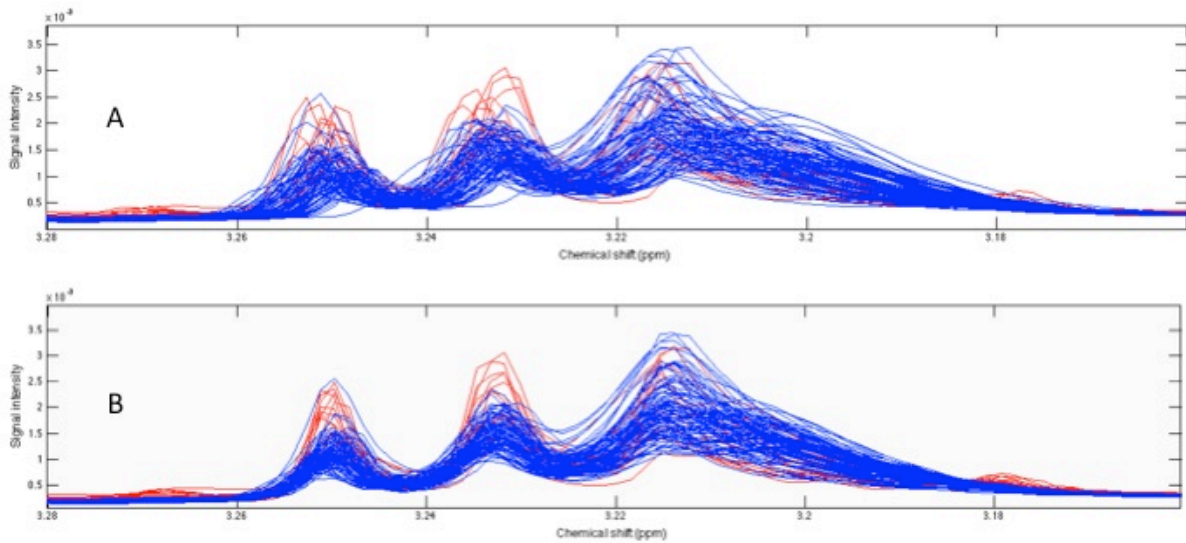


Figure 9 : Réalignement des spectres

Exemple de réalignement des spectres de sérum de patients cirrhotiques en utilisant un algorithme. La figure représente la même partie de la région comprise entre 3,28 ppm et 3,16 ppm du spectre, avant (A) et après alignement (B).

Le découpage de tous les spectres permet de construire une matrice dans laquelle figurent en colonnes les intégrales de chaque « bucket » nommé par leur déplacement chimique et en lignes les échantillons.

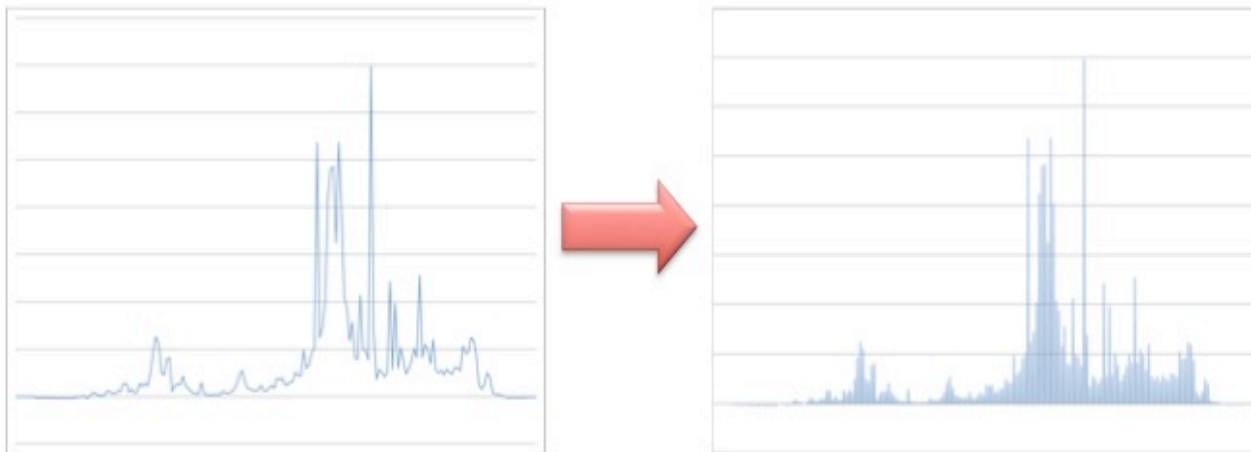


Figure 10 : Découpage des spectres

Le spectre de chaque prélèvement est découpé en colonne de largeur égale ou « Bucket ». L'aire sous la courbe des « buckets » est mesurée puis intégrée dans une matrice permettant l'analyse statistique.

L'analyse des données est faite à l'aide de programmes dit de chimiométrie. Celle-ci est pratiquée selon les étapes décrites dans le Tableau 4.

En RMN, l'ajout d'une référence dont les propriétés physicochimiques (déplacement chimique, nombre de pics, nombre de protons, poids moléculaire et quantité) sont parfaitement connues comme le fumarate, ou l'acide TrimethylSilylPropionate permet d'obtenir une quantification des métabolites. L'intensité des signaux étant proportionnelle à la concentration du métabolite et à la concentration de la référence connue, cela permet de pouvoir quantifier de façon absolue les différents métabolites trouvés dans le spectre.

Tableau 4 : Principales étapes de l'analyse des données en métabolomique

PRE-TRAITEMENT	ANALYSES STATISTIQUES	INTERPRETATION
Normalisation Opération mathématique permettant d'homogénéiser les échantillons	Méthodes univariées : Tests paramétriques (ANOVA, z-test, t-test) ou Tests non-paramétriques (Kruskal-Wallis) selon que la distribution soit gaussienne ou pas	Intérêt Diagnostic Biomarqueur Tout ou partie du profil Métabolique
Centrage Opération mathématique permettant de décaler le centre de gravité des variables à zéro pour un ensemble d'échantillons	Méthodes multivariées Non-Supervisée : ACP, HCA Supervisée : PLS, LDA, forêt aléatoire	Physiopathologique Voie métabolique perturbée
Autoscaling Opération mathématique permettant d'obtenir des variables centrées-réduites de variance égale à un pour chaque variable	Visualisation graphique Score plot, loading plot, coefficient plot, VIP	
Valeurs manquantes Données de la matrice non-disponibles pour l'analyse	Validation Paramètres de validation et de robustesse du modèle : Q ² , R ² , test de permutation, CV-ANOVA	
Valeurs aberrantes « Oultiers » Echantillons ou variables qui dévient de la distribution de la majorité des données		

Notes : ACP : analyse en composante principale ; HCA : classification hiérarchique ; PLS : régression par les moindres carrés partiels ; LDA : analyse discriminante linéaire ; VIP : variable importance ; ANOVA analyse de variance

2.2.1.1 Identification des métabolites

On estime actuellement à plus de 7800 le nombre de métabolites présents dans le métabolome humain²⁶. Cependant, l'identification de nombreux métabolites est encore incomplète et les bases de données actuelles n'incluent pas de nombreux lipides, drogues et leurs métabolites, nutriments ainsi que les métabolites issus des interactions avec la flore microbienne intestinale^{27, 28}.

Plus de 4000 composés ont été identifiés, quantifiés et validés dans le sérum et/ou le plasma en utilisant les différentes techniques décrites précédemment²¹.

De nombreuses bases de données ont vu le jour ces dernières années essentiellement pour la SM, permettant une identification plus rapide et facile des différents métabolites²⁸⁻³³. Il existe trois principales bases de données pour la RMN accessibles et gratuites sur internet : Madison Metabolomics Consortium Database ^{29, 30}, Biological Magnetic Resonance Data Bank ³¹ et Human Metabolome Database ^{26, 32, 33}.

En RMN, outre les bases de données qui se sont développées ces dix dernières années, les caractéristiques chimiques des métabolites permettant leur identification ont initialement été décrites par plusieurs équipes dans différents liquides biologiques : le sérum ou le plasma ^{34, 35}, l'urine ^{36, 37}, le liquide céphalorachidien ^{38, 39}.

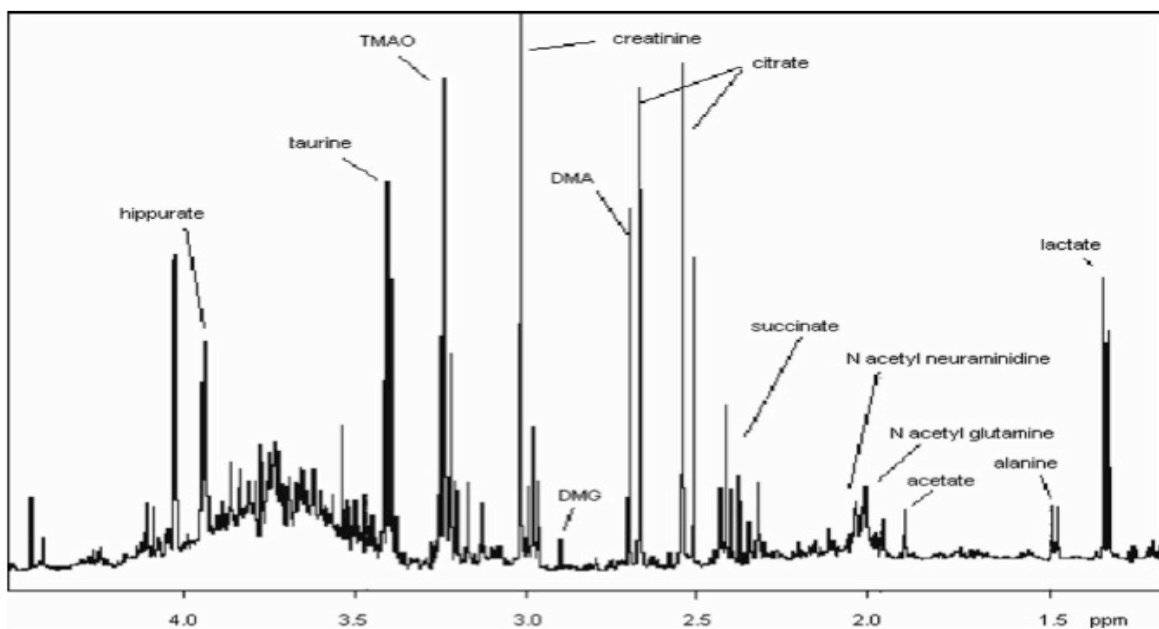


Figure 11 : Spectre d'urine et principaux métabolites

Exemple de spectre d'urine de rat. Les métabolites endogènes ou exogènes sont identifiés en fonction de leur déplacement chimique, du nombre et de la forme des pics (ou multiplicité). Le spectre total va de 0 à 9 ppm. Un grandissement de la zone 0 à 4,5 ppm est présenté avec une identification des métabolites. D'après ⁴⁰.

La grande majorité des métabolites en RMN sont identifiables en 1D par leurs caractéristiques chimiques desquelles dépendent les caractéristiques de leur résonance : déplacement chimique, forme et nombre de leurs pics (Figures 5 et 11). De plus, de

nombreux logiciels sont maintenant à disposition des chercheurs pour améliorer la reconnaissance des différents métabolites, souvent en association avec les bases de données précédemment évoquées ⁴¹.

2.2.1.2 Principaux métabolites indentifiables en RMN

De nombreux métabolites sont identifiables dans les différents liquides biologiques en RMN. Ils correspondent à des composés endogènes ou exogènes, et sont soit des composés intermédiaires ou finaux d'une voie métabolique, soit des composés non encore métabolisés ou non métabolisables. Dans le Tableau 5 sont décrits des exemples de métabolites classiquement détectés en ¹H RMN.

Tableau 5 : Exemples de métabolites détectés en RMN

Nom	δ (ppm), multiplicité, H	Type de métabolite	Remarques	
HDL	0,68m	C18	Lipoprotéine	Non visible en CPMG
LDL	0,86t	CH ₃ (CH ₂)	Lipoprotéine	
VLDL	0,89m 1,27m 1,31m 1,59m	CH ₃ CH ₂ CH ₂ C= (CH ₂) CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO CH ₂ CH ₂ CO	Lipoprotéine	
Leucine	0,99d 1,73m 3,71dd	δCH ₃ βCH ₂ αCH	Acide aminé branché	
Isoleucine	0,95t 1,02d 1,49m	δCH ₃ βCH ₃ CH ₂	Acide Aminé branché	
Valine	0,99d 1,04d 3,59d	CH ₃ CH ₃ αCH	Acide Aminé branché	
Lactate	1,35d 4,13q	CH ₃ CH	Acide organique	↑ métabolisme anaérobie
Glutamine	2,10m 2,43m 3,70t	βCH ₂ γCH ₂ αCH ₂	Acide Aminé	Transporteur de NH ₃ entrant dans le cycle de l'urée : ↑ lors des anomalies du cycle de l'urée
Glutamate	2,02m 2,16m 2,38m	βCH ₂ βCH ₂ γCH ₂	Acide Aminé	Cycle de l'urée
NAG	2,06s	NHCOCH ₃	-	Fonction N-Acetyl des glycoprotéines :
Acétate	1,93s	CH ₃	Corps cétonique	Métabolisme des corps cétoniques
Beta-hydroxybutyrate	1,22d 2,33m 2,40m 4,15m	γCH ₃ αCH ₂ αCH ₂ βCH	Corps cétonique	Métabolisme des corps cétoniques
Pyruvate	2,38s	CH ₂	Acide organique	Produit final de la dégradation du glucose Métabolite clé de plusieurs voies métaboliques
Créatinine	3,07s 4,07s	CH ₃ CH ₂	-	Produit de dégradation de la créatine
Choline	3,23s	N(CH ₃) ₃	Alcool Aminé	Entre dans la composition de nombreux lipides (phospholipides)

Exemples de métabolites détectés en RMN dans le sérum et/ou l'urine et leur voie métabolique ou signification. D'après ³⁴⁻³⁷

HDL : High Density Lipoprotein ; LDL : Low Density Lipoprotein ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein ;

s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; dd : doublet de doublet ; m : multiplet

2.2.1.3 STOCSY

Des méthodes statistiques ont été récemment introduites permettant d'obtenir des informations structurales d'après les spectres 1D en RMN ou en SM. L'utilisation de la spectrométrie totale par corrélation statistique (« Statistical Total Correlation Spectroscopy », STOCSY) peut permettre soit d'identifier les métabolites à partir des données de la RMN soit d'identifier des métabolites variant dans le même sens ou dans le sens opposé (Figure 12)^{42, 43}. Une méthode annexe, nommée hétérospectrométrie statistique (« Statistical Heterospectroscopy ») a été utilisée pour intégrer les données en SM et RMN et améliorer la reconnaissance des différents métabolites ⁴⁴. Encore plus récemment, une nouvelle approche a été présentée, la spectrométrie par diffusion statistique commandée (« Statitical diffusion-ordered spectroscopy », S-DOSY), laquelle associe la RMN par diffusion ordonnée avec la STOCSY pour l'analyse de liquides complexes⁴⁵.

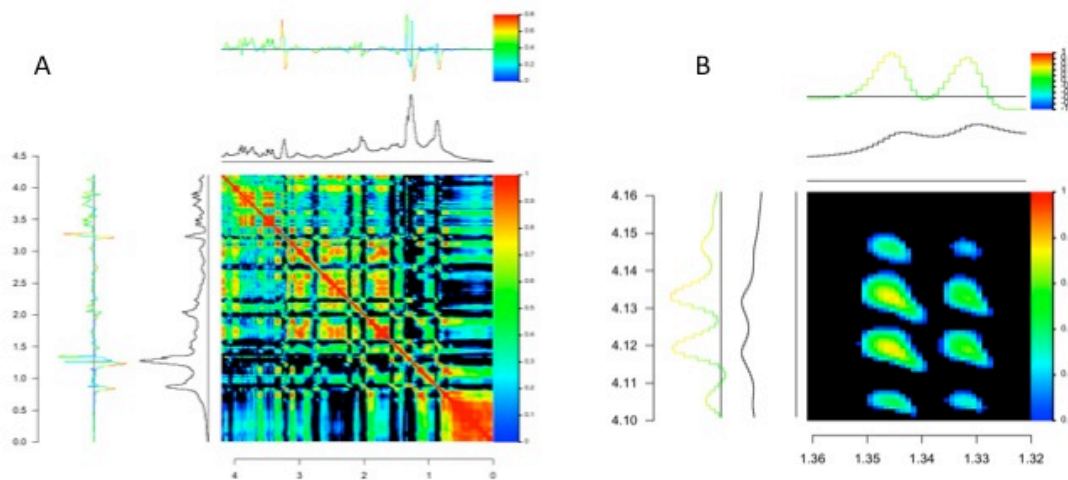


Figure 12 : STOCSY

Exemple de STOCSY réalisé à partir des données des loadings plot de patients présentant des degrés de sévérité différents d'insuffisance hépatique. A gauche, l'ensemble de la STOCSY (A) dans la région comprise entre 0 et 4 ppm. Les couleurs indiquent le degré de corrélation entre les axes verticaux et horizontaux. A droite, un grossissement sur deux régions, entre 1 et 2 ppm et 3,5 et 4,5 ppm. Cette image montre la forte corrélation entre le doublet à 1,32 ppm et le quadriplet à 4,12 ppm du lactate.

2.2.2 Analyses statistiques

Les analyses statistiques multivariées sont un ensemble de méthodes destinées à synthétiser l'information issue d'un grand nombre de variables afin d'en simplifier la représentation et l'interprétation. Elles permettent, lorsqu'elles sont appliquées à la métabolomique, de révéler l'importance d'une variable discriminante qui aurait été ignorée lors d'une analyse univariée. Les données obtenues sont mises sous la forme d'une matrice $N \times D$ où N correspond à l'échantillon et D aux variables (déplacement chimique le plus souvent en RMN). Le nombre de variables est, contrairement aux études usuelles en médecine, bien supérieur au nombre d'échantillons. L'approche statistique traditionnelle testant individuellement chaque métabolite est possible mais les analyses multivariées sont

le plus souvent préférées et beaucoup plus informatives.

Une approche moderne dans l'analyse des données en métabolomique consiste en la réalisation et la description d'empreintes métabolomiques (« metabolomic fingerprints »)⁴⁶.

2.2.2.1 Analyses statistiques multivariées non supervisées

2.2.2.1.1 Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) est la plus utilisée des analyses multivariées non supervisées ⁴⁷. Elle repose sur l'analyse sans *a priori* des variables à forte variance, permettant de séparer des groupes d'individus dans un espace réduit à deux ou trois composantes. L'ACP est donc une méthode statistique descriptive permettant de représenter un grand nombre de données de façon synthétique, en mettant en avant celles qui sont les plus représentatives de la matrice initiale. Les variables qui contribuent à la séparation des groupes ne sont pas systématiquement discriminantes en ACP : leur grande variance peut être due à une grande variabilité du métabolite au sein même d'un groupe.

2.2.2.1.2 Classification hiérarchique

D'autres analyses multivariées non supervisées sont utilisées mais dans une moindre mesure, telles que la clustérisation hiérarchique ou la « non-linear mapping »⁴⁷.

2.2.2.2 Analyses statistiques multivariées supervisées

2.2.2.2.1 Régression par les moindres carrés et analyses discriminantes (PLS, PLS-DA, OPLS)

La méthode statistique multivariée supervisée la plus courante demeure la PLS (Partial Least Squares) ⁴⁷. Les objectifs de la PLS sont à la fois d'avoir la meilleure prédiction tout en tenant compte d'un maximum de variabilité des variables X. Cette méthode prend

en compte l'appartenance des individus Y à un groupe prédéfini (malades *versus* témoins, par exemple).

La PLS-DA (« Partial Least Squares-Discriminant Analysis ») permet de décrire de manière optimale l'appartenance des groupes prédéfinis d'individus Y à partir de variables prédictives X (matrice de données initiales). Cette méthode permet donc de mettre en évidence les variables discriminantes entre les groupes.

Une méthode de filtrage des données par OSC (« Orthogonal Signal Correction ») peut être réalisée afin d'éliminer les variables X qui ne sont pas corrélées aux variables Y, facilitant ainsi l'interprétation et la visualisation des résultats. Cette méthode conduit parfois à une trop grande élimination de la variabilité de X qui n'est pas corrélée à Y, ce qui se traduit par des modèles statistiques expliquant parfaitement les données utilisées pour construire le modèle mais ne permettant pas de prédire correctement de nouvelles données. L'OSC est réalisée avant la PLS.

L'OPLS est une méthode combinant en une seule étape les objectifs de l'OSC et de la PLS, ce qui permet la réalisation de modèles plus prédictifs.

La PLS, tout comme l'OPLS, crée à partir des variables X un modèle prédictif d'appartenance (ou non) des individus Y au groupe prédéfini. Ces méthodes sont validées par deux paramètres : R^2 (X et Y) et Q^2Y , où R^2 représente la variance explicative de la matrice de variables X et de groupe Y, et Q^2Y estime la prédictibilité du modèle. Pour que le modèle soit considéré comme prédictif et les résultats de séparation(s) comme significatifs, ces deux valeurs doivent être le plus proche possible de la valeur 1. Classiquement et arbitrairement, un $Q^2Y > 0.5$ est considéré comme une bonne valeur pour la prédictibilité ⁴⁸.

Les modèles doivent être validés de façon interne soit par un test de permutation soit par une CV-ANOVA. L'objectif du test de permutation est de confirmer que le modèle

initial est supérieur à d'autres modèles réalisés en permutant de manière aléatoire les éléments de la matrice de groupe Y. L'objectif de la CV-ANOVA est de vérifier que l'erreur associée à la prédiction de la régression linéaire PLS ou OPLS est significativement plus petite que les variations de Y autour de sa moyenne.

2.2.3 Représentations visuelles : les cartes factorielles

Les statistiques multivariées permettent de représenter les données originales (individus et variables) dans un espace de dimensions inférieures à l'espace d'origine, tout en limitant au maximum la perte d'informations. La représentation des données dans des espaces de faibles dimensions facilite considérablement l'analyse. Pour cela, un changement de coordonnées est effectué afin de définir de nouveaux axes, appelés composantes principales, qui concentreront la plus grande partie de la variabilité des échantillons. Les composantes principales, extraites pour décrire la collection de données (variables expérimentales), sont classées en fonction de l'importance de la variabilité globale du jeu de données qu'elles expliquent. La première composante extrait la plus grande source de variance, la seconde composante, orthogonale à la première, extrait la plus grande source de variance de ce qui reste à expliquer, et ainsi de suite, si bien que les dernières composantes contiennent surtout le bruit aléatoire. En pratique, les deux ou trois premières composantes permettent souvent d'expliquer plus de 90 % de la variance totale.

2.2.3.1 Cartes factorielles du poids des observations ou Score Plots

Les données sont présentées sous forme de cartes factorielles des individus ou «score plots », qui correspondent aux coordonnées des échantillons dans le nouveau repère. Les échantillons appartenant à un même groupe sont proches les uns des autres. Les scores plots permettent donc de visualiser de façon synthétique l'ensemble des données de la

matrice initiale. Ils correspondent à la projection des données initiales dans un espace de dimensions réduites (2 ou 3 dimensions) ce qui permet une visualisation de l'ensemble des données (Figure 13).

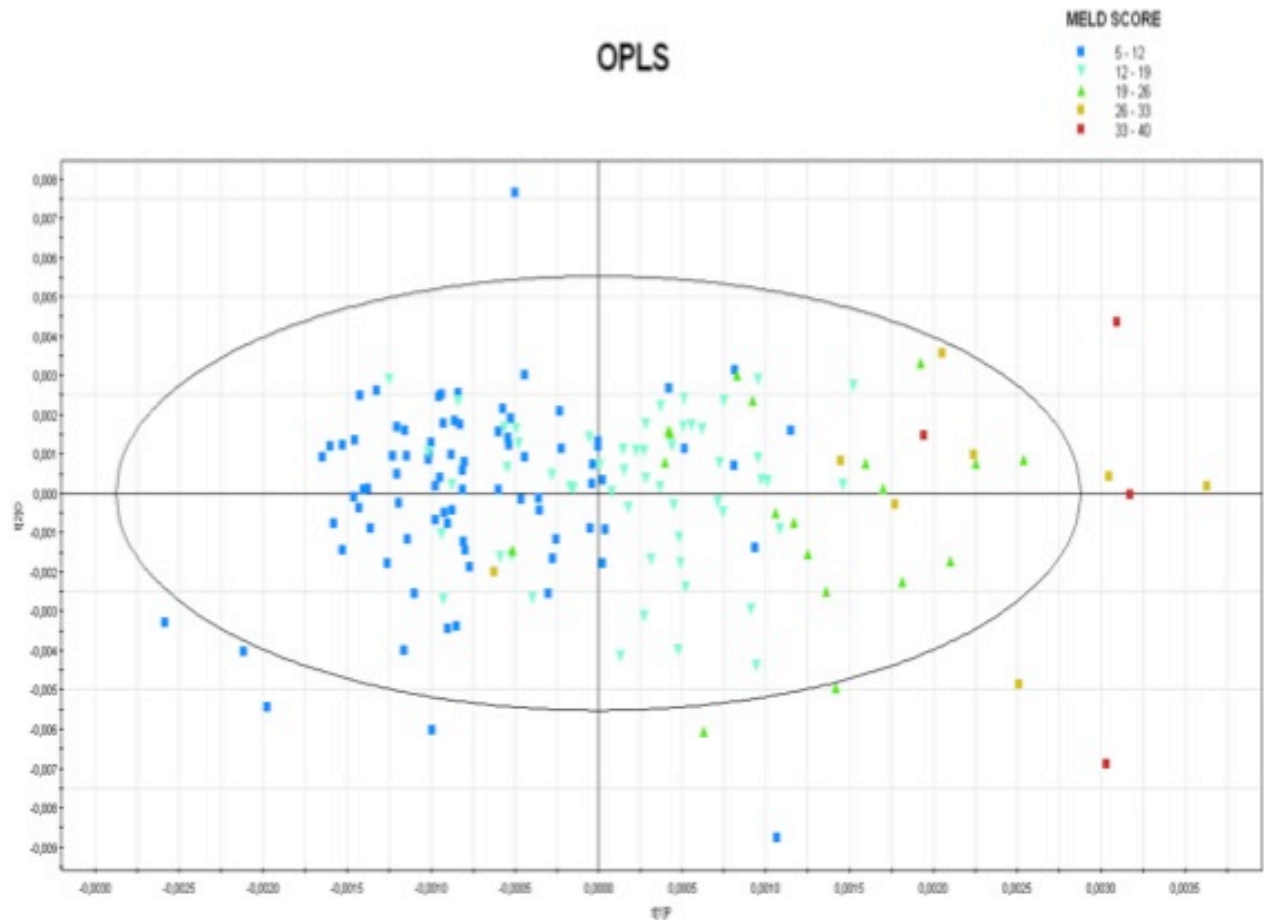


Figure 13 : Exemple de Carte « score plot »

Représentation en deux dimensions de la carte. Chaque carré représente le sérum d'un patient cirrhotique. Les patients se séparent de droite à gauche en fonction de la gravité de leur cirrhose estimée par un score biologique. Les patients à droite de la carte ont les cirrhoses les moins graves et à gauche les cirrhoses les plus graves.

2.2.3.2 Carte factorielle du poids des variables ou Loading plot

Quel que soit le type d'analyse, supervisée ou non, les variables du modèle peuvent être visualisées sous forme de carte factorielle du poids des variables ou loading plot. Celle

ci permet de mettre en évidence les principales variables responsables de la séparation des différents groupes dans le score plot (Figure 14).

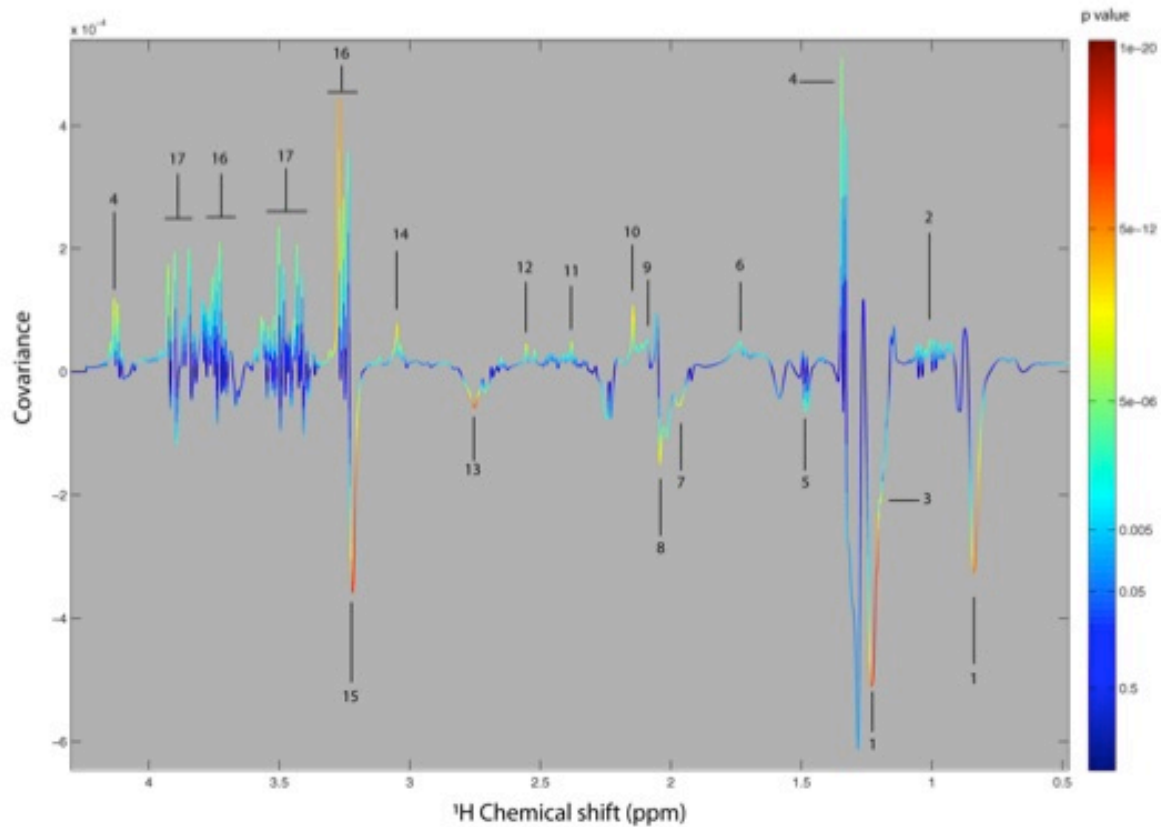


Figure 14 : Exemple de « Loading plot »

Exemple de carte représentant le poids des variables de patients présentant des degrés différents de gravité de leur cirrhose. Les différents métabolites présents de façon significative ou non sont identifiés par leurs déplacements chimiques. Les signaux « positifs » correspondent aux différents métabolites présents chez les malades les plus gravement atteints tandis que les signaux « négatifs » correspondent à des métabolites présents chez les malades les moins graves. D'après ⁴⁹

1 : HDL ; 2 : Leucine-Isoleucine ; 3 β -hydroxybutyrate ; 4 : Lactate ; 5 : Alanine ; 6 : Leucine ; 7 : Acétate ; 8 : *N*-acetyl-glycoprotéine ; 9 : Glutamine ; 10 : Methionine ; 11 : Pyruvate ; 12 : Citrate ; 13 : Lipides ; 14 : Créatinine ; 15 : Choline et Phosphocholine ; 16 : β -Glucose ; 17 : α -Glucose

2.2.4 Validations des modèles

Les différents modèles obtenus dans les études métabolomiques nécessitent d'être validés. Cette validation est dite « interne » et « externe ».

La validation interne est nécessaire aussi bien pour les analyses supervisées que non supervisées. Elle permet d'optimiser les différents paramètres en fonction du type d'analyse utilisée (nombre de variables latentes en PLS par exemple). Si elle est nécessaire, elle n'est pas suffisante pour valider entièrement le modèle.

Afin d'être validé, le modèle nécessite une validation « externe ». Celle-ci est maintenant bien définie ²³. Schématiquement, les données doivent être séparées en trois groupes : un pour la création du modèle, un pour la vérification du modèle et un pour l'utilisation du modèle.

2.3 Reproductibilité de la RMN

Durant la dernière décennie, la métabolomique basée sur la RMN a été appliquée à différents domaines notamment dans l'étude des variations physiologiques, en toxicologie, en pathologie humaine et plus récemment dans l'étude des réponses thérapeutiques à des médicaments.

Pour toutes ces applications, il est primordial que la technologie analytique soit reproductible, aussi bien en ce qui concerne l'effet métabolique des maladies, que les effets des traitements ou l'analyse dans l'interprétation des données de variations intra et interindividuelles.

Deux grandes études ont été utilisées pour valider la reproductibilité des plateformes de métabolomique. La première est une étude de l'urine de volontaires sains sur trois continents différents, Japon, Chine et USA, regroupant près de 1000 échantillons

(INTERMAP study)⁵⁰; la seconde est une étude de toxicologie chez l'animal (COMET project)

1.

3 Etat de l'Art

3.1 Applications précliniques de la métabolomique par RMN du proton

Depuis les années 80 du siècle précédent, la métabolomique par RMN du proton a fait l'objet de nombreuses études fondamentales « pré-cliniques », sur la cellule ou l'animal et « cliniques » chez l'homme. Une grande majorité de ces études a porté sur la recherche et le développement pharmaceutique avec la caractérisation de l'effet recherché du médicament et surtout l'évaluation de sa toxicité rénale et hépatique. Cette dernière a fait l'objet d'un consortium de laboratoires pharmaceutiques utilisant des plateformes de métabolomique : le projet COMET.

La RMN a été utilisée dans des branches fondamentales de la biologie notamment pour l'identification des structures de différentes molécules mais aussi sur des lignées cellulaires pour étudier le métabolisme de ces cellules et l'action de différentes drogues, ou bien encore sur des microorganismes comme les bactéries pour en étudier le métabolisme et les voies de résistance à certaines drogues, et enfin sur des modèles animaux. Les études sur l'animal, rongeurs ou autres, ont été utilisées pour servir de modèle dans de nombreuses situations, comme le sepsis expérimental, la cancérologie, la chirurgie, ou la transplantation avant d'être appliquées à l'homme.

3.2 Passage de la paille au lit du patient

L'origine de la métabolomique date de plusieurs décennies mais la multiplication des applications chez l'homme est beaucoup plus récente. Nicholson *et al.* ont défini la métabolomique dans la fin des années 90, mais l'étude des métabolites par SM ou RMN est beaucoup plus ancienne. Les premiers spectres datent des années 50 et les premières études des années 70 avec l'apparition des premiers spectromètres RMN à haut champ. Cependant, par rapport aux autres techniques « omiques », comme la génomique ou la protéomique, elle reste un tout nouveau champ permettant l'exploration finale des métabolismes et leurs perturbations. Ainsi, la métabolomique prend une place de plus en plus importante dans l'étude des systèmes biologiques du fait de la possibilité, en un seul examen de détecter un ensemble important de métabolites. Après avoir identifié complètement le génome, les chercheurs se sont de plus en plus penchés sur les modifications phénotypiques induites par l'environnement, l'exposition à des xénobiotiques (médicaments, toxiques chimiques) ou à l'apparition d'états pathologiques. Ainsi la place de la métabolomique dans l'analyse d'une influence extérieure ou génétique est devenue primordiale. Par ailleurs, les stratégies thérapeutiques ont évolué, avec le passage d'un traitement généraliste codifié d'une maladie à un traitement de plus en plus ciblé et adapté à un individu et non à un groupe d'individus. Cette nouvelle voie a ouvert tout un nouveau champ d'application pour la métabolomique avec la pharmaco-métabolomique⁵¹ et les approches moléculaires phénotypiques pour différents traitements ou prises en charge⁵². Cependant, il n'existe pas encore de nos jours d'application clinique en « routine » de la métabolomique chez l'homme.

3.3 Applications cliniques de la métabolomique par RMN du proton

Les applications cliniques de la métabolomique par RMN du proton se sont développées dans toutes les spécialités médicales. A tous les stades du développement de la maladie et de son traitement, la métabolomique a un intérêt (Figure 15). En pathologie, l'étude du métabolome peut permettre de classer des populations en fonction de facteurs de risque ou de prédisposition, du stade du diagnostic (précoce ou tardif), ou des conséquences de la maladie ou de sa gravité ; elle peut permettre aussi d'évaluer la réponse à un traitement et la toxicité de celui-ci. L'utilisation de la métabolomique pour rechercher des biomarqueurs spécifiques d'une maladie, de sa gravité, ou prédictifs de l'évolution de celle-ci, s'est développée de façon importante ces dix dernières années. De nombreux biomarqueurs ont été identifiés mais aucun, à ce jour, n'est encore utilisé au quotidien. Pour être validés, ces nouveaux biomarqueurs nécessitent des études prospectives sur des cohortes importantes de malades ⁵³.

Les études portant sur de potentielles applications de la métabolomique sont de plus en plus nombreuses, touchant quasiment toutes les spécialités médico-chirurgicales, qu'elles soient *in vivo* (SRM) et/ou *in vitro* (RMN). Nous donnerons quelques exemples pertinents pour le clinicien sur l'approche métabolomique par RMN *in vitro* des liquides biologiques.

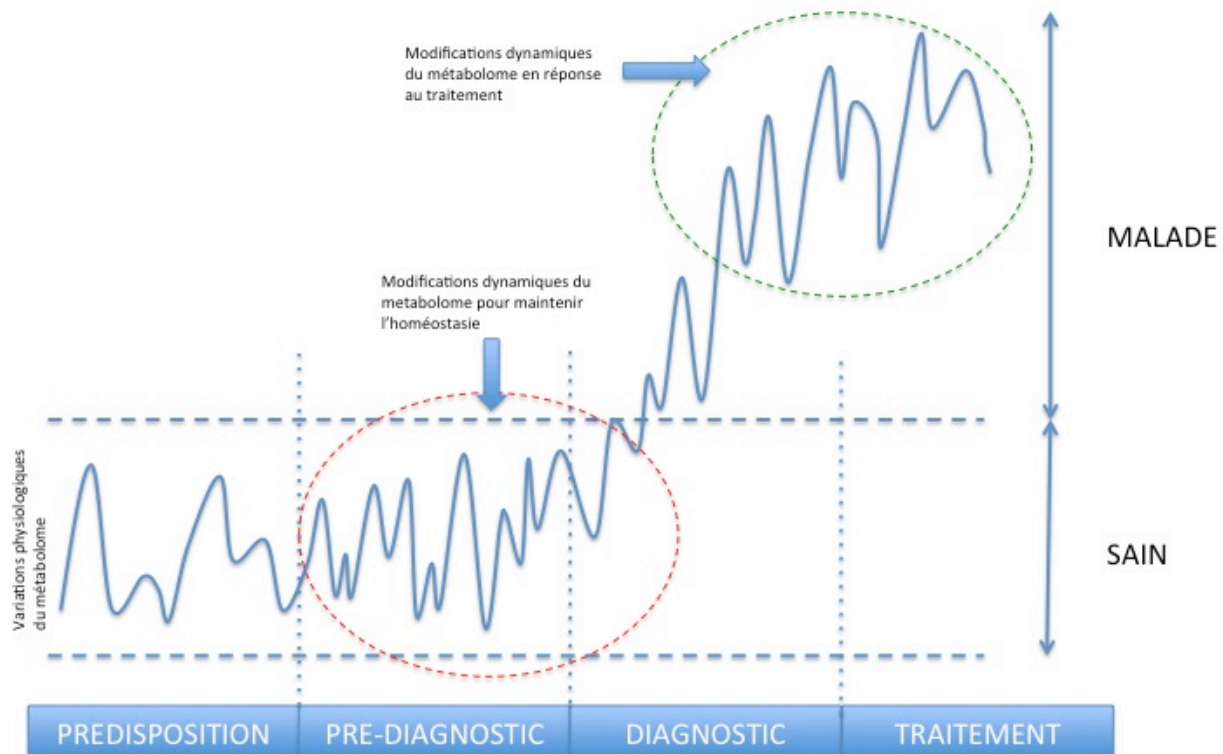


Figure 15 : Champs d'applications de la métabolomique chez l'homme

Représentation schématique des applications potentielles de la métabolomique par ¹H RMN pour l'analyse du métabolome: modifications physiologiques, physiopathologiques en réponse à une agression ou à l'installation d'une maladie, modifications en rapport avec la maladie, modifications tardives induites par la maladie ainsi que par le traitement (réponse thérapeutique, toxicité).

3.3.1 Variations physiologiques du métabolome et influence environnementale

Une notion importante à prendre en compte pour la métabolomique est la variation du métabolome en fonction du temps et sous l'effet de facteurs externes. Ces variations en fonction du moment de la journée, du stress, du genre, de l'âge et d'autres facteurs ont été bien montrées chez l'animal⁵⁴. Chez l'homme, lorsqu'on analyse le métabolome urinaire de patients de pays différents, comme dans le projet INTERMAP⁵⁵, en utilisant une

hiérarchisation par cluster, les patients des mêmes pays sont correctement classés en fonction du profil du métabolome urinaire. D'autres études moins ambitieuses que la précédente ont montré une influence du mode de vie sur les profils urinaires⁵⁶. Une autre information importante à ne pas méconnaître est la variation possible du métabolome secondaire aux interactions avec la flore microbienne intestinale (microbiote), notamment dans l'étude des médicaments⁵⁷.

Cependant, les fluctuations physiologiques, biologiques ou physiques, qui sont des facteurs confondants, peuvent être prises en compte lors de l'analyse statistique des données, et ainsi permettre de minimiser ou d'éliminer ces fluctuations⁵⁸. Une autre solution est d'avoir une analyse dynamique à partir de prélèvements séquentiels des liquides biologiques ou tissus à différents temps, permettant de déceler ce qui correspond à une variation physiologique intra et interindividuelle ou physiopathologique⁵⁹.

3.3.2 Erreurs innées de métabolisme

L'exploration des erreurs innées du métabolisme (EIM) est un exemple typique de l'utilisation de la métabolomique dans sa relation « génotype-phénotype ». Les EIM forment un groupe important de maladies génétiques. La grande majorité de ces maladies est due à une anomalie quantitative ou qualitative d'une enzyme non ou mal codée dans le génome. Dans les EIM les signes cliniques de la maladie sont donc la plupart du temps en rapport avec l'accumulation d'un métabolite intermédiaire. Ces erreurs du métabolisme peuvent être bénignes ou avoir des conséquences graves soit dès la naissance, soit plus tard dans l'enfance ou à l'âge adulte.

Les principales EIM étudiées et détectables en RMN sont les anomalies des acides aminés comme la phénylcétonurie qui est la plus fréquente et qui est détectée dès la naissance ⁶⁰, les anomalies des sucres, les maladies lysosomiales ⁶¹, les anomalies des acides organiques, certaines anomalies du métabolisme des lipides dont la plus fréquente est le déficit en acyl-CoA déshydrogénase à chaîne moyenne ⁶² qui est responsable de mort subite chez l'enfant ou l'homme jeune, les anomalies des purines et pyrimidines ⁶³, et enfin d'autres EIM comme le syndrome de Fanconi ou le « Fish Odor Syndrome ». Ce dernier syndrome touche tous les âges et est caractérisé cliniquement par une mauvaise odeur secondaire à l'accumulation de triméthylamine (TMA). Elle est due à un déficit en une enzyme hépatique, la flavine mono-oxygénase 3 (ou FMO3). La RMN de l'urine est la méthode de choix pour affirmer le diagnostic en montrant une augmentation de la concentration de TMA et une élimination réduite de triméthylamine N-Oxyde (TMAO) (Figure 16) ⁶⁴. Certains patients ont un déficit partiel de l'enzyme nécessitant une dose de charge de TMA pour confirmer le diagnostic.

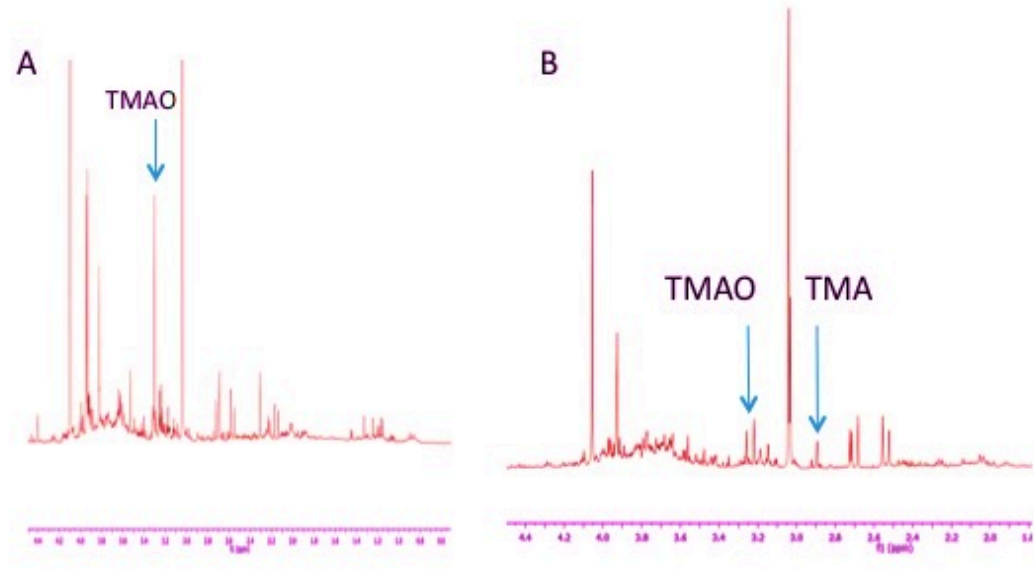


Figure 16 : Fish Odor Syndrome

(A) Spectre urinaire en RMN du proton d'urine de sujet contrôle, montrant le pic de TMAO sans pic de TMA. (B) Spectre urinaire d'un patient souffrant du « fish odor syndrome ». Le pic de TMAO est très diminué et il apparaît un pic de TMA, normalement non présent dans l'urine. *Données personnelles avec autorisation du Pr Le Moyec.*

3.3.3 Cardiologies et maladies vasculaires

Les maladies cardiovasculaires représentent une des premières causes de morbidité et de mortalité « prématurée » dans le monde occidental. La prédiction du risque, le diagnostic précoce non invasif de malades asymptomatiques sont des questions cliniques pertinentes pour lesquelles la RMN a été utilisée.

3.3.3.1 Prédiction du risque cardiovasculaire

La prédiction du risque cardiovasculaire est une notion importante en médecine préventive. Les données cliniques et biologiques standards les moins invasives actuelles

manquent de sensibilité pour cette prédiction. Il faut avoir recours à des examens plus invasifs comme l'angiographie afin de prédire ce risque. La prédiction d'un risque cardiovasculaire par RMN a été étudiée chez différentes populations. Barba *et al.* ont évalué la prédiction du risque d'ischémie lors de l'effort chez des patients suspects de maladie coronarienne ⁶⁵. Le sérum de 31 patients présentant une coronaropathie stable sans antécédent d'infarctus du myocarde a été prélevé avant la réalisation d'une épreuve d'effort. Deux groupes ont été définis en fonction de l'existence durant l'épreuve d'effort de l'apparition (n=22) ou non (n=9) d'une ischémie myocardique. Seulement 1 patient avec une coronaropathie stable et ayant présenté une ischémie à l'effort était mal classé. Kuller *et al.* ont étudié la relation entre la composition lipidique sérique par RMN et l'apparition d'incident cardiovasculaire chez les patients présentant une maladie coronaire avérée versus des patients sans maladie coronaire ⁶⁶. Leurs résultats ont montré une différence significative essentiellement sur les sous-classes de LDL (taille des particules et concentrations) notamment chez la femme malade par rapport aux témoins. D'autre part, l'implication de l'environnement et du type de flore bactérienne a été étudiée par Yap *et al.* qui ont mis en évidence des différences en terme de risque cardiovasculaire chez différentes populations⁶⁷. Holmes *et al.* ont montré, à partir de l'étude RMN de l'urine, l'association entre le type de nutrition et l'hypertension artérielle⁵⁵.

3.3.3.2 Diagnostic de la maladie coronarienne

La possibilité de faire un diagnostic non invasif de maladie coronarienne a été explorée par RMN. Brindle *et al.* ont étudié la spécificité de la RMN dans la prédiction du risque d'avoir une artériosclérose sévère⁶⁸. Le sérum de 36 patients ayant une coronaropathie tri-tronculaire (sténose coronaire de plus de 50% sur les trois principales

coronaires) et celui de 30 patients sans anomalie coronaire ont été inclus. En PLS-DA, les deux groupes étaient clairement séparés. La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 92 et 93%. Les auteurs ont alors appliqué cette méthode sur des patients présentant divers degrés de sténose coronaire (absence de sténose, 1, 2 ou 3 sténoses coronaires) retrouvant les mêmes résultats. La différence entre les deux groupes se trouvait essentiellement dans la région aliphatique des lipoprotéines autour de 1.33 ppm. Par contre, la RMN ne permettait pas de distinguer la gravité de l'atteinte coronaire (mono, bi ou tritronculaire).

Ces résultats sur la différence de profil lipidique chez les patients présentant ou non une maladie coronarienne ont été confirmés par d'autres études⁶⁶. Leur conclusion était la possibilité de pouvoir, à partir de la RMN de sérum, démontrer l'existence d'une maladie coronaire grave de façon non-invasive. L'étude de Brindle *et al* a ensuite été controversée^{69, 70}, mais il semblerait quand même que la différence de profil métabolique, notamment en ce qui concerne la région des lipoprotéines, serait une cause plutôt qu'une conséquence de la maladie. Pour répondre définitivement à cette question, une importante étude est en cours (MaGiCAD study)⁷¹.

3.3.4 Néphrologie

Les premières études dans le cadre des maladies rénales ont été faites sur des patients dialysés. Dans ces différentes études, le TMAO dans le plasma est clairement plus élevé lors des insuffisances rénales et bien corrélé au stade de l'insuffisance rénale⁷². L'analyse de l'urine de patients souffrant de glomérulonéphrite comparativement à des volontaires sains a permis de montrer l'intérêt de la RMN dans le diagnostic mais aussi dans

le pronostic des atteintes rénales ⁷³. De nombreux médicaments ont une toxicité rénale. La RMN de l'urine est alors un outil de choix dans le diagnostic précoce de l'atteinte rénale, souvent avant même que les lésions ne soient cliniquement parlantes. De plus, l'analyse urinaire par RMN montre, dans certains cas, une sensibilité plus importante que la biopsie rénale, et permet de déterminer le type de lésion rénale, tubulaire ou glomérulaire ⁷³. Notre équipe a étudié la toxicité des antibiotiques fortement néphrotoxiques comme les glycopeptides ou les aminosides chez des patients en état critique. Cela a permis de déterminer que les lésions n'étaient pas uniquement tubulaires mais aussi médullaires. De plus, certains biomarqueurs urinaires, comme la *N*-acetylneuraminidase, pourraient permettre de monitorer la toxicité rénale de ces antibiotiques^{74, 75}.

Un autre domaine pertinent en néphrologie de l'application de la RMN a été la transplantation rénale pour la surveillance de la fonction du greffon ⁷⁶, et le monitoring de la toxicité rénale des immunosuppresseurs ⁷⁷.

3.3.5 Neurologie

De nombreuses maladies neurologiques posent des problèmes diagnostiques. En effet, affirmer ou infirmer l'existence d'un trouble ou d'une maladie repose bien souvent sur l'évolutivité de la maladie ou sur un faisceau d'arguments allant pour ou contre le diagnostic. De ce fait, de nombreuses maladies sont diagnostiquées tardivement. A l'opposé de ce type de maladies neurologiques, d'autres pathologies, comme les ruptures d'anévrismes cérébraux posent un problème de surveillance (apparition de complications telles que le vasospasme)⁷⁸.

La RMN du LCR mais aussi celle du sérum ont été utilisées pour aider au diagnostic de certaines de ces maladies neurologiques. Un des exemples les plus marquants est la détermination par RMN du profil métabolique du LCR de patients souffrant de la maladie de Charcot ou sclérose latérale amyotrophique. Cette maladie qui touche le système nerveux périphérique au niveau du motoneurone alpha est une maladie dégénérative, malheureusement sans traitement pour le moment. Son diagnostic actuel est le plus souvent tardif. Blasco *et al.* ont trouvé une modification très nette du métabolisme du glucose dans le LCR chez les patients atteints⁷⁹. D'autres maladies neurologiques rares et/ou de diagnostic difficile ont de même été explorées comme l'ataxie de Friedreich⁸⁰, la sclérose en plaque^{81, 82}, et ont été comparées entre elles⁸³. Dans toutes ces études les profils métaboliques obtenus par RMN du LCR et/ou du sérum permettent de différencier les patients sains des malades, ou les malades entre eux en fonction de la maladie.

3.3.6 Infectiologie

Un autre champ d'application clinique et microbiologique de la RMN est le domaine de l'infectiologie. L'utilisation de la RMN en microbiologie reste fondamentale et permet la compréhension du métabolisme de différents germes (bactéries, parasites, virus ou champignons). En clinique, son utilisation pour l'identification du germe en cause est très intéressante. Les méthodes classiques d'identification reposent le plus souvent sur l'examen direct au microscope optique après coloration du liquide supposé infecté, puis sur la mise en culture dans des milieux sélectifs. La sensibilité de ces techniques usuelles est variable notamment lorsque le patient a déjà reçu un traitement antibiotique. L'intérêt de la

RMN dans ce contexte est la reconnaissance, dans le liquide biologique, d'une signature métabolique propre au germe.

Plusieurs équipes ont montré l'intérêt de cette approche, notamment dans le diagnostic d'infections bactériennes ou parasitaires. En parasitologie, la RMN a été utilisée pour le diagnostic de la schistosomiase (deuxième parasitose dans le monde après le paludisme, touchant près de 200 millions d'individus en région tropicale et subtropicale) ; l'étude de l'urine d'une cohorte de près de 500 patients a ainsi permis un diagnostic rapide d'infection et la surveillance de la réponse au traitement⁸⁴.

L'utilisation de la RMN pour le diagnostic étiologique des infections urinaires⁸⁵⁻⁸⁷ ou pulmonaires⁸⁸ est un autre exemple d'application clinique. Elle permet en effet le diagnostic de la maladie grâce à la spécificité métabolique d'une bactérie (infections urinaires à *Pseudomonas aeruginosas*) ou à la réponse spécifique de l'organisme à l'infection. Par exemple, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosas* sont des bactéries présentant des voies métaboliques spécifiques : *Pseudomonas aeruginosas* métabolise par hydroxylation de l'acide nocitinique en acide 6-hydroxynocotinique (6-OHNA), et la quantité de 6-OHNA est directement corrélée à la quantité de germes ; *Klebsiella pneumoniae*, quant à elle, métabolise le glycérol en 1,3-propanediol. Pour ces deux bactéries, l'étude de l'urine par RMN permet donc le diagnostic et la quantification du germe^{85, 87}. Par ailleurs, quand on ensemence de l'urine humaine par des germes usuels avec une quantité connue de colonies par unité (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Proteus mirabilis*), la RMN permet de faire la différence entre de l'urine stérile et de l'urine infectée, et entre une contamination et une infection urinaire ; elle renseigne également là encore sur le type de germe⁸⁶.

Les infections pulmonaires peuvent être dues à des bactéries, des virus, des parasites ou des champignons. La première cause des formes acquises en ville (communautaires) est une bactérie : *Streptococcus pneumoniae*. L'analyse par RMN de l'urine de patients souffrant d'une pneumopathie à *S. pneumoniae* montre des profils différents des autres causes et peut permettre un diagnostic rapide et adapté ⁸⁸.

3.3.7 Cancérologie

La RMN trouve actuellement des applications en cancérologie probablement du fait du développement des autres techniques « omiques » dans ce domaine. Elle peut être utilisée soit *in vitro* sur des liquides biologiques ou sur des tissus en HR-MAS, soit *in vivo*.

Elle s'applique à toutes les facettes de la procédure médicale moderne : le dépistage, le diagnostic, la surveillance et/ou la réponse au traitement, la récurrence et la présence de métastases. De nombreux types de cancers solides ont été explorés dont les principaux sont: colon, sein et/ou ovaire, poumon ^{89,90}, foie et voies biliaires ^{91,92}, pancréas ⁹³, rein ⁹⁴. Contrairement aux cancers solides, son utilisation en onco-hématologie clinique est encore peu développée. Cependant, elle pourrait permettre de mieux stratifier certaines maladies hématologiques telles que la leucémie myéloïde chronique, ce qui pourrait avoir une implication pronostique et thérapeutique⁹⁵. Elle pourrait également être intéressante dans la recherche de prédisposition aux complications tardives des traitements des lymphomes⁹⁶.

Nous développerons ici brièvement quelques exemples d'utilisation de la RMN en cancérologie pour les cancers les plus fréquents et/ou graves car de découverte tardive. Le

cancer du colon est la deuxième cause de mortalité par cancer dans les pays industrialisés. Différentes utilisations de le RMN semblent possibles pour améliorer la prise en charge, soit grâce à un diagnostic précoce par l'analyse de l'eau des selles ⁹⁷ soit par la caractérisation d'une signature métabolique dans le sérum ⁹⁸. A un stade plus tardif (stade métastatique), la RMN montre des signatures métaboliques pouvant prédire la survie ⁹⁹. L'analyse urinaire ou sanguine a également montré son intérêt dans le diagnostic précoce des cancers de l'ovaire ¹⁰⁰ et/ou du sein chez la femme ¹⁰¹, et la détection précoce de récurrence de cancer du sein ¹⁰². Réalisée avant traitement, elle pourrait enfin modifier la planification du traitement dans les cancers présentant des signatures métaboliques associées à un mauvais pronostic¹⁰³. Cao et *al.* ont réalisé une étude sur du tissu de cancer du sein avant et après traitement néo adjuvant pour évaluer la réponse thérapeutique et la modification métabolique induite par le traitement. Quatre vingt neuf patientes atteintes d'un cancer du sein ont été incluses. La biopsie était pratiquée avant chimiothérapie à des fins diagnostiques et pronostiques. Après traitement néo-adjuvant, la tumeur était enlevée chirurgicalement. Cette étude a montré principalement que la réponse métabolique obtenue par HR-MAS sur le tissu post-opératoire était corrélée à la survie mais pas à la réponse clinique (diminution de la masse de plus de 50%) ¹⁰⁴.

3.3.8 Patients en états critiques

Un autre exemple d'application clinique est celui des patients en état critique. Peu d'études chez l'homme, utilisant la RMN sont disponibles pour des raisons multiples, la principale étant probablement que la communauté des médecins s'occupant de ces patients

est peu familiarisée avec cette approche. Les autres problèmes pour ce type de patients sont avant tout l'hétérogénéité de la population présentant un état critique dans les suites d'un traumatisme ou d'une infection grave.

Cependant, l'apport de la RMN dans ces conditions a été montré par des études chez l'animal dans les infections systémiques¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, les atteintes pulmonaires graves¹⁰⁸ ou le choc hémorragique⁴⁰. Chez l'homme, elle pourrait permettre une évaluation et une classification plus précoce de la gravité des patients ou une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces situations complexes, par la détermination des différentes voies métaboliques mises en jeu. Enfin, cet outil pourrait servir à la personnalisation des traitements selon le « phénotype » métabolique des patients¹⁰⁹. L'analyse des profils métaboliques chez ces patients est probablement une perspective d'utilisation importante. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de biomarqueurs permettant de prédire l'évolution immédiate de la maladie, son pronostic ou la réponse au traitement. Les cliniciens sont de plus en plus conscients qu'un unique marqueur dans ce contexte est illusoire à trouver. Par contre, la notion de profils ou d'empreintes métaboliques, et leur évolution lors des premières heures de prise en charge apporteraient de précieux renseignements aux médecins. Plusieurs raisons amènent à souligner cette notion d'évolution. La première est qu'à l'arrivée du patient dans le service de réanimation, le médecin ne connaît ni son niveau d'agression du fait essentiellement de la méconnaissance de son état basal, ni sa durée d'exposition. Lorsqu'il commence à traiter le patient, il n'a pas de notion précise de la réponse immédiate au traitement. Ainsi, la plupart des patients sont traités de la même façon, en fonction des défaillances d'organes dont les marqueurs sont biologiques et/ou cliniques. Force est de constater que les patients ne répondent pas de la même façon au traitement puisqu'une partie non négligeable d'entre eux ne survivent pas. Il n'est donc pas

déraisonnable de penser que tout ou partie d'un profil métabolique aiderait à l'évaluation du degré de gravité et la progression de la maladie plus précisément que les marqueurs biologiques ou cliniques actuels.

Les études chez l'homme restent pour l'instant restreintes. En traumatologie, la RMN du sérum a une sensibilité supérieure pour la détermination de la gravité des patients par rapport aux dosages biologiques standards¹¹⁰. Elle permet aussi de décrire les modifications métaboliques systémiques physiopathologiques induites par les traumatismes chez ces patients ¹¹¹. Dans les atteintes pulmonaires graves, une étude a décrit les modifications métaboliques centrales chez les patients atteints de syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) ¹¹². Seules deux autres études utilisant la RMN ont été publiées à ce jour, l'une portant sur les conséquences métaboliques du SDRA ¹¹³ et l'autre sur l'efficacité d'une thérapeutique comme l'albumine dans ce contexte ¹¹⁴.

3.4 Applications de la métabolomique dans les maladies du foie

La métabolomique dans les maladies du foie, quelle que soit la technique utilisée, est un outil de plus en plus important dans la compréhension physiopathologique des maladies, l'aide au diagnostic, l'évaluation de la gravité et/ou du pronostic et dans la surveillance des traitements.

Cet organe, non classé parmi les organes « nobles » par les physiologistes, est une véritable usine métabolique, qui participe au maintien d'une grande partie de l'homéostasie et assure des fonctions de défenses immunologiques. Ses fonctions métaboliques majeures en font un organe cible pour les applications de la métabolomique notamment, en ce qui nous concerne, en RMN des liquides et des tissus.

3.4.1 Le foie et son métabolisme

3.4.1.1 Organisation générale du foie

Le foie est un organe complexe dans son organisation anatomique et dans ses fonctions physiologiques.

L'organisation anatomique du foie est lobulaire. Les lobules sont formés par le regroupement de petites unités fonctionnelles, les acini. Les grands principes de l'organisation anatomique et histophysiologique de l'acinus sont (Figures 17, 18 et 19):

- Une double vascularisation, veineuse (porte et sus hépatique) et artérielle permettant les apports nutritifs, les messages hormonaux, l'oxygénation cellulaire;

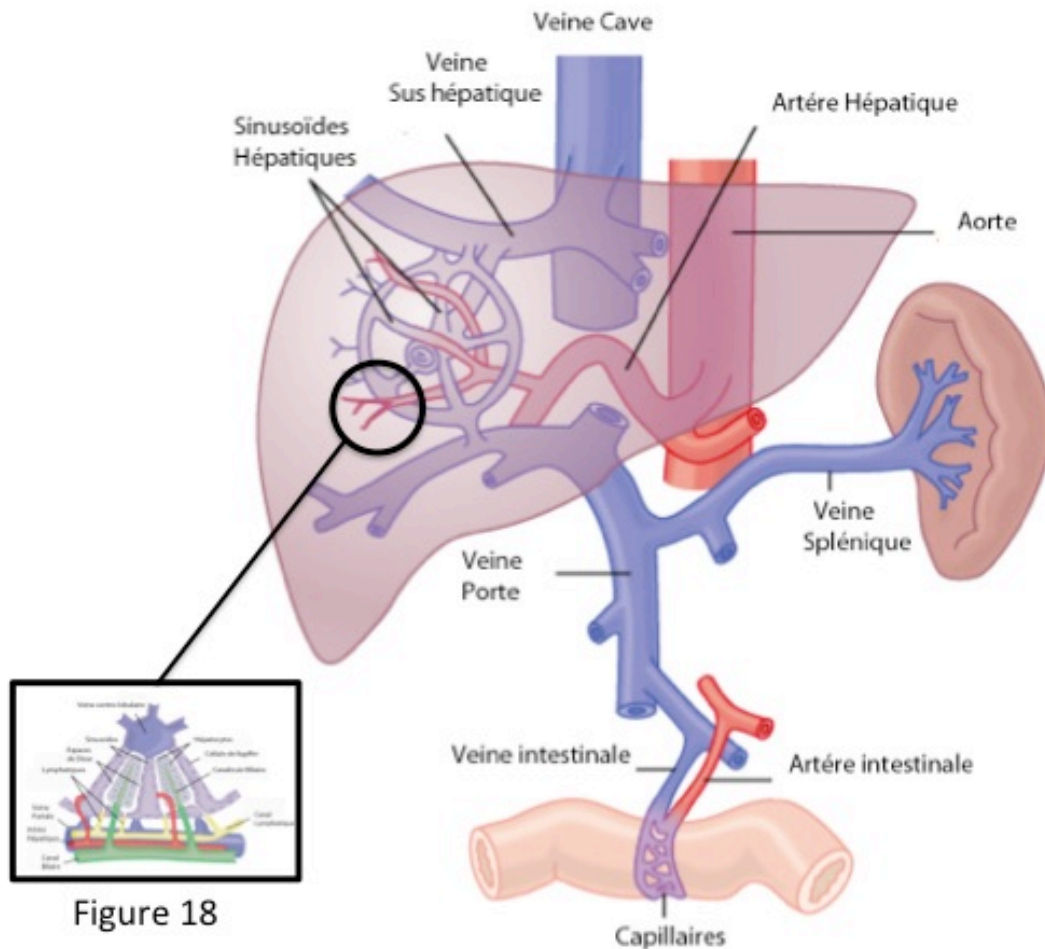


Figure 18

Figure 17 : Organisation générale du foie

Schéma représentant l'organisation vasculaire du foie. Modifié d'après ¹¹⁵

- Une disposition cellulaire en travées d'hépatocytes le long des cellules endothéliales fenestrées tapissant les sinusoides qui sont des capillaires dépourvus de membrane basale permettant un maximum d'échange;
- Une séparation du compartiment biliaire de la circulation sanguine permettant le cycle entérohépatique;
- Une organisation hépatocytaire intracellulaire spécifique en fonction de l'expression exocrine et métabolique. La fonction de l'hépatocyte est variable selon sa situation au sein de l'acinus. L'équipement enzymatique, les récepteurs et les composants

intracytoplasmiques des hépatocytes varient selon leur position entre l'arrivée du sang veineux portal et artériel, et la collecte par le système centrolobulaire et sus-hépatique. La zone périportale est une zone de métabolisme important : production de glucose par glycogénolyse ou néoglucogenèse, utilisation des acides aminés, synthèse de l'albumine et du fibrinogène, détoxification des radicaux NH_3^- , production de la bile et synthèse de métabolites protecteurs. La zone centrolobulaire présente des fonctions différentes telles que l'utilisation du glucose, la métabolisation des xénobiotiques et la formation des principales protéines de l'inflammation.

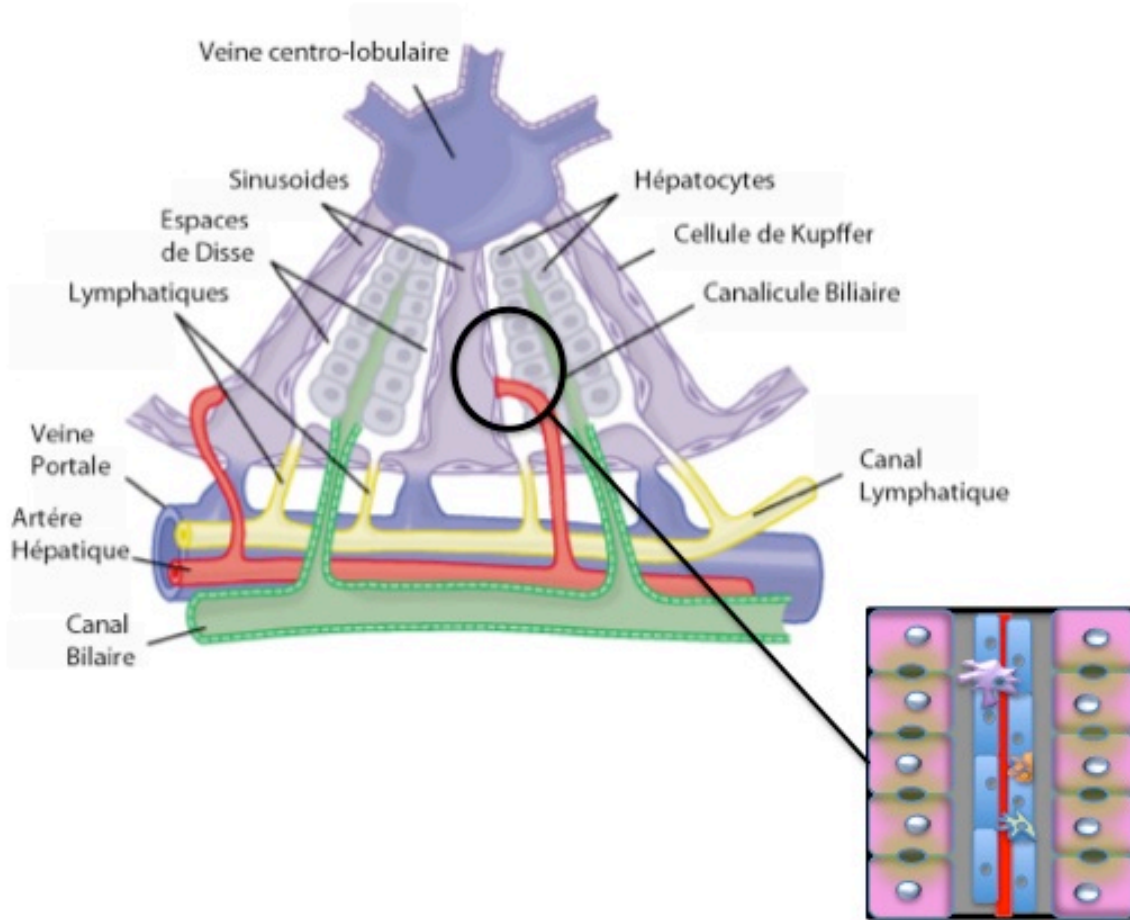


Figure 19

Figure 18 : Organisation d'un acinus

Schéma représentant l'organisation d'un acinus. Modifié d'après ¹¹⁵

- L'existence de différentes cellules non-parenchymateuses qui ont des rôles spécifiques : les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques) et les cellules endothéliales sinusoidales sont exposées au flux sanguin afin d'assurer une fonction de détoxification spécifique, une fonction inflammatoire (sécrétions de médiateurs de l'inflammation : $TNF\alpha$, autres cytokines, eicosanoïdes, $TGF\beta$) et immunologique importante (présentation d'antigènes et effets cytotoxiques contre les cellules tumorales et agents microbiens) ; les cellules de Pit, qui correspondent à un autre type de cellules immunitaires, de nature lymphocytaire, ont une activité cytotoxique contre les cellules tumorales.
- Une matrice extracellulaire, composée de collagène, glycoprotéines, glycoaminoglycanes et protéoglycanes. Elle est située entre les cellules sinusoidales et les hépatocytes et forme l'espace de Disse. Elle a pour rôle le maintien de l'homéostasie et la communication intercellulaire. Les cellules de Ito, maintenant appelées cellules étoilées du foie ou cellules stellaires, manchonnent les sinusoides et envoient des pseudopodes dans l'espace de Disse. Elles participent à la formation de la matrice extracellulaire et sont des lieux de stockage de la vitamine A. Leur rôle est important dans la régulation du flux sanguin sinusoidal et dans les processus de fibrogénese.

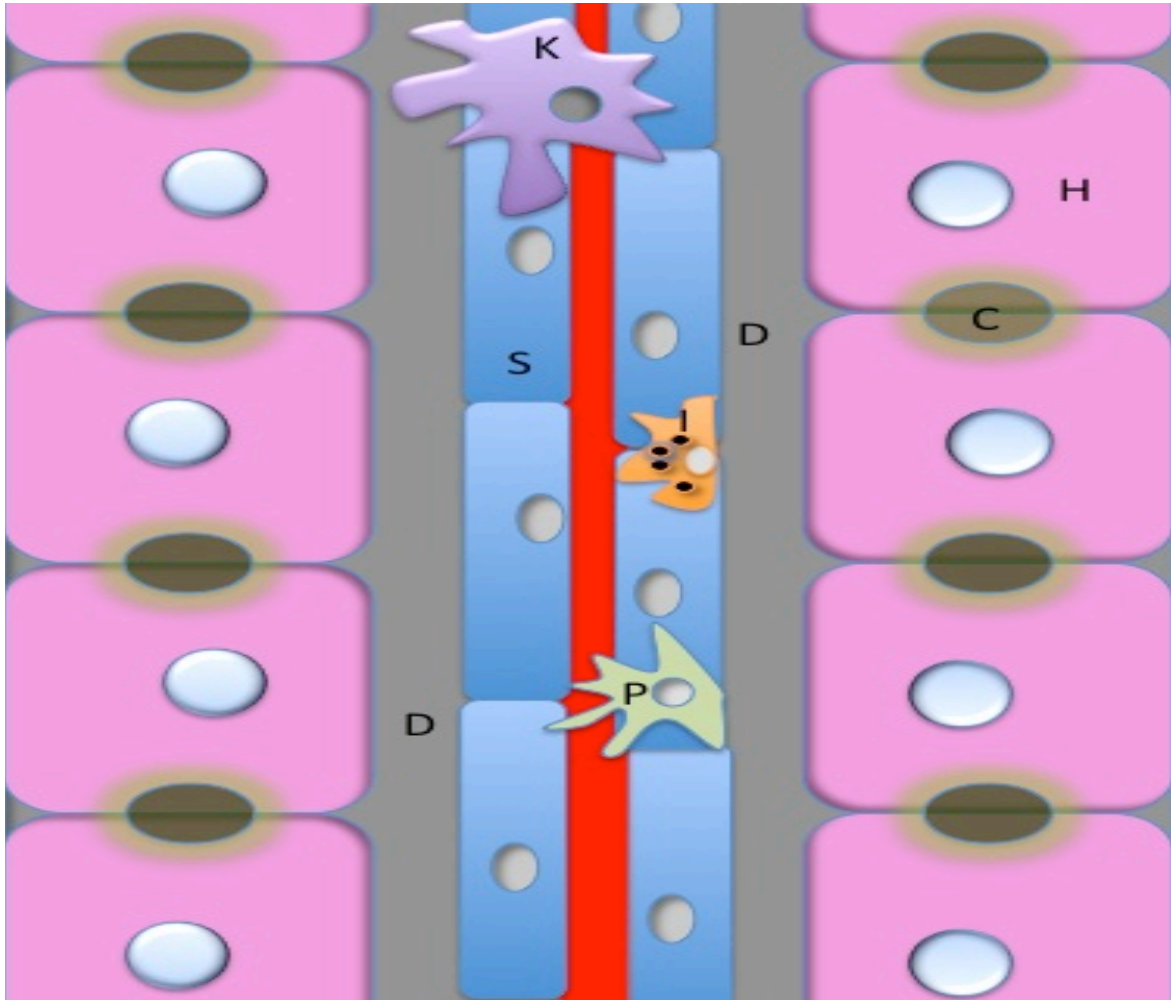


Figure 19 : Organisation Cellulaire

Représentation schématique de l'organisation cellulaire. La bile produite par les hépatocytes s'écoule vers l'espace porte par les canalicules (C). Les cellules composant l'acinus sont l'hépatocyte (H), la cellule endothéliale du sinusoïde (S), la cellule de Kupffer (K), la cellule de Ito (I) et la cellule de Pit (P). L'espace de Disse (D) compose la matrice extracellulaire entre les sinusoides et les hépatocytes.

3.4.1.2 Activités métaboliques du foie

3.4.1.2.1 Métabolisme glucidique

Le foie est le principal acteur de l'homéostasie du glucose (et des autres oses comme le galactose, mannose, fructose) avec une balance entre production de glucose et utilisation du glucose orchestrée par un système de régulation hormonale pro et contre-glycémique. Le foie a une position stratégique puisqu'il draine le lit splanchnique, riche en glucose

notamment en post-prandial, ainsi que les hormones de régulation pancréatiques et intestinales.

L'hyperglycémie stimule la production d'insuline qui stoppe la production de glucose hépatique et favorise le stockage. Le glucose (et les autres sucres comme le fructose, le galactose ou le mannose) pénètre les hépatocytes par un mécanisme de diffusion facilité par un transporteur membranaire de faible affinité (Glu 2). Dans la cellule, le glucose est rapidement transformé en glucose-6-phosphate, lequel est ensuite métabolisé par la glycogénogénèse ou la glycolyse. A l'opposé, la baisse de la glycémie entraîne la production de glucagon qui favorise la glycogénolyse et la néoglucogénèse (Figure 20).

Concernant les autres oses, il existe une interconversion entre eux leur permettant de participer à la glycolyse en y entrant sous la forme de Fructose-6-Phosphate. Enfin la voie des pentoses participe aussi à la glycolyse.

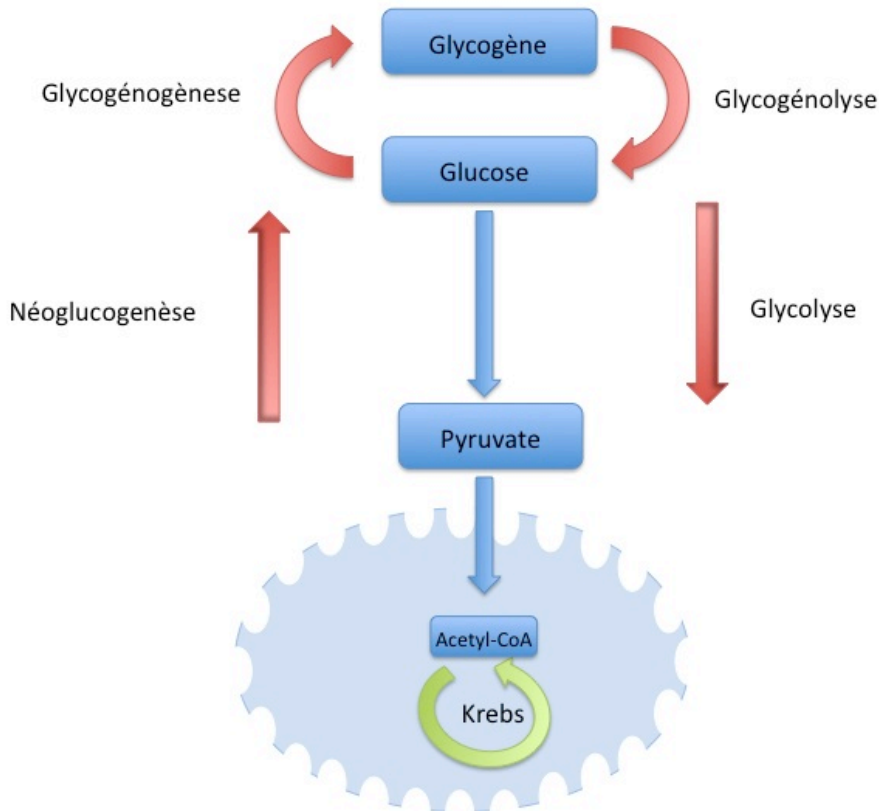


Figure 20 : Voies de la glycolyse et de la néoglucogènese

3.4.1.2.2 Métabolisme protéique

Le foie est le lieu de synthèse de nombreuses protéines mais aussi de leur catabolisme avec l'élimination de leur azote en urée (cycle de l'urée ou uréogènese).

Les acides aminés ne sont pas stockés dans l'organisme. Ils sont fournis essentiellement par l'alimentation. Ils participent à la synthèse des protéines (protéines structurales, enzymes, nucléotides, protéines de transport) mais aussi, pour certains, à la production directe d'énergie comme c'est le cas pour l'alanine, ou indirecte via la néoglucogènese. Il existe deux grandes catégories d'acides aminés : les acides aminés essentiels, qui sont exclusivement apportés par l'alimentation, et les acides aminés non

essentiels, qui sont pour 10 d'entre eux synthétisés par le foie par différentes voies (Figure 21).

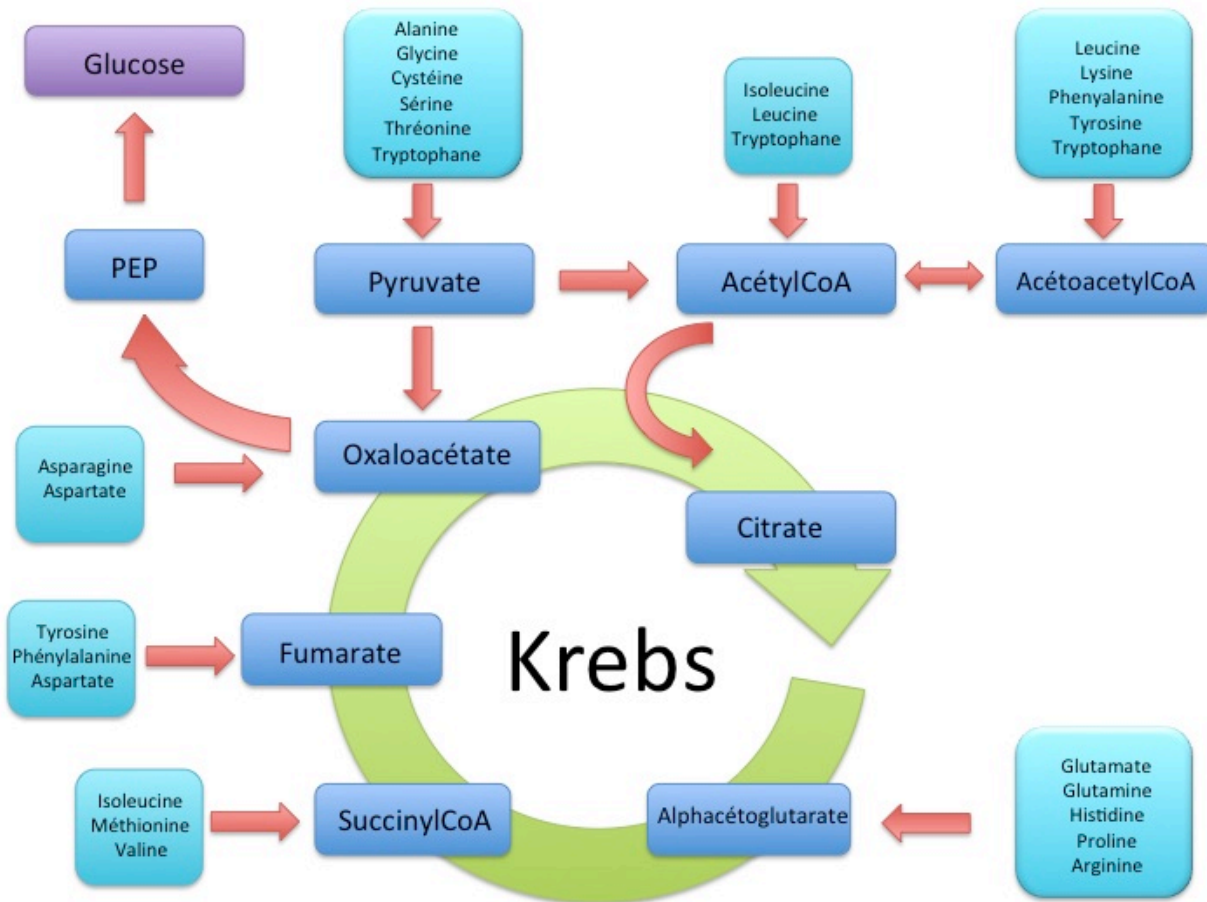


Figure 21: Métabolisme des acides aminés et cycle de Krebs

L'uréogénèse est un processus strictement hépatique qui se produit dans la zone périportale. Elle transforme la quasi-totalité de l'ammoniac et des résidus issus de la dégradation des protéines et des acides aminés en une forme éliminable : l'urée (figure 22).

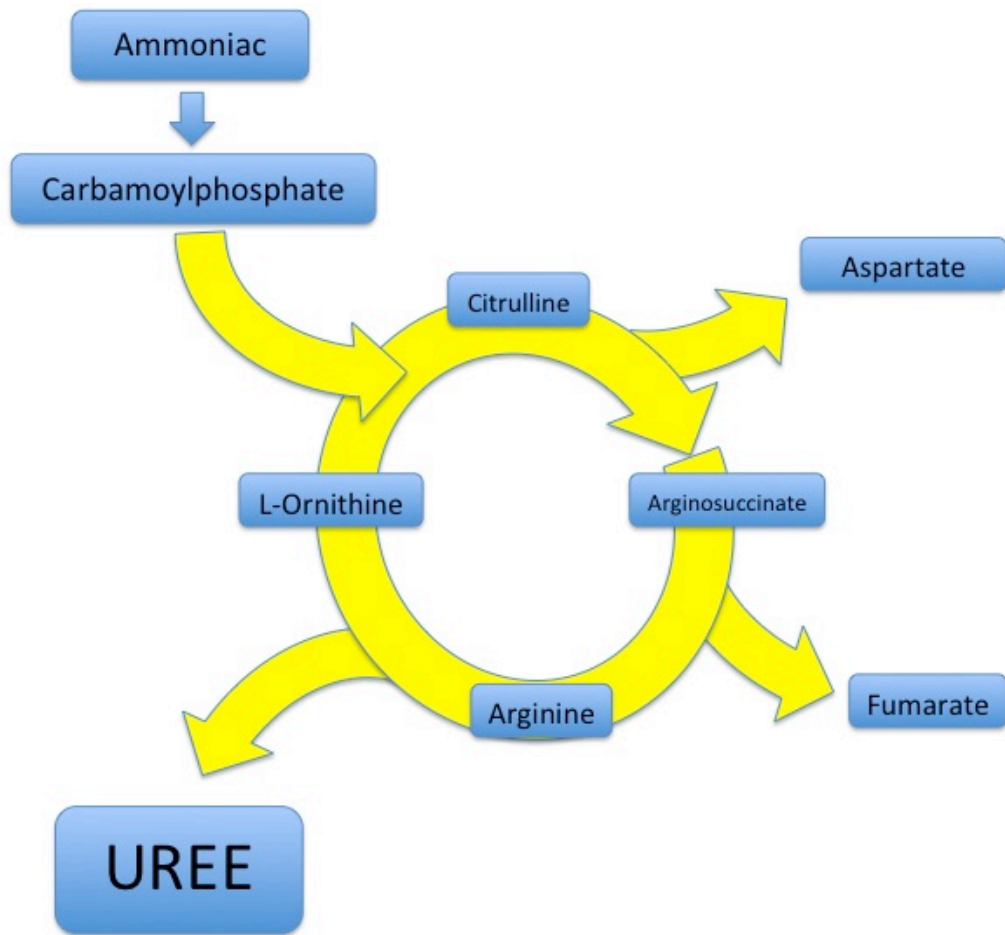


Figure 22: Cycle de l'urée

3.4.1.2.3 Métabolisme lipidique

Le foie est un organe important de synthèse et de catabolisme des acides gras et des triglycérides. Il contribue ainsi à la production énergétique via la bêta-oxydation des acides gras (cétogènese) (Figure 25).

Le foie possède une activité quasi exclusive de synthèse des lipides, en assurant la transformation du glucose en lipides sous la stimulation de l'insuline. Il participe au métabolisme de la plupart des acides gras mono ou polyinsaturés. Seuls deux acides gras sont d'origine exclusivement alimentaire (acide linoléique et linoléique).

La synthèse des triglycérides (TG) se produit par estérification des acides gras (AG) synthétisés dans le foie ou d'origine alimentaire. A l'opposé, les TG alimentaires, transportés par les chylomicrons, sont hydrolysés et mettent à disposition du foie du glycérol utilisable pour former du glucose (Figure 25). De nombreux autres lipides sont synthétisés dans le foie comme les phospholipides ou le cholestérol.

Le foie synthétise et/ou transforme des lipoprotéines à partir des TG, du cholestérol, des phospholipides et des apoprotéines afin de permettre le transport plasmatique des lipides. Ces lipoprotéines sont classées en fonction de leur poids moléculaire: très bas poids (VLDL), bas poids (LDL) et haut poids (HDL). Il constitue une plaque tournante des lipides circulants, de la synthèse à leur dégradation, notamment pour les HDL (Figure 23). Le foie est le lieu de synthèse quasi exclusif des HDL et par cette voie participe à la régulation du cholestérol plasmatique, excrété *in fine* par la bile.

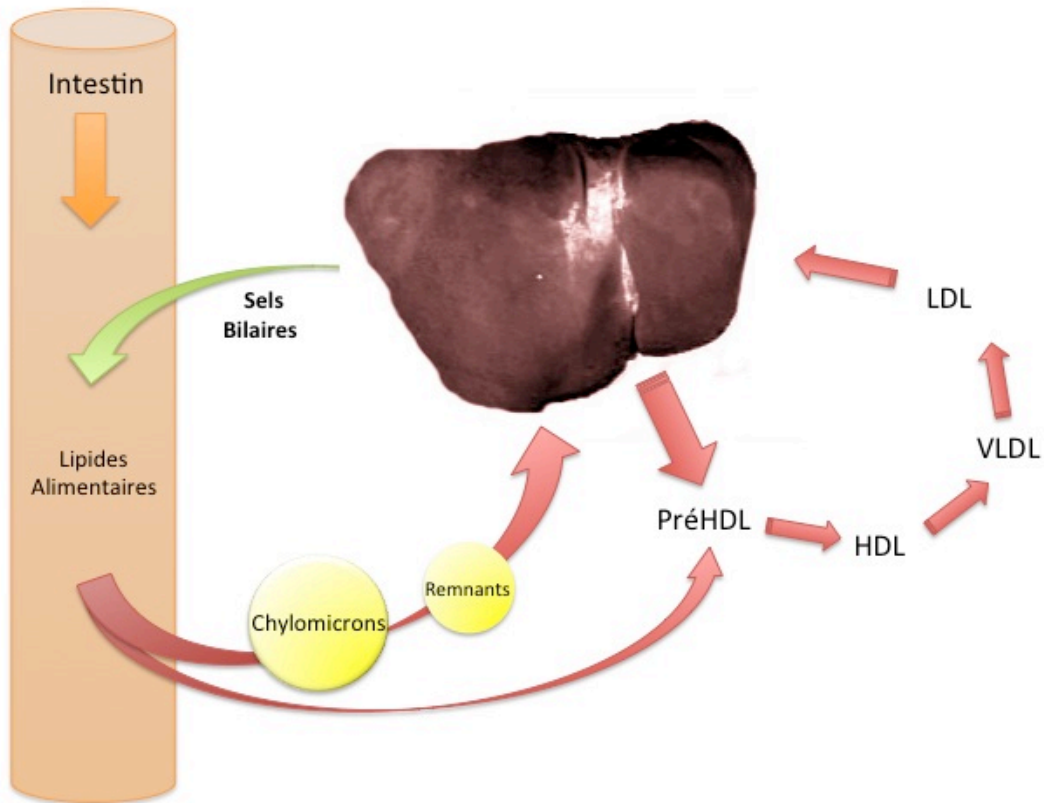


Figure 23 : Métabolisme des lipides

Les préHDL proviennent essentiellement du foie et en partie de l'intestin. Elles se chargent progressivement de cholestérol non estérifié et sous l'action de la LCAT (*lecithine cholesterol acyl transferase*) prennent une forme sphérique : HDL. La CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) transfère une partie du cholestérol estérifié sur les VLDL et les LDL en échange de triglycérides. L'épuration hépatique a lieu au niveau des récepteurs LDL-R (récepteur du LDL-cholestérol) et LRP (*LDL receptor-related protein*) pour les LDL et VLDL et par le SRB1 (*scavenger receptor B1*) pour le cholestérol provenant directement des HDL. Une partie des LDL s'oxyde au contact de la paroi vasculaire et pénètre ainsi dans les macrophages. Les chylomicrons proviennent de l'intestin et se transforment en remnants de chylomicrons, pris en charge par le foie.

3.4.1.2.4 Métabolisme de la bile

3.4.1.2.4.1 Formation et sécrétion de la bile

La sécrétion biliaire ou cholérèse normale est comprise entre 600 à 1000 ml/jour. La cholérèse aboutit à la formation d'un liquide complexe composé d'acides biliaires, de bilirubine, d'électrolytes, de divers pigments et de substances endo et exogènes. Il se

déplace dans les canalicules biliaires des hépatocytes périveineux vers les hépatocytes périportaux. Les rôles majeurs de la bile sont l'élimination des substances ne pouvant être excrétées par le rein et la participation à la digestion des graisses et des vitamines liposolubles.

La bilirubine libre (ou indirecte), produit de dégradation de l'hémoglobine par le système réticulo-endothélial, est transportée dans le sérum par l'albumine jusqu'aux hépatocytes ou elle est captée, transformée en bilirubine conjuguée (ou directe) hydrosoluble, puis excrétée de façon active par le pôle biliaire (Figure 24).

3.4.1.2.4.2 Acides Biliaires

Les acides biliaires (AB) sont synthétisés dans l'organisme soit par le foie (acides biliaires primitifs), qui représente la quasi totalité des AB, soit par des bactéries du tube digestif (acides biliaires secondaires).

Le précurseur des acides (ou sels) biliaires est le cholestérol issu de l'alimentation ou de sa synthèse hépatique. Le cholestérol est converti en acide cholique et chénodesoxycholique de façon équimolaire. Ces AG se combinent soit à la glycine soit à la taurine pour former des AB glyco ou tauro-cholique. Les cellules hépatiques forment environ 0,6 grammes de sels biliaires par jour.

Les AB ont comme principal effet dans le tube digestif une action détergente sur les graisses (ou action émulsifiante) permettant l'absorption intestinale des lipides par la formation de micelles, qui peuvent franchir la paroi des entérocytes ou être directement absorbés par les canaux lymphatiques.

3.4.1.2.4.3 Le cycle entéro-hépatique

Quatre vingt quatorze pourcent des AB sont réabsorbés par le sang de l'intestin grêle, soit par diffusion soit activement au niveau de la muqueuse terminale de l'iléon. Ils passent alors dans la circulation portale et retournent au foie. Dans le foie, la quasi-totalité des AB est captée par les hépatocytes dans la région périsinusoïdale puis est sécrétée dans la bile. Cette recirculation des AB est appelé cycle-entéro-hépatique.

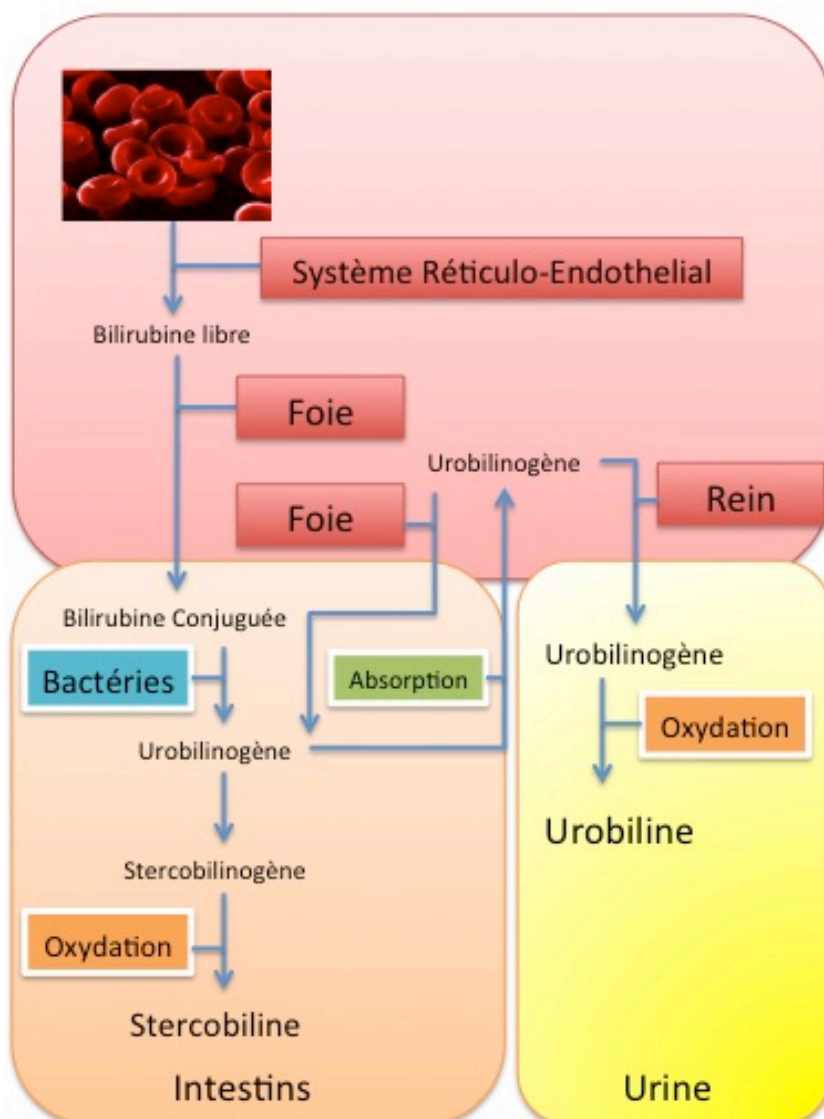


Figure 24: Métabolisme de la Bilirubine

3.4.1.2.5 Interdépendance des principaux métabolismes

Toutes ces voies métaboliques sont interconnectées et ont une influence les unes sur les autres. Ainsi, la production d'énergie, via le cycle de Krebs peut être l'aboutissement de ses voies (Figure 25).

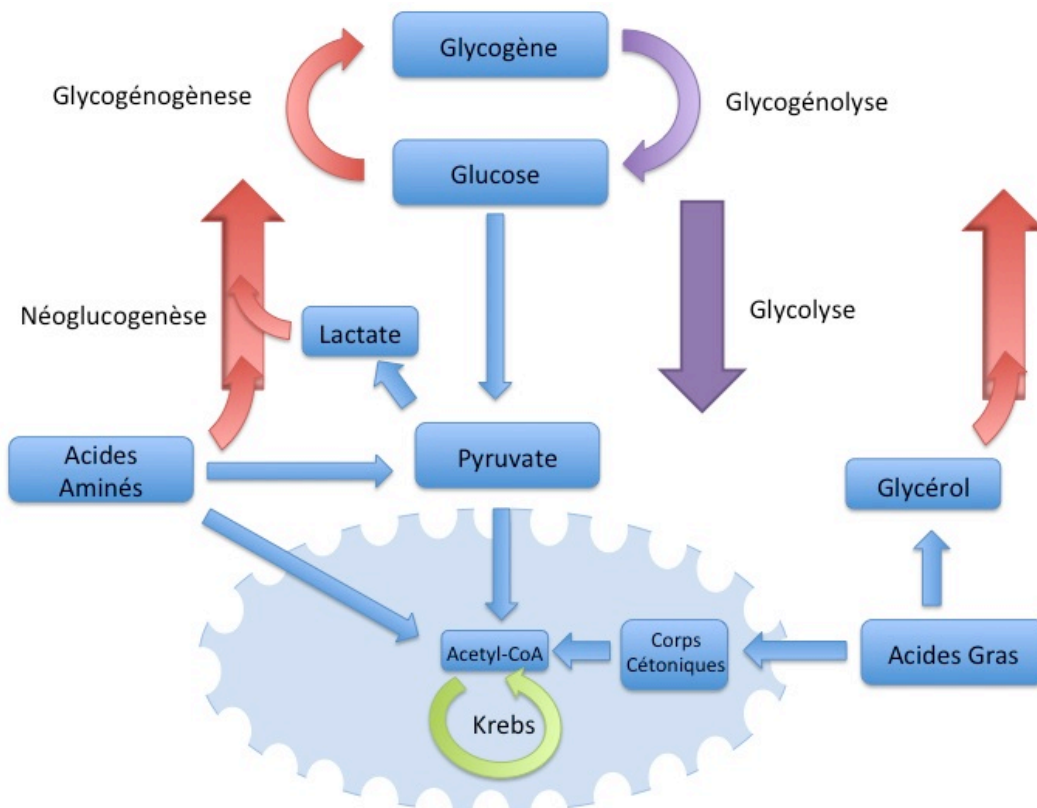


Figure 25: Synthèse des voies métaboliques

La production d'énergie via le cycle de Krebs peut se faire principalement par trois voies : la glycolyse, la cétogénèse et la protéolyse

3.4.1.2.6 Métabolisme des xénobiotiques

Le foie a un rôle métabolique majeur pour un grand nombre de substances exogènes médicamenteuses ou non : les xénobiotiques.

3.4.1.2.6.1 Principales voies métaboliques

Le métabolisme des xénobiotiques se fait en grande partie dans le foie par transformation enzymatique de ces molécules en composés soit inactifs, soit actifs et non toxiques, soit actifs et toxiques. Généralement, le métabolisme des xénobiotiques conduit à la formation de substances hydrosolubles plus facilement éliminées par les milieux aqueux (salive, bile, urines, sueur).

Il existe deux grandes voies parfois complémentaires du métabolisme de ces substances : l'oxydation et la conjugaison.

L'oxydation implique des enzymes comme le cytochrome P450 (CYP) qui fait partie de la super famille des mono-oxygénases. Le CYP est une hémoprotéine, essentiellement présente dans le foie, qui catalyse des réactions d'oxydation nécessitant de l'oxygène et une oxydo-réductase. Il existe des centaines d'isoformes du CYP réparties en quatre familles : CYP1 à 4. Les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments chez l'homme sont les CYP 3A4, CYP 2D6, CYP 2C9, CYP1A2 et CYP 2C19. Les isoenzymes du cytochrome P450 peuvent être inhibées ou induites par des médicaments ou des aliments. Un inducteur peut augmenter la synthèse et l'activité enzymatique d'une ou plusieurs isoformes de CYP; par exemple le phénobarbital induit le synthèse des CYP3A et CYP2B6, alors que la rifampicine induit celle des CYP3A et 2C9. L'inhibition des cytochromes P450 par certains médicaments ou aliments dits inhibiteurs enzymatiques est un autre facteur de variation du métabolisme. Cette inhibition est le plus souvent compétitive ; elle se manifeste

rapidement, le plus souvent par une augmentation de la concentration plasmatique et de la demi-vie du médicament dont le métabolisme a été inhibé, entraînant un risque de toxicité. L'inhibition enzymatique est fréquemment à l'origine d'interactions médicamenteuses. L'expression des CYP est par ailleurs, pour certaines isoenzymes, modulée par des facteurs génétiques.

La conjugaison est un processus qui aboutit à la formation de substances conjuguées hydrosolubles facilement éliminées par l'urine ou la bile. Les métabolites ou les médicaments subissent différentes réactions de conjugaison : glycu- (ou glucuro ou glucuruno) conjugaison, sulfo-conjugaison, acétylation, alcoylation (transfert d'un groupement méthyl) pour donner un produit conjugué plus soluble qui sera ensuite éliminé.

3.4.1.2.6.2 Exemple de l'alcool

Le toxique le plus connu en termes d'exposition est l'alcool. Il représente la première cause d'hépatopathie chronique dans les pays occidentaux. Son métabolisme, principalement hépatique mais aussi gastrique de façon plus limitée, comporte deux principales voies : la voie de l'alcool déshydrogénase (voie principale) et l'oxydation mitochondriale (voie mineure). La voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) favorise la formation de lactate, diminue la néoglucogénèse et la bêta-oxydation des AG. Les AG sont alors estérifiés et utilisés dans la synthèse des TG qui s'accumulent ce qui aboutit à la stéatose hépatique. La voie de l'oxydation mitochondriale est inductible notamment lors de la prise chronique d'alcool, et implique un type particulier de cytochrome (CYP2E1). Celui-ci a un rôle majeur dans la détoxification. Il existe une compétition pour l'utilisation du cytochrome P450 entre l'alcool et divers xénobiotiques, ce qui peut parfois expliquer une

augmentation de la concentration de ces molécules et de ce fait une sensibilité particulière à certains médicaments. En même temps, d'autres cytochromes sont inhibés par l'exposition chronique à l'alcool ce qui explique aussi l'accumulation de catabolites toxiques non épurés par le foie.

3.4.1.3 Modification de l'activité métabolique du foie dans les hépatopathies

Les deux principales modifications qui se produisent dans l'évolution des hépatopathies chroniques sont anatomopathologiques et fonctionnelles.

3.4.1.3.1 Modifications anatomopathologiques : de la fibrose à la cirrhose

La fibrose hépatique peut accompagner toutes les hépatopathies chroniques caractérisées par une agression hépatobiliaire et/ou une inflammation. Les principales causes en France sont l'intoxication alcoolique, les hépatites virales chroniques B et C, les stéatopathies non alcooliques (*non-alcoholic fatty liver disease*: NAFLD) et l'hémochromatose génétique. Les autres causes sont plus rares : hépatopathies auto-immunes, hépatopathies métaboliques dont la maladie de Wilson et les hépatopathies médicamenteuses (exemple : méthotrexate). La progression de la fibrose hépatique chez un individu est difficile à évaluer avec certitude. Néanmoins, il s'agit d'un processus chronique évolutif ; chez la majorité des patients, la progression vers la cirrhose intervient dans un délai de 15 à 20 ans¹¹⁶. La sévérité de l'inflammation et de l'agression hépatique est habituellement corrélée au taux de progression de la fibrose¹¹⁷. Par ailleurs, il existe un effet synergique de cofacteurs d'agression hépatique ; cela est surtout démontré dans le cadre d'excès d'alcool ou de NAFLD au cours des hépatites virales C. Au cours des hépatopathies alcooliques, le facteur prédominant dans la progression de la fibrose

hépatique est la poursuite de la consommation d'alcool. S'y ajoutent également d'autres facteurs de risque tels qu'une hyperglycémie ou une augmentation de l'indice de masse corporelle ¹¹⁸. Au cours des hépatites virales C, les facteurs de risque de progression de la fibrose hépatique sont : l'âge avancé au moment de la contamination, une consommation concomitante d'alcool, une coinfection virale B, une coinfection par le VIH ou une immunodépression associée, le sexe masculin, un surpoids ou une obésité (facteur de stéatose hépatique) et une surcharge en fer¹¹⁹. Les facteurs de risque de progression de la fibrose hépatique sont, en revanche, mal définis au cours des hépatites virales B¹¹⁹. Les facteurs de risque les plus importants associés à la sévérité des NAFLD sont l'hyperglycémie, le diabète de type 2, un syndrome métabolique, l'obésité viscérale et l'âge ¹²⁰.

L'agression chronique du foie provoque une destruction de cellules hépatiques et une augmentation des constituants de la matrice extracellulaire (MEC). La fibrose hépatique est une réponse « de cicatrisation » excessive à cette agression. Elle résulte de l'accumulation de constituants nouveaux de la MEC due à un déséquilibre entre la synthèse, le dépôt, et la dégradation de ses constituants. La MEC est le tissu d'échafaudage du foie normal et du foie fibrotique. Elle provient de l'assemblage de macromolécules appartenant à plusieurs familles : les collagènes (les collagènes I et III constituent 80 % du collagène total), les glycoprotéines (fibronectine, laminine), l'élastine, les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes (acide hyaluronique). Dans le foie normal, la MEC se trouve surtout au niveau de la capsule, autour des gros vaisseaux, et dans les espaces portes. Il y existe un équilibre entre la fibrogénèse et la fibrolyse. Au cours des hépatopathies chroniques, sous l'effet des agressions, la fibrogénèse dépasse la fibrolyse ; cela conduit à une fibrose pathologique avec des modifications significatives quantitatives et qualitatives qui

surviennent dans la MEC¹¹⁹, et qui sont responsables d'une désorganisation de l'architecture hépatique à la fois sur le plan anatomique et fonctionnel. Le stade le plus avancé de la fibrose hépatique est la cirrhose (Figures 26 et 27). Au cours des hépatopathies virales et biliaires, la fibrose hépatique est à point de départ portal, tandis qu'elle est centrolobulaire au cours des hépatopathies alcooliques ¹¹⁶.

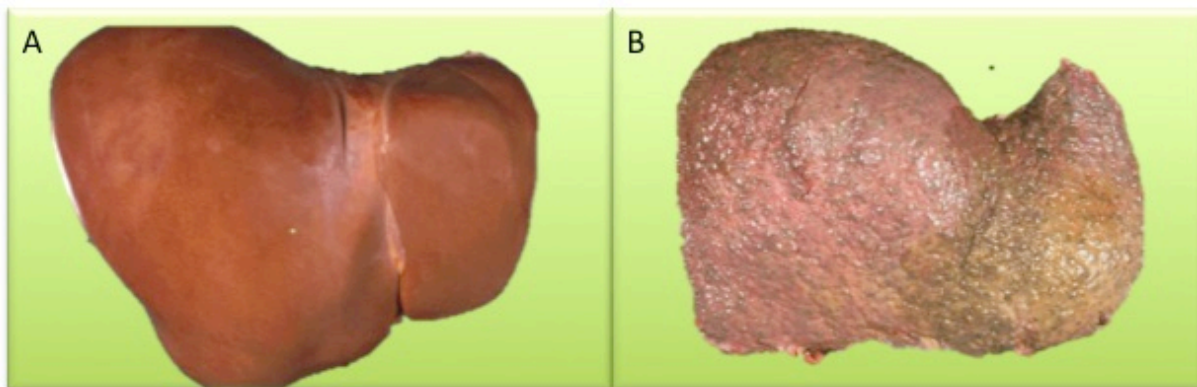


Figure 26 : Aspect macroscopique du foie sain et du foie cirrhotique

Aspect macroscopique d'un foie normal (A), et d'un foie de cirrhose (B). Le foie normal est caractérisé macroscopiquement par une surface lisse et une coloration brunâtre. Le foie de cirrhose présente un granité plus ou moins important correspondant aux milliers de nodules de régénérations.

Les conséquences physiopathologiques de la fibrose hépatique sont marquées par des modifications de la vascularisation du foie. Les sinusoides jouent un rôle important dans les échanges entre le sang et les hépatocytes. La fibrose périsinusoïdale va avoir un rôle important en capillarisant le sinusoides hépatique. En effet, la fibrogenèse, processus initiateur de la cirrhose, conduit, en outre, à une accumulation excessive de MEC dans le parenchyme hépatique, à une distorsion architecturale et à la formation de nodules de régénération (Figure 27)¹²¹. S'y associent des modifications phénotypiques des cellules endothéliales qui perdent leur fenestration entraînant une rigidification des sinusoides et un dépôt de collagène dans l'espace de Disse. L'ensemble de ces modifications anatomiques

entraîne une augmentation des résistances intrahépatiques par le biais, principalement, d'un phénomène compressif. Ainsi, le développement excessif de la fibrose a pour conséquences une diminution de la perméabilité sinusoidale, une diminution de la perfusion hépatocytaire due au développement d'une circulation collatérale, une hypertension portale par augmentation des résistances intrahépatiques ainsi que des modifications fonctionnelles et métaboliques.

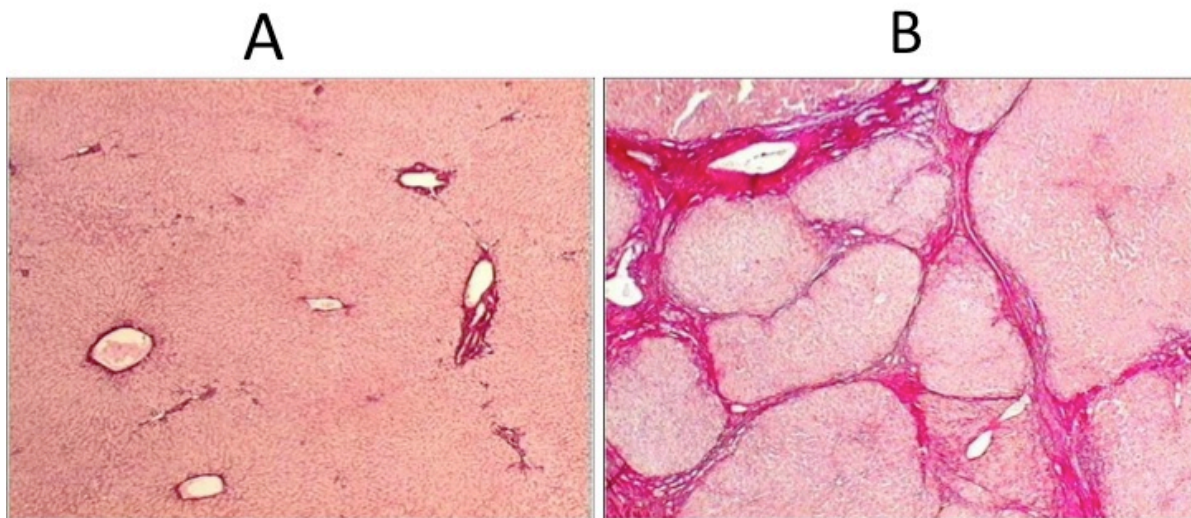


Figure 27 : Aspect microscopique du foie sain et du foie cirrhotique

A : foie microscopiquement sain. B : les nodules hépatocytaires sont séparés par des travées de collagène (rouge foncé). Les canaux biliaires et les vaisseaux portes parcourent les travées fibreuses.

3.4.1.3.2 Modifications fonctionnelles

Parallèlement à ces modifications histologiques, des modifications fonctionnelles du foie apparaissent portant notamment sur son activité métabolique ; à un stade avancé survient une insuffisance hépatocellulaire.

Lorsqu'il n'existe pas d'hépatopathie chronique sous jacente, les différents métabolismes sont altérés de façon cliniquement significative au delà d'une diminution de

plus de 75% de la masse hépatique. A ce stade, les réserves de glycogène ne sont plus suffisantes et la néoglucogenèse déficiente entraîne des hypoglycémies, une diminution de synthèse de toutes les protéines d'origine hépatique, et une accumulation de toxiques exo et endogènes comme l'ammoniac, par déficit de l'uréogénèse. Chez le cirrhotique, en fonction de la gravité, toutes les voies métaboliques sont touchées. L'organisation métabolique du foie a été étudiée sur des biopsies de foie sain, de foie de fibrose et de foie de cirrhose avec un marquage de différents enzymes. Les résultats ont montré que cette organisation métabolique du foie est essentiellement perturbée en cas de cirrhose¹²².

Nous présenterons par la suite quelques exemples d'altération des voies métaboliques hépatiques notamment dans la cirrhose.

3.4.1.3.3 Anomalies du métabolisme des glucides

Le rôle du foie dans le maintien de l'homéostasie du glucose est assuré par le biais d'un équilibre entre de la glycolyse et la glycogénogénèse. Dans les maladies hépatiques, le métabolisme du glucose est perturbé. De nombreux patients cirrhotiques présentent au cours de leur maladie une intolérance au glucose. Dans la majorité des cas il existe chez les sujets cirrhotiques une augmentation de la gluconéogenèse et une diminution de la glycolyse comparativement aux sujets contrôles¹²³.

3.4.1.3.4 Anomalies du métabolisme des acides aminés

De nombreuses études se sont intéressées à l'altération du métabolisme des acides aminés dans les maladies hépatiques. La composition sérique en acides aminés chez les patients cirrhotiques varie en fonction de l'étiologie et de la sévérité de l'atteinte hépatique^{124, 125}. Comparativement à des patients non cirrhotiques, le métabolisme des

acides aminés branchés (leucine, isoleucine, valine) est soit augmenté, soit inchangé, soit diminué. Ces résultats plutôt discordants sont probablement dus à des situations métaboliques différentes et/ou des sévérités différentes de la maladie hépatique dans les différentes populations étudiées¹²⁶⁻¹²⁹.

Concernant les acides aromatiques, une augmentation de leur métabolisme a été observée chez les patients cirrhotiques notamment à un stage avancé^{130, 131}.

Enfin, une déviation du métabolisme de la méthionine chez le patient cirrhotique a été décrite avec une accumulation de son métabolite, l'homocystéine, responsable d'une augmentation des résistances intravasculaires hépatiques chez l'animal ^{130, 132, 133}.

3.4.1.3.5 Anomalies du métabolisme des lipides

Le foie a un rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines et dans l'homéostasie des particules de lipoprotéines circulantes. Plus de 90% des lipoprotéines de haute densité sont synthétisées dans le foie. En pratique clinique de routine, seul l'HDL-Cholestérol est dosé et une diminution de sa concentration semble être bien corrélée avec la gravité de la maladie et la survenue de complications ¹³⁴.

3.4.1.3.6 Anomalies de l'uréogénèse

Les perturbations du métabolisme de l'urée chez le patient cirrhotique sont responsables d'une diminution de la détoxification de l'ammoniac qui aboutit chez le patient cirrhotique à une augmentation de la glutamine. Celle-ci est mise en cause dans les atteintes neurologiques chez les patients cirrhotiques¹³⁵.

Le foie est donc une véritable usine métabolique ; on comprend alors l'intérêt de plus en plus important des chercheurs et des cliniciens pour une méthode d'exploration globale de cet organe par la métabolomique notamment en RMN.

3.5 Applications de la métabolomique dans les atteintes hépatiques

Pour être didactique, nous classerons les atteintes hépatiques en deux grandes catégories : les atteintes aiguës du foie et les atteintes chroniques du foie.

Les atteintes aiguës du foie peuvent être classées en traumatiques ou non traumatiques. Parmi les atteintes non traumatiques, on distingue les hépatites cytolytiques, cholestatiques ou mixtes. Les principales étiologies sont virales (virus de l'hépatite A, B ou E) et toxiques (médicamenteuses ou non). Dans sa forme la plus grave l'atteinte hépatique aiguë sur foie sain est l'hépatite fulminante caractérisée clinico-biologiquement par l'association d'une élévation de la bilirubine, d'une baisse des facteurs de coagulation et d'une atteinte neurologique (encéphalopathie)^{136, 137}. Les principales études chez l'homme en RMN, SRM ou SM sont synthétisées dans le tableau 6.

Les atteintes chroniques du foie peuvent être classées en deux grandes catégories : les hépatopathies chroniques non cirrhotiques et la cirrhose. Les hépatopathies chroniques virales et la cirrhose ont des complications communes. La complication la plus étudiée à ce jour en métabolomique est le cancer du foie. Une autre complication est l'aggravation brutale de la fonction hépatique appelée « *acute on chronic liver failure* » par les anglo-saxons. Les études en RMN, SRM et SM dans les atteintes chroniques ou leurs complications sont synthétisées dans les tableaux 7, 8 et 9.

3.5.1 Les atteintes aigües non-médicamenteuses du foie

Dans les atteintes traumatiques du foie, il existe une augmentation significative de la concentration dans le sérum des acides aminés aromatiques (AAro)¹³⁸. Cette augmentation, notamment de la phénylalanine et de la tyrosine, pourrait être le marqueur d'une atteinte de la fonction hépatique plus précoce que les marqueurs traditionnels utilisés en clinique (facteur V et TP). Une perturbation du métabolisme des acides aromatiques a déjà été décrite, en utilisant les méthodes traditionnelles de dosages biochimiques, dans d'autres situations d'atteintes hépatiques aigües ou chroniques. Une augmentation des acides aminés aromatiques a été trouvée dans le sérum de patients souffrant d'encéphalopathie, notamment dans le cadre d'hépatite fulminante¹³⁹. Les autres situations aigües responsables d'une augmentation sérique de AAro sont l'infection, le stress chirurgical et la reperfusion hépatique des foies transplantés¹⁴⁰⁻¹⁴⁵ ; elle semble alors être le marqueur d'une dysfonction hépatique. A l'opposé, une étude portant sur les atteintes aigües par le virus B ou E a montré qu'il existait une diminution des AAro dans ce contexte¹⁴⁶ ; ces résultats ne sont cependant pas forcément contradictoires avec ceux qui précèdent car dans cette dernière étude, aucune notion d'insuffisance hépatique n'était donnée, et peu de patients avaient été inclus.

Les autres études sur les formes les plus graves d'atteintes hépatiques aigües en RMN n'ont pas étudié la région des AAro et se sont focalisées sur les métabolites du phosphore, les lipides et la glutamine. Dans ces études concernant les atteintes fulminantes, représentant les formes les plus graves d'atteintes hépatiques, la concentration des métabolites phosphorés semble bien corrélée avec la gravité de la dysfonction hépatocellulaire¹⁴⁷.

L'étude des lipides en ^{13}C RMN et ^1H RMN à partir du tissu hépatique obtenu par biopsie a montré que les profils lipidiques sont modifiés, avec une augmentation du rapport AG libres / AG totaux et une diminution du rapport lipides polyinsaturés / lipides monoinsaturés, quelque soit la cause de l'atteinte aigüe ¹⁴⁸.

En RMN du proton, l'étude du métabolisme de la glutamine et de l'urée a montré une perturbation importante de ces métabolites avec une augmentation de la glutamine et une diminution de l'urée. Cela pourrait avoir un intérêt dans la prédiction de la survie chez des patients présentant une hépatite fulminante quelque soit l'étiologie ¹⁴⁹.

Au total, les résultats de cette approche métabolomique des atteintes aiguës du foie sont encourageants mais néanmoins insuffisants pour permettre de conclure à son utilité en pratique quotidienne dans l'évaluation de la fonction hépatocellulaire ; une évaluation à plus grande échelle, incluant différentes étiologies et différents stades d'atteinte hépatique pourrait permettre de mieux définir le pronostic de ces maladies.

3.5.2 Atteintes médicamenteuses du Foie

La première cause de retrait d'un médicament du marché est l'apparition d'effets indésirables hépatiques. En effet, il existe une susceptibilité individuelle d'origine génétique à la tolérance aux médicaments ¹⁵⁰. Celle ci n'est, pour le moment, pas individuellement prévisible.

Le paracétamol est l'un des principaux médicaments impliqués dans les hépatites médicamenteuses. Si les études précliniques chez l'animal utilisant la métabolomique par RMN pour étudier les effets des drogues sur le foie sont maintenant courantes, l'application de cette technique chez l'homme n'en est qu'à son début. Winnke *et al.* ont évalué l'intérêt de la RMN de l'urine dans la prédiction individuelle de la toxicité hépatique du paracétamol.

Les volontaires ont été exposés à une dose maximale thérapeutique de paracétamol (4 grammes) pendant 7 jours. L'urine a été prélevée avant traitement, puis chaque jour du traitement et les marqueurs biologiques sériques habituels d'atteinte hépatique (Alanine-Amino-Transférase, ALAT) ont été dosés. Le profil métabolomique urinaire prétraitement ne permettait pas de prédire le risque de toxicité hépatique. Par contre, après une courte exposition au paracétamol et avant même qu'il n'y ait une élévation de l'ALAT, les profils urinaires étaient prédictifs d'une atteinte hépatique. Les métabolites urinaires prédictifs étaient les métabolites dérivés du métabolite toxique du paracétamol, le N-acetyl paraquinone imine ¹⁵¹. Pour comprendre le mécanisme physiopathologique chez l'homme, la même équipe a utilisé une approche transcriptomique et métabolomique par SM et RMN, dans une étude contre placebo, et a montré qu'après 48 heures d'exposition à une dose unique suprathérapeutique de 4 grammes de paracétamol, il existait des modifications transcriptomiques et métabolomiques. D'un point de vue transcriptomique, il y avait une diminution de l'expression des gènes codant pour une protéine mitochondriale jouant un rôle dans la phosphorylation oxydative. D'un point de vue métabolomique par RMN du proton, les patients exposés au paracétamol montraient tous une augmentation du lactate ; celle ci était concomitante à une diminution de l'expression des gènes de la protéine mitochondriale¹⁵².

Ces deux études sont des exemples concrets d'utilisation de techniques « omiques » associant pharmacogénomique et pharmacométabolomique pour l'évaluation d'un risque de toxicité médicamenteuse individuel.

Tableau 6: Atteintes aiguës du foie et pharmacométabolomique

Technique	Objectif de l'étude	Patients étudiés	Principaux Résultats	Références
¹³ P SMR <i>in vivo</i>	Mesures séquentielles des modifications des ³¹ P métabolites comparativement au TP dans les insuffisances hépatiques aiguës	18 patients avec hépatite au paracétamol	↓des métabolites ³¹ P avec la ↓ du TP.	147
¹³ P SMR <i>in vivo</i>	Evaluation de la modification des métabolites ³¹ P lors des atteintes hépatiques virales.	26 patients avec hépatites A aiguës	↑PME/PDE à la phase aiguë. Normal dans les 6 semaines après l'infection.	153
¹³ C RMN et ¹ H RMN Tissu	Description des anomalies lipidiques dans les insuffisances hépatiques aiguës	Patients avec insuffisance hépatique aiguë et témoins	↑AGlibres/AGtotaux et ↓lipides polyinsaturés/lipides monoinsaturés dans les insuffisances hépatiques aiguës .	148
¹ H RMN Sérum Urines	Recherche de biomarqueurs prédictifs du risque de décès dans les hépatites fulminantes	22 patients avec hépatite fulminante (12 survivants et 10 décès)	Marqueurs précoces de risque de décès : ↑Glutamine/Créatinine et Urée/Créatinine urinaires	149
¹ H RMN Sérum	Recherche de biomarqueurs de lésion hépatique traumatique dans les traumatismes abdominaux fermés.	96 patients avec traumatisme abdominal (dont 84 traumatismes hépatiques) et 38 Témoins	↑phénylalanine (sensibilité 100%) et ↑tyrosine (sensibilité 98,8%) lors d'un traumatisme hépatique	138
¹ H RMN Urines	Evaluation du profil urinaire avant administration de paracétamol et prédiction de son métabolisme (pharmacométabolomique)	99 volontaires sans pathologie hépatique pré-existante	Pré-dose : si ↑ <i>p-cresol</i> urinaire, ↓des métabolites urinaires de paracétamol après injection et ↑ risque de toxicité du médicament.	57
¹ H RMN et SM Sérum	Recherche de biomarqueurs de prédisposition à la toxicité hépatique du ximelagatran (134 patients traités par ximelagatran	Patients prédisposés : ↓ pyruvate, ↑ corps cétoniques, ↑glutamine, ↓cystéine	154
¹ H RMN Urines	Détermination de la capacité des profils urinaires de volontaires sains à prédire la toxicité hépatique du paracétamol	71 volontaires sans pathologie hépatique préexistante	Profils urinaires après la première administration prédictifs d'une toxicité hépatique du paracétamol à dose thérapeutique.	151
¹ H RMN Sérum Urines	Recherche des anomalies métaboliques spécifiques lors des hépatites aiguës B et E.	26 patients avec hépatite E, 6 avec hépatite B et 18 volontaires	Anomalies de la glycolyse, du cycle de Krebs et de l'urée dans les hépatites B et/ou E <i>versus</i> témoins. Altération du métabolisme de la thiamine dans les hépatites E uniquement	146

Notes: TP: Temps de prothrombine ; AG : Acides Gras ; PME : phosphomonoesters ; PDE : phosphodiester

3.5.3 Applications dans les maladies chroniques du foie

L'approche métabolomique par RMN dans les maladies chroniques du foie a fait l'objet de nombreuses recherches, contrairement aux atteintes aiguës. Les études sont basées sur les profils métaboliques du sérum, de l'urine, de la bile ou du tissu avec différents objectifs : exploration des perturbations métaboliques globales, explications physiopathologiques, évaluation de la gravité et/ou outil diagnostique.

3.5.3.1 Approche diagnostique et physiopathologique des hépatopathies

Plusieurs études ont eu une approche diagnostique utilisant la métabolomique en SM ou en RMN. Elles ont comparé des profils métaboliques ou ont recherché des biomarqueurs permettant d'aider au diagnostic.

Les études sur le tissu *in vitro* (principalement en HR-MAS), le foie *in vivo* et le sérum ont montré qu'il existait chez les patients cirrhotiques une nette perturbation du métabolisme des phospholipides avec une augmentation du PE et PC concomitante d'une diminution du GPE et du GPC^{155, 156}. Il a de plus été montré que le foie cirrhotique présentait un défaut de production d'ATP par rapport au foie non cirrhotique¹⁵⁷. Plus spécifiquement dans les atteintes stéatosiques du foie d'origine non alcoolique, il existait comparativement aux témoins, une anomalie des phospholipides, des AG libres et des AB¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Il a de même été décrit dans les NAFLD une augmentation nette d'un marqueur indirect de l'état d'oxydo-réduction et du stress oxydatif, le dipeptide γ -Glutamyl¹⁶⁰. Ces anomalies du stress oxydatif ont été également observées dans une autre étude chez des malades présentant une maladie alcoolique de foie non cirrhotique¹⁶¹. Les autres modifications discriminant patients cirrhotiques et témoins concernent principalement le

métabolisme du glucose et des acides aminés ¹⁶². Les anomalies précédemment décrites semblent être présentes à un stade précoce de la maladie, bien avant l'apparition d'une insuffisance hépatocellulaire cliniquement et biologiquement décelable ¹⁶².

Les profils métaboliques des patients présentant une hépatopathie ou une cirrhose sont donc bien différents des témoins. Ils permettent de différencier, à partir du tissu, les témoins, des patients avec hépatopathie virale C sans cirrhose, de ceux avec hépatite virale C et cirrhose, ceci tout aussi bien que l'anatomopathologiste^{155, 162}. D'autre part, les profils urinaires ont permis une discrimination des patients présentant ou non une hépatite C avec une sensibilité et une spécificité de 94 et 97% respectivement¹⁶³.

3.5.3.2 Evaluation de la gravité et complications des hépatopathies et des cirrhoses

L'évaluation de la gravité est un enjeu majeur notamment pour orienter la prise en charge des malades. Cette évaluation doit permettre de connaître le stade de l'hépatopathie (cirrhotique ou non), le degré d'atteinte hépatique, notamment sur le plan fonctionnel avec l'importance de l'insuffisance hépatocellulaire sous jacente, et la survenue antérieure de complications comme l'encéphalopathie ou la décompensation de la cirrhose.

Différentes études ont montré qu'il existait une corrélation entre le degré de l'atteinte hépatique et les anomalies du métabolisme des phospholipides et du phosphore. Dans différentes étiologies il existe, *in vivo* et *in vitro*, une augmentation des PME ¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ en fonction du degré d'inflammation et du degré de fibrose.

Dans les hépatopathies stéatosiques non alcooliques (NAFLD), différents profils lipidiques ont été décrits en fonction du stade de la maladie (stéatose, NALD, NASH). Les

principales modifications concernaient les phospholipides et les eicosanoïdes ^{158, 168}, bien que cela n'ait pas été confirmé dans toutes les études ¹⁶⁰.

Dans les hépatopathies virales C, outre les modifications du métabolisme des phospholipides qui sont bien corrélées avec le degré de fibrose ¹⁶⁴, il existe aussi une modification portant essentiellement sur les lipides insaturés présents en plus grande quantité lorsque la fibrose est avancée ¹⁶⁹.

Les mêmes anomalies des phospholipides ont été trouvées dans les hépatopathies virales B permettant notamment de différencier les hépatopathies avec et sans insuffisance hépatique^{169, 170}. Il existe une nette différence entre la cirrhose virale B avec et sans insuffisance hépatique notamment en ce qui concerne le métabolisme des acides aminés aromatiques, du pyruvate et des lipides ¹⁷¹. Toujours dans le cadre de l'hépatite B, plusieurs biomarqueurs potentiels ont été identifiés en SM, permettant de différencier l'atteinte chronique sans cirrhose de l'atteinte avec cirrhose ¹⁷².

L'encéphalopathie est une complication fréquente et grave de la maladie hépatique chronique. Elle correspond à un syndrome neuropsychiatrique recouvrant un large panel de dysfonctionnements cérébraux, incluant l'altération de la fonction intellectuelle, de la conscience et des fonctions motrices¹⁷³. Son diagnostic est clinique et il existe différents stades. Récemment le concept d'encéphalopathie hépatique minimale (EHM) ou sub-clinique est apparu. Elle correspond à une atteinte de l'encéphale dans le cadre de la cirrhose, de diagnostic souvent difficile mais pouvant avoir de graves répercussions sur la qualité de vie du fait des troubles de l'attention et de la concentration. Dans l'étude de Jimenez *et al.*, les principaux métabolites sériques ayant une concentration élevée chez les cirrhotiques avec EHM étaient le glucose, le lactate, le triméthylamine-N-oxide (TMAO), le glycérol et la méthionine. On observait en revanche une diminution des acides aminés

branchés, de l'alaline, des N-acetyl-glyproteines, de l'acetoacetate et de la glycine. Les perturbations métaboliques décrites dans le groupe EHM sont le reflet d'un hypermétabolisme décrit dans les insuffisances hépatiques avancées. La présence d'une diminution des corps cétoniques pourrait correspondre à une augmentation de leur utilisation cérébrale en l'absence de possible utilisation du glucose et/ou à une décroissance de la cétonogénèse hépatique secondaire à un dysfonctionnement mitochondrial hépatique. De même, l'élévation du glycérol pourrait être en rapport avec une dysfonction de la néoglucogénèse connue chez les patients cirrhotiques. Outre les renseignements physiopathologiques apportés dans cette étude, la RMN permet d'obtenir une empreinte biologique des patients présentant une EHM et en facilite son diagnostic ¹⁷⁴.

3.5.3.3 Différences entre les étiologies des hépatopathies

Les hépatopathies chroniques, cirrhotiques ou non, ont probablement des mécanismes physiopathologiques différents, impliquant souvent une réponse inflammatoire à des agressions d'origines diverses : lésion directe pour l'alcool, lésion directe et indirecte pour les causes virales. Il semble donc possible que l'approche métabolomique dans ce contexte permette de différencier les différentes causes d'hépatopathies. A ce jour, cependant, peu d'études ayant pour objectif de décrire les profils et/ou biomarqueurs en fonction de l'étiologie pour les différentes hépatopathies ont été menées.

L'étude *in vivo* du métabolisme du phosphore au cours d'hépatopathies d'étiologies variées a permis d'observer une augmentation du phosphore inorganique dans les causes

virales et une nette diminution dans les causes biliaires¹⁶¹. Dans cette étude, les causes alcooliques et virales étaient différenciées par une diminution de la résonance des PDE.

In vitro, les profils sériques des patients avec cirrhose alcoolique présentaient une résonance plus importante de la glutamine/glutamate et de l'acétoacétate par rapport aux patients avec cirrhose virale B. Dans le cadre de l'hépatite C, les profils lipidiques étaient différents en fonction du génotype de virus (type 1 ou 3) ¹⁶⁹.

Enfin, un nouveau biomarqueur, reflet de l'état d'oxydo-reduction hépatique et de la production de glutathion, le dipeptide γ -Glutamyl pourrait permettre de différencier des atteintes hépatiques entre elles¹⁷⁵.

Ces études *in vivo* ou *in vitro* permettent de mieux comprendre les perturbations métaboliques présentes lors des hépatopathies chroniques. D'après l'ensemble de ces études, on peut retenir que la RMN pourrait permettre spécifiquement d'évaluer la gravité de la dysfonction hépatique notamment en étudiant les métabolites phosphorés. Elle pourrait aussi permettre une surveillance de l'évolution de la maladie comme dans les cirrhoses virales C ¹⁶⁴ ou les hépatopathies dysmétaboliques ¹⁶⁸, ou bien encore être prédictive d'une réponse thérapeutique ¹⁷⁶ et avoir une valeur pronostique ¹⁷⁷.

Tableau 7: Atteintes chroniques du foie *in vivo* et *in vitro*

Technique	Objectif de l'étude	Patients étudiés	Principaux Résultats	Réf.
³¹ P SMR <i>in vivo</i>	Détermination du mécanisme de diminution de synthèse de l'urée chez le cirrhotique	5 cirrhoses alcooliques et 5 volontaires sains	ATP ↓ en rapport avec une diminution de la capacité fonctionnelle notamment pour la synthèse d'urée.	157
³¹ P SMR <i>in vivo</i>	Evaluation de la gravité de la cirrhose	14 cirrhoses d'étiologie et de sévérité variables	PME ↑ avec la gravité de la cirrhose.	166
³¹ P SMR <i>in vivo</i>	Evaluation de l'effet de l'ingestion chronique d'alcool	26 alcooliques chroniques après consommation d'alcool, 17 réétudiés après abstinence et 16 volontaires sains.	↑ PME/ATP et ↓ PDE/ATP : en relation avec une anomalie du stress oxydatif et une induction du réticulum endoplasmique.	161
³¹ P SMR <i>in vivo et in vitro</i>	Description des modifications en fonction de la gravité de la cirrhose et de son étiologie.	85 cirrhoses prouvées d'étiologie variable et 16 volontaires sains.	↑ PME et ↓ PDE avec la gravité de la cirrhose. ↑ Pi dans les causes virales. ↓ PDE dans les cirrhoses alcooliques. ↓ Pi dans les causes biliaires.	165
³¹ P SMR <i>in vivo</i>	Relation entre les modifications des ³¹ P métabolites et les données cliniques, biologiques et histologiques.	38 patients avec hépatopathies chroniques d'étiologie variable et 22 volontaires sains.	↑ PME/Pi quand ↑ l'inflammation et la nécrose histologique.	167
³¹ P RMN <i>in vitro</i> Tissu	Etude de la composition des phospholipides membranaires <i>in vitro</i> sur des biopsies hépatiques	Patients cirrhotiques et volontaires sains	↑ PE, PC et ↓ GPE et GPC chez les cirrhotiques.	156
³¹ P SMR <i>in vivo</i>	Evaluation de la ³¹ P SRM comme marqueur pronostique dans la cirrhose biliaire primitive	23 CBP de sévérité variable et 16 volontaires sains	↑ PME/NTP, Pi/NTP, PME/PDE et PME/Pi chez les CBP.	177
³¹ P SMR <i>in vivo</i>	Evaluation des modifications des métabolites phosphorés par rapport aux types de lésions trouvées à la biopsie et étude de la réponse thérapeutique.	46 patients avec une hépatite chronique autoimmune ou virale et 16 volontaires sains	↓PDE/ATP est prédictif d'une mauvaise réponse thérapeutique et d'une évolution vers la cirrhose.	176
³¹ P SMR <i>in vivo</i>	Détermination de la capacité de la ³¹ P SRM à évaluer la gravité dans l'hépatite chronique C	48 patients avec hépatite virale C chronique prouvée histologiquement et 15 volontaires sains.	↑PME/PDE avec ↑ de l'atteinte hépatique (absence, mineure, modérée ou cirrhose).	164
¹ H RMN Tissu (HR-MAS)	Caractérisation des altérations métaboliques des hépatites C chroniques avec et sans cirrhose	17 patients avec hépatite C chronique avec et sans cirrhose	↑↓métabolisme lipidique, du glucose et des acides aminés précoce chez les cirrhoses. Différenciation entre tissus sains, et tissus des d'hépatites chroniques C sans et avec cirrhose par les profils.	155
SM Sérum	Etude des profils lipidiques des patients non obèses et patients avec NAFLD (NAFL et NASH).	25 patients avec NAFL, 50 patients avec NASH et 50 volontaires sains non obèses	NAFLD : ↑AGMI et ↑↓AGPI circulants. NASH : ↑PC, ↑PE. La progression entre témoin, NAFL et NASH : ↑ de l'activité de la lipoxigénase.	168

SM Sérum	Identification de biomarqueurs potentiels permettant de différencier l'hépatite chronique B de la cirrhose	20 patients présentant une hépatite B chronique sans cirrhose et 20 avec cirrhose	Cirrhose : ↑acide acétique, ↓sorbitol, ↓acide lactique, ↑acide hexanoïque, ↑acide butanoïque, ↓acide phosphorique, ↑naphtalénamine, ↓glucose et ↓glucitol.	172
SM Sérum	Utilité du profil métabolique dans la recherche de biomarqueurs des NAFLD.	42 patients obèses morbides 24 NAFL, 9 NASH)	NAFLD : ↑LPC, ↑acide deoxycholique, ↓créatine, ↓↑ AGLibres AFLD sévères : ↑GPL et des ↑eicosanoïdes.	158
¹H RMN Tissu (HR- MAS) et ¹H SRM in vivo	Etude de la composition métabolique en fonction de la sévérité de l'hépatopathie <i>in vitro</i> et de la corrélation des résultats <i>in vitro-in vivo</i>	95 patients avec hépatite C chronique : 47 patients dont 9 au stade de cirrhose (étude <i>in vitro</i>) et 59 patients dont 11 cirrhotiques (étude <i>in vivo</i>)	<i>In vitro</i> il existe une forte corrélation entre le degré de fibrose et la composition lipidique estimée par le pourcentage total de lipides, le rapport choline/lipides, l'index de saturation et de polyinsaturation. Cette relation est trouvée <i>in vivo</i> sauf pour les lipides insaturés. Les profils lipidiques sont différents entre le génotype 1 et 3 du VHC.	169
SM Sérum	Recherche de biomarqueurs et validation d'un modèle permettant de prédire l'insuffisance hépatique dans les hépatites B.	156 avec hépatite B chronique avec IHC, 21 hépatites chroniques sans IHC, 14 cirrhoses	Sensibilité de 100 % et spécificité de 94.3%. La phosphatidylcholine est le métabolite le plus discriminant	170
¹H RMN Sérum	Etude des profils métaboliques des patients cirrhotiques avec ou sans encéphalopathie	101 patients cirrhotiques dont 39 avec encéphalopathie et 69 volontaires.	patients cirrhotiques présentant une encéphalopathie hépatique minimale ↑glucose, ↑lactate, ↑TMAO, ↑glycérol, ↑méthionine et ↓acides aminés branchés, ↓alanine, ↓NAG, ↓acetoacetate ↓glycine	174
¹H RMN Urines	Etude de la valeur diagnostique des profils urinaires pour l'hépatite C	66 patients : 34 avec hépatite C (virémique) et 32 contrôles	Discrimination des patients avec et sans hépatite C à partir des profils urinaires (sensibilité 94%, spécificité 97%).	163
SM Sérum	Validation du γ-Glutamyl comme biomarqueurs d'atteintes hépatiques	217 patients dont 160 hépatopathies aiguës (DILI, VHA) ou chroniques et 57 volontaires sains.	γ-Glutamyl permet de différencier les atteintes hépatiques aiguës et/ou chroniques entre elles et les volontaires sains.	175
SM Sérum	Comparaison des profils métaboliques de patients avec NAFLD (NASH ou Stéatose) et de volontaires sains.	35 NAFLD (11 NAFL et 24 NASH) et 25 volontaires	NAFLD (NASH ou NAFL) : ↑AB (glycocholate, taurocholate, et glycochenodeoxycholate) et ↑glutamyl dipeptides, ↓cysteine-glutathione.	160
¹H RMN Tissu (HR- MAS)	Caractérisation des altérations métaboliques secondaires à la gravité de la cirrhose	68 patients avec hépatopathies chroniques : 11 cirrhoses et 57 hépatopathies non cirrhotiques	Cirrhose : ↑PC et PE et ↓glucose ↓aspartate et glutamine. ↑glutamate chez les non-cirrhotiques.	162
SM Tissu	Description du profil métabolique des foies stéatosiques	46 patients : 23 NAFLD et 23 témoins sans NAFLD	Les foies stéatosiques : ↑phospholipides), ↑AB, ↑↓AA (Hyp, Glc, GIt) ↓γ-glutamyl-dipeptide, ↓Creat, ↓des espèces antioxydantes.	159
SM Urines	Etude des profils métaboliques des patients avec ictère chronique ou aigu	85 patients avec ictère chronique ou aigu et 22 témoins	Altération du métabolisme de la glutamine, des corps cétoniques, de l'alanine et de l'aspartate chez les patients présentant un ictère aigu ou chronique par rapport aux témoins.	178

¹ H RMN Sérum	Etude des différences de profils métaboliques entre les cirrhoses virales B et les cirrhoses alcooliques	21 cirrhoses VHB, 20 cirrhoses alcooliques et 20 volontaires sains	Cirrhose VHB : ↑isobutyrate, ↑créatine Cirrhose alcoolique : ↑glutamine, ↑glutamate, ↑acetoacetate	179
¹ H RMN Sérum	Etude des variations des profils métaboliques de patients présentant une cirrhose virale B compensée et décompensée	30 patients avec cirrhose B compensée, 30 patients avec cirrhose B décompensée et 30 volontaires sains	↑citrate et ↑ pyruvate ↑acides aminés aromatiques et ↑glutamate ↑ LDL et VLDL chez les cirrhotiques virales B décompensés	171

Notes : IH : Insuffisance hépatique ; IHC : Insuffisance hépatique Chronique; NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFL : Non-Alcoholic Fatty Liver ; NASH : Non-Alcoholic SteatoHepatitis ; VHA : Virus de l'hépatite A ; VHB : Virus de l'hépatite B ; VHC : Virus de l'hépatite C ; PE : PhosphoEthanolamine ; PC : PhosphoCholine ; GPE : GlyceroPhosphoryEthanolamine ; GPC ; GlyceroPhophorylCholine ; LPC : LysoPhosphatidylCholine ; PtC : PhosphatidylCholine ; PME : phosphomonoesters ; PDE : phosphodiesters ; AGMI Acide Gras MonoInsaturé ; AGPI : Acide Gras Polyinsaturé ; NAG : N-Acetyl-glycoproteines ; TMAO : triméthylamine-N-Oxide ; AB : Acides Biliaires ; AG : Acides Gras ; Hyp : Hypoxanthine ; Glc : Glutamine ; Glt : Glutamate ; Creat : créatinine ; LDL : Low Density Lipoprotein ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein ; Sen : Sensibilité ; Spé : Spécificité

3.5.4 Applications dans les cancers hépatobiliaires

Quelle qu'en soit la cause, la cirrhose peut être considérée comme une condition précancéreuse prédisposant au développement du carcinome hépatocellulaire (CHC) ¹⁸⁰. Exceptionnellement développé sur foie sain, le CHC est la 5^{ème} tumeur maligne chez l'homme dans le monde par ordre de fréquence. Il représente plus de 5 % de l'ensemble des cancers et le nombre annuel de nouveaux cas excède 500 000 à l'échelle mondiale. Son diagnostic repose essentiellement sur l'augmentation de l' α -fœtoprotéine et sur la découverte d'un nodule hépatique suspect lors d'examen d'imagerie. Il n'existe pas de marqueur biologique ayant une assez bonne sensibilité et spécificité pour affirmer ou infirmer le diagnostic de carcinome hépatocellulaire. Les études appliquant la métabolomique ont été menées sur le tissu, la bile, le sérum ou l'urine de patients présentant des tumeurs hépatiques. Elles avaient pour buts essentiels l'aide au diagnostic de la maladie et le suivi thérapeutique après traitement, notamment après chimioembolisation artérielle. Les principales études sont résumées dans le Tableau 7.

3.5.4.1 Différenciation tissu tumoral et tissu sain

Les études visant à différencier le tissu sain du tissu cancéreux, quelle qu'en soit la cause (carcinome hépatocellulaire, métastase, lymphome...), ont été réalisées soit *in vitro* sur des pièces de biopsie, soit *in vivo* en SRM du proton et du phosphore. Les principaux résultats qui ressortent de ces études sont des modifications de la concentration en choline et de la composition des phospholipides. Dans le tissu cancéreux, il existe une augmentation de PE, PC ainsi qu'une diminution de GPC et GPE ¹⁸¹⁻¹⁸³. On observe aussi une augmentation

dans le tissu tumoral de Pi et de la production d'ATP probablement en rapport avec une augmentation de l'activité du métabolisme par rapport au tissu sain¹⁸¹. Ces modifications ne sont plus observées après traitement de la tumeur¹⁸⁴. En ¹H SMR, il existe par ailleurs une élévation de composés participant au cycle de Krebs (citrate, lactate) ¹⁸¹.

3.5.4.2 Diagnostic du CHC et du cholangiocarcinome: recherche de biomarqueurs

Concernant le CHC, les études en SM ou RMN *in vivo* et *in vitro* permettent de dresser une carte des anomalies métaboliques en rapport avec la présence du cancer par rapport à la présence d'une cirrhose ou d'un foie sain.

Comme décrit précédemment sur le tissu tumoral, il existe une augmentation non spécifique de choline et phosphocholine dans le tissu pathologique des patients ¹⁸⁵. Ces modifications ne sont pas trouvées dans les autres liquides biologiques. Par contre, il existe dans le sérum une diminution des composés contenant de la choline¹⁸⁶. Plus spécifiquement, le sérum et l'urine sont marqués par des anomalies du métabolisme des acides biliaires ¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ en présence d'un CHC. Il existe de même une anomalie de la composition des acides gras, dont certains sont absents du sérum des patients ¹⁸⁶ ainsi qu'une anomalie du métabolisme des sphingolipides ¹⁸⁸. Le métabolisme énergétique subit des modifications probablement en rapport avec l'utilisation de voies alternatives utilisant d'autres substrats que le glucose. Le glucose et certains acides aminés tels que la glutamine sont diminués dans le tissu cancéreux par rapport au tissu sain ou cirrhotique reflétant probablement une grande consommation d'énergie en relation avec une activité mitotique souvent intense ¹⁸⁵. Cette activité est marquée par une augmentation de métabolites

intermédiaires du métabolisme des acides aminés entrant dans le cycle de Krebs et la voie du pyruvate (créatine, phosphocréatine, créatinine, carnitine) dans le tissu et l'urine^{185, 189}.

Les études portant sur le cancer des voies biliaires (cholangiocarcinome) se sont spécifiquement intéressées à l'étude de la bile. Le résultat principal de 2 des 3 études disponibles est une diminution d'un phosphoglycéride, la phosphatidylcholine ou lécithine utilisable comme biomarqueur pour différencier les causes bénignes des causes malignes. L'altération du métabolisme de la phosphatidylcholine dans le cancer pourrait être secondaire à une altération de l'excrétion biliaire par les hépatocytes du fait d'une altération d'un transporteur (le MDR3). Ces résultats apportent des informations sur le rôle de la bile et de sa composition dans la physiopathogénie du cholangiocarcinome¹⁹⁰.

En résumé, il existe, notamment en présence d'un CHC, que cela soit dans le tissu, le sérum ou l'urine des marqueurs potentiels pouvant permettre le diagnostic. L'ensemble de ces marqueurs est le reflet d'une intense activité métabolique au sein du tissu tumoral avec la mise en œuvre de différentes voies énergétiques permettant la production d'énergie nécessaire au renouvellement cellulaire. Parallèlement, il existe de nombreuses anomalies de la composition lipidique et biliaire chez les patients présentant un CHC. Cependant, ces études portent sur de trop petits échantillons et sur des populations trop hétérogènes pour envisager une utilisation clinique de routine.

3.5.4.3 Evaluation de la réponse thérapeutique

L'évaluation de la réponse thérapeutique, uniquement après chimioembolisation artérielle (CEA) de CHC a été étudiée en RMN et SM. D'une façon intéressante, après CEA, il existe une modification importante de la composition du tissu. Immédiatement après CEA,

la ³¹P SRM montre une diminution du niveau d'ATP ¹⁸⁴. A distance, ce niveau est rétabli en rapport probablement avec une régénération hépatique. La composition en lipides, en acides aminés et en choline est de même modifiée après CEA ¹⁹¹⁻¹⁹³. La diminution de la choline semble être un marqueur de bonne réponse thérapeutique à distance de la CEA^{192, 193}.

Tableau 8 : Atteintes tumorales du Foie *in vivo* et *in vitro*

Technique	Objectif de l'étude	Patients étudiés	Principaux Résultats	Réf.
³¹ P SRM <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> Tissu	Evaluation <i>in vivo</i> de la mesure du rapport PME/PDE des tumeurs hépatiques et comparaison des résultats <i>in vitro</i> .	32 patients avec des tumeurs hépatiques malignes d'étiologie variée et 28 volontaires sains.	↑PME/PDE avec ↑ PE et PC et ↓GPC et GPE.	182
³¹ P SMR <i>in vivo</i>	Evaluation des modifications métaboliques à court et à long terme après chimioembolisation du CHC	5 patients avec CHC avant et après chimioembolisation (3 temps).	Après CEA : ↓ATP ↓PME ↓PDE ↑Pi A distance : ↓ PME/ATP et ↑ATP (régénération hépatique)	184
¹ H et ³¹ P SRM <i>in vitro</i> Tissu	Description des modifications métaboliques présentes dans le tissu sain et le tissu tumoral.	NC	Tumeur : ↑PC ↑PE ↑taurine, ↑citrate, ↑lactate ↑glycine (anomalie des voies énergétiques)	181
¹ H SRM <i>in vitro</i> Tissu	Evaluation de la possibilité de différencier le tissu sain du tissu cancéreux	122 biopsies hépatiques (31 normales, 59 cirrhoses et 32 CHC)	La sensibilité et la spécificité pour classer les différents types de tissu sont de 100%.	185
¹ H SMR <i>in vivo</i>	Valeur diagnostique de la ¹ H SMR pour les tumeurs hépatiques. Evaluation des modifications métaboliques après CEA.	33 patients avec des tumeurs hépatiques et 8 volontaires sains. 8 patients avec CHC avant et 2 à 5 jours après CEA.	Tumeurs malignes : ↑choline totale Après CEA : ↓choline ↑lipides ↑eau ↓choline totale/lipides	183
¹ H et ³¹ P RMN Bile	Détermination de la valeur diagnostique de la composition de la bile dans différentes situations d'obstruction	25 patients avec obstruction biliaire : 13 cancers (pancréas, cholangiocarcinome, métastase hépatique) et 12 causes non tumorales	↓phosphatidylcholine si obstruction tumorale	194
¹ H SMR <i>in vivo</i>	Monitoring de la réponse thérapeutique après CEA des CHC	20 patients avec CHC et 8 témoins	Avant CEA : ↑choline chez les patients présentant un CHC Après CEA : ↓ choline.	195
¹ H RMN Tissu (HR-MAS)	Evaluation de la possibilité de caractériser les CHC en HR-MAS	31 échantillons de tissu de 17 patients : 17 CHC (6 bas grades et 11 haut grades) et 14 échantillons adjacents sans CHC.	CHC : ↑Glc/Glt, ↑lactate, ↑Leu, ↑Ala, ↑PE, ↑PC ↑GPC ↓glycogène ↓ glucose CHC de haut grade/bas grade : ↑lactate, ↑Glc, ↑Glt, ↑Ala, ↑Leu, ↑créatine, ↑PE, ↑glycine et ↓lipides, ↓PC, ↓GPC, ↓glucose, ↓glycogène.	196
¹ H SMR <i>in vivo</i>	Différence entre tissu tumoral et tissu sain	55 patients avec lésions tumorales de plus de 3 cm de diamètre et 39 volontaires	Lésions tumorales : ↓Choline	197

SM Sérum	Etude des différences de métabolites dans le sérum de patients présentant un CHC	20 CHC et 20 témoins	Métabolites discriminants : acide butanoïque, acide ethanimidique, glycérol, L-isoleucine, L-valine, acide minomalonique, D-erythrose, acide hexadecanoïque, acide octadecanoïque, et acide 9,12-octadecadiénoïque.	198
SM Urines	Diagnostic de CHC à partir du profil métabolique urinaire	20 CHC et 20 témoins	↑AG, acides organiques et inorganiques, AA (Glycine, Thréonine, Tyrosine, Proline), nucléosides (Purine, Hypoxanthine), urée discriminants dans l'urine des CHC.	199
SM Urines	Identification des voies métaboliques perturbées et recherche des biomarqueurs de CHC	21 CHC et 24 témoins	Les principales voies métaboliques impliquées: le métabolisme de l'arginine, de la proline, de l'alanine et de l'aspartate, la voie de dégradation de la lysine ainsi que le métabolisme du nicotinate et de la nicotinamide. Anomalies de l'oxydation des AG chez les CHC.	200
SM Sérum	Recherche de biomarqueurs de cirrhose induite par VHB et CHC	25 CHC, 24 cirrhotiques et 25 témoins	AB (acide lycocholique, glycochenodeoxycholique, taurocholique taurochenodesoxycholique) sont de potentiels biomarqueurs pour la cirrhose. La dihydrosphingosine et phytosphingosine potentiels biomarqueurs du CHC.	188
¹H RMN Sérum	Description des différences métaboliques entre cirrhose, CHC et témoins	38 patients cirrhotiques, 39 CHC et 63 témoins	Différence entre témoins et cirrroses ou CHC sur les AA (Leu, Isoleu, Glc, Val, Tau, Tyr, Phe), les LDL et VLDL, corps cétoniques, les NAG et les lipides insaturés. <i>Pas d'information sur les métabolites différenciant les cirrroses et les CHC.</i>	92
¹H RMN Bile	Evaluation de l'intérêt des profils métaboliques de la bile pour le diagnostic de cholangiocarcinome	17 cholangiocarcinomes et 21 pathologies biliaires bénignes	Quatre métabolites sont discriminants : ↑citrate, ↑lactate, ↑choline et ↓glucose La prédictibilité de la RMN de la bile pour le diagnostic est supérieure aux marqueurs classiques (CA19-9, CEA, Cytologie).	91
¹H RMN Bile	Description et quantification des métabolites présents dans la bile avec cholangiocarcinome	5 cholangiocarcinomes et 20 autres pathologies biliaires non tumorales	Le profil métabolique biliaire avait une sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et négative respectivement de 80, 95, 80 et 95%. Les principaux métabolites étaient : ↑glycine et ↑taurine conjuguée à un AB qui sont élevées dans les cholangiocarcinomes, ↓phosphatidylcholine et ↓AB (H18).	190
¹H RMN Urines	Recherche de marqueurs urinaires de CHC secondaires au VHB	18 patients africains avec VHB et HCC, 10 patients avec cirrhose post VHB et 15 témoins	Bonne discrimination (Sen 100%, Spé 89,5%) des patients sains et CHC. Les principaux métabolites discriminant les HCC, hépatite chronique B et témoins sont la créatinine, la carnitine, la créatine et l'acétone.	189
¹H SMR	Evaluation des modifications métaboliques après CEA	25 patients avec CHC	Après CEA : ↓Cho/Lip, ↓Glu/Lip, et ↓Glx/Lip	191

SM Sérum Urines	Recherche de biomarqueurs urinaires et sanguins de CHC	82 patients avec CHC, 24 avec tumeurs bénignes du foie et 71 témoins	Il existe une perturbation du métabolisme des acides biliaires, des AG, de la glycolyse, de l'urée, et de la méthionine chez les patients présentant un CHC.	187
SM Plasma	Etude des modifications du métabolisme des lipides chez les patients présentant un CHC	20 patients avec CHC :19 cirrhotiques et 1 non cirrhotique. 28 contrôles (22 Leucémies Aigües Myeloblastiques et 6 volontaires sains)	CHC : ↑glycodeoxycholate, ↑3-sulfate deoxycholate, ↑bilirubine ↓lysophosphocholines. Acide lignocerique et nervonique absents du plasma des patients avec CHC.	186
¹H RMN Urines	Recherche de marqueurs urinaires de CHC secondaires au VHC	16 patients avec VHC et CHC, 14 cirrroses post VHC et 17 témoins	La sensibilité et la spécificité pour différencier les CHC des témoins étaient de 100% et 81%. La sensibilité et la spécificité pour différencier les CHC des cirrroses étaient de 94% et 71%. Etude de validation des résultats de ¹⁸⁹	175
¹H RMN Bile	Comparaison des profils métaboliques de la bile de deux types de patients (Egyptiens et Anglais) ayant un cholangiocarcinome	8 patients avec cholangiocarcinome (4 Egyptiens et 4 Anglais) et 21 patients avec pathologie biliaire non tumorale	↓phosphatidylcholine dans les cholangiocarcinomes. Différence de composition de la bile des Egyptiens et des Anglais, sur le niveau de phosphatidylcholine reflétant une carcinogénese différente.	201
¹H SMR in vivo	Evaluation de la réponse thérapeutique précoce après CEA d'un CHC.	44 patients avec CHC	Un mois après CEA, ↓choline si réponse thérapeutique est considérée comme bonne.	192
³¹P SMR in vivo	Evaluation des modifications du métabolisme du phosphore dans la surveillance et la prédiction de la réponse thérapeutique après CEA des CHC	17 patients avec CHC	Après CEA : ↓PDE/NTP et ↓PDE/TPC. Groupe avec bonne réponse thérapeutique (n=12) ↓PDE/TPC et ↑NTP/TPC. Groupe avec mauvaise réponse thérapeutique (n=5), aucune modification.	193

Notes : CHC : Carcinome hépatocellulaire ; NASH : Non-Alcoholic Steatotic Hepatitis ; VHA : Virus de l'hépatite A ; VHB : Virus de l'hépatite B ; VHC : Virus de l'hépatite C ; Sen : Sensibilité, Spé : Spécificité ; VPP ; valeur prédictive positive, VPN, valeur prédictive négative ; AA : Acides aminés ; Lys : Lysine ; Ala : Alanine ; Leu : Leucine ; Glc : Glutamine ; Glt : Glutamate ; His : Histidine ; Thr : Thréonine ; PE : Phosphoethanolamine ; PC : Phosphocholine ; GPE : Glycerophosphoryéthanoline ; GPC : Glycerophosphorylcholine ; PME : phosphomonoesters ; PDE : phosphodiester ; NTP : nucléoside triphosphates ; CTP : contenu total de Phosphore ; NAG : N-Acetyl-glycoprotéines ; TMAO : triméthylamine-N-Oxide ; CEA : ChimioEmbolisation par voie Artérielle

3.5.5 Application en transplantation hépatique

La transplantation hépatique est la thérapeutique ultime lors des insuffisances hépatiques aiguës fulminantes, des insuffisances hépatiques aiguës chez les patients cirrhotiques ou des patients cirrhotiques graves. Elle est réalisée à partir d'une partie de foie d'un patient vivant ou beaucoup plus fréquemment dans les pays occidentaux, à partir d'un foie d'un patient en mort encéphalique. La surveillance post-transplantation est primordiale, notamment pour le diagnostic précoce de dysfonction du greffon et de rejet aigu.

Duarte et *al.* ont réalisé l'unique étude chez l'homme sur le tissu utilisant la RMN en HR-MAS et décrivant les modifications métaboliques avant prélèvement du foie sur le donneur, durant la phase d'ischémie froide et après transplantation chez le receveur. Six greffons ont été inclus dans cette étude. Tous les greffons hépatiques avaient avant prélèvement une fonction hépatocellulaire normale. L'aspect macroscopique du foie était normal pour 4 des foies et stéatosique pour deux d'entre eux. Un patient receveur d'un des foies stéatosiques a développé une dysfonction du greffon et est décédé. Les résultats des profils obtenus sont essentiellement descriptifs et montre des variations de différents métabolites (lipides, acides aminés, lactate, glucose) entre les différents donneurs et durant ces trois phases. Tout d'abord, il existait une différence aussi bien en ce qui concerne la composition lipidique que pour les petites molécules entre les différents donneurs. Pendant la phase d'ischémie froide, les foies sont perfusés à l'aide d'une solution glucosée. Les spectres des biopsies de foie après cette période montraient tous une augmentation des signaux dans la région du glucose sauf pour les deux foies stéatosiques. L'absence de cette augmentation de signaux pourrait être un signe de mauvaise clairance de la solution glucosée en rapport soit avec le degré de stéatose hépatique soit avec une dysfonction du

greffon. Une autre différence était la diminution lors de la phase d'ischémie froide de la GPC en rapport avec une diminution du métabolisme membranaire des cellules. Un foie stéatosique ne présentait pas de diminution de la GPC et une dysfonction du greffon a été diagnostiquée chez le receveur. Ces résultats préliminaires ont pour intérêt de décrire les modifications métaboliques au cours des différentes phases du prélèvement à la greffe mais sont effectuées sur un trop petit nombre de sujets pour permettre d'évaluer des facteurs prédictifs de dysfonction précoce du greffon en RMN ²⁰². En SM, à partir de biopsies de foie, réalisées avant et après perfusion, une augmentation de la production d'urée, d'AB et une diminution des composés contenus dans le soluté de conservation indiquent une reprise de l'activité métabolique et un bon fonctionnement du greffon ²⁰³.

Toutes les autres études ont été pratiquées sur les liquides biologiques : sérum, urine ou bile. L'analyse de la bile était bien corrélée avec le degré de stéatose hépatique ainsi qu'avec le bon fonctionnement du greffon. En présence d'une stéatose importante, il existe une augmentation de la phosphatidylcholine dans la bile. D'autre part, l'analyse séquentielle de la bile à différents temps pendant l'intervention pourrait permettre d'évaluer le bon fonctionnement du foie (diminution du glucose et du lactate)²⁰⁴. En SM, l'augmentation des différents types d'AB, notamment l'acide taurocholique, avant et après reperfusion pourrait être un marqueur de bon fonctionnement du greffon. Dans le sang et l'urine, une augmentation du lactate, de la glutamine et des acides aminés aromatiques après greffe pourrait être un signe de dysfonction aigüe^{203, 205, 206}. L'intérêt de l'utilisation de la métabolomique dans ce contexte est principalement la précocité du diagnostic. Malheureusement, ces études sont toutes pour la plupart des cas cliniques avec trop peu de patients pour conclure définitivement.

Tableau 9 : Transplantation hépatique

Technique	Objectif de l'étude	Patients étudiés	Principaux Résultats	Réf
³¹ P SMR <i>in vivo et In vitro</i> Tissu	Description des anomalies <i>in vivo</i> en SRM des patients présentant un rejet chronique cholestatique	16 patients transplantés et 29 contrôles (23 témoins et 6 pathologies biliaires)	Cholangite chronique : ↑PME et ↑PDE. <i>In vitro</i> , ↑ PE et PC et ↓ du GPE et GPC.	204
¹ H RMN Bile	Descriptions séquentielles des profils métaboliques de la bile avant puis 10, 20 ,30 minutes après la greffe	8 patients donneurs et 4 receveurs	Avant greffe : ↑phosphatidylcholine dans la bile des greffons stéatosiques. Après greffe : ↑initiale des résonances dans la région du glucose correspondant au soluté de conservation puis ↓ à 10, 20 et 30 minutes sauf pour les foies présentant une dysfonction du greffon. Pas de ↓lactate pour les foies présentant une dysfonction.	207
¹ H RMN Sérum Urines	Description d'un cas de dysfonction aigüe du greffon secondaire à une thrombose précoce de l'artère hépatique	1 patient transplanté	↑ précoce de la glutamine sanguine et urinaire au troisième jour et une ↓ de l'urée dans l'urine suggérant une anomalie aigüe du cycle de l'urée.	206
¹ H RMN Tissu (HR-MAS)	Description séquentielle des modifications métaboliques du foie transplanté (avant prélèvement, après la période d'ischémie froide, après transplantation)	6 patients transplantés	Après ischémie, ↑ des résonances dans la région du glucose correspondant au soluté de conservation sauf pour deux foies stéatosiques. ↓GPC du à une diminution du métabolisme cellulaire sauf pour un foie stéatosique qui a développé une dysfonction du greffon.	202
¹ H RMN Sérum	Description des profils métaboliques sériques avec dysfonction aigüe du greffon	1 patient transplanté	Les modifications métaboliques lors du rejet apparaissent précocement avant que les marqueurs biologiques usuels avec ↑lactate, ↑glutamine, ↑méthionine et ↑citrate	205
¹ H RMN Sérum	Détermination des biomarqueurs en rapport avec la fonctionnalité du foie après greffe	9 patients transplantés	9 métabolites ↑ en rapport avec une dysfonction précoce du greffon : lactate, alanine, lysine, glutamine, méthionine, asparagine, tyrosine, histidine et phénylalanine.	208
SM Tissu	Evaluation de la faisabilité d'analyse des profils avant et après reperfusion du greffon	8 patients transplantés	Différence de profil avant et après reperfusion du greffon avec une ↑ d'urée, de la synthèse des acides biliaires et de la clairance du soluté de préservation indiquant une reprise de l'activité métabolique du greffon après reperfusion.	203
SM Tissu	Evaluation d'une méthode pour l'analyse des tissus	20 foies (10 foies transplantés et 10 récusés pour la transplantation)	Il existe une différence de profil métabolique entre foies acceptés pour la transplantation et foie récusés. <i>Aucune donnée sur les métabolites.</i>	209
SM Bile	Analyse séquentielle de la composition de la bile avant et après transplantation	10 patients transplantés	Après transplantation, ↑ de l'acide taurocholique et taurochenodeoxycholique. en relation avec une régénération hépatique et une synthèse <i>de novo</i> .	210

4 Présentation des travaux de recherche : Métabolomique par RMN du proton, cirrhose alcoolique et complications

4.1 Rationnel de la recherche

Les différentes approches métabolomiques des maladies du foie décrites précédemment montrent tout d'abord l'intérêt grandissant des cliniciens pour cette technique. Les différentes études se sont surtout centrées sur les maladies du foie d'origine virale, première cause mondiale d'hépatopathie chronique. Il existe peu d'études appliquant la métabolomique par RMN aux hépatopathies chroniques d'origine alcoolique.

Nos premiers travaux, présentés dans ce manuscrit, se sont donc axés naturellement sur la cirrhose d'origine alcoolique. Les raisons de ce choix sont d'ordre épidémiologique et méthodologique. Du point de vue épidémiologique, l'alcool est la 1^{ère} cause de cirrhose en France, représentant à elle seule plus de 80% des cas. Les complications peuvent être aiguës, principalement représentées par le sepsis ou l'hémorragie digestive, ou chroniques comme le carcinome hépatocellulaire (CHC). Ces complications peuvent être responsables d'une aggravation de la fonction hépatique de patients souffrant d'une cirrhose préalablement compensée ou bien non compensée mais jusqu'alors stable. C'est pourquoi, dans un souci d'homogénéité, nous n'avons considéré qu'une seule étiologie et nous avons étudié les perturbations métaboliques dans cette population. Comme nous l'avons décrit précédemment, il existe des différences métaboliques en fonction de l'étiologie de la cirrhose, notamment entre la cirrhose d'origine virale B et la cirrhose d'origine alcoolique¹⁷⁹ ; Il est très probable qu'il en soit de même pour les autres causes.

Notre approche métabolomique s'est focalisée sur trois points. Le premier a été de décrire les perturbations métaboliques des patients présentant des degrés d'insuffisance hépatocellulaire différents, évalués par un score uniquement biologique et validé dans la littérature comme étant la référence : le MELD score. Cette première approche a été fondamentale pour la suite de nos travaux. Nous avons ainsi pu décrire les différentes variations de métabolites en dehors de toute complication aiguë ou chronique comme le cancer, en fonction du degré d'insuffisance hépatocellulaire du patient. La plupart de ces modifications étaient déjà connues dans la cirrhose, mais l'intérêt de notre étude a été de montrer, en une seule expérience, l'ensemble des modifications du métabolome. Un autre point important présent dans les résultats de notre étude, mais non discuté dans l'article, a été de mettre en évidence que pour un même niveau de gravité, c'est-à-dire à MELD équivalent, les patients pouvaient présenter des métabolomes différents. La RMN du sérum dans ce contexte pourrait ainsi être un outil permettant de mieux stratifier les patients présentant une insuffisance hépatocellulaire chronique, notamment pour ceux en attente de greffe hépatique.

Le second volet de nos travaux a consisté à décrire les profils métaboliques sériques des patients cirrhotiques présentant un cancer hépatocellulaire. L'intérêt de ce travail a été tout d'abord de confirmer que la présence d'un CHC perturbait l'homéostasie sérique et que les modifications étaient détectables dans le sérum. Nous avons donc d'abord créé un modèle en comparant des patients présentant un CHC de taille importante (nodule > 5cm ou plus de trois nodules > 3cm), par définition non curables et des patients cirrhotiques sans CHC. En pratique clinique, cette approche a un intérêt relativement limité pour le diagnostic mais elle nous a permis de décrire les modifications métaboliques induites par la présence d'un CHC (diagnostic confirmé par les moyens diagnostics usuels). La seconde

partie, plus pertinente sur le plan clinique a eu pour objet d'analyser le sérum de patients présentant un nodule de petite taille (<5 cm), situation qui pose souvent un problème diagnostique. Tous les patients ont eu une biopsie avant traitement confirmant ainsi le diagnostic de CHC. Ces sérums ont été projetés sur le modèle initialement construit avec les CHC de taille supérieure. D'une façon intéressante, les petits CHC se projetaient de façon hétérogène : ceux qui se projetaient du côté des gros CHC récidivaient plus fréquemment que les autres. Cette étude pilote montre que la RMN pourrait avoir un intérêt dans le choix thérapeutique et le pronostic des petits CHC.

Notre dernier travail a concerné une population de patients cirrhotiques hospitalisés en réanimation dans les suites d'un sepsis ou d'une hémorragie digestive grave. Les patients cirrhotiques souffrent d'une insuffisance hépatocellulaire chronique de degré et d'expression variable. Lorsqu'ils subissent une agression externe, ils peuvent aggraver brutalement leur fonction hépatique déjà précaire et réaliser un tableau d'insuffisance hépatique aigüe sur insuffisance hépatocellulaire chronique (IHAC ou Acute on Chronic Liver Failure). Ce syndrome, non clairement défini dans la littérature, a des conséquences systémiques potentiellement graves car il est responsable de défaillances d'organes et il augmente la mortalité de ces patients. C'est pourquoi, le diagnostic précoce de ce syndrome pourrait avoir un intérêt majeur dans la prise en charge des patients et l'amélioration de celle-ci.

4.2 Travaux de recherche

4.2.1 Evaluation des modifications métaboliques chez les patients cirrhotiques présentant une insuffisance hépatocellulaire chronique de gravité différente évaluée par le score de MELD (*Publié Journal of Proteome Research, Juillet 2011*)

La cirrhose a pour conséquence l'apparition d'une insuffisance hépatocellulaire chronique (IHC). Le score de Child-Pugh-Turcotte (CPT) et plus récemment le MELD permettent une évaluation de la sévérité de la cirrhose et de l'IHC. Toutefois, ces modèles ne prennent pas en compte l'ensemble de l'activité métabolique du foie comme le métabolisme des lipides ou du glucose.

Le but de cette étude est d'évaluer si les profils métaboliques obtenus par spectrométrie RMN du proton de sérum de patients ayant une cirrhose alcoolique sont modifiés en fonction de la gravité de la cirrhose évaluée par le MELD.

Cent soixante neuf patients hospitalisés présentant une cirrhose alcoolique prouvée ont été prospectivement inclus. Ces patients n'avaient pas de coinfection virale, de décompensation récente de leur cirrhose dans les six derniers mois ou de carcinome hépatocellulaire.

Les patients ont été discriminés en fonction de leur gravité d'IHC en OPLS. Les principaux métabolites en relation avec un IHC sévère étaient : le lactate, le pyruvate, le glucose, la glutamine, le glutamate, la méthionine et la créatinine. Plus le MELD était important, plus le niveau de ces métabolites dans les sérums des patients était élevé. De plus, de profondes modifications ont été trouvées concernant lipides. Les lipoprotéines de basse densité (LDL et VLDL) étaient présentes en concentration plus importante chez les patients ayant un MELD élevé. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) et la

phosphocholine étaient eux présents en concentration plus importante chez les patients ayant un MELD bas.

Les profils métaboliques des sérums obtenus par spectroscopie RMN du proton sont modifiés par la gravité de l'IHC. L'analyse des profils métaboliques en fonction de la gravité de la cirrhose apporte une nouvelle évaluation globale des perturbations du métabolisme hépatique se produisant lors de l'IHC.

Metabolomic Approach by ^1H NMR Spectroscopy of Serum for the Assessment of Chronic Liver Failure in Patients with Cirrhosis

Roland Amathieu,^{*,†,§} Pierre Nahon,^{†,‡} Mohamed Triba,[†] Nadia Bouchemal,[†] Jean-Claude Trinchet,[†] Michel Beaugrand,[†] Gilles Dhonneur,[§] and Laurence Le Moyec^{†,||}

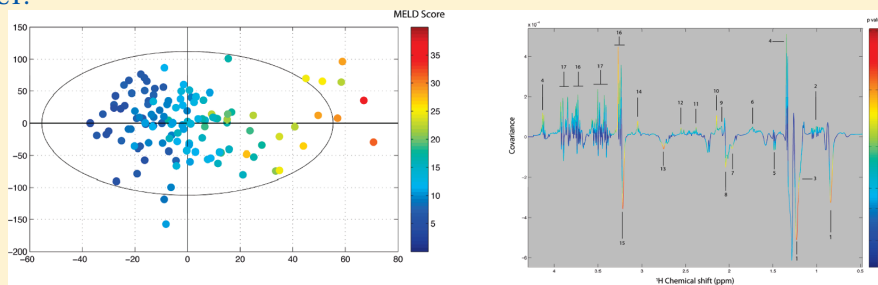
[†]Laboratoire CSPBAT, UMR 7244, Université Paris 13, Equipe Spectroscopie Biomolécules et Milieux Biologiques, Avenue Marcel Cachin, Bobigny 93000, France

[‡]Service d'Hépatologie, and [§]Service d'anesthésie-réanimation, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris 13, Hôpital Jean Verdier, Avenue du 14 Juillet, Bondy 93140, France

[‡]INSERM, U773, Centre de Recherche Bichat-Beaujon CRB3, Paris 75018, France

^{||}Université d'Evry, INSERM U902, UBIAE, 3bis impasse Christophe Colomb, Evry 91000, France

ABSTRACT:



Assessment of chronic liver failure (CLF) in cirrhotic patients is needed to make therapeutic decisions. A biological score is usually performed, using the Model for End-Stage Liver Disease (MELD), to evaluate CLF. Nevertheless, MELD does not take into account metabolic perturbations produced by liver-function impairment. In contrast, metabolomics can investigate many metabolic perturbations within biological systems. The purpose of this study was to assess whether metabolomic profiles of serum, obtained by proton NMR spectroscopy from cirrhotic patients, are affected by the severity of CLF. An orthogonal projection to latent-structure analysis was performed to compare MELD scores and NMR spectra of 124 patients with cirrhosis. The statistical model obtained showed a good explained variance ($R^2X = 0.87$ and $R^2Y = 0.86$) and a good predictability ($Q^2Y = 0.64$). Metabolomic profiles showed significant differences regarding various metabolites depending of severity of CLF: levels of high-density lipoprotein and phosphocholine resonances were significantly higher in patients with mild CLF compared to severe CLF. Other metabolites such as lactate, pyruvate, glucose, amino acids, and creatinine were significantly higher in patients with severe CLF than mild CLF. Our conclusion is that metabolomic NMR analysis provides new insights into metabolic processes related to the severity of hepatic function impairment in cirrhosis.

KEYWORDS: metabolomics, ^1H NMR spectroscopy, serum, cirrhosis, chronic liver failure, MELD score

INTRODUCTION

Evaluation of chronic liver failure (CLF) in patients with cirrhosis is essential when making decisions that involve hepatology or hepatic surgery and is needed for monitoring, for designing treatments (including those on orthotopic liver-transplant waiting lists), and to evaluate prognoses.

The scoring systems principally used are the Child–Turcotte–Pugh (CTP) system and, more recently, the Model for End-stage Liver Disease (MELD). The MELD score has the advantage, over the traditional Child–Turcotte–Pugh score, of being based on objective and readily available variables [serum bilirubin, international normalized ratio of prothrombin time (INR), and serum creatinine] rather than on subjective assessment of the

degree of clinical abnormalities, which does not have universally accepted definitions.^{1,2} Also, these traditional scoring systems do not take into account the importance of metabolic liver dysfunction. The liver is a multifunctioned organ, and estimation of chronic liver failure is complex: the limited number of parameters used in CTP and MELD scores may not evaluate all metabolic perturbations.

Metabolomics, which is the study of metabolic change in an integrated biological system, using a multiparametric analysis technique, may help identify biomarkers that characterize metabolomic

Received: March 22, 2011

Published: May 13, 2011

profiles and evaluate the prognoses of patients suffering from CLF. Metabolomics was applied in the field of human liver disease and showed a close relationship between metabolic abnormality and etiology or severity of the disease, using proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy in serum or tissues^{3,4} or mass spectroscopy in serum.^{5,6} These studies were performed to assess viral or nonalcoholic fatty liver cirrhosis. Such investigations with *in vitro* ^1H NMR metabolomics have been previously reported for hepatic diseases, mainly in animal models on hepatic toxicity, hepatic regeneration after surgery, and drug-induced cirrhosis.^{7–9} In human investigations, some studies have evaluated the different metabolomic profiles following transplantation and compared nonsurvivors to survivors, as well as graft-failure cases, and have shown that assessment improved patient status after a liver transplantation.^{10,11} Goa et al. have shown that metabolite profiles obtained from ^1H NMR based metabolomics analysis of blood serum may be different in healthy volunteers compared to patients with liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma.¹² Major changes to metabolites within the sera include lipids, ketone bodies, and amino acid metabolism. Another study, using ^1H NMR on serum, has shown the potential to predict an unfavorable outcome from a metabolomic profile evaluation in patients with fulminant hepatic failure.¹³ Recently, Jiménez et al. have shown that ^1H NMR metabolomics, used on cirrhotic patients, allows identification of patients with hepatic encephalopathy.¹⁴

The purpose of this study was to assess whether metabolomic profiles of the sera, obtained by ^1H NMR spectroscopy, were modified by the severity of CLF, evaluated with the MELD score, in alcohol-induced cirrhosis patients and if it identified the metabolic pathways impaired in CLF.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Collection of Serum Samples

We included all consecutive cirrhotic outpatients that were referred to our unit for either therapeutic management (paracentesis for refractory ascites) or for screening procedures, between January 2008 and August 2008. Patients needed to fulfill the following inclusion criteria: (1) biopsy-proven alcoholic cirrhosis; (2) no infection by the human immunodeficiency or hepatitis B or C viruses; (3) no evidence of hepatocellular carcinoma (HCC), as judged by negative ultrasonographic findings and serum α -fetoprotein of <50 ng/mL; and (4) an absence of acute liver failure in the past 6 months. Local ethics committee approval for the protocol was obtained, as was informed consent from all enrolled patients.

For each patient, the date of inclusion was the date of serum collection. Gender, age, presence of ascites or hepatic encephalopathy, serum bilirubin, albumin and prothrombin levels, INR, serum alanine-aminotransferase (ALT) activity, serum aspartate-aminotransferase (AST) activity, serum γ -glutamyl-transferase (GGT) activity, platelet count, fasting blood glucose, and total cholesterol and triglyceride levels were recorded at inclusion. Associated diabetes or dyslipidemia was noted.

The MELD score was calculated using the following equation: $9.6 \times \log_e(\text{creatinine} [\text{mg/dL}]) + 3.8 \times \log_e(\text{bilirubin} [\text{mg/dL}]) + 11.2 \times \log_e(\text{INR}) + 6.43$.¹ This MELD score was used to evaluate the gravity of the CLF and was used with the metabolomic data in the statistical analysis.

Blood samples were drawn under fasting conditions. Sera were separated and stored at -80 °C until analysis.

^1H NMR Spectroscopy

For NMR analysis, samples were thawed at room temperature. A volume of 0.6 mL of serum was placed into a 5-mm-diameter specific tube together with 0.1 mL of D_2O containing a known amount of fumaric acid. The proton spectra were acquired at 500 MHz on a Varian Unity Inova spectrometer at 25 °C. A signal was acquired after a 90° pulse of 32 K data points on a spectral window of 5000 Hz. The relaxation delay was 4 s. The water signal was suppressed by a presaturation sequence using low-power irradiation (0.03 W for 2 s) on the water signal frequency during the relaxation delay. The resulting free induction decays obtained with 128 transients were processed by Mestrec software. A Fourier transformation was applied with an exponential window function to produce a 1-Hz broadening line. Spectra were phased, and a spline baseline correction was applied with three points at 0, 5, and 9 ppm. Each spectrum was referenced using a fumaric acid signal (6.53 ppm). The spectral region between 0–9 ppm was divided into 9000 spectral regions of 0.001 ppm width, called buckets, using a personal program with R. Water, urea (signal damaged by water-saturation transfer), and fumaric acid regions were excluded (1810 variables excluded). Each bucket was integrated and scaled to the total summed integrals for each spectrum.

Data Processing for Statistical Analyses

After processing of spectra, statistical analyses were performed on the data using SIMCA-P+ software (ver. 12, Umetrics AB, Umea, Sweden). A principal component analysis (PCA) was first performed to detect any group separation based on NMR signal variability. This method also enabled detection of any excluded outliers, defined as observations situated outside the 95% confidence region of the model.

An orthogonal projection to latent-structure (OPLS) analysis was run to discriminate the severity of disease using a continuous-response variable, Y , related to the MELD of each patient (MELD range: 6–40). Compared to the classical projection of latent-structure analysis (PLS), this method allowed improved interpretation of the spectroscopic variations between discriminated groups, by removing information that had no impact on discrimination. R^2X and R^2Y represent the explained variation, respectively, of the X and the Y matrices. Q^2Y estimates the predictability of the model.

To validate the OPLS model we performed a permutation testing (999 permutations) using in-house Matlab code. The aim of this test was to evaluate whether our OPLS model, built with MELD scores, was significantly better than any other OPLS model obtained by randomly permuting the original MELD values.

The buckets were designated according to their central chemical shift values. Their most probable assignment to a metabolite was given according to the spectral assignment, as previously described in the literature.¹⁵ We took into account the spectral detailed appearance (multiplet, high-resolution peaks, and broad signals) and compared this to values of adjacent buckets.

Score and loading plots illustrated the results. Each point in a score plot represented the projection of an NMR spectrum (and thus a patient sample's) on the predictive (horizontal axis) and orthogonal components of the model (vertical axis). For easier reading, colors, depending on the MELD score, were used in the score plot.

The loading plot represents the covariance between the Y -response matrix and the signal intensity of the various spectral domains.

Colors were also used in the loading plot depending of the p -value associated with the correlation between the corresponding bucket intensity and the Y variable. To minimize false positive rates in multiple comparisons of the 7190 spectral domains, we used the conservative Bonferroni correction, which discards any low significant variable.¹⁶ The p -values used in this study correspond to the hypothesis that there was no correlation with the alternative, that there was a non-zero correlation between X (intensity of the buckets) and Y (MELD score) variables. Thus, for an error rate of 0.01, a metabolite variation in the loading plot was considered significant if its p -value was $<1.4 \times 10^{-6}$.

The buckets and their corresponding metabolites involved in the discrimination are shown in Table 2 with their corresponding p -values and correlation. On the loading plot, positive signals corresponded to those metabolites that had an increased concentration in the serum of patients with severe CLF. Conversely, a negative signal corresponded to those metabolites that had an increased concentration in the serum of patients with mild CLF.

RESULTS

Patients

The study included 178 patients, though 45 of these presented with exclusion criteria: 9 patients had suspected or confirmed hepatocellular carcinoma, 17 patients had acute alcoholic hepatitis, and 19 patients had recent episode of acute or chronic liver failure (gastrointestinal bleeding or sepsis). Thus, sera spectra were fully acquired for 133 patients. The data obtained by bucketing the 133 sera spectra were first analyzed by a PCA (results not shown). From this analysis, 11 outliers were identified. Among these, nine spectra exhibited high levels of ethanol (1.11 ppm and 3.66 ppm) and were excluded; two others were maintained for OPLS analysis. Demographics and clinical and biological data for the 124 remaining patients are shown in Table 1.

Metabolomics Analysis

The ¹H NMR spectra of two patient's sera, with different levels of CLF, are represented in Figure 1. Using the MELD score to evaluate CLF severity, the sera spectra were well discriminated with the OPLS model with a good predictability (Q^2Y) of 0.64 and a good explained variance (R^2X) of 0.87 and (R^2Y) of 0.86, as shown in Figure 2a. This figure shows the heterogeneous distribution of MELD scores between patients. This distribution reflects what a clinician would face when prospectively recruiting patients with this pathology.

All Q^2Y and R^2Y values obtained with permuted MELD scores were smaller than corresponding values obtained with the non permuted MELD scores. Intercept values for Q^2Y and R^2Y obtained from the permutation plot (not shown) were respectively of -0.80 and 0.53 . These results suggest the original mode was valid.

The metabolites that showed discrimination within the sera spectra varied according to the severity of CLF (Figure 2b). Seventeen major metabolites or groups of metabolites were detected in these spectra and are summarized in the Tables 2 and 3. In Figure 2b, the metabolites corresponding to buckets with a positive intensity were increased for patients with more severe CLF, i.e., higher MELD score, whereas the metabolites with negative intensity were increased in those with mild CLF, i.e., lower MELD score. Among the metabolites that varied according to MELD scores, lipids seemed to be one of the most important parameters.

Table 1. Clinical and Biological Characteristics of the Studied Population^a

	all patients (n = 124)
age (years) ^b	58.4 ± 0.9
gender: male ^c	105 (85%)
CTP score ^b	6.9 ± 0.2
MELD score ^b	13.2 ± 0.6
INR ^b	1.5 ± 0.1
prothrombin level (% control) ^b	66.7 ± 2.0
bilirubin (μmol/L) ^b	44.4 ± 6.8
albumin (g/L) ^b	37.4 ± 0.6
AST (IU/L) ^b	91.4 ± 12.1
ALT (IU/L) ^b	53.8 ± 5.5
GGT (IU/L) ^b	262.7 ± 24.8
platelets (G/L)	135.4 ± 6.6
creatinine (μmol/L) ^b	85.8 ± 3.1
fasting glucose (mmol/L) ^b	6.6 ± 0.2
total cholesterol (mmol/L) ^b	4.8 ± 0.2
triglyceride (mmol/L) ^b	1.25 ± 0.6
dyslipidemia ^c	19 (15%)
diabetes ^c	24 (19%)

^aNote: CTP, Child–Turcotte–Pugh (CTP) score; MELD, model for end-stage liver disease; INR, international normalized ratio of prothrombin time; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine transaminase; GGT, γ -glutamyl transpeptidase. All biological and clinical parameters were recorded at inclusion. ^bMean ± SEM. ^cNumber (percentage) of patients.

In ¹H NMR sera spectra, lipids could be detected as broad resonances of fatty acid methyl and methylene functions at 0.8 and 1.24 ppm, respectively, and the N -trimethyl function of choline included in phospholipids. At 0.8 and 1.24 ppm, the resonances arising from lipids included lipoprotein particles of different densities. It has been widely reported that high-density lipid (HDL) particles produce resonances with lower chemical shifts than low-density lipoprotein (LDL and VLDL) particles. Interestingly, lipoproteins with higher density were significantly elevated when CLF was mild compared to severe CLF. For VLDL, corresponding to the highest chemical shifts in methyl and methylene resonances, no difference was found. The choline or phosphocholine peak at 3.23 ppm for phospholipids relatively enriched in the HDL fraction was significantly higher in patients with low severity CLF. A fraction of linoleic acid, with a characteristic resonance peak at 2.75 ppm, was significantly higher in mild CLF compared to severe CLF.

Lactate was an important metabolite for discriminating between severe and minor CLF. Patients with severe CLF showed significantly higher lactate signals than patients with minor CLF. Also, glucose produces a complex massif of resonances between 3.24 and 3.9 ppm. This region, with the doublet at 4.65 ppm (C1 of α -glucose), showed that glucose levels were higher in severe CLF than minor CLF.

Several amino acids can be identified in the spectra (Figure 2b). Alanine was significantly higher in mild CLF than severe CLF, whereas leucine, isoleucine, glutamine, and methionine were significantly higher in severe CLF than in mild CLF. Other metabolites such as ketone bodies and carboxylic acids could be detected in the spectra and participated in the discrimination of CLF severity. Ketone bodies, mainly β -hydroxybutyrate (1.20 ppm)

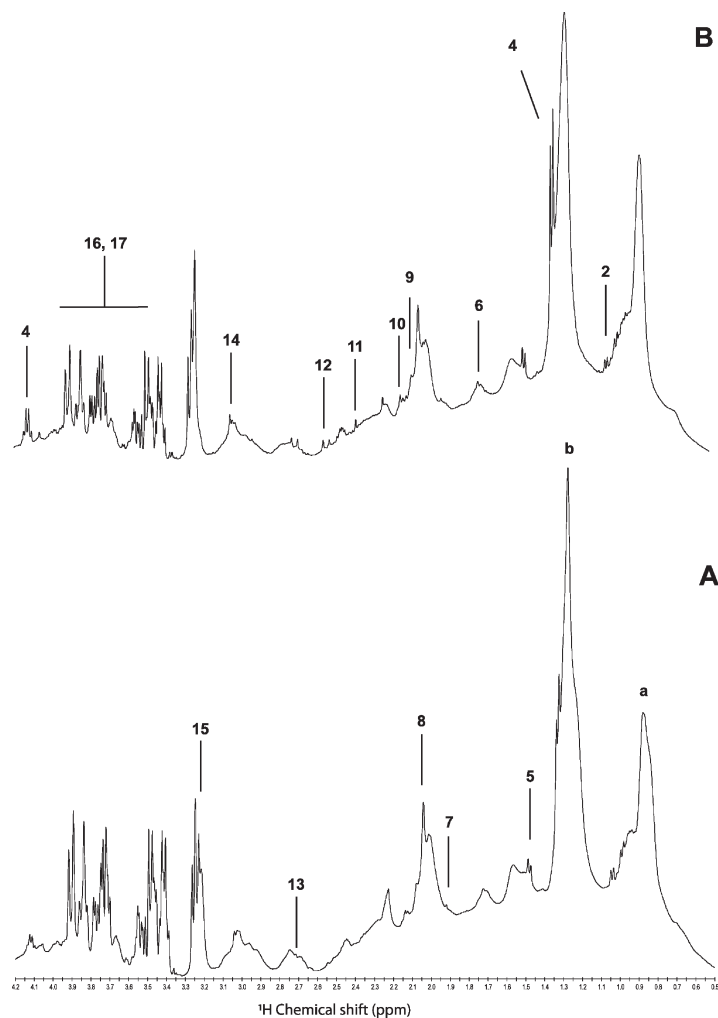


Figure 1. 500 MHz ^1H NMR spectra of two patients' sera in the region between 0.5 and 4.2 ppm. Patient A had minor CLF (MELD score 6). Patient B had severe CLF (MELD 35). The metabolite labels are shown in Tables 2 and 3. Peaks a and b correspond to lipoproteins.

and acetate (1.92 ppm), were significantly higher in mild CLF than severe CLF. Butyrate (1.15 ppm), citrate (2.54 and 2.71 ppm), and pyruvate (2.38 ppm) were significantly higher in severe CLF than mild CLF. The *N*-acetyl functions of glycoprotein produced a broad resonance at 2.05 ppm and were increased in mild CLF when compared to severe CLF. Finally, creatinine produced two peaks at 3.06 and 3.95 ppm, which were higher in the spectra of patients with severe CLF than those with mild CLF.

DISCUSSION

Cirrhosis can lead to chronic liver failure (CLF). Assessment of the severity of CLF is usually performed using MELD score.

However, total perturbation of hepatic-function impairment has not been evaluated before. In the present study, we show that chronic liver failure, as evaluated by the MELD score, affected ^1H NMR spectroscopy metabolomic profiles of the serum. Metabolomic profiles corresponding to different grades of CLF severity showed important metabolic liver dysfunctions. The main altered metabolic pathways were those of lipoproteins, glucose, and amino acids.

Inclusion criteria for patients are important when obtaining a homogeneous population and interpreting the metabolomic findings. We restricted the study to alcoholic cirrhosis-induced CLF because other etiologies are associated with altered metabolomic profiles.^{3,5,17} Patients with hepatocellular carcinoma were excluded because metabolomic profiles can be altered, as

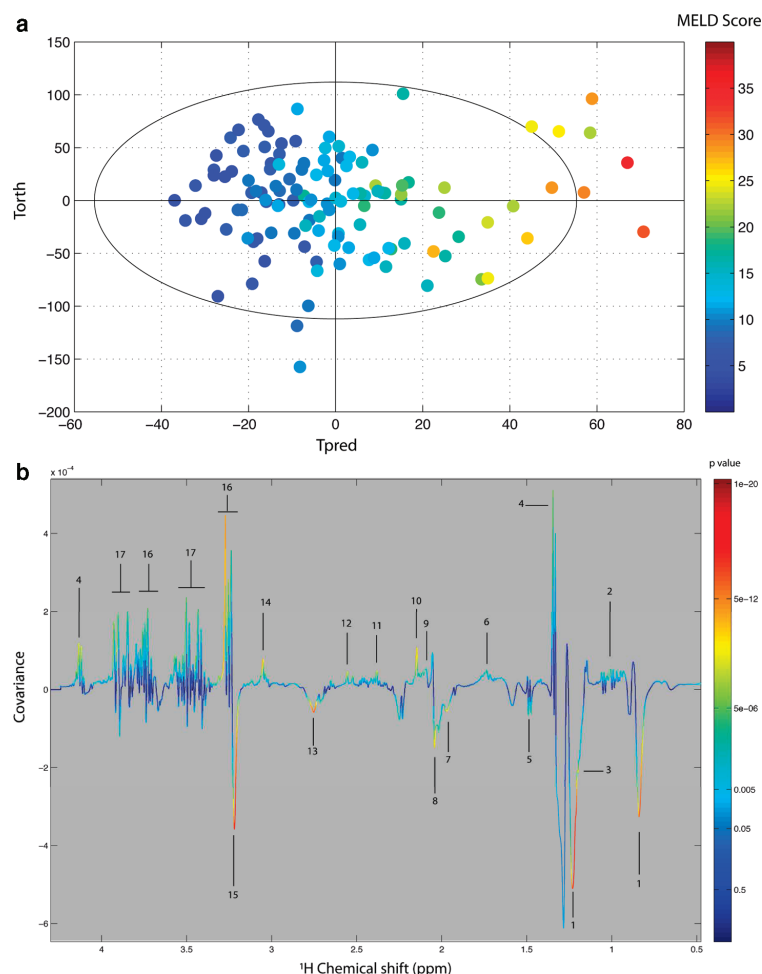


Figure 2. (a) Orthogonal projection to latent-structure (OPLS) score plot. For easy reading, patients are colored depending on their MELD score. (b) OPLS loadings plot. Variations in metabolites are represented using a line plot between 0.5–4.2 ppm. Positive signals correspond to metabolites present at increased concentrations in patients with a high MELD score and severe CLF. Conversely, negative signals correspond to metabolites present at increased concentrations in patients with a low MELD score and minor or mild CLF. The buckets are labeled according to metabolite assignments, as presented in Tables 2 and 3.

described by Gao.¹² Patients with sepsis or acute complication of cirrhosis (acute encephalopathy episode, gastrointestinal bleeding, or acute alcoholic hepatitis), during the screening period or during the previous 6 months, were also excluded because they suffered acute impairment of the liver function (acute on chronic liver failure) that may have modified their metabolomic profiles.

Several studies have shown the influence of lipoprotein levels on the prognosis of cirrhotic patients. However, we have shown that metabolomic profiles for high-density lipoproteins (HDL) allowed us to discriminate between patients depending of the severity of CLF. Most HDL (90%) is synthesized by the liver, and HDL blood concentration seemed to be a good indicator of liver function.^{18,19}

Cirrhotic patients may have impaired metabolic homeostasis of glucose. This can result in insulin resistance, impaired glucose

tolerance in up to 96% of patients, and diabetes mellitus in 30% of these cases.^{20,21} Abnormal glucose metabolism is associated with increased severity of liver disease, infection risk, carcinoma, and mortality.²² In our experiment, glucose was significantly higher in severe CLF cases than mild CLF, as shown by the elevated resonances arising from both glucose anomers. This difference could not be explained by only the diabetic status as, interestingly, when fasting blood glucose was assayed by a biochemical method, it was within normal ranges. Cirrhotic subjects have increased rates of neoglucogenesis and decreased rates of net hepatic glycogenolysis compared to control subjects. These alterations are likely important contributing factors to the altered carbohydrate metabolism.²³ Pyruvate and lactate were higher in severe CLF patients' sera. These metabolites may be increased

Table 2. Discriminant Metabolites Observed by ¹H NMR Spectroscopy, According to the Loading Plot (Figure 2b), and Their Variations Depending on Severity of Chronic Liver Failure (CLF)^a

no. of metabolite	name	chemical shift (ppm) and multiplicity ^b	r	P
1	lipids (HDL)	0.84 m; 1.23 m	0.65	2.55 × 10 ⁻¹⁶
3	β-hydroxybutyrate (ketone body)	1.22 d	0.67	5.12 × 10 ⁻¹⁸
5	alanine	1.48 d	0.39	4.81 × 10 ⁻⁶
7	acetate (ketone body)	1.93 s	0.42	1.08 × 10 ⁻⁶
8	glycoprotein (N-acetyl)	2.06 s	0.56	7.9 × 10 ⁻¹²
13	lipids (fatty acid residues, linoleic acid)	2.75 m	0.66	7.53 × 10 ⁻¹⁷
15	choline and phosphocholine	3.23 s	0.70	1.14 × 10 ⁻¹⁹

^aThe metabolites are listed according to the loading plot in patients with a low severity of CLF. The number of the metabolite corresponds to the number in Figure 1 and to the line plot in Figure 2b. Chemical shift and multiplicity correspond to those found in the ¹H NMR spectra of the patient's sera. ppm: part per million. ^bs, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m multiplet.

Table 3. Discriminant Metabolites Observed by ¹H NMR Spectroscopy, According to the Loading Plot (Figure 2b), and Their Variations Depending on Severity of Chronic Liver Failure (CLF)^a

no. of metabolite	name	chemical shift (ppm) and multiplicity ^b	r	P
2	leucine–isoleucine	1.02 d	0.41	1.82 × 10 ⁻⁶
4	lactates	1.35 d; 4.13 q	0.44	2.21 × 10 ⁻⁷
6	leucine	1.73 m	0.39	5 × 10 ⁻⁶
9	glutamine	2.10 m	0.39	5.14 × 10 ⁻⁶
10	methionine	2.15 s	0.55	1.12 × 10 ⁻¹¹
11	pyruvate	2.38 s	0.47	2.75 × 10 ⁻⁸
12	citrate	2.54 d	0.39	7.19 × 10 ⁻⁶
14	creatinine	3.05 s; 4.06 s	0.55	2.01 × 10 ⁻¹¹
16	β-glucose	3.26 dd; 3.92 dd	0.60	9.31 × 10 ⁻¹⁴
17	α-glucose	3.44 t; 3.78 m	0.41	1.41 × 10 ⁻⁶

^aThe principal discriminant metabolites are ordered according to the loading plot in patients with a high severity of CLF. The number of the metabolite corresponds to the number in Figure 12 and corresponds to the line plot in Figure 2b. Chemical shift and multiplicity correspond to those found in the ¹H NMR spectra of the patient's sera. ppm: part per million. ^bs, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m multiplet; q, quadruplet.

by impairment of pyruvate-dehydrogenase (PDH) activity. Impaired hepatic PDH activity can occur during end-stage cirrhosis, which can lead to increased lactate levels.²⁴ Neoglucogenesis can result from the transformation of lactate into glucose, in the liver. Increased pyruvate, lactate, and glucose in the sera seem to confirm the impairment of this important energetic pathway in cirrhotic patients with severe CLF. Citrate levels can show discrimination between severe and less severe CLF. This tricarboxylic acid (TCA) cycle metabolite is increased in severe CLF. Consequently, possible changes to the TCA cycle may also be a marker of CLF severity. Ketone bodies are produced mainly in the mitochondria of liver cells. Their synthesis occurs during lipolysis and seems to be altered in severe CLF. In view of our results, the liver's ability to maintain homeostasis via glycogenolysis, neoglucogenesis, and ketogenesis is compromised with increasing severity of CLF, as well as altering the TCA cycle.

Alterations to amino acids in cirrhotic patients are determined by a number of factors, such as nutritional status, associated illness, age, etiology of the liver disease, or severity of the CLF.²⁵ An interesting finding from our experiment was that leucine and isoleucine were

significantly higher in patients with severe CLF than in those with low or mild CLF. Our hypothesis is that severe CLF activates proteolysis of skeletal muscle and enhances branched amino acids oxidation, as described in inflammatory states.²⁶ A deviation in methionine metabolism has been found in cirrhosis, and its metabolite (homocysteine) is clearly responsible for intrahepatic vascular resistance in animals.^{27,28} In our study, only methionine could be seen, and the increased severity of CLF with increased methionine corroborated these previous results. The impaired urea metabolism and porto-systemic shunt system in cirrhotic patients leads to decreased ammonia detoxification and is responsible for the glutamine increase we found in our experiment.

Creatinine was higher in patients with severe CLF than in patients with mild CLF. This result is expected as creatinemia is included within the MELD score. The increase in creatinine confirms the interaction between liver function and renal function in cirrhosis.

Our metabolomic approach describes several perturbations within one experiment, whereas these have been described in individual experiments in previous reports on cirrhotic patients. A future parallel approach using metabolomics and biochemistry may further differentiate between the different levels of CLF severity and, thus, could confirm our results.

CONCLUSION

Our NMR metabolomics investigation clearly shows that the severity of CLF produces several modifications to sera metabolite content. These modifications are related to liver function impairment. One of the major advantages of ¹H NMR is its ability to simultaneously detect endogenous variations of metabolites and metabolic pathways. Our metabolomic results should be prospectively validated, independently of the MELD score, to evaluate the severity of CLF. Further studies, with a larger cohort, should be performed to confirm these results and to emphasize the usefulness of the metabolomics approach to diagnose and assess the severity of CLF.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: + 33 1 48 02 66 80. Fax: + 33 1 48 02 68 75. E-mail: roland.amathieu@jvr.aphp.fr.

Author Contributions

Drs. Amathieu and Nahon contributed equally to this manuscript.

REFERENCES

- (1) Kamath, P. S.; Wiesner, R. H.; Malinchoc, M.; Kremers, W.; Therneau, T. M.; Kosberg, C. L.; D'Amico, G.; Dickson, E. R.; Kim, W. R. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* **2001**, *33* (2), 464–70.
- (2) Pugh, R. N.; Murray-Lyon, I. M.; Dawson, J. L.; Pietroni, M. C.; Williams, R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br. J. Surg.* **1973**, *60* (8), 646–9.
- (3) Kalhan, S. C.; Guo, L.; Edmison, J.; Dasarathy, S.; McCullough, A. J.; Hanson, R. W.; Milburn, M. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* **2010**, 404–13.
- (4) Martinez-Granados, B.; Monleon, D.; Martinez-Bisbal, M. C.; Rodrigo, J. M.; del Olmo, J.; Lluch, P.; Ferrandez, A.; Marti-Bonmati, L.; Celda, B. Metabolite identification in human liver needle biopsies by high-resolution magic angle spinning ^1H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* **2006**, *19* (1), 90–100.
- (5) Puri, P.; Wiest, M. M.; Cheung, O.; Mirshahi, F.; Sargeant, C.; Min, H. K.; Contos, M. J.; Sterling, R. K.; Fuchs, M.; Zhou, H.; Watkins, S. M.; Sanyal, A. J. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2009**, *50* (6), 1827–38.
- (6) Yu, K.; Sheng, G.; Sheng, J.; Chen, Y.; Xu, W.; Liu, X.; Cao, H.; Qu, H.; Cheng, Y.; Li, L. A metabolomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (7), 2413–9.
- (7) Bollard, M. E.; Contel, N. R.; Ebbels, T. M.; Smith, L.; Beckonert, O.; Cantor, G. H.; Lehman-McKeeman, L.; Holmes, E. C.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Keun, H. C. NMR-based metabolic profiling identifies biomarkers of liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. *J. Proteome Res.* **2009**, *9* (1), 59–69.
- (8) Coen, M.; Hong, Y. S.; Cloarec, O.; Rhode, C. M.; Reily, M. D.; Robertson, D. G.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Heteronuclear ^1H - ^31P statistical total correlation NMR spectroscopy of intact liver for metabolic biomarker assignment: application to galactosamine-induced hepatotoxicity. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (23), 8956–66.
- (9) Constantinou, M. A.; Theocharis, S. E.; Mikros, E. Application of metabolomics on an experimental model of fibrosis and cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *218* (1), 11–9.
- (10) Serkova, N. J.; Zhang, Y.; Coatney, J. L.; Hunter, L.; Wachs, M. E.; Niemann, C. U.; Mandell, M. S. Early detection of graft failure using the blood metabolic profile of a liver recipient. *Transplantation* **2007**, *83* (4), 517–21.
- (11) Tripathi, P.; Bala, L.; Saxena, R.; Yachha, S. K.; Roy, R.; Khetrpal, C. L. ^1H NMR spectroscopic study of blood serum for the assessment of liver function in liver transplant patients. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2009**, *18* (3), 329–36.
- (12) Gao, H.; Lu, Q.; Liu, X.; Cong, H.; Zhao, L.; Wang, H.; Lin, D. Application of ^1H NMR-based metabolomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci.* **2009**, *100* (4), 782–5.
- (13) Saxena, V.; Gupta, A.; Nagana Gowda, G. A.; Saxena, R.; Yachha, S. K.; Khetrpal, C. L. ^1H NMR spectroscopy for the prediction of therapeutic outcome in patients with fulminant hepatic failure. *NMR Biomed.* **2006**, *19* (5), 521–6.
- (14) Jimenez, B.; Montoliu, C.; MacIntyre, D. A.; Serra, M. A.; Wassel, A.; Jover, M.; Romero-Gomez, M.; Rodrigo, J. M.; Pineda-Lucena, A.; Felipo, V. Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by (^1H) -nuclear magnetic resonance. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (10), 5180–7.
- (15) Nicholson, J. K.; Foxall, P. J.; Spraul, M.; Farrant, R. D.; Lindon, J. C. 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (5), 793–811.
- (16) Broadhurst, D.; Douglas, B. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics* **2006**, *2* (4), 171–196.
- (17) Cobbold, J. F.; Patel, J. H.; Goldin, R. D.; North, B. V.; Crossey, M. M.; Fitzpatrick, J.; Wylezinska, M.; Thomas, H. C.; Cox, I. J.; Taylor-Robinson, S. D. Hepatic lipid profiling in chronic hepatitis C: an in vitro and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *J. Hepatol.* **2008**, *52* (1), 16–24.
- (18) Habib, A.; Mihai, A. A.; Abou-Assi, S. G.; Williams, L. M.; Gavis, E.; Pandak, W. M.; Heuman, D. M. High-density lipoprotein cholesterol as an indicator of liver function and prognosis in nonhepatic cirrhotics. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2005**, *3* (3), 286–91.
- (19) Jiang, M.; Liu, F.; Xiong, W. J.; Zhong, L.; Xu, W.; Xu, F.; Liu, Y. B. Combined MELD and blood lipid level in evaluating the prognosis of decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16* (11), 1397–401.
- (20) Hickman, I. J.; Macdonald, G. A. Impact of diabetes on the severity of liver disease. *Am. J. Med.* **2007**, *120* (10), 829–34.
- (21) Holstein, A.; Hinze, S.; Thiessen, E.; Plaschke, A.; Egberts, E. H. Clinical implications of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2002**, *17* (6), 677–81.
- (22) El-Serag, H. B.; Tran, T.; Everhart, J. E. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **2004**, *126* (2), 460–8.
- (23) Petersen, K. F.; Krssak, M.; Navarro, V.; Chandramouli, V.; Hundal, R.; Schumann, W. C.; Landau, B. R.; Shulman, G. I. Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis. *Am. J. Physiol.* **1999**, *276* (3 Pt 1), E529–35.
- (24) Shangraw, R. E.; Rabkin, J. M.; Lopaschuk, G. D. Hepatic pyruvate dehydrogenase activity in humans: effect of cirrhosis, transplantation, and dichloroacetate. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274* (3 Pt 1), G569–77.
- (25) Morgan, M. Y.; Marshall, A. W.; Milsom, J. P.; Sherlock, S. Plasma amino-acid patterns in liver disease. *Gut* **1982**, *23* (5), 362–70.
- (26) Holecek, M.; Sprongl, L.; Skopec, F.; Andrys, C.; Pecka, M. Leucine metabolism in TNF-alpha- and endotoxin-treated rats: contribution of hepatic tissue. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273* (6 Pt 1), E1052–8.
- (27) Bosy-Westphal, A.; Petersen, S.; Hinrichsen, H.; Czech, N.; M, J. M. Increased plasma homocysteine in liver cirrhosis. *Hepatol. Res.* **2001**, *20* (1), 28–38.
- (28) Distrutti, E.; Mencarelli, A.; Santucci, L.; Renga, B.; Orlandi, S.; Donini, A.; Shah, V.; Fiorucci, S. The methionine connection: homocysteine and hydrogen sulfide exert opposite effects on hepatic microcirculation in rats. *Hepatology* **2008**, *47* (2), 659–67.

4.2.2 Empreinte métabolique des patients cirrhotiques d'origine alcoolique présentant un carcinome hépatocellulaire (*Accepted Clinical Cancer Research*)

Le carcinome hépatocellulaire est la 5^{ième} cause de cancer dans le monde. Son diagnostic repose essentiellement sur la découverte de nodules hépatiques lors des examens d'imagerie qui sont pratiqués pendant le suivi de la cirrhose. Il existe parfois une incertitude diagnostique devant certains nodules, notamment ceux de petite taille.

Le but de ce travail était de déterminer les profils métaboliques sériques obtenus par spectrométrie par ¹H RMN chez des patients ayant une cirrhose compliquée ou non de carcinome hépatocellulaire (CHC).

Cent cinquante quatre patients ayant une cirrhose alcoolique prouvée et compensée ont été inclus. Parmi eux, 93 avaient une cirrhose sans CHC (groupe « Contrôles »), 28 avaient une cirrhose et un CHC prouvé histologiquement répondant aux critères de Milan et accessible à un traitement curatif (groupe « Petits CHC ») et 33 avaient un CHC développé sur cirrhose au-delà des critères de Milan (groupe « Gros CHC »). Une analyse multivariée (OPLS) a été initialement utilisée pour discriminer les échantillons sériques des patients du groupe « Gros CHC » et du groupe « Contrôles » et construire un modèle. Les échantillons du groupe « Petits CHC » étaient secondairement projetés sur le modèle

Les profils métabolomiques obtenus dans les groupes "Contrôles" et "Gros CHC" sont significativement différents ($p < 10^{-16}$), les principaux métabolites associés à la présence d'un CHC étant : glutamate, lactate, acétate et les *N*-acetyl-glycoprotéines. Les métabolites associés à la cirrhose sans CHC étaient les lipides et la glutamine.

Les échantillons du groupe « Petits CHC » sont distribués sur le modèle de façon hétérogène parmi ceux des groupes « Contrôles » et « Gros CHC », montrant que les profils métaboliques dans le groupe « Petits CHC » peuvent être soit comparables à ceux des

cirrhoses sans CHC, soient comparables à ceux des gros CHC. Les critères clinicobiologiques pouvant expliquer cette distribution (nombre de nodules, taille, différenciation histologique,...) sont analysés à l'intérieur du groupe « Petit CHC ». Parmi les 11 échantillons du groupe « Petits CHC » qui avaient un profil comparable aux « gros CHC », 7 récidivaient dans l'année suivant le traitement (63% de récurrence vs 41% pour ceux ayant un profil comparable aux « Contrôles »), reflétant probablement une activité métabolique différente des autres.

L'analyse métabolomique sérique permet d'identifier des profils métaboliques spécifiques de la présence de CHC développé sur foie cirrhotique. Parmi les « Petits CHC », il semble qu'il soit possible d'identifier différents profils métaboliques en rapport avec leur activité métabolique.

Clinical Cancer Research



Identification of serum proton NMR metabolomic fingerprints associated with hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis

Pierre Nahon, Roland Amathieu, Mohamed N. Triba, et al.

Clin Cancer Res Published OnlineFirst November 7, 2012.

Updated Version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1099
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2012/11/06/1078-0432.CCR-12-1099.DC1.html
Author Manuscript	Author manuscripts have been peer reviewed and accepted for publication but have not yet been edited.

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .

Title:

Identification of serum proton NMR metabolomic fingerprints associated with hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis

Running title:

Serum metabolomics and liver cancer

Authors:

Pierre Nahon^{*1,2}, Roland Amathieu^{*3,4}, Mohamed N. Triba³, Nadia Bouchemal³, Jean-Charles Nault¹, Marianne Ziol⁵, Olivier Seror⁶, Gilles Dhonneur⁴, Jean-Claude Trinchet¹, Michel Beaugrand¹, Laurence Le Moyec⁷.

¹Service d'Hépatologie et Université Paris 13, Hôpital Jean Verdier, AP-HP, Bondy, France

²INSERM U773, CRB3, Université Paris 7, Paris, France

³Laboratoire CSPBAT, UMR 7244, Université Paris 13, Bobigny, France

⁴Service d'Anesthésie-Réanimation et Université Paris 12, Hôpital Henri Mondor, AH-HP, Créteil, France

⁵Service d'Anatomopathologie et Université Paris 13, Hôpital Jean verdier, AP-HP, Bondy, France

⁶Service de Radiologie et Université Paris 13, Hôpital Jean Verdier, AP-HP, Bondy, France

⁷INSERM U902, UBIAE, Université d'Evry, Evry, France.

***Pierre Nahon and Roland Amathieu participated equally to this study**

Address Correspondence to:

Pierre Nahon, MD, PhD

Service d'Hépatologie,

Hôpital Jean Verdier,

93140 Bondy, France.

Phone: 33-1-48-02-62-80; Fax : 33-1-48-02-62-02.

Email: pierre.nahon@jvr.aphp.fr

Keywords: metabolomics; proton nuclear magnetic-resonance spectrometry; serum biomarkers; profiling; liver cancer

No conflict of interest exists.

This work was supported by grants from Paris 13 University.

Manuscript notes:

Abstract 249 words, total word count (excluding reference, including figures and tables legends) 4604 with 3 figures and 3 Tables. 25 References. Supplementary Data contains 2 figures and legends.

Translational Relevance

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading cancers worldwide in terms of incidence and mortality. Most of HCC arise on cirrhosis in western countries, alcohol intake being the main cause of cirrhosis and related HCC in these countries. The difficulties to assess the outcome of such patients stress the need to identify new biomarkers in order to refine the identification of those with a poorer therapeutic response. The present data enabled us to observe changes in serum metabolomic profiles in patients with advanced HCC that reflected the distinct activation or impairment of multiple biological pathways. Furthermore, the analysis small-HCC patients eligible for curative procedures revealed various metabolomic profiles that probably reflect differences in outcome after tumour ablation. By providing new patterns of recognition, serum metabolomic profiling may represent a clinical breakthrough in order to refine prognosis and to guide therapeutic procedures for these patients.

Abstract

Purpose: Metabolomics depicts metabolic changes in biological systems using a multiparametric analysis technique. This study assessed the metabolomic profiles of serum, obtained by proton NMR spectroscopy, from cirrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma (HCC). **Experimental Design:** The study included 154 consecutive patients with compensated biopsy-proven alcoholic cirrhosis. Among these, 93 had cirrhosis without HCC, 28 had biopsy-proven HCC within the Milan criteria and were eligible for curative treatment ('small' HCC) and 33 had HCC outside the Milan criteria ('large' HCC). Proton spectra were acquired at 500 MHz. An orthogonal partial latent structure (OPLS) analysis model was built to discriminate large HCC spectra from cirrhotic spectra. Small HCC spectra were secondarily projected using previously built OPLS discriminant components. **Results:** The OPLS model showed discrimination between cirrhotic and large HCC spectra. Metabolites that significantly increased with large HCC were, glutamate, acetate and N-acetyl glycoproteins, whereas metabolites that correlated with cirrhosis were lipids and glutamine. Projection of small HCC samples into the OPLS model showed a heterogeneous distribution between large HCC and cirrhotic samples. Small HCC patients with metabolomic profile similar to those of large HCC group had higher incidences of recurrence or death during follow-up. **Conclusions:** Serum NMR-based metabolomics identified metabolic fingerprints that could be specific to large HCC in cirrhotic livers. From a metabolomic standpoint, some patients with small HCC, who are eligible for curative treatments, seem to behave as patients with advanced cancerous disease. It would be useful to further prospectively investigate these patients to define a subgroup with a worse prognosis.

Introduction

Staging systems of hepatocellular carcinoma (HCC) aim to assess prognosis and to select adequate treatments for each case, particularly in patients eligible for curative procedures, such as hepatic resection, percutaneous ablation or liver transplantation²¹¹. However, there is still a need for biological markers to be associated with clinical outcomes or treatment responses. A definition of the molecular classification of HCC is still preliminary and, unlike other tumours, as yet, no molecular data have been incorporated into algorithms for the routine management of liver cancer²¹². A wide spectrum of serum biomarkers has been studied as potential diagnosis or prognosis tools in this setting, but their ability to refine HCC classification or to predict the patient's outcome is still debated. Consequently, the main prognostic factors used in practice are restricted to clinical features such as tumour status and liver-function impairment linked to the underlying liver disease.

Metabolomics is an 'omics' technique that is situated downstream of genomics, transcriptomics and proteomics⁴⁷. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy-based metabolomics can identify and quantify metabolic changes within a biological system and has been applied to various pathological conditions². The development of metabolomics in the field of oncology may be used to identify fingerprints, profiles or signatures, which could be useful for screening or diagnosis procedures as well as refining prognosis or therapeutic response in various tumors such as prostate, breast, ovarian, or brain cancers^{213, 214}.

Recent studies have attempted to describe the metabolic phenotype of liver cancer in heterogeneous populations of patients with HCC using ¹H NMR or mass spectroscopy. This has led to the identification of various metabolically impaired pathways in serum and urine^{92, 199, 215, 216}. However, these data were obtained in small sample-sized cohorts of patients and important clinical information was lacking, such as the stage of liver cancer and the cause and degree of severity of the underlying liver disease, which can induce specific and serious serum metabolic

disturbances²¹⁷. Furthermore, these studies were mostly restricted to Asian populations in whom cases of HCC were as a whole related to HCV or HBV chronic infections.

The aim of the present study was to assess serum metabolomic profiles in a large cohort of well-characterized Caucasian patients with HCC that developed in alcoholic cirrhotic liver and classified according to their tumor status.

PATIENTS AND METHODS

Patients and collection of serum samples

We considered all out-patients who were consecutively referred to our Hepatology unit for the management of cirrhosis and/or HCC between January 2009 and December 2010, and who fulfilled the following inclusion criteria: 1) biopsy-proven cirrhosis and chronic daily alcohol consumption >50 g; 2) no infection from the human immunodeficiency, hepatitis B or C viruses; 3) compensated liver disease (Child–Pugh score <8); 4) residence in France and of Caucasian origin; and 5) availability of frozen serum samples. Exclusion criteria were 1) treatment of HCC before serum collection; 2) past history or on-going extra-hepatic neoplasm or inflammatory systemic disease; 3) recent history of acute or chronic liver failure in the previous 6 months.

For each patient, the date of inclusion was the date of serum collection. Demographic, clinical and routine biological data were recorded at inclusion. Blood samples were drawn under fasting conditions before therapeutic management of HCC. Sera were separated and stored at -80°C until analysis. All patients gave their written consent for blood sampling.

The local ethics committee approved the protocol.

HCC was diagnosed according to the Barcelona criteria ²¹⁸: histological evidence or convergent demonstration of a focal lesion >2 cm in size and arterial hypervascularization as assessed by two different imaging techniques, or the combination of one imaging technique that showed this morphological aspect plus an α -fetoprotein (AFP) level of ≥ 400 ng/mL in patients with biopsy-proven cirrhosis.

Patients were classified according to the presence and status of HCC as follows.

1) Cirrhosis group: patients with cirrhosis without evidence of HCC at the time of inclusion, as judged by negative ultrasonographic findings, serum AFP of <50 ng/mL. All patients were

prospectively evaluated every six months for HCC periodical screening for at least one year. None of the selected patients in this sub-group developed liver tumour during this time.

2) Small HCC group: patients with cirrhosis and ‘small’ HCC within the Milan criteria ²¹⁹ (single tumour <5 cm or three nodules <3 cm) and eligible for curative treatment; all these patients underwent radiofrequency ablation (RFA) by the same operator during which a percutaneous biopsy for histological assessment of HCC was performed before ablation. Only patients with biopsy-proven HCC were selected in this subset. All of them were then followed-up using abdominal CT scan, serum alpha-fetoprotein assessment and physical examination at one month then every 3 months. Patients with partial response at one month defined by a persistent enhancement of the lesion on CT scan could have been re-treated by RFA. Follow-up ended at the date of death or liver transplantation, or at the last recorded visit (or information) within the last 6 months before December 2011. Overall survival was defined by the time between the day of inclusion and death, liver transplantation or last visit recorded until December 2011. Recurrence free survival was defined by the time between the date of inclusion and the date of HCC recurrence.

3) Large HCC group: patients with cirrhosis and ‘large’ HCC outside the Milan criteria (multinodular HCC and/or tumoural portal vein thrombosis and/or extra-hepatic metastases), ²¹¹ with these patients being eligible for palliative treatment.

¹H NMR spectroscopy

For NMR analysis, samples were thawed at room temperature. A volume of 0.6 mL of serum was placed into a 5-mm-diameter specific tube together with 0.1 mL of D₂O containing a known amount of fumaric acid (6.5 mg. mL⁻¹). The deuterium oxide was used for the spectrometer locking and fumaric signal for chemical shift calibration at 6.53 ppm. The addition of this acid

solution lowered the sera pH of 0.1 units (identical for all samples). The resulting pH samples were between 8.4 and 8.7. Fumaric acid as an internal reference presents the advantages to produce a single signal located in a spectral region without other interfering resonances. The proton spectra were acquired at 500 MHz on a Varian Unity Inova® spectrometer at 298 K. A signal was acquired after a 90° pulse of 32K data points on a spectral window of 5000 Hz. The relaxation delay was 4 s. The water signal was suppressed by a pre-saturation sequence using low-power irradiation (0.03 W for 2 s) on the water-signal frequency during the relaxation delay. Frequently, the CPMG sequence is used to suppress the broad signal of protein according to their short relaxation time. Because the lipid changes in the serum of patients with HCC, we have used a single pulse sequence to preserve the complete lipid profile of our spectra. The resulting free induction decays obtained with 128 transients were processed by Mestrec® software. A Fourier transformation was applied with an exponential window function to produce a 1-Hz broadening line. Spectra were phased and a spline baseline correction was applied with three points at 0.5 and 9 ppm. The spectral region between 0–9 ppm was divided into 9000 spectral regions of 0.001 ppm width, called buckets, using a personal program with R®. Water, urea (signal damaged by water-saturation transfer) and fumaric-acid regions were excluded (1810 variables excluded). Each bucket was integrated and scaled to the total summed integrals for each spectrum. For resonance assignment purpose, ¹H-¹H TOCSY 2D NMR spectra were also acquired at 298 K for some samples with a mixing time of 80 ms, 4k data points and 32 transients for each of the 512 increments.

Univariate statistical analyses

Qualitative variables were compared using Fisher's exact test, the chi-squared test, or the chi-squared trend test with 1 degree of freedom. Quantitative variables were compared using the non-

parametric Wilcoxon test. All reported P values are two-tailed. Associations were considered statistically significant at a two-tailed α of 0.05.

Multivariate statistical analyses

A principal component analysis (PCA) was first performed to detect any outliers or group separation based on NMR-signal variability.

An orthogonal projection to latent-structure (OPLS) analysis was run to discriminate patients from the cirrhosis or large HCC groups. Compared to the classical projection of latent-structure analysis (PLS), this method allowed improved interpretation of the spectroscopic variations between discriminated groups, by removing information that had no impact on discrimination.

Samples were split into three sets: training set, test set and small HCC set. The training set was used to build the OPLS model. The test set was projected on the OPLS model for validation and to assess the general predictive power of the model.

The training and test sets were randomly constituted of 84 training cases (62 cirrhosis and 22 large HCC) and 42 test cases (31 cirrhosis and 11 large HCC). The small HCC set included 28 small HCC cases and the same 31 cirrhosis cases used in the test set.

The goodness-of-fit parameters of the OPLS model, R^2X , R^2Y and Q^2Y , were calculated. R^2X and R^2Y represent the explained variance, respectively, of the X and the Y matrices. Q^2Y estimates the predictability of the model. $R^2 = 1$ indicates a perfect description of the data by the model whereas $Q^2 = 1$ indicates perfect predictability. For internal validation of the OPLS models we performed a permutation test (999 permutations). The aim of this test was to evaluate whether our OPLS models, built with the groups, was significantly better than any other OPLS model obtained by randomly permuting the original groups attribution.

For validation, a receiver–operator characteristic (ROC) curve was drawn to evaluate the ability of the OPLS latent variable T_{pred} to correctly classify the test set. The area under the ROC (AUROC) was calculated. A perfect discrimination corresponded to an AUROC equal to 1. An optimal cut-off value of T_{pred} (T_{opt}) was also calculated with the Matlab® function “perfcurve” which minimize both the false positive and false negative cases in the test set, assuming equal weightings on the cost of misclassification.

The small HCC set was used to test the ability of the model to discriminate between small HCC observations and cirrhosis cases. False positive and false negative rates were calculated using the curve cut-off, T_{opt} , previously calculated for the test set.

A score plot illustrated the results. Each point in the score plot represented the projection of an NMR spectrum (and thus a patient’s sample) on the predictive (horizontal axis) and the first orthogonal component of the model (vertical axis).

The loading plot represents the covariance between the Y-response matrix and the signal intensity of the various spectral domains. Colours were also used in the loading plot depending of the p -value associated with the correlation between the corresponding bucket intensity and the Y variable. The null hypothesis associated with the p -values used in this study is that there is no correlation between X (intensity of the buckets) and Y (cirrhotic group or HCC group) variables. To minimize false-positive rates in multiple comparisons of the 4239 spectral domains, we used the conservative Bonferroni correction, which discards any low significant variables. Thus, for an error rate of 0.01, a metabolite variation in the loading plot was considered significant if its p -value was $<2.4 \cdot 10^{-6}$.

PCA and OPLS analyses were performed using Simca-P12 (Umetrics, Umea) and in-house Matlab® (Mathworks, Natick, MA) code based on Trygg and Wold method ²²⁰.

Metabolite identification

On the loading plot, the positive signals corresponded to those metabolites that had an increased concentration in the serum of patients with HCC. Conversely, a negative signal corresponded to those metabolites that had an increased concentration in the serum of patients without HCC.

The buckets were designated according to their central chemical-shift values. Their most probable assignment to a metabolite was given according to the spectral assignment, as previously described in the literature ³⁴, and was confirmed with ¹H-¹H TOCSY 2D NMR spectra.

RESULTS

Patients' characteristics

A total of 286 patients were screened: of these, 158 patients fulfilled the inclusion criteria as shown in Figure 1. The data obtained by bucketing of the 158 serum spectra were successfully acquired and first analysed by PCA (results not shown). From this analysis, four outliers were identified. All spectra that exhibited high levels of ethanol (1.11 ppm and 3.66 ppm) were excluded. Demographics, clinical and biological features, as well as data regarding characteristics of liver tumours for the 154 remaining patients, are displayed in Table 1. As expected, patients with HCC were older and were more often male than patients without HCC. There was no difference in the severity of liver disease as assessed by the MELD score between the three groups.

OPLS model with cirrhosis and large HCC

Serum spectra from cirrhotic and large HCC groups that belonged to the training set were discriminated with the OPLS model as shown in the score plot in Figure 2a. The model was build with one predictive and 3 Y-orthogonal components and exhibited a good explained variance: (R^2X) of 0.46, (R^2Y) of 0.90, predictability (Q^2Y) of 0.83.

The model was internally validated, as all Q^2Y and R^2Y values obtained with permuted Y were smaller than those of the model. Intercept values for Q^2Y and R^2Y obtained from the permutation plot (not shown) were, respectively, -0.57 and 1.40 .

Validation performed with the test set shows that the model could predict cirrhosis or HCC as shown in the score plot in Figure 3a. In all cases, each sample was correctly classified according to the presence or absence of large HCC. Consequently, the AUROC was equal to 1 (not shown).

The optimal cut-off value of T_{pred} was $T_{opt}=0.25$.

Small HCC set

As shown in the score plot in Figure 3b the projection of cirrhotic and small HCC on the predictive component was heterogeneous.

Using the optimal cut-off value of T_{pred} obtained from the test set ($T_{opt}=0.25$), all cirrhotic sera were correctly assigned to the cirrhotic groups but, among the 28 small HCC group, 11 patients displayed a serum metabolic profile similar to that of patients with large HCC (true positive) while 17 had a metabolic profile close to that observed in cirrhotic patients without HCC (false negative).

Having identified two different metabolomic profiles in this subset of patients, we compared their baseline features as well as their outcomes after the RFA procedure (Table 2). If their clinical and radiological characteristics were comparable, there was a non significant trend towards higher rates of local or distant recurrence, as well as a higher rate of deaths during follow-up in patients with serum metabolomic profiles defining the true positive subset.

Discriminant metabolites

The appearance of ^1H NMR serum spectra was globally similar to those previously described in human sera of cirrhotic patients (Supplementary Figure S1) ²¹⁷. The spectral assignment was confirmed with ^1H - ^1H TOCSY 2D NMR spectra (Supplementary Figure S2).

The loading plot obtained with the OPLS model for the training set revealed that twelve signals, corresponding to eight metabolites or groups of metabolites, were highly significantly correlated with the presence of large HCC (Figure 2b). They are presented in Table 3.

In ^1H NMR serum spectra, lipids could be detected as broad resonances of fatty-acid methyl and methylene moieties at 0.8 and 1.24 ppm, respectively, and the N-trimethyl moiety of choline was included in phospholipids at 3.22 ppm as shown in figure 1. Among those signals, those at 0.8 and 1.24 ppm were significantly correlated to the presence of large HCC. These resonances of fatty acids arise from lipids included lipoprotein particles of different densities. It has been widely reported that high-density lipid (HDL) particles produce resonances with lower chemical shifts than low-density lipoprotein (LDL and VLDL) particles. Interestingly, lipoproteins with higher density were significantly elevated in cirrhotic patients without HCC. For VLDL, corresponding to the highest chemical shifts in methyl and methylene resonances, no differences were found. Others lipids were identified and participated in the discrimination.

Three other broad lipid signals were identified in the patients' sera at 1.50, 1.99 and 5.33 ppm. The two first corresponded to methylene moieties following the ester moiety. The last one corresponded to methylene moiety following a double bond in unsaturated fatty acid.

N-acetyl moieties of glycoprotein produced a broad resonance at 2.05 ppm, which was increased for patients with HCC when compared to those without HCC. This signal corresponded to different N-acetylated glycoproteins as well as to their metabolites: N-acetylneuraminic acid and N-acetylglucosamine.

Some amino acids were identified in the spectra and were highly significant for discrimination. Glutamine was significantly higher in cirrhotic patients than HCC patients, whereas glutamate was significantly lower.

Ketone bodies could be detected in the spectra and participated in discrimination. Acetate (1.92 ppm) was significantly higher in HCC than cirrhotic patients.

Discussion

This preliminary study was conducted in a homogeneous and large sample-sized cohort of patients. The usual major limitation encountered in a translational metabolomic approach to liver diseases is methodological bias when selecting patients, thus limiting the confidence that can be drawn from conclusions^{92, 189, 216}. We attempted to avoid these pitfalls by constructing well-defined subgroups of patients according to their stage of underlying liver disease and HCC status. We also focused specifically on alcoholic aetiology to avoid any potential specific influence of viral or non-alcoholic-related liver disease on sera metabolomic profiles, as previously reported^{168, 221}. Moreover, to eliminate the effect of liver-function impairment on different metabolic pathways (as previously reported), we excluded all patients with end-stage liver disease from this analysis²¹⁷. Also, the collection of sera samples before the onset of any therapeutic procedure for HCC reinforced the confidence of the observed effect of tumour metabolism.

In this setting, the present data enabled us to draw several conclusions. First, it appears that changes in serum metabolomic profiles were observed according to the presence of advanced HCC. Second, these fingerprints reflected the distinct activation or impairment of multiple biological pathways, mainly energetic metabolism involving glutamine/glutamate, ketone bodies and lipids. On another hand, glucose sera content was not a discriminant metabolite. Lastly, the refinement of our initial projection, to analyse metabolic changes observed in biopsy-proven small-HCC patients, revealed various profiles that probably reflect different metabolic activities with potential clinical implications.

The metabolic profiles of cirrhotic patients with large HCC exhibited clear modifications in lipid composition, glutamine metabolism and ketone bodies compared to the metabolic profiles obtained from cirrhotic patients without HCC as previously described using mass spectroscopy or ¹H NMR spectroscopy in urine, tissue or serum^{92, 186, 189, 196, 199, 215, 216}. However, those metabolic

profiles were mainly described with viral etiology and not in alcoholic cirrhotic patients with well classified HCC.

Patients with advanced HCC had lower HDL than cirrhotic patients without HCC. Using serum ¹H NMR spectroscopy of cirrhotic patients, we have previously confirmed that HDL level is altered and decreased with the severity of chronic liver failure ²¹⁷. Patients with end-stage liver disease were excluded, thus, differences in HDL could not be explained by the severity of liver disease. Interestingly, several epidemiological studies have reported a good correlation between with low HDL-cholesterol levels and several cancers, including HCC ²²². In the population studied here, cholesterolemia was not modifying in the presence of HCC (Table 1). Nevertheless, the lipoprotein profile, as assess with NMR spectra, showed that HDL fraction (not HDL-cholesterol) could be modulated in sera of patients with HCC. However, low HDL levels may be a non-specific surrogate marker for an existing malignancy rather than a predisposing factor. Unsaturated lipids were also found at higher levels in patients without cancer.

Glutaminolysis and glycolysis represent the main metabolic energy pathways in cell tumours. Alterations in glutamine metabolism in this context may have several explanations. First, ‘trapping’ of glutamine by malignant cells could explain the glutamine depletion in the serum of HCC patients when compared to the cirrhotic patients in our study. Yang *et al* showed, using HR MAS, in simultaneous samples of HCC and non-HCC tissues obtained from the same patients, elevated levels of glutamine in tumour samples: the levels were higher in high-grade tumours than low-grade or non-tumoral tissues ¹⁹⁶. Glutamine consumption by tumour cells has been reported and seems to depend upon the presence or absence of an alternative energy substrate ²²³. Moreover, low levels of glutamine and high levels of glutamate in serum may be found in different states as cachexia, cancer (specifically digestive cancers) or pro-inflammatory states. In

these clinical settings, high glutamate levels were secondary to the accumulation of this metabolite in the serum in parallel with a decrease in muscular glutamate intake²²⁴.

The role of glycoproteins in cancer disease has been widely studied. Using data from proton NMR spectroscopy of serum or plasma, the prominent resonance in the region of 2.0 to 2.1 ppm has been frequently associated with tumour invasion or malignancy in several types of cancer, including colorectal, gastric, breast, cervical, prostate and ovarian²¹⁴. Nicholson et al. have suggested that this resonance arises mainly from N-acetyl protons from alpha1 acid glycoprotein. This glycoprotein contains a high ratio of carbohydrate (45%), as N-linked glycans of a sialic-acid type³⁴. More specifically, in HCC, raised levels of alpha1 acid glycoprotein had been found in patients with cancer, as well as low AFP, when compared to cirrhotic patients without cancer²²⁵.

Thus, serum metabolomic analysis of cirrhotic patients with large HCC highlights the activation of various metabolic pathways that seem to be specific to this tumour. Based on the present data, metabolomic NMR analysis provides new insights into the metabolic processes related to the biology of liver cancer. Furthermore, the projection of small HCC serum samples along pre-defined discriminant axes reveals important clinical information. Indeed, based on the serum analysis of these 'intermediate' patients, we were able to observe a subgroup of patients whose metabolomic profiles were similar to those of patients with large HCC, whereas other 'intermediate' patients displayed fingerprints suggesting an absence of liver cancer.

The model failed to clearly discriminate between cirrhotic patients and small HCC patients. However, from a metabolomic point of view, some patients with small HCC, who were eligible for curative treatment, seemed to behave as patients with advanced cancerous disease.

HCC recurrence after curative treatment (whether RFA, surgical resection or transplantation) is a major challenge as tumour recurrence can be as high as 50% at 2 years²¹¹. Thus, we attempted to

classify small HCC patients according to their serum metabolomic profile and compared HCC characteristics within this subgroup (Table 2). We did not observe any differences according to clinical characteristics or HCC status, (number, size, histological features comprising expression of glutamine synthase): this suggests a certain degree of homogeneity that does not account for the identified metabolomic changes. However, there was a trend towards a worse prognosis in patients with profiles similar to the large HCC group, with higher rates of local or distant recurrences and a greater incidence of death, though these findings must be cautiously interpreted due to the small sample-size of this sub-population ²²⁶. By providing new patterns of recognition, metabolomic profiling may be a useful tool to refine prognosis and to aid therapeutic procedures for these patients.

However, metabolomic profiling, which assesses surrogate markers of tumour biology in tumoural tissues or serum samples, can provide complete and multivariate information on metabolomic changes related to liver tumours and can possibly assess its aggressiveness, thus defining various metabolic profiles. The assessment of this technique as a prognosis tool in patients with HCC and who are eligible for curative treatment deserves further investigation, particularly in HCV- or HBV- infected HCC patients in whom metabolomic changes reported here may not be entirely translated. Most importantly, the intra-individual analysis of serum changes during follow-up of treated patients may provide essential information related to therapeutic responses, recurrence or progression. These new approaches should be developed in large prospective cohorts of well-defined patients undergoing standardized therapeutic procedures classified according to both the etiology on the underlying liver disease and the stage of liver tumour, and in whom sequential biological samples are available for metabolomic profiling. Finally, the additional integration of metabolomic information, which may improve the performance of pre-existing risk-assessment models for HCC occurrence or recurrence after

treatment, warrants to be tested in large cohorts of prospective followed-up patients with cirrhosis. Such approach will surely improve our understanding of the implications of the various biological pathways involved in the progression towards cancer diseases and may, in the near future, help identify subgroups of patients at high risk of HCC, and so could benefit from specific preventive measures or could be given adapted screening policies.

References

1. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol.* 2008;48Suppl 1:S20-37.
2. Breuhahn K, Gores G, Schirmacher P. Strategies for hepatocellular carcinoma therapy and diagnostics: lessons learned from high throughput and profiling approaches. *Hepatology.* 2011;53:2112-21.
3. Lindon JC, Nicholson JK. Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2008;1:45-69.
4. 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;29:1181-9.
5. Slupsky CM, Steed H, Wells TH, Dabbs K, Schepansky A, Capstick V, et al. Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2010;16:5835-41.
6. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG. Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res.* 2009;15:431-40.
7. Chen T, Xie G, Wang X, Fan J, Qiu Y, Zheng X, et al. Serum and urine metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10:M110 004945.
8. Gao H, Lu Q, Liu X, Cong H, Zhao L, Wang H, et al. Application of ¹H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci.* 2009;100:782-5.

9. Shariff MI, Gomaa AI, Cox IJ, Patel M, Williams HR, Crossey MM, et al. Urinary metabolic biomarkers of hepatocellular carcinoma in an Egyptian population: a validation study. *J Proteome Res.* 2011;10:1828-36.
10. Wu H, Xue R, Dong L, Liu T, Deng C, Zeng H, et al. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2009;648:98-104.
11. Amathieu R, Nahon P, Triba M, Bouchemal N, Trinchet JC, Beaugrand M, et al. Metabolomic approach by ¹H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis. *J Proteome Res.* 2011;10:3239-45.
12. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, et al. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol.* 2001;35:421-30.
13. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 1996;334:693-9.
14. Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J Chemometrics.* 2002;16:116-28.
15. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem.* 1995;67:793-811.
16. Shariff MI, Ladep NG, Cox IJ, Williams HR, Okeke E, Malu A, et al. Characterization of urinary biomarkers of hepatocellular carcinoma using magnetic resonance spectroscopy in a Nigerian population. *J Proteome Res.* 2010;9:1096-103.

17. Cobbold JF, Patel JH, Goldin RD, North BV, Crossey MM, Fitzpatrick J, et al. Hepatic lipid profiling in chronic hepatitis C: an in vitro and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Hepatol.* 2008;52:16-24.
18. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholicsteatohepatitis. *Hepatology.* 2009;50:1827-38.
19. Patterson AD, Maurhofer O, Beyoglu D, Lanz C, Krausz KW, Pabst T, et al. Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling. *Cancer Res.* 2011;71:6590-600.
20. Yang Y, Li C, Nie X, Feng X, Chen W, Yue Y, et al. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning ¹H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *J Proteome Res.* 2007;6:2605-14.
21. Ahn J, Lim U, Weinstein SJ, Schatzkin A, Hayes RB, Virtamo J, et al. Prediagnostic total and high-density lipoprotein cholesterol and risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:2814-21.
22. Meng M, Chen S, Lao T, Liang D, Sang N. Nitrogen anabolism underlies the importance of glutaminolysis in proliferating cells. *Cell Cycle.* 2010;9:3921-32.
23. Hack V, Stutz O, Kinscherf R, Schykowski M, Kellerer M, Holm E, et al. Elevated venous glutamate levels in (pre)catabolic conditions result at least partly from a decreased glutamate transport activity. *J Mol Med (Berl).* 1996;74:337-43.
24. Bachtiar I, Kheng V, Wibowo GA, Gani RA, Hasan I, Sanityoso A, et al. Alpha-1-acid glycoprotein as potential biomarker for alpha-fetoprotein-low hepatocellular carcinoma. *BMC Res Notes.*3:319.

25. Di Tommaso L, Destro A, Seok JY, Balladore E, Terracciano L, Sangiovanni A, et al. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2009;50:746-54.

Table 1: Baseline characteristics of the population

	Training set (n=84)		Test set (n=42)		Small HCC Projections (n=28)
	Cirrhosis (n=62)	Large HCC (n=22)	Cirrhosis (n=31)	Large HCC (n=11)	
Age (years) ^a	59.0±1.4	71.7±1.7*	59.5±2.2	66.3±2.5	66.7±1.3*
Male gender ^b	53 (85%)	22 (100%)*	27 (81%)	11 (100%)	22 (28%)
ALT (UI/L) ^a	41.1±2.5	53±11.4	47.0±7.8	38.5±7.2	49.5±12.2
AST (UI/L) ^a	75.9±6.8	97.3±26.7	72.4±12.4	54.5±5.9	62.0±7.5
Albumin (g/L) ^a	38.9±0.7	37.3±1.0	37.9±1.2	37.7±1.5	39.8±1.0
Prothrombin level (% control) ^a	72.5±2.2	75.4±3.7	70.0±3.5	69.1±4.7	69.9±2.7
Bilirubin (µmol/L) ^a	23.6±3.3	17.9±2.1	29.4±4.1	26.6±8.7	17.1±1.7
Child Pugh score ^a	5.8±0.1	6.0±0.2	6.3±0.2	6.2±0.3	5.5±0.2*
MELD score ^a	11.3±0.5	11.1±1.0	11.9±0.8	13.4±2.1	10.5±0.8
Creatinine (µmol/L) ^a	87.0±4.8	101.3±8.6	79.2±3.1	136.1±40.5*	82.2±5.5
Blood Glucose (mmol/L)	6.3±0.3	6.1±0.3	8.0±0.9	7.0±0.9	6.3±0.4
Triglyceride (g/L) ^a	1.1±0.1	1.5±0.3	1.5±0.2	1.2±0.1	1.1±0.1
Total cholesterol (mmol/L) ^a	4.4±0.2	4.9±0.6	4.6±0.3	5.0±0.6	4.8±0.3
AFP (ng/mL) ^a	10.3±3.1	6156.2±3947.6*	18.0±4.0	5665.2±5484.3	179.4±178.3 ^µ
HCC Characteristics					
Number of nodules	___	2.4±0.3	___	3.6±0.8	1.2±0.1 ^µ
Size (mean sum of nodules, mm)	___	93.1±9.4	___	100.1±12.2	31.9±2.9 ^µ
PVT (number, %)	1 (2%)	8 (36%)	___	2 (18%)	0 (0%)
Metastasis (number, %)	___	3 (14%)	___	1 (9%)	0 (0%)

All biological and clinical parameters were recorded at inclusion. ^aMean ± SEM. ^bNumber (percentage) of patients. HCC: hepatocarcinoma

*P<0.05 between HCC and Cirrhosis

^µ P<0.05 between Large and Small HCC Groups

Table 2: Characteristics of small HCC according to their projection on the model

	False Negative ^c (n=17)	True Positive ^d (n=11)
Age (years) ^a	64.8±1.7	69.9±1.8
Male gender ^b	12/17	10/11
Child	5.2±0.1	6.1±0.3
MELD	9.9±0.5	11.5±1.2
Number of Tumors	1.3±0.1	1.2±0.1
Size of Tumors (mm)	33.2±4.5	30.1±3.1
Edmondson grade (I/II/III)	3/11/3	2/7/2
Liver Glutamine synthase ^e	38%	25%
Recurrence ^b	7 (41%)	7 (63%)
Overall Mortality ^b	4 (23%)	6 (54%)

^aMean ± SEM. ^bNumber (percentage) of patients. ^cFalse negative corresponds to proven-biopsy HCC case projected with the cirrhosis cases. ^dTrue positive corresponds to proven-biopsy HCC case projected with Large HCC cases. ^eGlutamine synthase was considered positive when more than 50% of tumor cells showed a strong cytoplasmic staining. Results were expressed in percentage of positive biopsy

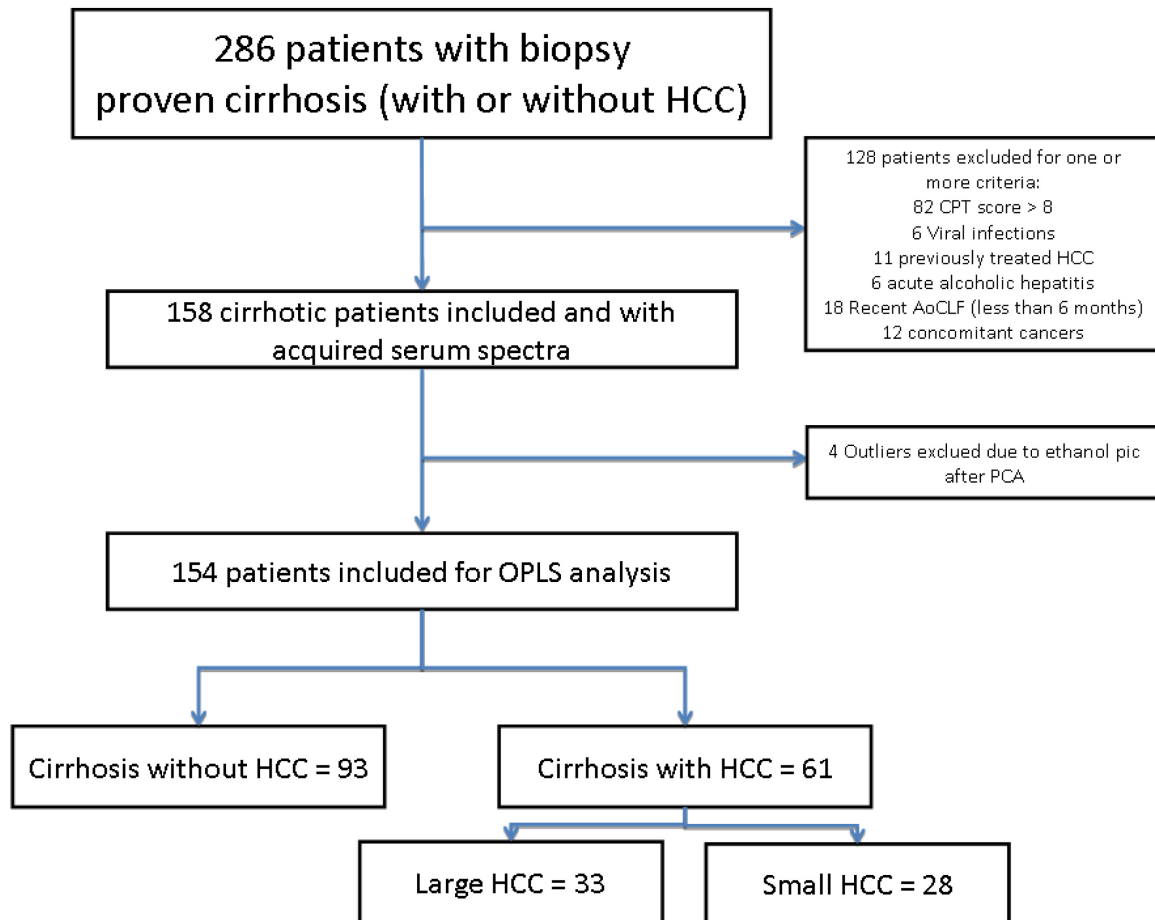
Table 3: Discriminant metabolites observed by ^1H NMR spectroscopy, according to the loading plot (Figure 2b), between cirrhotic serum spectra and Large HCC serum spectra.

Number	Name	Chemical shift (ppm) and multiplicity	r	P
1	Methyl moieties of fatty acids (HDL)	0.84 ^m 1.23 ^m	-0.60	5.22 10 ⁻⁹
2	Methylene moieties of fatty acids	1.50 ^m	-0.56	4.09 10 ⁻⁶
3	Acetate	1.90 ^s	+0.57	2.56 10 ⁻⁸
4	Methylene moieties of fatty acids (β of esters)	1.99 ^b	-0.48	5.42 10 ⁻⁶
5	N-acetyl moiety	2.02 ^m	+0.52	5.68 10 ⁻⁷
6	Glutamate	2.33 ^m	+0.83	1.23 10 ⁻²¹
7	Glutamine	2.11 ^m 2.43 ^m	-0.63	3.92 10 ⁻¹²
8	Fatty acids double bounds	5.33 ^b	-0.42	6.50 10 ⁻⁷

The metabolite number corresponds to the label in the loading plot in Figure 2b. Chemical shift (referenced to fumaric acid signal at 6.53 ppm) and multiplicity correspond to those found in the ^1H NMR spectra of the patient's serum at 298K. ppm: part per million, ^ssinglet, ^ddoublet, ^{dd}doublet of doublet, ^ttriplet, ^mmultiplet, ^bbroadsignal. A negative correlation (r) corresponds of an increased metabolite concentration in the cirrhotic group and a positive correlation to an increased metabolite concentration in the HCC group.

Figure 1: Flow chart of patients.

Figure 1

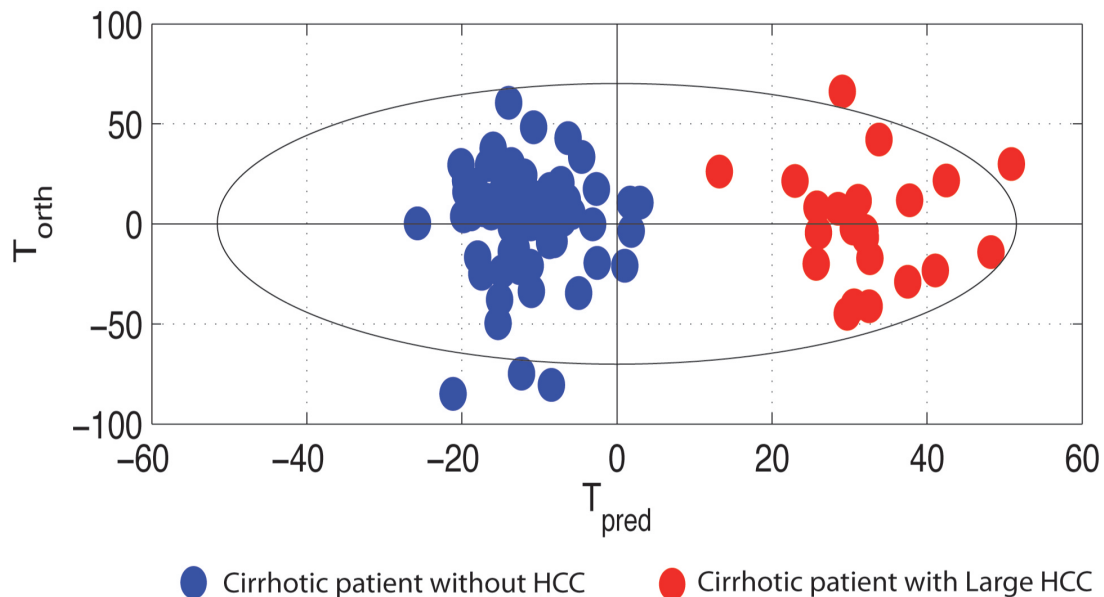


HCC: Hepatocellular carcinoma; CPT: Child–Pugh–Turcotti score; AoCLF: acute on chronic liver failure; PCA: principal component analysis; OPLS: orthogonal partial latent structure analysis

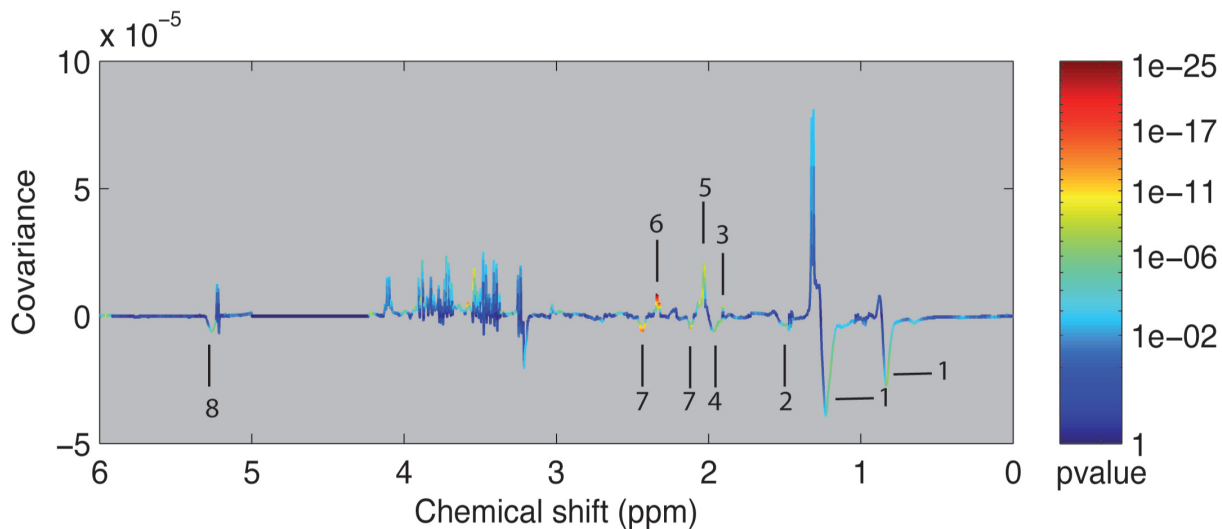
Figure 2: OPLS score plot (a) and Loading plot (b).

Figure 2

(a)



(b)

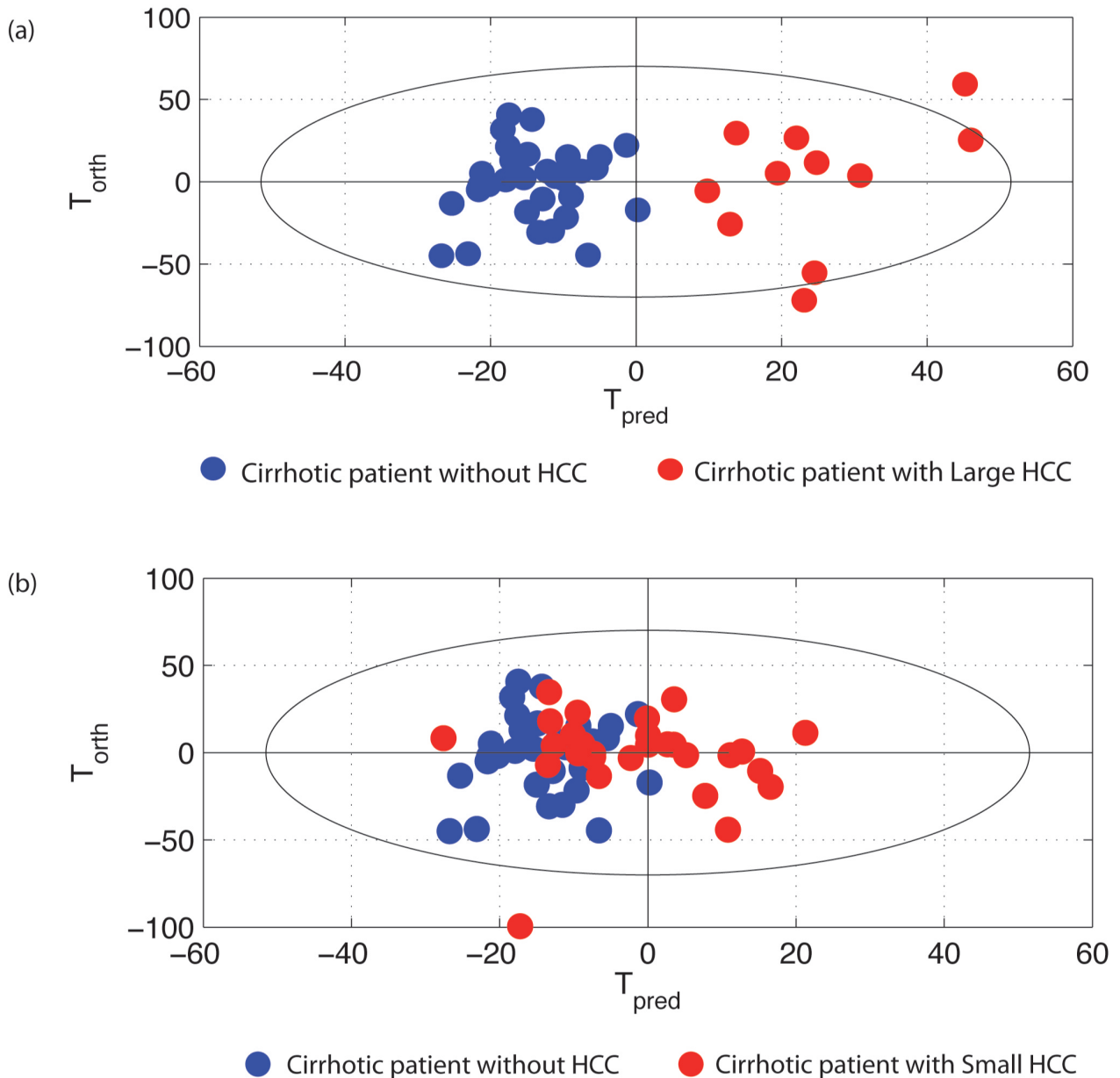


(a): On the score plot, each dot corresponds to a spectrum coloured according to the absence (blue) or the presence (red) of hepatocellular carcinoma (HCC). The constructed model displays a good separation between the spectrum of cirrhotic patients without HCC and those with HCC.

(b): On the Loading plot, variations of bucket intensities are represented using a line plot between 0 to 6 ppm. Positive signals correspond to the metabolites present at increased concentrations in patients with large HCC. Conversely, negative signals correspond to the metabolites present at increased concentrations in patients without HCC. The buckets are labelled according to the metabolite as presented in Table 2.

Figure 3: Validation of the model (a) and projection of serum spectra in patients from the cirrhosis or small HCC group (b).

Figure 3



Each dot corresponds to a spectrum coloured depending on the absence (blue) or presence (red) of hepatocellular carcinoma (HCC).

(a): Each new spectrum was projected in the score plot using the previously constructed model to enable prediction of the presence or absence of HCC. The area under the a receiver–operator characteristic (AUROC) drawn to evaluate the ability of the OPLS (orthogonal projection to latent structure analysis latent variable, T_{pred} , to correctly classify each spectrum was equal to 1 with a cut-off of T_{pred} (T_{opt}) equal to 0.25.

(b): Using the same previously calculated cut-off value of the training set ($T_{opt}=0.25$), each spectrum of cirrhotic patients without HCC was correctly assigned. Nevertheless, the spectra from small HCC patients had a heterogeneous distribution in the score plot. Some were projected on the left with the cirrhotic spectra, others were projected on the right, with the large HCC patients, and some were projected in between.

4.2.3 Profils métaboliques des patients cirrhotiques présentant une insuffisance hépatocellulaire aigüe (*soumis*)

Les patients cirrhotiques présentent des degrés d'insuffisance hépatique chronique variables en fonction de l'évolution de leur maladie. Lors d'un événement aigu, comme une hémorragie digestive ou une infection sévère, ces patients vont aggraver brutalement leur insuffisance hépatique chronique réalisant un tableau d'insuffisance hépatique aigüe (IHA) sur cirrhose. Il n'existe pas de définition consensuelle de ce syndrome. Le but de ce travail était de déterminer les profils métaboliques sériques obtenus par spectrométrie par résonance magnétique nucléaire du proton chez des patients cirrhotiques admis en réanimation pour un événement aigu associé à une aggravation brutale de leur insuffisance hépatique.

Cent vingt trois patients ont été inclus : 93 patients cirrhotiques sans aggravation récente de leur fonction hépatique (Groupe Contrôle), hospitalisé pour un bilan de leur hépatopathie et 30 patients hospitalisés en réanimation principalement pour un sepsis ou une hémorragie digestive (Groupe IHA). Le sérum a été prélevé à l'admission et congelé à -80°C jusqu'à la réalisation de l'acquisition des spectres. Une OPLS a été réalisée et les métabolites permettant la discrimination des deux groupes identifiés.

Les deux groupes étaient correctement discriminés en OPLS, avec une valeur prédictive de 0.73 et une variance explicative de 0.63. Les principaux métabolites discriminants dont la résonance était augmentée dans le groupe IHA étaient le lactate, le pyruvate, les corps cétoniques, la glutamine et les acides aminés aromatiques. La résonance des HDL lipoprotéines était augmentée dans le groupe contrôle par rapport au groupe IHA.

Chez les patients présentant une cirrhose, lors d'une aggravation aigue de leur fonction hépatique, il existe une perturbation aigue de différentes voies métaboliques, notamment celles du lactate, de l'urée et des acides aminés aromatiques. Ces perturbations pourraient être la signature métabolique de l'insuffisance hépatique aigue sur cirrhose. Cette approche pourrait nous permettre de mieux stratifier les patients présentant ce syndrome et d'apporter de nouvelles données sur les modifications métaboliques aigues qui lui sont associées.

Serum ¹H NMR metabolomic fingerprints of Acute on Chronic Liver Failure in ICU cirrhotic patients

Short title: Serum metabolomics and Acute on Chronic Liver Failure

Roland Amathieu^{1,2}, Mohamed N. Triba^{*2}, Pierre Nahon³, Nadia Bouchemal², Walid Kamoun¹, Hakim Haouache¹, Jean-Claude Trinchet³, Philippe Savarin², Gilles Dhonneur¹, Laurence Le Moyec⁴.

¹Service d'Anesthésie-Réanimation et Université Paris 12, Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France;

²Laboratoire CSPBAT, UMR 7244, Université Paris 13, Equipe Spectroscopie Biomolécules et Milieux Biologiques, Avenue Marcel Cachin, Bobigny, 93000, France ;

³Service d'Hépatologie et Université Paris 13, Hôpital Jean Verdier, AP-HP, Bondy, France ;

⁴INSERM U902, UBIAE, Université d'Evry, Val d'Essonne, rue du Père Jarlan, 91025 Evry, France;

*** Roland Amathieu and Mohamed N Triba participated equally to this work.**

Correspondance: Roland Amathieu, Service d'Anesthésie-Réanimation, Hôpital Henri Mondor, 94000 Créteil, France. Tel: 33-1-48-02-66-80; Fax : 33-1-48-02-66-79. Email: roland.amathieu@hmn.aphp.fr

Electronic Word Count: 4757 (Abstract: 247; Text and references: 3988; Tables and figure legends: 537). **Figures: 3; Tables: 3**

Keywords: Metabolomics; Acute on Chronic Liver Failure; ICU; serum biomarkers; cirrhosis

Abstract

Background and aims: Acute on Chronic Liver Failure (ACLF) is a condition characterized by the acute deterioration of liver function in a patient with compensated or decompensated, but up to now stable cirrhosis. Accurate definition of ACLF is lacking and physicians often use this term to describe different clinical entities. Metabolomics investigates metabolic perturbations in a biologic system allowing the identification of biomarkers or metabolic profiles. The present study was performed to assess the interest of metabolomic profiling of the serum by proton (^1H) NMR spectroscopy to identified metabolic perturbations related to ACLF.

Methods: Ninety-three cirrhotic patients (CLF group) without ACLF and thirty cirrhotic patients (ACLF group) hospitalized for management of acute event responsible of ACLF were prospectively included. Blood samples were drawn at admission, serum was separated and stored at -80°C until ^1H NMR spectra acquisition. OPLS analysis was run out to discriminate the groups and discriminant metabolites were identified.

Results: Groups were discriminated in OPLS analysis: the predictability of the model was 0.73 (Q^2Y) and explained variance was 0.63 (R^2Y). Main metabolites with increased signals related to ACLF were lactate, pyruvate, ketone bodies, glutamine, phenylalanine, tyrosine and creatinine. HDL signals were lower in ALCF group than in CLF group.

Conclusion: A serum metabolite fingerprint of ACLF obtained with ^1H NMR could be identified. Metabolomic profiling may help to refine clinical evaluation of cirrhotic patients admitted in ICU with ACLF and also provides new insights into metabolic process involved in the acute impairment of hepatic functions.

Introduction

Acute on Chronic Liver Failure (ACLF) is a syndrome characterized by the acute deterioration of liver functions in a patient with compensated or decompensated, but up to now stable cirrhosis. ACLF is a serious condition with varied etiology and manifestations, as well as high mortality ²²⁷. ACLF is commonly precipitated by an acute event, and often associated with extra-hepatic organ failures. The most common triggers of ACLF include sepsis and digestive bleeding ²²⁸. Any patient with cirrhosis is exposed to acute complications, which, by turn, may occasionally initiate a cascade of events possibly leading to further deterioration of liver functions, multiple organ failures and death within few days or weeks. These cirrhotic patients are eligible to ICU management.

There is no consistent definition of ACLF in the literature. Clear definition of ACLF is lacking and the physician often uses this term to describe different entities. Each study done previously on ACLF has used its own definition, and there is no unanimity in these definitions in term of criteria for liver failure, the causing acute event, and the diagnosis of underlying chronic liver disease. Recently, the Asia-Pacific Association for the study of liver disease ²²⁹ and the EASL-AASLD proposed consensus definition for the ACLF ²²⁷. The criteria included for ACLF definition are as wide as the level of bilirubin and the time period of deterioration from the onset, initiating event to be accepted as jaundice, or any symptom pertaining to hepatic dysfunction. Better definition of ACLF probably requires new biomarkers. Nevertheless, it is now widely accepted that the search for a single biomarker that can be used in routine clinical practice to diagnosis patient with ACLF is probably utopic.

Metabolomics, which is the study of metabolic changes in an integrated biologic system using a multiparametric analysis technique, may help identifying biomarkers, characterizing metabolic profiles of a disease or evaluate metabolic modifications after treatment initiation ²³⁰. Metabolomics using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy was applied to liver diseases showing a close relationship between metabolic abnormality severity of the disease in serum or tissue ^{49, 168, 231-233}. Jimènez *et al.* showed that ¹H NMR metabolomics of the sera of the cirrhotic patients could discriminate patients with minimal hepatic encephalopathy from patients without encephalopathy ²³⁴. Others studies showed metabolomics fingerprint differences between compensated and decompensated cirrhotic or between alcoholic and viral etiology of the cirrhosis ^{235, 236}. Applied to cirrhotic patients without acute on chronic liver failure, we previously showed that the metabolomic approach is a powerful tool to assess chronic liver failure severity in alcohol-induced cirrhosis. In this study, severity of the chronic liver failure was evaluated with the MELD score and was well correlated with impairment of lipid, glucose or amino acid metabolisms ⁴⁹. In the liver ICU field of human investigations, some studies have evaluated the different metabolic profiles following transplantation comparing non-survivor to survivor or graft failure cases and have showed the assessment improvement of the patient status liver after transplantation^{205, 237}. Another study, using ¹H NMR on serum, has shown the potential of the metabolomic profile evaluation for patients with fulminant hepatic failure to predict an unfavorable outcome²³⁸. None of them studied metabolic perturbations in cirrhotic patients with ACLF.

We hypothesis that cirrhotic patients hospitalized in ICU have acute metabolic perturbations distinguishable by ¹H NMR in the serum. These metabolic perturbations could identify patient with ACLF, independently of the triggers event. Then, the purpose of

this study was to assess whether serum metabolomic profiles obtained by ^1H NMR spectroscopy were modified for alcohol-induced cirrhotic patients hospitalized in ICU during an acute event known to be responsible of ACLF compared to compensated or decompensated by stable cirrhotic patients. Another aim was to identify common metabolic pathways impaired.

Materials and Methods

Patients and collection of serum samples

Between August 2010 and December 2010, all consecutive cirrhotic patients referred to our Liver Center were screened for the study. Cirrhotic patients hospitalized in ICU for the management of an acute event, mainly gastrointestinal bleeding or sepsis, were included in the ACLF group. Compensated and decompensated, but up to now stable, cirrhotic patients referred to the hepatology unit for either therapeutic management (paracentesis) or screening procedures were included in the CLF group. Cirrhosis was defined by the liver biopsy or by the presence of at least two compatible diagnostic examinations from the following: radiological (ultrasound, computed tomography or magnetic resonance imaging), clinical (at least two signs: hepatomegaly, splenomegaly, encephalopathy, at least two arterial spiders, collateral venous circulation, and jaundice) and/or biological (increased bilirubinemia, prolonged International Normalized Ratio (INR), thrombocytopenia). Only patients with alcoholic etiology were included. Exclusion criteria were: infection by the human immunodeficiency, hepatitis B or C viruses, evidence of HCC (as judged by ultrasonographic findings and serum α -fetoprotein of more than 50 ng/mL) and presence past history of acute decompensating in the last 6 months.

The date of inclusion was the date of blood collection. Blood samples were drawn under fasting conditions for the CLF group and immediately at admission for the ACLF group. Serum was separated and stored at -80°C until further experiments. Gender, age, presence of ascites or hepatic encephalopathy, serum bilirubin, albumin and prothrombin levels, INR, serum alanine aminotransferase (ALT) activity, serum aspartate

aminotransferase (AST) activity, creatininemia, platelet count, were recorded at inclusion. For the ICU patients, admission diagnosis was recorded. Main diagnoses were sepsis, gastrointestinal bleeding, acute renal failure or hepatic encephalopathy. Gastrointestinal bleeding was defined as any hematemesis or melena with a transfusion of 2 or more units of blood. Sepsis was defined as proposed in the international survey sepsis campaign ²³⁹. Blood lactate, hemodynamic parameters, use of catecholamine and mechanical ventilation were recorded. To evaluate the severity of the patient, Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score was calculated during the first day of admission ²⁴⁰. For all patients, severity of chronic liver failure was calculated using both Child-Pugh-Turcott and the MELD score ^{241, 242}. For ACLF group, the more recent Child-Pugh-Turcott score before hospitalization in ICU was taken into account.

Local ethical committee approved the protocol and informed consent was obtained from all enrolled patients.

¹H NMR spectroscopy

For NMR analysis, samples were thawed at room temperature. A volume of 0.6 mL of serum was placed into a 5-mm-diameter specific tube together with 0.1 mL of D₂O containing a known amount of fumaric acid. The proton spectra were acquired at 500 MHz on a Varian Unity Inova® spectrometer at 25°C. The signal was acquired after a 90° pulse on 32K data points for a spectral window of 5000 Hz. The relaxation delay was 4 s. The water signal was suppressed by a pre-saturation sequence using low-power irradiation (0.03 W for 2 s) on the water-signal frequency during the relaxation delay. Frequently, the CPMG sequence is used to suppress the broad signal of protein according to their short T₂

relaxation time. Because the lipids change in the serum of patients with cirrhosis ⁴⁹ and are an important discriminant variable, the single pulse sequence was preferred to preserve the complete lipid profile of the spectra. The resulting free induction decays obtained with 128 transients were processed by Mestrec® software.

A Fourier transformation was applied with an exponential window function to produce a 1 Hz broadening line. The spectra were phased and a spline baseline correction was applied with three points at 0.5, 4.6 and 9 ppm. The chemical shifts were referenced using the fumaric acid signal (6.53 ppm). The spectral region between 0–9 ppm was divided into 9000 spectral regions of 0.001 ppm width, called buckets, using a personal program with R®. Water, urea (signal damaged by water-saturation transfer) and fumaric acid regions were excluded (1810 variables excluded).

At admission, ICU patients were not fasten conversely to the patients from the CLF group. Moreover, some ICU patients were perfused with hydroxylethyl starch, a volume expander, before ICU admission. Glucose residues of hydroxylethyl starch produce an intense and broad resonance between 3.35 and 4.06 ppm. For this reason, region between 3.35 ppm and 4.06 ppm, corresponding to the glucose signal, was excluded from all spectra of the CLF and ACLF groups. Each bucket integral was integrated and scaled to the total summed bucket integrals for each spectrum.

Demographic and biologic data analysis

Qualitative variables were compared using the Fischer exact Chi-2 test or Chi-2 trend test with 1 degree of freedom, while quantitative variables were compared using the non-

parametric Wilcoxon test. All reported p values are two-tailed. Associations were first considered statistically significant at a two-tailed α of 0.05.

Multivariate analyses

A principal component analysis (PCA) was first performed to detect any group separation based on NMR-signal variability. This method also enabled detection and exclusion of any outliers, defined as observations located outside the 95% confidence region of the model. An orthogonal projection to latent-structure (OPLS) analysis was run to discriminate patients from the CLF and ACLF groups. Compared to the classical projection of latent-structure analysis (PLS), this method allowed improved interpretation of the spectroscopic variations between discriminated groups, by removing information that had no impact on discrimination. PCA and OPLS analyses were performed using Simca-P12 (Umetrics, Umea) and in-house Matlab® (Mathworks, Natick, MA) code based on Trygg and Wold method²⁴³.

The goodness-of-fit parameters of the OPLS model, R^2Y and Q^2Y , were calculated. R^2Y represents the explained variance of the Y matrix. Q^2Y estimates the predictability of the model. $R^2Y = 1$ indicates a perfect description of the data by the model whereas $Q^2X = 1$ indicates perfect predictability. For internal validation of the OPLS models a permutation test (999 permutations) was performed. The aim of this test was to evaluate whether the OPLS models, built with the groups, was significantly better than any other OPLS model obtained by randomly permuting the original group attributions.

A score plot illustrates the results. Each point in the score plot represents the projection of an NMR spectrum (and thus a patient's sample) on the predictive (horizontal axis) and the first orthogonal component of the model (vertical axis). The loading plot

represents the covariance between the Y-response matrix and the signal intensity of the various spectral domains. Colors were also used in the loading plot depending on the p -value associated with the correlation between the corresponding bucket intensity and the Y variable. The null hypothesis associated with the p -values used in this study is that there is no correlation between X (intensity of the buckets) and Y (CLF or ALCF group) variables. To minimize false-positive rates in multiple comparisons of the 4239 spectral domains, we used the conservative Bonferroni correction, which discards any low significant variables. Thus, for an error rate of 0.01, a metabolite variation in the loading plot was considered significant if its p -value was $<2.4 \times 10^{-6}$.

Metabolite identifications

On the loading plot, the positive signals corresponded to the metabolites that had an increased concentration in the serum of patients of the ALCF group. Conversely, a negative signal corresponded to the metabolites that had an increased concentration in the serum of patients of the CLF group.

The buckets were designated according to their central chemical-shift values. Their most probable assignment to a metabolite was given according to the spectral assignment and detailed appearance (multiplet, high-resolution peaks and broad signals), as previously described in the literature^{34,35}. To help the identification of metabolites, a statistical total correlation spectroscopy (STOCSY) analysis was also performed (data not shown)⁴².

Results

Patient characteristics and PCA analysis

One hundred thirty patients fulfilled inclusion criteria with 35 patients in the ACLF group and 95 patients in the CLF group. Flow chart of the patients was presented in Figure 1. The data obtained by bucketing of the 130 serum spectra were first analyzed by PCA (not shown). From this analysis, seven outliers were identified: 2 in the CLF group and 5 in the ACLF group. Outliers of the CLF group exhibited high level of ethanol (1.11 ppm and 3.66 ppm). Among the 4 outliers of ACLF group, three were in hemorrhagic shock and were previously transfused. All the outliers were excluded for the OPLS analysis.

Demographics, clinical, and biological features of patients are displayed in Table 1 and specific characteristics of ICU patients are displayed in Table 2.

OPLS models and validations

Serum spectra from CLF and ACLF groups were discriminated with the OPLS model as shown in the score plot in Figure 2A. Examples of typical patient spectra of each group were showed in the Figure 2 B and C. The model was built with one predictive and 2 Y-orthogonal components and exhibited a good explained variance (R^2Y) of 0.73 and predictability (Q^2Y) of 0.63.

On the score plot, patient spectra of CLF and ACLF group were well separated along the horizontal axis. Nevertheless, four patients from the ACLF group had a similarly metabolomic profiles to the one of the CLF group. These patients were hospitalized in ICU for gastrointestinal bleeding, not related to portal hypertension and no severe, for two of them, for acute kidney injury related to acute cardiac insufficiency for one of them, and for

an acute episode of seizure related to alcohol withdrawal for one of them. All these patients were alive after ICU hospitalization. None of them had major impairment of their liver functions when hospitalized in ICU. Two patients of the CLF group were projected with ACLF group. One of them had liver and kidney failures and died one month after inclusion, and one of them was initially classified Child A at admission and final diagnosis was none severe acute alcoholic hepatitis.

The model was internally validated, as all Q^2Y and R^2Y values obtained with permuted Y were smaller than those of the model. Intercept values for Q^2Y and R^2Y obtained from the permutation plot (not shown) were, respectively, -0.22 and 0.19 .

Discriminants metabolites

The metabolites responsible for the discrimination could be identified within the sera spectra according to the loading plot (Figure 3). The table 3 presents the nine metabolites with their variation according to the groups.

In 1H NMR serum spectra, lipids could be detected as broad resonances of fatty-acid methyl and methylene functions at 0.8 ppm and 1.24 ppm, respectively, and the N-trimethyl function of choline included in phospholipids at 3.2 ppm. The line shape of the methyl and methylene fatty acid resonances at 0.8 and 1.24 ppm, depends on the size of the lipoprotein particles. It has been widely reported that high-density lipid (HDL) particles produce resonances with lower chemical shifts than low-density lipoprotein (LDL and VLDL) particles. Interestingly, lipoproteins with higher density were significantly elevated in CLF group. For VLDL, corresponding to the highest chemical shifts in methyl and methylene resonances, no difference was found.

Lactate was an important metabolite for discrimination between ACLF group and

CLF group. Patients with ACLF showed significantly higher lactate signals than patients in CLF group. Pyruvate, ketone bodies, mainly hydroxybutyrate and acetoacetate were significantly higher in ACLF group than in CLF group.

Several amino acids could be identified in the spectra. Glutamine and Glutamate were significantly higher in ACLF group than in CLF group. Aromatic amino acids such tyrosine and phenylalanine were significantly higher in ACLF group than in CLF group.

Finally, creatinine was higher in the spectra of patients in ACLF group than in CLF group.

Discussion

This preliminary study was conducted in a cohort of alcohol cirrhotic patients with acute impairment of the liver disease hospitalized in ICU and patients with compensated or decompensated but stable liver function. This investigation clearly shows a difference in metabolomic profiles between the two studied populations.

During the evolution of the chronic liver failure in cirrhotic patients, several liver metabolism perturbations can be detected. In our previous study, stable patients with alcoholic cirrhosis with various liver injury degree evaluated by the MELD score were included. In severe chronic liver failure, metabolism of lipids, glucose, ketone bodies were significantly discriminants ⁴⁹. Interestingly, in the present study, the metabolites perturbed by the acute phase are different from the previous one or are in increased concentration independently of the severity of the underlying chronic liver failure. In ACLF group, lipid metabolism, lactate, amino acid metabolism and urea metabolism are affected by the impairment of the liver function. This point is important to differentiate metabolomic fingerprints of chronic liver failure and acute on chronic liver failure.

In the ACLF group, HDL were higher than CLF group and no difference was found concerning VLDL and LDL. The fasting state of ACLF patients was not controlled. This should have produce the increase of lipid in sera. Despite this discrepancy, the resonances corresponding to lipids were not increased in ACLF patients. Moreover, the HDL lipid region was found lower than in fasten CLF patients. In several studies, HDL seems to be a good reflect of the hepatic function. Liver plays a key role in the lipid metabolism and low HDL level seems to be more a sign of severity of the chronic liver disease than the sign of an

acute episode of chronic impairment.

The rise of serum lactate concentration is well known in case of acute liver failure and was proposed as a prognosis marker ²⁴⁴. The production of lactate is also impaired in chronic liver failure with a decrease of hepatic PDH activity ²⁴⁵. Moreover, lactate is a major biomarker of tissue hypoxia and necrosis. Hepatic necrosis and inflammation detected by the histological examination of liver biopsy are well correlated with the severity of the ACLF and poor outcomes ²⁴⁶. Lactate was a discriminant metabolite in our previous study concerning the cirrhotic patients with the highest Meld scores. In patients with ACLF, increased lactate concentration may be related to the superimposed impairment of hepatic lactate catabolism and increase production of lactate due to hypoxia and liver necrosis.

The important perturbation of the aromatic acids, *i.e.* phenylalanine and tyrosine, has been found for different etiologies of liver injury such as traumatic injury and seems to be an early marker ²⁴⁷. In patients with chronic liver disease and acute event as gastrointestinal bleeding, infection, acute alcoholic hepatitis and encephalopathy, aromatic acids were increased in relation to inflammation and hepatic necrosis ¹³⁹. Systemic inflammation occurs in patients with cirrhosis with superimposed liver insult and is significantly related with bleeding, sepsis and outcomes ²⁴⁸. Inflammation plays an active role in worsening the patient conditions and elevated levels of multiple pro-inflammatory cytokines have been well described in ACLF ²⁴⁹.

Liver is the major organ of urea metabolism. Impaired urea metabolism leads to decreased ammonia detoxification and is responsible for the glutamine and glutamate increase. This increase was also shown in different situations in patients with chronic liver diseases: gastrointestinal bleeding or infection ¹³⁹, hepatic encephalopathy or end stage of liver disease ⁴⁹.

Finally, this metabolomic approach describes several perturbations within one experiment, whereas these have been described in previous reports in different situations in cirrhotic patients.

Some patients of the CLF group were classified with the ACLF group. Both patients have impairment of the liver function due to acute alcoholic hepatitis for one of them, and cardiac failure for the other. Metabolomic fingerprint seems to reflect the perturbation of the liver function before standard biological laboratory test. Conversely, some patients of the ACLF group were classified in the CLF group. All those patients have minor gastrointestinal bleeding, acute kidney injury or encephalopathy not related to liver disease and minor liver injury. Metabolomic profiles could probably exclude acute liver perturbation.

The usual major limitation encountered in a translational metabolomic approach to liver diseases is methodological bias when selecting patients, thus limiting the confidence that can be drawn from conclusions. We attempted to avoid these pitfalls by constructing well-defined subgroups of patients according to their stage of underlying liver disease with a control group composed of compensated or uncompensated (CLF group) but stable cirrhotic patients and a group of cirrhotic patient with acute event potentially responsible of superimposed liver impairment (ACLF group). We also focused specifically on alcoholic etiology to avoid any potential specific influence of viral or non-alcoholic-related liver disease on sera metabolomic profiles, as previously reported ²³⁵.

In this setting, the present data enabled us to draw several hypothesis and conclusions: First, the metabolomic fingerprints reflect major perturbations of liver functions such as lipid metabolism, lactate, amino acid metabolism and urea metabolism. Second, in case of acute impairment, the perturbations correlated with severity of liver

failure shown in our previous study were increased. Other modulations were not found in chronic liver failure and increase in case of acute dysfunction of the liver such as the aromatic acids. Third, increase creatinine in the ACLF group reflects extra-liver failure with renal injury comparatively of cirrhotic patients of the CLF group. Fourth, these metabolomic perturbations were also in relation with inflammation and necrosis. Systemic inflammation and necrosis were well known to play a major role in pathophysiology of acute on chronic liver failure and other organ failures. Finally, metabolomic profiles improve patient classification with or without acute on chronic liver failure, as shown with the misclassified patients.

Metabolomic approach assesses liver markers and other organ impairments in serum samples, with a unique experiment: this profiling provides complete and multivariate information on metabolomic changes related to the ACLF and can possibly stratify the cases. The use of this technique as a diagnosis and prognosis tool for patients with ACLF needs further investigation. Finally, the additional integration of metabolomic informations, needs to be tested in large cohorts of prospective followed-up ICU patients with cirrhosis. Such an approach will surely improve our understanding of the involvement of biological pathways in the ACLF.

REFERENCES

- [1] Olson JC, Wendon JA, Kramer DJ, Arroyo V, Jalan R, Garcia-Tsao G, et al. Intensive care of the patient with cirrhosis. *Hepatology* 2011;54:1864-1872.
- [2] Jalan R, Williams R. Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood Purif* 2002;20:252-261.
- [3] Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, Chawla YK, Fan ST, Garg H, et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL). *Hepatol Int* 2009;3:269-282.
- [4] Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society reviews* 2011;40:387-426.
- [5] Martinez-Granados B, Morales JM, Rodrigo JM, Del Olmo J, Serra MA, Ferrandez A, et al. Metabolic profile of chronic liver disease by NMR spectroscopy of human biopsies. *Int J Mol Med* 2011;27:111-117.
- [6] Amathieu R, Nahon P, Triba M, Bouchemal N, Trinchet JC, Beaugrand M, et al. Metabolomic approach by ¹H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis. *Journal of proteome research* 2011;10:3239-3245.
- [7] Yu K, Sheng G, Sheng J, Chen Y, Xu W, Liu X, et al. A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus. *Journal of proteome research* 2007;6:2413-2419.
- [8] Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2009;50:1827-1838.
- [9] Yu K, Sheng G, Sheng J, Chen Y, Xu W, Liu X, et al. A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus. *J Proteome Res* 2007;6:2413-2419.
- [10] Jimenez B, Montoliu C, MacIntyre DA, Serra MA, Wassel A, Jover M, et al. Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by (1)H-nuclear magnetic resonance. *J Proteome Res* 2010;9:5180-5187.

- [11] Qi S, Tu Z, Ouyang X, Wang L, Peng W, Cai A, et al. Comparison of the metabolic profiling of hepatitis B virus-infected cirrhosis and alcoholic cirrhosis patients by using (1) H NMR-based metabonomics. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2012;42:677-685.
- [12] Qi SW, Tu ZG, Peng WJ, Wang LX, Ou-Yang X, Cai AJ, et al. (1)H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. *World journal of gastroenterology : WJG* 2012;18:285-290.
- [13] Tripathi P, Bala L, Saxena R, Yachha SK, Roy R, Khetrapal CL. 1H NMR spectroscopic study of blood serum for the assessment of liver function in liver transplant patients. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD* 2009;18:329-336.
- [14] Serkova NJ, Zhang Y, Coatney JL, Hunter L, Wachs ME, Niemann CU, et al. Early detection of graft failure using the blood metabolic profile of a liver recipient. *Transplantation* 2007;83:517-521.
- [15] Saxena V, Gupta A, Nagana Gowda GA, Saxena R, Yachha SK, Khetrapal CL. 1H NMR spectroscopy for the prediction of therapeutic outcome in patients with fulminant hepatic failure. *NMR in biomedicine* 2006;19:521-526.
- [16] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Critical care medicine* 2008;36:296-327.
- [17] Vincent JL, de Mendonca A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Critical care medicine* 1998;26:1793-1800.
- [18] Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *The British journal of surgery* 1973;60:646-649.
- [19] Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464-470.

- [20] Trygg J, Wold S. Orthogonal projections to latent structure (OPLS). *J Chemometrics* 2002;16:116-128.
- [21] Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* 1995;67:793-811.
- [22] Wevers RA, Engelke U, Heerschap A. High-resolution ¹H-NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clin Chem* 1994;40:1245-1250.
- [23] Cloarec O, Dumas ME, Craig A, Barton RH, Trygg J, Hudson J, et al. Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ¹H NMR data sets. *Anal Chem* 2005;77:1282-1289.
- [24] Bernal W, Donaldson N, Wyncoll D, Wendon J. Blood lactate as an early predictor of outcome in paracetamol-induced acute liver failure: a cohort study. *Lancet* 2002;359:558-563.
- [25] Shangraw RE, Rabkin JM, Lopaschuk GD. Hepatic pyruvate dehydrogenase activity in humans: effect of cirrhosis, transplantation, and dichloroacetate. *The American journal of physiology* 1998;274:G569-577.
- [26] Rastogi A, Kumar A, Sakhuja P, Bihari C, Gondal R, Hissar S, et al. Liver histology as predictor of outcome in patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF). *Virchows Arch* 2011;459:121-127.
- [27] Ranjan P, Gupta A, Kumar S, Gowda GA, Ranjan A, Sonker AA, et al. Detection of new amino acid markers of liver trauma by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2006;26:703-707.
- [28] Rosen HM, Yoshimura N, Hodgman JM, Fischer JE. Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology. *Gastroenterology* 1977;72:483-487.
- [29] Cazzaniga M, Dionigi E, Gobbo G, Fioretti A, Monti V, Salerno F. The systemic inflammatory response syndrome in cirrhotic patients: relationship with their in-hospital outcome. *J Hepatol* 2009;51:475-482.
- [30] Sen S, Davies NA, Mookerjee RP, Cheshire LM, Hodges SJ, Williams R, et al. Pathophysiological effects of albumin dialysis in acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled study. *Liver Transpl* 2004;10:1109-1119.

Table 1: Baseline characteristic of the population

	CLF group (n=95)	ACLF group (n=35)
Age (years) ^a	58.1±1.0	58.9±1.5
Male gender ^b	85 (84%)	27 (87%)
ALT (UI/L) ^a	54.6±6.0	142.3±69.5*
AST (UI/L) ^a	94.5±14.5	532.5±275.5*
Albumin (g/L) ^a	37.1±0.7	31.4±1.2*
Prothrombin level (% control) ^a	65.7±2.2	34.7±2.8*
Bilirubin (μmol/L) ^a	45.3±7.6	75.2±14.4
Child Pugh score ^a	7.0±0.2	9.6±0.3*
MELD score ^a	13.4±0.6	25.6±1.8*
Creatinine (μmol/L) ^a	85.3±3.5	158.6±18.8*
Blood Glucose (mmol/L)	6.6±0.2	8.3±0.8*
White cell count (G/L) ^a	6.1±0.2	12.6±1.6*
Paletted count (G/L) ^a	137.7±7.5	101.4±12.9*
Hemoglobinemia (g/L)	12.6±0.2	8.6±0.4*

NOTE. All biological and clinical parameters were recorded at inclusion. ^aMean ± SEM. ^bNumber (percentage) of patients.

*P<0.05 between AoCLF and CLF group

Table 2 : ACLF characteristics of patients included in OPLS analysis

ICU Initial Diagnostic	30
GIB	12
Hemorrhagic shock	5
Severe sepsis	4
Septic shock	6
Acute Kidney Failure	1
Hepatic Encephalopathy	2
Previous CPT	7.6±2.1
Admission CPT	9.7±2.0*
Mechanical Ventilation	16/31
Catecholamines	7/31
SOFA	7.7±3.6
Encephalopathy (0/I/II/III/IV)	3/10/7/1/6
Lactate	5.7±6.3
Death	6/31

p<0.01 between previous and admission CPT

Notes: SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; CPT: Child Pugh Turcott score;
GIB: GastroIntestinal Bleeding;

Table 3: Discriminant Metabolites Observed by ¹H NMR Spectroscopy

No. of metabolite	Name	Chemical shift (ppm) and multiplicity ^{\$}	<i>r</i> [#]	<i>p</i> [*]	group
1	Lipids (mainly HDL)	0.8 ^b ; 1.2 ^b	-0.46	4,8 x 10 ⁻⁸	CLF
2	Hydroxybutyrate	1.13 ^d	+0.38	8.7 x 10 ⁻⁶	ACLF
3	Lactate	1.30 ^d ; 4.13 ^q	+0.55	2.6 x 10 ⁻¹¹	ACLF
4	Acetoacetate	2.11 ^s	+0.43	3.1 x 10 ⁻⁷	ACLF
5	Pyruvate	2.36 ^s	+0.54	4.9 x 10 ⁻¹¹	ACLF
6	Glutamine-Glutamate	2.42 ^m	+0.48	9.6 x 10 ⁻⁹	ACLF
7	Creatinine	3.03 ^s 4.04 ^s	+0.56	1.1 x 10 ⁻¹²	ACLF
8	Tyrosine	6.88 ^m ; 7.18 ^d	+0.45	9.0 x 10 ⁻⁸	ACLF
9	Phenylalanine	7.31 ^m ; 7.40 ^m	+0.63	3.3 x 10 ⁻¹⁵	ACLF

The principal discriminant metabolites are ordered according to the loading plot in patients with CLF and ACLF. The number of the metabolite corresponds to the number in the line plot in Figure 2. Chemical shift and multiplicity correspond to those found in the ¹H NMR spectra of the patient's sera. \$ppm: part per million. s, singlet; b, broad; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet, m multiplet; q, quadriplet. #Positive correlation indicate increase concentration in the ACLF group and negative correlation indicate decrease concentration in the CLF group. * p value less to 6 x 10⁻⁶ is significant.

Figure 1: Flow chart of the patients

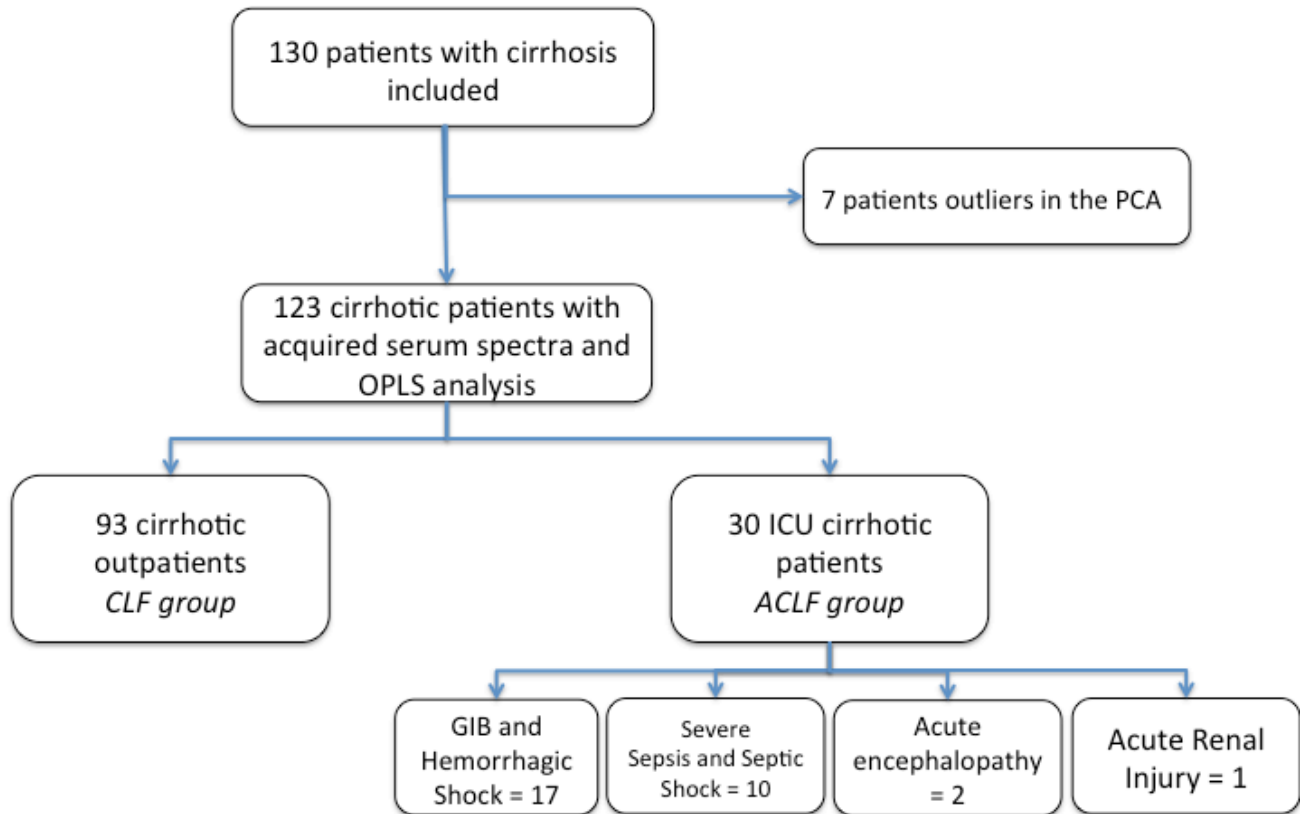
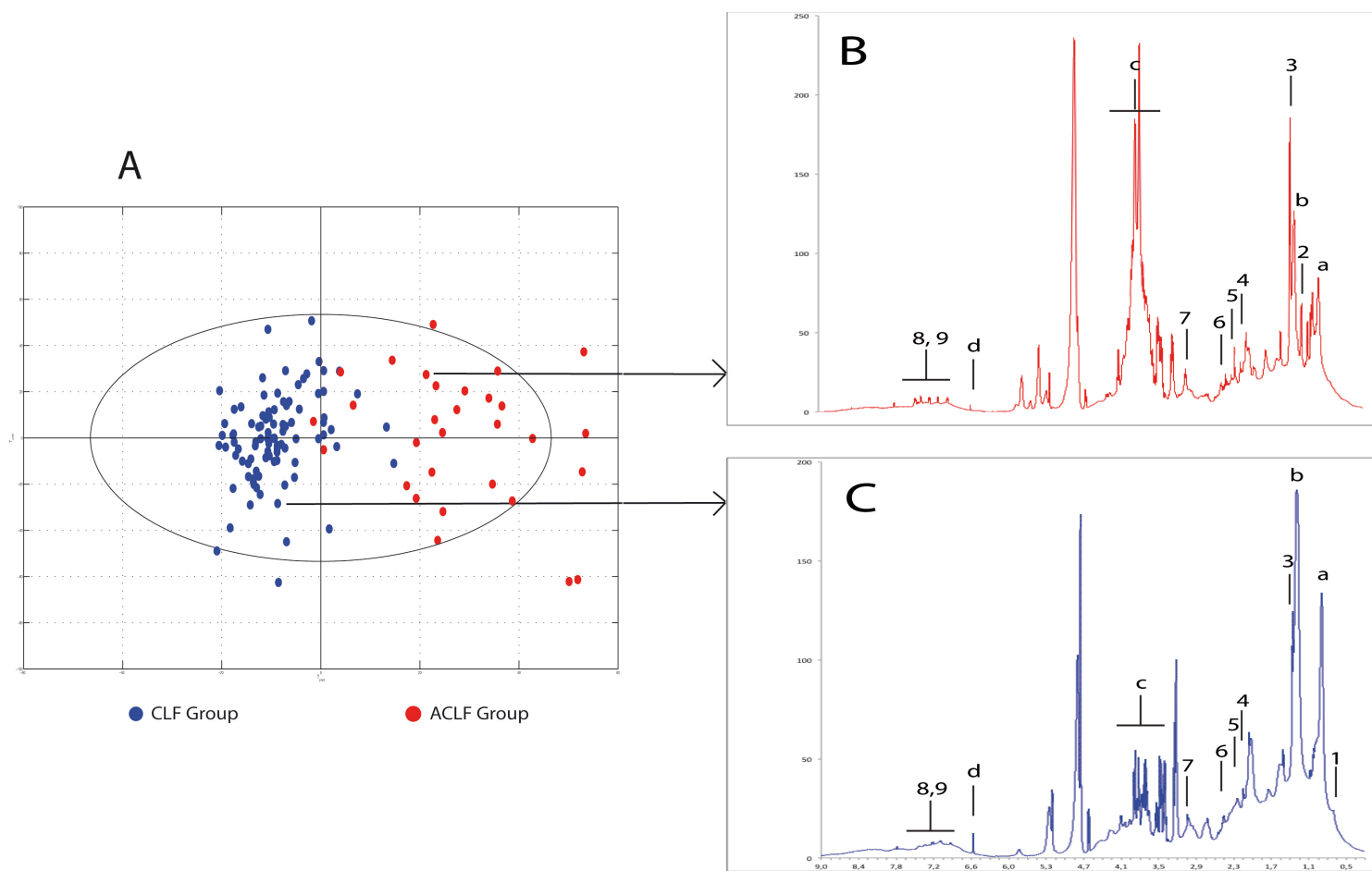


Figure 2: OPLS score plot and spectra of the CLF and ACLF patients

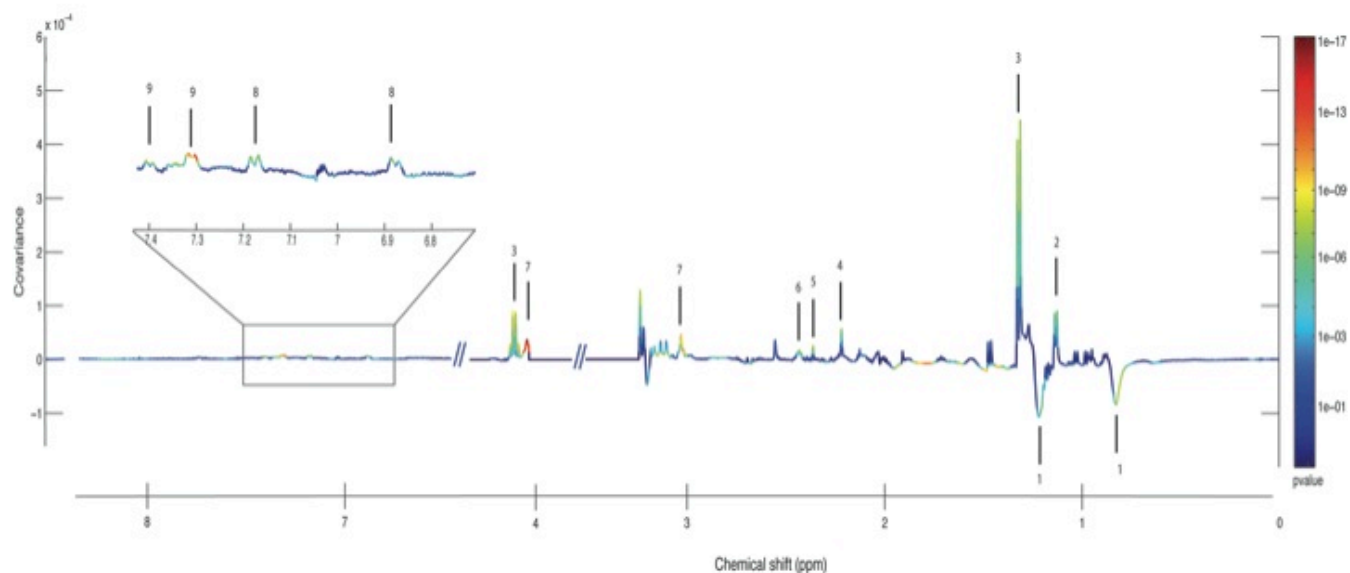


A: Score plot separating CLF (blue) and ACLF (red) patients.

B and C: Representative spectra showing the metabolic difference of CLF and ACLF patient.

Legends: a: $-\text{CH}_3$ of Fatty Acid; b: $-\text{CH}_2$ of Fatty Acid; c: glucose (C) and hydroxyethyl starch (B); d: fumaric acid; 1: Cholesterol; 2: Hydroxybutyrate; 3: Lactate; 4: Acetoacetate; 5: Pyruvate; 6: Glutamine; 7: Creatinine; 8 and 9: Aromatic Amino-acids (Phenylalanine and Tyrosine).

Figure 3: OPLS line plot and discriminant metabolites



OPLS loading plot. Variations of metabolites are represented using a line plot between 0–9 ppm. Positive signals correspond to metabolites present at increased concentrations in ACLF group. Conversely, negative signals correspond to metabolites present at increased concentrations in CLF group. The buckets are labeled according to metabolite assignments, as presented in Table 3.

5 Conclusion et Perspectives

L'approche métabolomique par RMN en pratique clinique n'en est qu'à son début. Elle nécessite d'être validée sur de grandes cohortes et surtout de bénéficier d'une automatisation des acquisitions du signal. Elle a l'avantage sur la SM de ne pas nécessiter de préparation importante de l'échantillon et d'être rapide. Par rapport à la biologie traditionnelle, elle permet en une seule expérience d'avoir un nombre bien plus important d'informations biologiques. Toutes les études que nous avons présentées dans ce travail sont pertinentes quant à l'aide diagnostique, la surveillance thérapeutique ou la prédiction d'un risque. Les freins majeurs actuels pour son utilisation sont la compréhension par le clinicien de l'analyse multivariée et de la notion de profil métabolique, l'absence de validation des données sur un grand nombre d'échantillons et la disponibilité d'un spectromètre. Il est de plus en plus admis par la communauté médicale que la recherche d'un seul marqueur biologique permettant d'identifier une maladie ou de prédire le pronostic est illusoire. Il est de plus nécessaire de prendre en compte les éléments pouvant modifier la réponse de l'organisme à ce qui peut être considérée comme une agression interne ou externe perturbant l'homéostasie du système biologique. Les éléments externes tels que la nutrition ou l'environnement au sens large modifient le métabolome comme nous l'avons vu. La flore bactérienne commensale (microbiote) a un rôle important dans des situations telles que la réponse à un traitement ou à une agression, et elle doit aussi être prise en compte comme facteur modifiant le métabolome.

Nos applications sur les maladies du foie et leurs complications ouvrent les voies à de nombreuses autres études. Ces études doivent avant tout pouvoir répondre à une question pertinente que le clinicien se pose.

Ainsi la suite de notre travail sur les maladies chroniques du foie (cirrhose alcoolique mais aussi virale) et leurs complications va se centrer autour de trois axes majeurs : le cancer du foie, les complications aiguës et la réponse au traitement.

Concernant le cancer du foie, outre la recherche de facteurs prédictifs qui ne sera possible que sur de grandes cohortes, la réponse au traitement radiologique représente le principal travail en cours. Dans le traitement des petits cancers, nous étudions la réponse au traitement par radiofréquence. Trente patients avec des prélèvements de sérum avant, après et à 3 et 6 mois du traitement ont été inclus. L'objectif de cette étude préliminaire est d'étudier les variations du métabolome sérique en fonction du temps après traitement et de voir si ces variations sont prédictibles d'une récurrence précoce.

Une question majeure que se pose l'hépatologue dans le traitement de l'hépatite C chronique active est la réponse au traitement antiviral. Une cohorte multicentrique (CIRVIR) incluant plusieurs milliers de patients est en cours de réalisation. Nous proposons d'évaluer l'intérêt de la RMN dans la prédiction précoce à la réponse au traitement antiviral.

Concernant les complications aiguës, notamment dans le sepsis, à partir de la sérothèque réalisée durant ces deux dernières années en réanimation comportant 59 chocs septiques chez des patients cirrhotiques ou non, nous allons étudier les profils métaboliques de ces patients de façon séquentielle (H0, H12, J1, J2). Le premier objectif est de comprendre quelles sont les variations métaboliques induites par le sepsis chez les cirrhotiques et les non cirrhotiques. La nature des voies métaboliques perturbées chez le cirrhotique, qui présente lors d'un choc septique une mortalité bien plus importante que le

patient non cirrhotique, pourrait nous permettre de mieux comprendre la physiopathologie dans cette affection aiguë et d'en améliorer la prise en charge. Le deuxième objectif est, à l'aide des prélèvements séquentiels, d'identifier les variations métaboliques chez les patients répondeurs au traitement et les non répondeurs au traitement, qu'ils soient cirrhotiques ou non.

Une autre application de la RMN envisagée pour la suite de notre travail concerne le domaine de la chirurgie hépatique et de la transplantation hépatique. Concernant la chirurgie hépatique, à partir de l'analyse de l'urine des patients avant, après la chirurgie et quotidiennement en réanimation, nous voulons différencier sur ce modèle humain les marqueurs de lésions hépatiques qui sont secondaires à la chirurgie et les marqueurs de régénération hépatique.

En ce qui concerne la transplantation, des études sont en cours de réflexion sur la prédiction et la dysfonction précoce du greffon à partir du tissu, sérum et urine, sur la prédiction de l'insuffisance rénale post-greffe et sur la surveillance de la toxicité rénale d'immunosuppresseurs tels que les anti-calcineurines, connus pour leur néphrotoxicité.

6 REFERENCES

1. Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Antti, H.; Bollard, M. E.; Keun, H.; Beckonert, O.; Ebbels, T. M.; Reily, 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.; Thomas, C., Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol Appl Pharmacol* **2003**, 187, (3), 137-46.
2. Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; 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, (11), 1181-9.
3. Ryan, D.; Robards, K., Metabolomics: The greatest omics of them all? *Anal Chem* **2006**, 78, (23), 7954-8.
4. Dunn, W. B.; Bailey, N. J.; Johnson, H. E., Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* **2005**, 130, (5), 606-25.
5. Roessner, U.; Luedemann, A.; Brust, D.; Fiehn, O.; Linke, T.; Willmitzer, L.; Fernie, A., Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* **2001**, 13, (1), 11-29.
6. Boros, L. G.; Lerner, M. R.; Morgan, D. L.; Taylor, S. L.; Smith, B. J.; Postier, R. G.; Brackett, D. J., [1,2-¹³C₂]-D-glucose profiles of the serum, liver, pancreas, and DMBA-induced pancreatic tumors of rats. *Pancreas* **2005**, 31, (4), 337-43.
7. Dettmer, K.; Hammock, B. D., Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences. *Environ Health Perspect* **2004**, 112, (7), A396-7.
8. Griffin, J. L.; Shockcor, J. P., Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* **2004**, 4, (7), 551-61.
9. Robertson, D. G.; Watkins, P. B.; Reily, M. D., Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications. *Toxicol Sci* **2011**, 120 Suppl 1, S146-70.
10. Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* **2007**, 2, (11), 2692-703.

11. Lenz, E. M.; Wilson, I. D., Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res* **2007**, 6, (2), 443-58.
12. Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Keun, H. C.; Craig, A.; Pearce, J. T.; Bruce, S. J.; Hardy, N.; Sansone, S. A.; Antti, H.; Jonsson, P.; Daykin, C.; Navarange, M.; Beger, R. D.; Verheij, E. R.; Amberg, A.; Baunsgaard, D.; Cantor, G. H.; Lehman-McKeeman, L.; Earll, M.; Wold, S.; Johansson, E.; Haselden, J. N.; Kramer, K.; Thomas, C.; Lindberg, J.; Schuppe-Koistinen, I.; Wilson, I. D.; Reily, M. D.; Robertson, D. G.; Senn, H.; Krotzky, A.; Kochhar, S.; Powell, J.; van der Ouderaa, F.; Plumb, R.; Schaefer, H.; Spraul, M., Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nat Biotechnol* **2005**, 23, (7), 833-8.
13. Aue, W.; Bartholdi, E.; Ernst, R., Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys* **1976**, 64, 2229-2246.
14. Brauschweiler, L.; Ernst, R., Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *1983* **1983**, 53, 521-528.
15. Giraudeau, P.; Akoka, S., Resolution and sensitivity aspects of ultrafast J-resolved 2D NMR spectra. *J Magn Reson* **2008**, 190, (2), 339-45.
16. Giraudeau, P.; Remaud, G. S.; Akoka, S., Evaluation of ultrafast 2D NMR for quantitative analysis. *Anal Chem* **2009**, 81, (1), 479-84.
17. Pathan, M.; Akoka, S.; Giraudeau, P., Ultrafast hetero-nuclear 2D J-resolved spectroscopy. *J Magn Reson* **2012**, 214, (1), 335-9.
18. Beckonert, O.; Coen, M.; Keun, H. C.; Wang, Y.; Ebbels, T. M.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature protocols* **2010**, 5, (6), 1019-32.
19. Wong, A.; Jimenez, B.; Li, X.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Sakellariou, D., Evaluation of high resolution magic-angle coil spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of nanoliter tissue biopsies. *Analytical chemistry* **2012**, 84, (8), 3843-8.
20. Cox, I. J., Development and applications of in vivo clinical magnetic resonance spectroscopy. *Progress in biophysics and molecular biology* **1996**, 65, (1-2), 45-81.
21. Psychogios, N.; Hau, D. D.; Peng, J.; Guo, A. C.; Mandal, R.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Krishnamurthy, R.; Eisner, R.; Gautam, B.; Young, N.; Xia, J.; Knox, C.; Dong, E.; Huang, P.; Hollander, Z.; Pedersen, T. L.; Smith, S. R.; Bamforth, F.; Greiner, R.; McManus, B.; Newman, J.

W.; Goodfriend, T.; Wishart, D. S., The human serum metabolome. *PLoS One* **2011**, 6, (2), e16957.

22. Giraudeau, P.; Massou, S.; Robin, Y.; Cahoreau, E.; Portais, J. C.; Akoka, S., Ultrafast quantitative 2D NMR: an efficient tool for the measurement of specific isotopic enrichments in complex biological mixtures. *Anal Chem* **2011**, 83, (8), 3112-9.

23. Goodacre, R.; Broadhurst, D.; Smilde, A. K.; Kristal, B. S.; Baker, D.; Beger, R. D.; Bessant, C.; Connor, S.; Capuani, G.; Craig, A.; Ebbels, T.; Kell, D. B.; Manetti, C.; Newton, J.; Paternostro, G.; Somorjai, R. L.; Sjöström, M.; Trygg, J.; Wulfert, F., Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. *Metabolomics* **2007**, (3), 231-241.

24. Forshed, J.; Torgrip, R. J.; Aberg, K. M.; Karlberg, B.; Lindberg, J.; Jacobsson, S. P., A comparison of methods for alignment of NMR peaks in the context of cluster analysis. *J Pharm Biomed Anal* **2005**, 38, (5), 824-32.

25. Stoyanova, R.; Nicholls, A. W.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C.; Brown, T. R., Automatic alignment of individual peaks in large high-resolution spectral data sets. *J Magn Reson* **2004**, 170, (2), 329-35.

26. 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.; Querengesser, L., HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* **2007**, 35, (Database issue), D521-6.

27. Goodacre, R., Metabolomics of a superorganism. *The Journal of nutrition* **2007**, 137, (1 Suppl), 259S-266S.

28. Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Wilson, I. D., The challenges of modeling mammalian biocomplexity. *Nature biotechnology* **2004**, 22, (10), 1268-74.

29. <http://mmcd.nmr.wisc.edu/>.

30. Cui, Q.; Lewis, I. A.; Hegeman, A. D.; Anderson, M. E.; Li, J.; Schulte, C. F.; Westler, W. M.; Eghbalnia, H. R.; Sussman, M. R.; Markley, J. L., Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat Biotechnol* **2008**, 26, (2), 162-4.

31. <http://www.bmrb.wisc.edu/>.

32. <http://www.hmdb.ca/>.

33. Wishart, D. S., Human Metabolome Database: completing the 'human parts list'. *Pharmacogenomics* **2007**, 8, (7), 683-6.
34. Nicholson, J. K.; Foxall, P. J.; Spraul, M.; Farrant, R. D.; Lindon, J. C., 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* **1995**, 67, (5), 793-811.
35. Wevers, R. A.; Engelke, U.; Heerschap, A., High-resolution ¹H-NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clin Chem* **1994**, 40, (7 Pt 1), 1245-50.
36. Connor, S.; Everett, J.; Nicholson, J. K., Spin-echo proton NMR spectroscopy of urine samples. Water suppression via a urea-dependent T2 relaxation process. *Magn Reson Med* **1987**, 4, (5), 461-70.
37. Lenz, E. M.; Bright, J.; Wilson, I. D.; Morgan, S. R.; Nash, A. F., A ¹H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J Pharm Biomed Anal* **2003**, 33, (5), 1103-15.
38. Lutz, N. W.; Maillet, S.; Nicoli, F.; Viout, P.; Cozzone, P. J., Further assignment of resonances in ¹H NMR spectra of cerebrospinal fluid (CSF). *FEBS Lett* **1998**, 425, (2), 345-51.
39. Sweatman, B. C.; Farrant, R. D.; Holmes, E.; Ghauri, F. Y.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., 600 MHz ¹H-NMR spectroscopy of human cerebrospinal fluid: effects of sample manipulation and assignment of resonances. *J Pharm Biomed Anal* **1993**, 11, (8), 651-64.
40. Amathieu, R.; Racine, S.; Triba, M.; Poloujadoff, M. P.; Borron, S. W.; Bouchemal, N.; Lapostolle, F.; Merouani, M.; Le Moyec, L.; Adnet, F., Use of nuclear magnetic resonance spectroscopy to assess renal dysfunction after hypertonic-hyperoncotic resuscitation in rats. *J Trauma* **2007**, 63, (2), 379-87.
41. Tulpan, D.; Leger, S.; Belliveau, L.; Culf, A.; Cuperlovic-Culf, M., MetaboHunter: an automatic approach for identification of metabolites from ¹H-NMR spectra of complex mixtures. *BMC Bioinformatics* **2011**, 12, 400.
42. Cloarec, O.; Dumas, M. E.; Craig, A.; Barton, R. H.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J., Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ¹H NMR data sets. *Anal Chem* **2005**, 77, (5), 1282-9.
43. Holmes, E.; Cloarec, O.; Nicholson, J. K., Probing latent biomarker signatures and in vivo pathway activity in experimental disease states via statistical total correlation

spectroscopy (STOCSY) of biofluids: application to HgCl₂ toxicity. *J Proteome Res* **2006**, 5, (6), 1313-20.

44. Craig, A.; Cloarec, O.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Anal Chem* **2006**, 78, (7), 2262-7.

45. Smith, L. M.; Maher, A. D.; Cloarec, O.; Rantalainen, M.; Tang, H.; Elliott, P.; Stamler, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K., Statistical correlation and projection methods for improved information recovery from diffusion-edited NMR spectra of biological samples. *Anal Chem* **2007**, 79, (15), 5682-9.

46. Ellis, D. I.; Dunn, W. B.; Griffin, J. L.; Allwood, J. W.; Goodacre, R., Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* **2007**, 8, (9), 1243-66.

47. Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **2008**, 1, 45-69.

48. Tenenhaus, M., *La Régression PLS. Théorie et Pratique*. 1998.

49. Amathieu, R.; Nahon, P.; Triba, M.; Bouchemal, N.; Trinchet, J. C.; Beaugrand, M.; Dhonneur, G.; Le Moyec, L., Metabolomic approach by ¹H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis. *Journal of proteome research* **2011**, 10, (7), 3239-45.

50. Dumas, M. E.; Maibaum, E. C.; Teague, C.; Ueshima, H.; Zhou, B.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Stamler, J.; Elliott, P.; Chan, Q.; Holmes, E., Assessment of analytical reproducibility of ¹H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem* **2006**, 78, (7), 2199-208.

51. Corona, G.; Rizzolio, F.; Giordano, A.; Toffoli, G., Pharmaco-metabolomics: An emerging "omics" tool for the personalization of anticancer treatments and identification of new valuable therapeutic targets. *J Cell Physiol* **2011**, 227, (7), 2827-31.

52. Mirnezami, R.; Kinross, J. M.; Vorkas, P. A.; Goldin, R.; Holmes, E.; Nicholson, J.; Darzi, A., Implementation of Molecular Phenotyping Approaches in the Personalized Surgical Patient Journey. *Ann Surg* **2011**.

53. Mamas, M.; Dunn, W. B.; Neyses, L.; Goodacre, R., The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Archives of toxicology* **2011**, 85, (1), 5-17.

54. Bollard, M. E.; Stanley, E. G.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E., NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed* **2005**, 18, (3), 143-62.
55. Holmes, E.; Loo, R. L.; Stamler, J.; Bictash, M.; Yap, I. K.; Chan, Q.; Ebbels, T.; De Iorio, M.; Brown, I. J.; Veselkov, K. A.; Davignus, M. L.; Kesteloot, H.; Ueshima, H.; Zhao, L.; Nicholson, J. K.; Elliott, P., Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* **2008**, 453, (7193), 396-400.
56. Lenz, E. M.; Bright, J.; Wilson, I. D.; Hughes, A.; Morrisson, J.; Lindberg, H.; Lockton, A., Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ¹H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal* **2004**, 36, (4), 841-9.
57. Clayton, T. A.; Baker, D.; Lindon, J. C.; Everett, J. R.; Nicholson, J. K., Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, (34), 14728-33.
58. Beckwith-Hall, B. M.; Brindle, J. T.; Barton, R. H.; Coen, M.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Antti, H., Application of orthogonal signal correction to minimise the effects of physical and biological variation in high resolution ¹H NMR spectra of biofluids. *Analyst* **2002**, 127, (10), 1283-8.
59. Smilde, A. K.; Westerhuis, J. A.; Hoefsloot, H. C.; Bijlsma, S.; Rubingh, C. M.; Vis, D. J.; Jellema, R. H.; Pijl, H.; Roelfsema, F.; van der Greef, J., Dynamic metabolomic data analysis: a tutorial review. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* **2010**, 6, (1), 3-17.
60. Yamaguchi, S.; Koda, N.; Eto, Y.; Aoki, K., Rapid screening of metabolic disease by proton NMR urinalysis. *Lancet* **1984**, 2, (8397), 284.
61. Engelke, U. F.; Liebrand-van Sambeek, M. L.; de Jong, J. G.; Leroy, J. G.; Morava, E.; Smeitink, J. A.; Wevers, R. A., N-acetylated metabolites in urine: proton nuclear magnetic resonance spectroscopic study on patients with inborn errors of metabolism. *Clin Chem* **2004**, 50, (1), 58-66.
62. Rafter, J. E.; Chalmers, R. A.; Iles, R. A., Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a ¹H-n.m.r. spectroscopic study. *Biochem Soc Trans* **1990**, 18, (5), 912-3.

63. Wevers, R. A.; Engelke, U. F.; Moolenaar, S. H.; Brautigam, C.; de Jong, J. G.; Duran, R.; de Abreu, R. A.; van Gennip, A. H., ¹H-NMR spectroscopy of body fluids: inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *Clin Chem* **1999**, 45, (4), 539-48.
64. Eugene, M., [Diagnosis of "fish odor syndrome" by urine nuclear magnetic resonance proton spectrometry]. *Ann Dermatol Venereol* **1998**, 125, (3), 210-2.
65. Barba, I.; de Leon, G.; Martin, E.; Cuevas, A.; Aguade, S.; Candell-Riera, J.; Barrabes, J. A.; Garcia-Dorado, D., Nuclear magnetic resonance-based metabolomics predicts exercise-induced ischemia in patients with suspected coronary artery disease. *Magn Reson Med* **2008**, 60, (1), 27-32.
66. Kuller, L.; Arnold, A.; Tracy, R.; Otvos, J.; Burke, G.; Psaty, B.; Siscovick, D.; Freedman, D. S.; Kronmal, R., Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2002**, 22, (7), 1175-80.
67. Yap, I. K.; Brown, I. J.; Chan, Q.; Wijeyesekera, A.; Garcia-Perez, I.; Bictash, M.; Loo, R. L.; Chadeau-Hyam, M.; Ebbels, T.; De Iorio, M.; Maibaum, E.; Zhao, L.; Kesteloot, H.; Daviglus, M. L.; Stamler, J.; Nicholson, J. K.; Elliott, P.; Holmes, E., Metabolome-wide association study identifies multiple biomarkers that discriminate north and south Chinese populations at differing risks of cardiovascular disease: INTERMAP study. *J Proteome Res* **2010**, 9, (12), 6647-54.
68. 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.; Grainger, D. J., Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics. *Nat Med* **2002**, 8, (12), 1439-44.
69. Kirschenlohr, H. L.; Griffin, J. L.; Clarke, S. C.; Rhydwen, R.; Grace, A. A.; Schofield, P. M.; Brindle, K. M.; Metcalfe, J. C., Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nat Med* **2006**, 12, (6), 705-10.
70. Roussel, R.; Mentre, F.; Bouchemal, N.; Hadjadj, S.; Lievre, M.; Chatellier, G.; Menard, J.; Panhard, X.; Le Henanff, A.; Marre, M.; Le Moyec, L., NMR-based prediction of cardiovascular risk in diabetes. *Nat Med* **2007**, 13, (4), 399-400.
71. <http://www.magivad.org.uk>.
72. Bell, J. D.; Lee, J. A.; Lee, H. A.; Sadler, P. J.; Wilkie, D. R.; Woodham, R. H., Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal

failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim Biophys Acta* **1991**, 1096, (2), 101-7.

73. Knubovets, T. L.; Lundina, T. A.; Sibeldina, L. A.; Sedov, K. R., ¹H NMR urinalysis in glomerulonephritis: a new prognostic criterion. *Magn Reson Imaging* **1992**, 10, (1), 127-34.

74. Racine, S. X.; Le Toumelin, P.; Adnet, F.; Cohen, Y.; Cupa, M.; Hantz, E.; Le Moyec, L., N-acetyl functions and acetate detected by nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine to detect renal dysfunction following aminoglycoside and/or glycopeptide antibiotic therapy. *Nephron Physiol* **2004**, 97, (4), p53-7.

75. Le Moyec, L.; Racine, S.; Le Toumelin, P.; Adnet, F.; Larue, V.; Cohen, Y.; Leroux, Y.; Cupa, M.; Hantz, E., Aminoglycoside and glycopeptide renal toxicity in intensive care patients studied by proton magnetic resonance spectroscopy of urine. *Crit Care Med* **2002**, 30, (6), 1242-5.

76. Foxall, P. J.; Mellotte, G. J.; Bending, M. R.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of renal transplant function. *Kidney Int* **1993**, 43, (1), 234-45.

77. Le Moyec, L.; Pruna, A.; Eugene, M.; Bedrossian, J.; Idatte, J. M.; Huneau, J. F.; Tome, D., Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine and plasma in renal transplantation follow-up. *Nephron* **1993**, 65, (3), 433-9.

78. Dunne, V. G.; Bhattachayya, S.; Besser, M.; Rae, C.; Griffin, J. L., Metabolites from cerebrospinal fluid in aneurysmal subarachnoid haemorrhage correlate with vasospasm and clinical outcome: a pattern-recognition ¹H NMR study. *NMR Biomed* **2005**, 18, (1), 24-33.

79. Blasco, H.; Corcia, P.; Moreau, C.; Veau, S.; Fournier, C.; Vourc'h, P.; Emond, P.; Gordon, P.; Pradat, P. F.; Praline, J.; Devos, D.; Nadal-Desbarats, L.; Andres, C. R., ¹H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* **2010**, 5, (10), e13223.

80. Iltis, I.; Hutter, D.; Bushara, K. O.; Clark, H. B.; Gross, M.; Eberly, L. E.; Gomez, C. M.; Oz, G., (¹H) MR spectroscopy in Friedreich's ataxia and ataxia with oculomotor apraxia type 2. *Brain Res* **2010**, 1358, 200-10.

81. Lutz, N. W.; Viola, A.; Malikova, I.; Confort-Gouny, S.; Ranjeva, J. P.; Pelletier, J.; Cozzone, P. J., A branched-chain organic acid linked to multiple sclerosis: first identification by NMR spectroscopy of CSF. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, 354, (1), 160-4.

82. Lutz, N. W.; Cozzone, P. J., Metabolic profiling in multiple sclerosis and other disorders by quantitative analysis of cerebrospinal fluid using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol* **2011**, 12, (7), 1016-25.
83. Sinclair, A. J.; Viant, M. R.; Ball, A. K.; Burdon, M. A.; Walker, E. A.; Stewart, P. M.; Rauz, S.; Young, S. P., NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases--a diagnostic tool? *NMR Biomed* **2010**, 23, (2), 123-32.
84. Balog, C. I.; Meissner, A.; Goraler, S.; Bladergroen, M. R.; Vennervald, B. J.; Mayboroda, O. A.; Deelder, A. M., Metabonomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection. *Mol Biosyst* **2011**, 7, (5), 1473-80.
85. Gupta, A.; Dwivedi, M.; Nagana Gowda, G. A.; Ayyagari, A.; Mahdi, A. A.; Bhandari, M.; Khetrapal, C. L., ¹H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*-induced urinary tract infection. *NMR Biomed* **2005**, 18, (5), 293-9.
86. Gupta, A.; Dwivedi, M.; Mahdi, A. A.; Gowda, G. A.; Khetrapal, C. L.; Bhandari, M., ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy for identifying and quantifying common uropathogens: a metabolic approach to the urinary tract infection. *BJU Int* **2009**, 104, (2), 236-44.
87. Gupta, A.; Dwivedi, M.; Gowda, G. A.; Mahdi, A. A.; Jain, A.; Ayyagari, A.; Roy, R.; Bhandari, M.; Khetrapal, C. L., ¹H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Klebsiella pneumoniae*-induced urinary tract infection. *NMR Biomed* **2006**, 19, (8), 1055-61.
88. Slupsky, C. M.; Rankin, K. N.; Fu, H.; Chang, D.; Rowe, B. H.; Charles, P. G.; McGeer, A.; Low, D.; Long, R.; Kunimoto, D.; Sawyer, M. B.; Fedorak, R. N.; Adamko, D. J.; Saude, E. J.; Shah, S. L.; Marrie, T. J., Pneumococcal pneumonia: potential for diagnosis through a urinary metabolic profile. *J Proteome Res* **2009**, 8, (12), 5550-8.
89. Rocha, C. M.; Carrola, J.; Barros, A. S.; Gil, A. M.; Goodfellow, B. J.; Carreira, I. M.; Bernardo, J.; Gomes, A.; Sousa, V.; Carvalho, L.; Duarte, I. F., Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of blood plasma. *J Proteome Res* **2011**, 10, (9), 4314-24.
90. Carrola, J.; Rocha, C. M.; Barros, A. S.; Gil, A. M.; Goodfellow, B. J.; Carreira, I. M.; Bernardo, J.; Gomes, A.; Sousa, V.; Carvalho, L.; Duarte, I. F., Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of urine. *J Proteome Res* **2011**, 10, (1), 221-30.

91. Wen, H.; Yoo, S. S.; Kang, J.; Kim, H. G.; Park, J. S.; Jeong, S.; Lee, J. I.; Kwon, H. N.; Kang, S.; Lee, D. H.; Park, S., A new NMR-based metabolomics approach for the diagnosis of biliary tract cancer. *J Hepatol* **2010**, 52, (2), 228-33.
92. Gao, H.; Lu, Q.; Liu, X.; Cong, H.; Zhao, L.; Wang, H.; Lin, D., Application of ¹H NMR-based metabonomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci* **2009**, 100, (4), 782-5.
93. OuYang, D.; Xu, J.; Huang, H.; Chen, Z., Metabolomic profiling of serum from human pancreatic cancer patients using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Appl Biochem Biotechnol* **2011**, 165, (1), 148-54.
94. Zira, A. N.; Theocharis, S. E.; Mitropoulos, D.; Migdalis, V.; Mikros, E., (¹H) NMR metabonomic analysis in renal cell carcinoma: a possible diagnostic tool. *J Proteome Res* **2010**, 9, (8), 4038-44.
95. MacIntyre, D. A.; Jimenez, B.; Lewintre, E. J.; Martin, C. R.; Schafer, H.; Ballesteros, C. G.; Mayans, J. R.; Spraul, M.; Garcia-Conde, J.; Pineda-Lucena, A., Serum metabolome analysis by ¹H-NMR reveals differences between chronic lymphocytic leukaemia molecular subgroups. *Leukemia* **2010**, 24, (4), 788-97.
96. Cano, K. E.; Li, L.; Bhatia, S.; Bhatia, R.; Forman, S. J.; Chen, Y., NMR-based metabolomic analysis of the molecular pathogenesis of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *J Proteome Res* **2011**, 10, (6), 2873-81.
97. Monleon, D.; Morales, J. M.; Barrasa, A.; Lopez, J. A.; Vazquez, C.; Celda, B., Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed* **2009**, 22, (3), 342-8.
98. Ludwig, C.; Ward, D. G.; Martin, A.; Viant, M. R.; Ismail, T.; Johnson, P. J.; Wakelam, M. J.; Gunther, U. L., Fast targeted multidimensional NMR metabolomics of colorectal cancer. *Magn Reson Chem* **2009**, 47 Suppl 1, S68-73.
99. Bertini, I.; Cacciatore, S.; Jensen, B. V.; Schou, J. V.; Johansen, J. S.; Kruhoffer, M.; Luchinat, C.; Nielsen, D. L.; Turano, P., Metabolomic NMR fingerprinting to identify and predict survival of patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Res* **2012**, 72, (1), 356-64.
100. Garcia, E.; Andrews, C.; Hua, J.; Kim, H. L.; Sukumaran, D. K.; Szyperski, T.; Odunsi, K., Diagnosis of early stage ovarian cancer by ¹H NMR metabonomics of serum explored by use of a microflow NMR probe. *J Proteome Res* **2011**, 10, (4), 1765-71.

101. Smith, C. A.; O'Maille, G.; Want, E. J.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Brandon, T. R.; Custodio, D. E.; Abagyan, R.; Siuzdak, G., METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit* **2005**, *27*, (6), 747-51.
102. Asiago, V. M.; Alvarado, L. Z.; Shanaiah, N.; Gowda, G. A.; Owusu-Sarfo, K.; Ballas, R. A.; Raftery, D., Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Res* **2010**, *70*, (21), 8309-18.
103. Giskeodegard, G. F.; Grinde, M. T.; Sitter, B.; Axelson, D. E.; Lundgren, S.; Fjosne, H. E.; Dahl, S.; Gribbestad, I. S.; Bathen, T. F., Multivariate modeling and prediction of breast cancer prognostic factors using MR metabolomics. *J Proteome Res* **2010**, *9*, (2), 972-9.
104. Cao, M. D.; Giskeodegard, G. F.; Bathen, T. F.; Sitter, B.; Bofin, A.; Lonning, P. E.; Lundgren, S.; Gribbestad, I. S., Prognostic value of metabolic response in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 39.
105. Bozza, F. A.; Garteiser, P.; Oliveira, M. F.; Doblas, S.; Cranford, R.; Saunders, D.; Jones, I.; Towner, R. A.; Castro-Faria-Neto, H. C., Sepsis-associated encephalopathy: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *J Cereb Blood Flow Metab* **2010**, *30*, (2), 440-8.
106. Izquierdo-Garcia, J. L.; Nin, N.; Ruiz-Cabello, J.; Rojas, Y.; de Paula, M.; Lopez-Cuenca, S.; Morales, L.; Martinez-Caro, L.; Fernandez-Segoviano, P.; Esteban, A.; Lorente, J. A., A metabolomic approach for diagnosis of experimental sepsis. *Intensive Care Med* **2011**.
107. Lin, Z. Y.; Xu, P. B.; Yan, S. K.; Meng, H. B.; Yang, G. J.; Dai, W. X.; Liu, X. R.; Li, J. B.; Deng, X. M.; Zhang, W. D., A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by (1)H NMR and pattern recognition. *NMR Biomed* **2009**, *22*, (6), 601-8.
108. Serkova, N. J.; Van Rheen, Z.; Tobias, M.; Pitzer, J. E.; Wilkinson, J. E.; Stringer, K. A., Utility of magnetic resonance imaging and nuclear magnetic resonance-based metabolomics for quantification of inflammatory lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2008**, *295*, (1), L152-61.
109. Grimaldi, D.; Claessens, Y. E.; Mira, J. P.; Chiche, J. D., Beyond clinical phenotype: the biologic integratome. *Crit Care Med* **2009**, *37*, (1 Suppl), S38-49.
110. Cohen, M. J.; Serkova, N. J.; Wiener-Kronish, J.; Pittet, J. F.; Niemann, C. U., 1H-NMR-based metabolic signatures of clinical outcomes in trauma patients--beyond lactate and base deficit. *J Trauma* **2010**, *69*, (1), 31-40.

111. Mao, H.; Wang, H.; Wang, B.; Liu, X.; Gao, H.; Xu, M.; Zhao, H.; Deng, X.; Lin, D., Systemic metabolic changes of traumatic critically ill patients revealed by an NMR-based metabonomic approach. *J Proteome Res* **2009**, 8, (12), 5423-30.
112. Kuo, C. D.; Wu, W. G.; Wang, J. H.; Chen, S. M.; Chiang, B. N., Proton nuclear magnetic resonance studies of plasma to determine metabolic status of patients with adult respiratory distress syndrome. *Clin Chem* **1989**, 35, (4), 667-70.
113. Stringer, K. A.; Serkova, N. J.; Karnovsky, A.; Guire, K.; Paine, R., 3rd; Standiford, T. J., Metabolic consequences of sepsis-induced acute lung injury revealed by plasma (1)H-nuclear magnetic resonance quantitative metabolomics and computational analysis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2011**, 300, (1), L4-L11.
114. Park, Y.; Jones, D. P.; Ziegler, T. R.; Lee, K.; Kotha, K.; Yu, T.; Martin, G. S., Metabolic effects of albumin therapy in acute lung injury measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma: a pilot study. *Crit Care Med* **2011**, 39, (10), 2308-13.
115. Guyton, A. C.; Hall, J. E., *Textbook of Medical Physiology*. 10th ed.; PICCIN: Philadelphia, 2000.
116. Bataller, R.; Brenner, D. A., Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **2005**, 115, (2), 209-18.
117. Poynard, T.; Bedossa, P.; Opolon, P., Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* **1997**, 349, (9055), 825-32.
118. Raynard, B.; Balian, A.; Fallik, D.; Capron, F.; Bedossa, P.; Chaput, J. C.; Naveau, S., Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology* **2002**, 35, (3), 635-8.
119. Friedman, S. L., Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology* **2003**, 38 Suppl 1, S38-53.
120. Farrell, G. C.; Larter, C. Z., Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* **2006**, 43, (2 Suppl 1), S99-S112.
121. Shibayama, Y.; Nakata, K., Localization of increased hepatic vascular resistance in liver cirrhosis. *Hepatology* **1985**, 5, (4), 643-8.
122. Racine-Samson, L.; Scoazec, J. Y.; D'Errico, A.; Fiorentino, M.; Christa, L.; Moreau, A.; Roda, C.; Grigioni, W. F.; Feldman, G., The metabolic organization of the adult human liver: a comparative study of normal, fibrotic, and cirrhotic liver tissue. *Hepatology* **1996**, 24, (1), 104-13.

123. Petersen, K. F.; Krssak, M.; Navarro, V.; Chandramouli, V.; Hundal, R.; Schumann, W. C.; Landau, B. R.; Shulman, G. I., Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis. *The American journal of physiology* **1999**, 276, (3 Pt 1), E529-35.
124. Morgan, M. Y.; Marshall, A. W.; Milsom, J. P.; Sherlock, S., Plasma amino-acid patterns in liver disease. *Gut* **1982**, 23, (5), 362-70.
125. Morgan, M. Y.; Milsom, J. P.; Sherlock, S., Plasma ratio of valine, leucine and isoleucine to phenylalanine and tyrosine in liver disease. *Gut* **1978**, 19, (11), 1068-73.
126. Merli, M.; Riggio, O.; Romiti, A.; Ariosto, F.; Mango, L.; Pinto, G.; Savioli, M.; Capocaccia, L., Basal energy production rate and substrate use in stable cirrhotic patients. *Hepatology* **1990**, 12, (1), 106-12.
127. Mullen, K. D.; Denne, S. C.; McCullough, A. J.; Savin, S. M.; Bruno, D.; Tavill, A. S.; Kalhan, S. C., Leucine metabolism in stable cirrhosis. *Hepatology* **1986**, 6, (4), 622-30.
128. O'Keefe, S. J.; Abraham, R. R.; Davis, M.; Williams, R., Protein turnover in acute and chronic liver disease. *Acta Chir Scand Suppl* **1981**, 507, 91-101.
129. Swart, G. R.; van den Berg, J. W.; Wattimena, J. L.; Rietveld, T.; van Vuure, J. K.; Frenkel, M., Elevated protein requirements in cirrhosis of the liver investigated by whole body protein turnover studies. *Clin Sci (Lond)* **1988**, 75, (1), 101-7.
130. Bosy-Westphal, A.; Petersen, S.; Hinrichsen, H.; Czech, N.; M, J. M., Increased plasma homocysteine in liver cirrhosis. *Hepatol Res* **2001**, 20, (1), 28-38.
131. Tessari, P.; Kiwanuka, E.; Vettore, M.; Barazzoni, R.; Zanetti, M.; Cecchet, D.; Orlando, R., Phenylalanine and tyrosine kinetics in compensated liver cirrhosis: effects of meal ingestion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2008**, 295, (3), G598-604.
132. Distrutti, E.; Mencarelli, A.; Santucci, L.; Renga, B.; Orlandi, S.; Donini, A.; Shah, V.; Fiorucci, S., The methionine connection: homocysteine and hydrogen sulfide exert opposite effects on hepatic microcirculation in rats. *Hepatology* **2008**, 47, (2), 659-67.
133. Garcia-Tevijano, E. R.; Berasain, C.; Rodriguez, J. A.; Corrales, F. J.; Arias, R.; Martin-Duce, A.; Caballeria, J.; Mato, J. M.; Avila, M. A., Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension* **2001**, 38, (5), 1217-21.
134. Habib, A.; Mihas, A. A.; Abou-Assi, S. G.; Williams, L. M.; Gavis, E.; Pandak, W. M.; Heuman, D. M., High-density lipoprotein cholesterol as an indicator of liver function and prognosis in noncholestatic cirrhotics. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2005**, 3, (3), 286-91.

135. Romero-Gomez, M.; Jover, M.; Galan, J. J.; Ruiz, A., Gut ammonia production and its modulation. *Metabolic brain disease* **2009**, 24, (1), 147-57.
136. Ichai, P.; Samuel, D., Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl* **2008**, 14 Suppl 2, S67-79.
137. O'Grady, J. G.; Schalm, S. W.; Williams, R., Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* **1993**, 342, (8866), 273-5.
138. Ranjan, P.; Gupta, A.; Kumar, S.; Gowda, G. A.; Ranjan, A.; Sonker, A. A.; Chandra, A.; Ramakant, Detection of new amino acid markers of liver trauma by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Liver Int* **2006**, 26, (6), 703-7.
139. Rosen, H. M.; Yoshimura, N.; Hodgman, J. M.; Fischer, J. E., Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology. *Gastroenterology* **1977**, 72, (3), 483-7.
140. Dale, G.; Young, G.; Latner, A. L.; Goode, A.; Tweedle, D.; Johnston, I. D., The effect of surgical operation on venous plasma free amino acids. *Surgery* **1977**, 81, (3), 295-301.
141. Mori, E.; Suzuki, H.; Hasebe, M.; Kobayashi, K., Alterations in levels of plasma phenylalanine and its catabolism in the liver of stressed rats. *Metabolism: clinical and experimental* **1992**, 41, (8), 807-13.
142. Pruijm, J.; ten Vergert, E. M.; Klompmaker, I. J.; Verwer, R.; Slooff, M. J., Cellular damage and early metabolic function of transplanted livers stored in Eurocollins or University of Wisconsin solution. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* **1991**, 23, (5-6), 285-91.
143. Shiota, T.; Nakatsukasa, H.; Fujiwara, M.; Takei, N.; Yamauchi, Y.; Kobayashi, M.; Watanabe, A.; Nagashima, H., Plasma amino acid imbalance in alcoholic liver cirrhosis. *Biochemical medicine* **1984**, 32, (2), 181-8.
144. Stinnett, J. D.; Alexander, J. W.; Watanabe, C.; MacMillan, B. G.; Fischer, J. E.; Morris, M. J.; Trocki, O.; Miskell, P.; Edwards, L.; James, H., Plasma and skeletal muscle amino acids following severe burn injury in patients and experimental animals. *Annals of surgery* **1982**, 195, (1), 75-89.
145. Wannemacher, R. W., Jr.; Klainer, A. S.; Dinterman, R. E.; Beisel, W. R., The significance and mechanism of an increased serum phenylalanine-tyrosine ratio during infection. *The American journal of clinical nutrition* **1976**, 29, (9), 997-1006.

146. Munshi, S. U.; Taneja, S.; Bhavesh, N. S.; Shastri, J.; Aggarwal, R.; Jameel, S., Metabonomic analysis of hepatitis E patients shows deregulated metabolic cycles and abnormalities in amino acid metabolism. *J Viral Hepat* **2011**, 18, (10), e591-602.
147. Dixon, R. M.; Angus, P. W.; Rajagopalan, B.; Radda, G. K., ³¹P magnetic resonance spectroscopy detects a functional abnormality in liver metabolism after acetaminophen poisoning. *Hepatology* **1992**, 16, (4), 943-8.
148. Pollesello, P.; Eriksson, O.; Hockerstedt, K., Analysis of total lipid extracts from human liver by ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Biochem* **1996**, 236, (1), 41-8.
149. Saxena, V.; Gupta, A.; Nagana Gowda, G. A.; Saxena, R.; Yachha, S. K.; Khetrapal, C. L., ¹H NMR spectroscopy for the prediction of therapeutic outcome in patients with fulminant hepatic failure. *NMR Biomed* **2006**, 19, (5), 521-6.
150. Evans, W. E.; McLeod, H. L., Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* **2003**, 348, (6), 538-49.
151. Winnike, J. H.; Li, Z.; Wright, F. A.; Macdonald, J. M.; O'Connell, T. M.; Watkins, P. B., Use of pharmaco-metabonomics for early prediction of acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans. *Clin Pharmacol Ther* **2010**, 88, (1), 45-51.
152. Fannin, R. D.; Russo, M.; O'Connell, T. M.; Gerrish, K.; Winnike, J. H.; Macdonald, J.; Newton, J.; Malik, S.; Sieber, S. O.; Parker, J.; Shah, R.; Zhou, T.; Watkins, P. B.; Paules, R. S., Acetaminophen dosing of humans results in blood transcriptome and metabolome changes consistent with impaired oxidative phosphorylation. *Hepatology* **2010**, 51, (1), 227-36.
153. Yamane, Y.; Umeda, M.; O'Uchi, T.; Mitsushima, T.; Nakata, K.; Nagataki, S., Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance in vivo spectroscopy of human liver during hepatitis A virus infection. *Dig Dis Sci* **1994**, 39, (1), 33-8.
154. Andersson, U.; Lindberg, J.; Wang, S.; Balasubramanian, R.; Marcusson-Stahl, M.; Hannula, M.; Zeng, C.; Juhasz, P. J.; Kolmert, J.; Backstrom, J.; Nord, L.; Nilsson, K.; Martin, S.; Glinghammar, B.; Cederbrant, K.; Schuppe-Koistinen, I., A systems biology approach to understanding elevated serum alanine transaminase levels in a clinical trial with ximelagatran. *Biomarkers* **2009**, 14, (8), 572-86.
155. Martinez-Granados, B.; Monleon, D.; Martinez-Bisbal, M. C.; Rodrigo, J. M.; del Olmo, J.; Lluch, P.; Ferrandez, A.; Marti-Bonmati, L.; Celda, B., Metabolite identification in human liver

needle biopsies by high-resolution magic angle spinning ^1H NMR spectroscopy. *NMR Biomed* **2006**, 19, (1), 90-100.

156. Taylor-Robinson, S. D.; Thomas, E. L.; Sargentoni, J.; Marcus, C. D.; Davidson, B. R.; Bell, J. D., Cirrhosis of the human liver: an in vitro ^{31}P nuclear magnetic resonance study. *Biochim Biophys Acta* **1995**, 1272, (2), 113-8.

157. Rajanayagam, V.; Lee, R. R.; Ackerman, Z.; Bradley, W. G.; Ross, B. D., Quantitative P-31 MR spectroscopy of the liver in alcoholic cirrhosis. *J Magn Reson Imaging* **1992**, 2, (2), 183-90.

158. Barr, J.; Vazquez-Chantada, M.; Alonso, C.; Perez-Cormenzana, M.; Mayo, R.; Galan, A.; Caballeria, J.; Martin-Duce, A.; Tran, A.; Wagner, C.; Luka, Z.; Lu, S. C.; Castro, A.; Le Marchand-Brustel, Y.; Martinez-Chantar, M. L.; Veyrie, N.; Clement, K.; Tordjman, J.; Gual, P.; Mato, J. M., Liquid chromatography-mass spectrometry-based parallel metabolic profiling of human and mouse model serum reveals putative biomarkers associated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res* **2010**, 9, (9), 4501-12.

159. Garcia-Canaveras, J. C.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Lahoz, A., A comprehensive untargeted metabolomic analysis of human steatotic liver tissue by RP and HILIC chromatography coupled to mass spectrometry reveals important metabolic alterations. *J Proteome Res* **2011**, 10, (10), 4825-34.

160. Kalhan, S. C.; Guo, L.; Edmison, J.; Dasarathy, S.; McCullough, A. J.; Hanson, R. W.; Milburn, M., Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* **2011**, 60, (3), 404-13.

161. Menon, D. K.; Harris, M.; Sargentoni, J.; Taylor-Robinson, S. D.; Cox, I. J.; Morgan, M. Y., In vivo hepatic ^{31}P magnetic resonance spectroscopy in chronic alcohol abusers. *Gastroenterology* **1995**, 108, (3), 776-88.

162. Martinez-Granados, B.; Morales, J. M.; Rodrigo, J. M.; Del Olmo, J.; Serra, M. A.; Ferrandez, A.; Celda, B.; Monleon, D., Metabolic profile of chronic liver disease by NMR spectroscopy of human biopsies. *Int J Mol Med* **2011**, 27, (1), 111-7.

163. Godoy, M. M.; Lopes, E. P.; Silva, R. O.; Hallwass, F.; Koury, L. C.; Moura, I. M.; Goncalves, S. M.; Simas, A. M., Hepatitis C virus infection diagnosis using metabolomics. *J Viral Hepat* **2010**, 17, (12), 854-8.

164. Lim, A. K.; Patel, N.; Hamilton, G.; Hajnal, J. V.; Goldin, R. D.; Taylor-Robinson, S. D., The relationship of in vivo ³¹P MR spectroscopy to histology in chronic hepatitis C. *Hepatology* **2003**, 37, (4), 788-94.
165. Menon, D. K.; Sargentoni, J.; Taylor-Robinson, S. D.; Bell, J. D.; Cox, I. J.; Bryant, D. J.; Coutts, G. A.; Rolles, K.; Burroughs, A. K.; Morgan, M. Y., Effect of functional grade and etiology on in vivo hepatic phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in cirrhosis: biochemical basis of spectral appearances. *Hepatology* **1995**, 21, (2), 417-27.
166. Munakata, T.; Griffiths, R. D.; Martin, P. A.; Jenkins, S. A.; Shields, R.; Edwards, R. H., An in vivo ³¹P MRS study of patients with liver cirrhosis: progress towards a non-invasive assessment of disease severity. *NMR Biomed* **1993**, 6, (2), 168-72.
167. van Wassenaeer-van Hall, H. N.; van der Grond, J.; van Hattum, J.; Kooijman, C.; Hoogenraad, T. U.; Mali, W. P., ³¹P magnetic resonance spectroscopy of the liver: correlation with standardized serum, clinical, and histological changes in diffuse liver disease. *Hepatology* **1995**, 21, (2), 443-9.
168. Puri, P.; Wiest, M. M.; Cheung, O.; Mirshahi, F.; Sargeant, C.; Min, H. K.; Contos, M. J.; Sterling, R. K.; Fuchs, M.; Zhou, H.; Watkins, S. M.; Sanyal, A. J., The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **2009**, 50, (6), 1827-38.
169. Cobbold, J. F.; Patel, J. H.; Goldin, R. D.; North, B. V.; Crossey, M. M.; Fitzpatrick, J.; Wylezinska, M.; Thomas, H. C.; Cox, I. J.; Taylor-Robinson, S. D., Hepatic lipid profiling in chronic hepatitis C: an in vitro and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Hepatol* **2010**, 52, (1), 16-24.
170. Zhang, L.; Jia, X.; Peng, X.; Ou, Q.; Zhang, Z.; Qiu, C.; Yao, Y.; Shen, F.; Yang, H.; Ma, F.; Wang, J.; Yuan, Z., Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry metabonomic platform in human plasma of liver failure caused by hepatitis B virus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2010**, 42, (10), 688-98.
171. Qi, S. W.; Tu, Z. G.; Peng, W. J.; Wang, L. X.; Ou-Yang, X.; Cai, A. J.; Dai, Y., (1)H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* **2012**, 18, (3), 285-90.
172. Xue, R.; Dong, L.; Wu, H.; Liu, T.; Wang, J.; Shen, X., Gas chromatography/mass spectrometry screening of serum metabolomic biomarkers in hepatitis B virus infected cirrhosis patients. *Clin Chem Lab Med* **2009**, 47, (3), 305-10.

173. Bustamante, J.; Rimola, A.; Ventura, P. J.; Navasa, M.; Cirera, I.; Reggiardo, V.; Rodes, J., Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol* **1999**, 30, (5), 890-5.
174. Jimenez, B.; Montoliu, C.; MacIntyre, D. A.; Serra, M. A.; Wassel, A.; Jover, M.; Romero-Gomez, M.; Rodrigo, J. M.; Pineda-Lucena, A.; Felipo, V., Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by (1)H-nuclear magnetic resonance. *J Proteome Res* **2010**, 9, (10), 5180-7.
175. Soga, T.; Sugimoto, M.; Honma, M.; Mori, M.; Igarashi, K.; Kashikura, K.; Ikeda, S.; Hirayama, A.; Yamamoto, T.; Yoshida, H.; Otsuka, M.; Tsuji, S.; Yatomi, Y.; Sakuragawa, T.; Watanabe, H.; Nihei, K.; Saito, T.; Kawata, S.; Suzuki, H.; Tomita, M.; Suematsu, M., Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol* **2011**, 55, (4), 896-905.
176. Kiyono, K.; Shibata, A.; Sone, S.; Watanabe, T.; Oguchi, M.; Shikama, N.; Ichijo, T.; Kiyosawa, K.; Sodeyama, T., Relationship of 31P MR spectroscopy to the histopathological grading of chronic hepatitis and response to therapy. *Acta Radiol* **1998**, 39, (3), 309-14.
177. Jalan, R.; Sargentoni, J.; Coutts, G. A.; Bell, J. D.; Rolles, K.; Burroughs, A. K.; Taylor Robinson, S. D., Hepatic phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in primary biliary cirrhosis and its relation to prognostic models. *Gut* **1996**, 39, (1), 141-6.
178. Wang, X.; Zhang, A.; Han, Y.; Wang, P.; Sun, H.; Song, G.; Dong, T.; Yuan, Y.; Yuan, X.; Zhang, M.; Ning, X.; Zhang, H.; Dong, H.; Dong, W., Urine metabolomics analysis for biomarker discovery and detection of jaundice syndrome in patients with liver disease. *Mol Cell Proteomics* **2012**.
179. Qi, S.; Tu, Z.; Ouyang, X.; Wang, L.; Peng, W.; Cai, A.; Dai, Y., Comparison of the metabolic profiling of hepatitis B virus-infected cirrhosis and alcoholic cirrhosis patients by using (1) H NMR-based metabonomics. *Hepatol Res* **2012**.
180. Fattovich, G.; Stroffolini, T.; Zagni, I.; Donato, F., Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* **2004**, 127, (5 Suppl 1), S35-50.
181. Bell, J. D.; Cox, I. J.; Sargentoni, J.; Peden, C. J.; Menon, D. K.; Foster, C. S.; Watanapa, P.; Iles, R. A.; Urenjak, J., A 31P and 1H-NMR investigation in vitro of normal and abnormal human liver. *Biochim Biophys Acta* **1993**, 1225, (1), 71-7.

182. Cox, I. J.; Bell, J. D.; Peden, C. J.; Iles, R. A.; Foster, C. S.; Watanapa, P.; Williamson, R. C., In vivo and in vitro ³¹P magnetic resonance spectroscopy of focal hepatic malignancies. *NMR Biomed* **1992**, 5, (3), 114-20.
183. Kuo, Y. T.; Li, C. W.; Chen, C. Y.; Jao, J.; Wu, D. K.; Liu, G. C., In vivo proton magnetic resonance spectroscopy of large focal hepatic lesions and metabolite change of hepatocellular carcinoma before and after transcatheter arterial chemoembolization using 3.0-T MR scanner. *J Magn Reson Imaging* **2004**, 19, (5), 598-604.
184. Meyerhoff, D. J.; Karczmar, G. S.; Valone, F.; Venook, A.; Matson, G. B.; Weiner, M. W., Hepatic cancers and their response to chemoembolization therapy. Quantitative image-guided ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Invest Radiol* **1992**, 27, (6), 456-64.
185. Soper, R.; Himmelreich, U.; Painter, D.; Somorjai, R. L.; Lean, C. L.; Dolenko, B.; Mountford, C. E.; Russell, P., Pathology of hepatocellular carcinoma and its precursors using proton magnetic resonance spectroscopy and a statistical classification strategy. *Pathology* **2002**, 34, (5), 417-22.
186. Patterson, A. D.; Maurhofer, O.; Beyoglu, D.; Lanz, C.; Krausz, K. W.; Pabst, T.; Gonzalez, F. J.; Dufour, J. F.; Idle, J. R., Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling. *Cancer Res* **2011**, 71, (21), 6590-600.
187. Chen, T.; Xie, G.; Wang, X.; Fan, J.; Qiu, Y.; Zheng, X.; Qi, X.; Cao, Y.; Su, M.; Xu, L. X.; Yen, Y.; Liu, P.; Jia, W., Serum and urine metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics* **2011**, 10, (7), M110 004945.
188. Yin, P.; Wan, D.; Zhao, C.; Chen, J.; Zhao, X.; Wang, W.; Lu, X.; Yang, S.; Gu, J.; Xu, G., A metabolomic study of hepatitis B-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by using RP-LC and HILIC coupled with mass spectrometry. *Mol Biosyst* **2009**, 5, (8), 868-76.
189. Shariff, M. I.; Ladep, N. G.; Cox, I. J.; Williams, H. R.; Okeke, E.; Malu, A.; Thillainayagam, A. V.; Crossey, M. M.; Khan, S. A.; Thomas, H. C.; Taylor-Robinson, S. D., Characterization of urinary biomarkers of hepatocellular carcinoma using magnetic resonance spectroscopy in a Nigerian population. *J Proteome Res* **2010**, 9, (2), 1096-103.
190. Sharif, A. W.; Williams, H. R.; Lampejo, T.; Khan, S. A.; Bansi, D. S.; Westaby, D.; Thillainayagam, A. V.; Thomas, H. C.; Cox, I. J.; Taylor-Robinson, S. D., Metabolic profiling of bile in cholangiocarcinoma using in vitro magnetic resonance spectroscopy. *HPB (Oxford)* **2010**, 12, (6), 396-402.

191. Bian, D. J.; Xiao, E. H.; Hu, D. X.; Chen, X. Y.; Situ, W. J.; Yuan, S. W.; Sun, J. L.; Yang, L. P., Magnetic resonance spectroscopy on hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Chin J Cancer* **2010**, 29, (2), 198-201.
192. Bonekamp, S.; Shen, J.; Salibi, N.; Lai, H. C.; Geschwind, J.; Kamel, I. R., Early response of hepatic malignancies to locoregional therapy-value of diffusion-weighted magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy. *J Comput Assist Tomogr* **2011**, 35, (2), 167-73.
193. Yuan, Z.; Ye, X. D.; Dong, S.; Xu, L. C.; Xiao, X. S., Evaluation of early imaging response after chemoembolization of hepatocellular carcinoma by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy-initial experience. *J Vasc Interv Radiol* **2011**, 22, (8), 1166-73.
194. Khan, S. A.; Cox, I. J.; Thillainayagam, A. V.; Bansil, D. S.; Thomas, H. C.; Taylor-Robinson, S. D., Proton and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy of human bile in hepatopancreaticobiliary cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2005**, 17, (7), 733-8.
195. Chen, C. Y.; Li, C. W.; Kuo, Y. T.; Jaw, T. S.; Wu, D. K.; Jao, J. C.; Hsu, J. S.; Liu, G. C., Early response of hepatocellular carcinoma to transcatheter arterial chemoembolization: choline levels and MR diffusion constants--initial experience. *Radiology* **2006**, 239, (2), 448-56.
196. Yang, Y.; Li, C.; Nie, X.; Feng, X.; Chen, W.; Yue, Y.; Tang, H.; Deng, F., Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *J Proteome Res* **2007**, 6, (7), 2605-14.
197. Fischbach, F.; Schirmer, T.; Thormann, M.; Freund, T.; Ricke, J.; Bruhn, H., Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy of the normal liver and malignant hepatic lesions at 3.0 Tesla. *Eur Radiol* **2008**, 18, (11), 2549-58.
198. Xue, R.; Lin, Z.; Deng, C.; Dong, L.; Liu, T.; Wang, J.; Shen, X., A serum metabolomic investigation on hepatocellular carcinoma patients by chemical derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, 22, (19), 3061-8.
199. Wu, H.; Xue, R.; Dong, L.; Liu, T.; Deng, C.; Zeng, H.; Shen, X., Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **2009**, 648, (1), 98-104.

200. Chen, J.; Wang, W.; Lv, S.; Yin, P.; Zhao, X.; Lu, X.; Zhang, F.; Xu, G., Metabonomics study of liver cancer based on ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Anal Chim Acta* **2009**, 650, (1), 3-9.
201. Hashim Abdalla, M. S.; Taylor-Robinson, S. D.; Sharif, A. W.; Williams, H. R.; Crossey, M. M.; Badra, G. A.; Thillainayagam, A. V.; Bansi, D. S.; Thomas, H. C.; Waked, I. A.; Khan, S. A., Differences in phosphatidylcholine and bile acids in bile from Egyptian and UK patients with and without cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)* **2011**, 13, (6), 385-90.
202. 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.; Murphy, G. M., Metabolic assessment of human liver transplants from biopsy samples at the donor and recipient stages using high-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy. *Anal Chem* **2005**, 77, (17), 5570-8.
203. Hrydziusko, O.; Silva, M. A.; Perera, M. T.; Richards, D. A.; Murphy, N.; Mirza, D.; Viant, M. R., Application of metabolomics to investigate the process of human orthotopic liver transplantation: a proof-of-principle study. *OMICS* **2010**, 14, (2), 143-50.
204. Taylor-Robinson, S. D.; Sargentoni, J.; Bell, J. D.; Thomas, E. L.; Marcus, C. D.; Changani, K. K.; Saeed, N.; Hodgson, H. J.; Davidson, B. R.; Burroughs, A. K.; Rolles, K.; Foster, C. S.; Cox, I. J., In vivo and in vitro hepatic phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and electron microscopy in chronic ductopenic rejection of human liver allografts. *Gut* **1998**, 42, (5), 735-43.
205. Serkova, N. J.; Zhang, Y.; Coatney, J. L.; Hunter, L.; Wachs, M. E.; Niemann, C. U.; Mandell, M. S., Early detection of graft failure using the blood metabolic profile of a liver recipient. *Transplantation* **2007**, 83, (4), 517-21.
206. Singh, H. K.; Yachha, S. K.; Saxena, R.; Gupta, A.; Nagana Gowda, G. A.; Bhandari, M.; Khetrpal, C. L., A new dimension of 1H-NMR spectroscopy in assessment of liver graft dysfunction. *NMR Biomed* **2003**, 16, (4), 185-8.
207. Melendez, H. V.; Ahmadi, D.; Parkes, H. G.; Rela, M.; Murphy, G.; Heaton, N., Proton nuclear magnetic resonance analysis of hepatic bile from donors and recipients in human liver transplantation. *Transplantation* **2001**, 72, (5), 855-60.
208. Tripathi, P.; Bala, L.; Saxena, R.; Yachha, S. K.; Roy, R.; Khetrpal, C. L., 1H NMR spectroscopic study of blood serum for the assessment of liver function in liver transplant patients. *J Gastrointest Liver Dis* **2009**, 18, (3), 329-36.

209. Cortes, M.; Pareja, E.; Castell, J. V.; Moya, A.; Mir, J.; Lahoz, A., Exploring mass spectrometry suitability to examine human liver graft metabonomic profiles. *Transplant Proc* **2010**, 42, (8), 2953-8.
210. Legido-Quigley, C.; McDermott, L.; Vilca-Melendez, H.; Murphy, G. M.; Heaton, N.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E., Bile UPLC-MS fingerprinting and bile acid fluxes during human liver transplantation. *Electrophoresis* **2011**, 32, (15), 2063-70.
211. Llovet, J. M.; Bruix, J., Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* **2008**, 48 Suppl 1, S20-37.
212. Breuhahn, K.; Gores, G.; Schirmacher, P., Strategies for hepatocellular carcinoma therapy and diagnostics: lessons learned from high throughput and profiling approaches. *Hepatology* **2011**, 53, (6), 2112-21.
213. Slupsky, C. M.; Steed, H.; Wells, T. H.; Dabbs, K.; Schepansky, A.; Capstick, V.; Faught, W.; Sawyer, M. B., Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* **2010**, 16, (23), 5835-41.
214. Spratlin, J. L.; Serkova, N. J.; Eckhardt, S. G., Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin Cancer Res* **2009**, 15, (2), 431-40.
215. Chen, T.; Xie, G.; Wang, X.; Fan, J.; Qiu, Y.; Zheng, X.; Qi, X.; Cao, Y.; Su, M.; Wang, X.; Xu, L. X.; Yen, Y.; Liu, P.; Jia, W., Serum and urine metabolite profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics* **2011**, 10, (7), M110 004945.
216. Shariff, M. I.; Goma, A. I.; Cox, I. J.; Patel, M.; Williams, H. R.; Crossey, M. M.; Thillainayagam, A. V.; Thomas, H. C.; Waked, I.; Khan, S. A.; Taylor-Robinson, S. D., Urinary metabolic biomarkers of hepatocellular carcinoma in an Egyptian population: a validation study. *J Proteome Res* **2011**, 10, (4), 1828-36.
217. Amathieu, R.; Nahon, P.; Triba, M.; Bouchemal, N.; Trinchet, J. C.; Beaugrand, M.; Dhonneur, G.; Le Moyec, L., Metabolomic approach by ¹H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis. *J Proteome Res* **2011**, 10, (7), 3239-45.
218. Bruix, J.; Sherman, M.; Llovet, J. M.; Beaugrand, M.; Lencioni, R.; Burroughs, A. K.; Christensen, E.; Pagliaro, L.; Colombo, M.; Rodes, J., Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* **2001**, 35, (3), 421-30.

219. Mazzaferro, V.; Regalia, E.; Doci, R.; Andreola, S.; Pulvirenti, A.; Bozzetti, F.; Montalto, F.; Ammatuna, M.; Morabito, A.; Gennari, L., Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* **1996**, 334, (11), 693-9.
220. Trygg, J.; Wold, S., Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J Chemometrics* **2002**, 16, 116-128.
221. Cobbold, J. F.; Patel, J. H.; Goldin, R. D.; North, B. V.; Crossey, M. M.; Fitzpatrick, J.; Wylezinska, M.; Thomas, H. C.; Cox, I. J.; Taylor-Robinson, S. D., Hepatic lipid profiling in chronic hepatitis C: an in vitro and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *J Hepatol* **2008**, 52, (1), 16-24.
222. Ahn, J.; Lim, U.; Weinstein, S. J.; Schatzkin, A.; Hayes, R. B.; Virtamo, J.; Albanes, D., Prediagnostic total and high-density lipoprotein cholesterol and risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2009**, 18, (11), 2814-21.
223. Meng, M.; Chen, S.; Lao, T.; Liang, D.; Sang, N., Nitrogen anabolism underlies the importance of glutaminolysis in proliferating cells. *Cell Cycle* **2010**, 9, (19), 3921-32.
224. Hack, V.; Stutz, O.; Kinscherf, R.; Schykowski, M.; Kellerer, M.; Holm, E.; Droge, W., Elevated venous glutamate levels in (pre)catabolic conditions result at least partly from a decreased glutamate transport activity. *J Mol Med (Berl)* **1996**, 74, (6), 337-43.
225. Bachtiar, I.; Kheng, V.; Wibowo, G. A.; Gani, R. A.; Hasan, I.; Sanityoso, A.; Budhihusodo, U.; Lelosutan, S. A.; Martamala, R.; Achwan, W. A.; Soemoharjo, S.; Sulaiman, A.; Lesmana, L. A.; Tai, S., Alpha-1-acid glycoprotein as potential biomarker for alpha-fetoprotein-low hepatocellular carcinoma. *BMC Res Notes* 3, 319.
226. Di Tommaso, L.; Destro, A.; Seok, J. Y.; Balladore, E.; Terracciano, L.; Sangiovanni, A.; Iavarone, M.; Colombo, M.; Jang, J. J.; Yu, E.; Jin, S. Y.; Morengi, E.; Park, Y. N.; Roncalli, M., The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **2009**, 50, (4), 746-54.
227. Olson, J. C.; Wendon, J. A.; Kramer, D. J.; Arroyo, V.; Jalan, R.; Garcia-Tsao, G.; Kamath, P. S., Intensive care of the patient with cirrhosis. *Hepatology* **2011**, 54, (5), 1864-72.
228. Jalan, R.; Williams, R., Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood purification* **2002**, 20, (3), 252-61.
229. Sarin, S. K.; Kumar, A.; Almeida, J. A.; Chawla, Y. K.; Fan, S. T.; Garg, H.; de Silva, H. J.; Hamid, S. S.; Jalan, R.; Komolmit, P.; Lau, G. K.; Liu, Q.; Madan, K.; Mohamed, R.; Ning, Q.; Rahman, S.; Rastogi, A.; Riordan, S. M.; Sakhuja, P.; Samuel, D.; Shah, S.; Sharma, B. C.;

Sharma, P.; Takikawa, Y.; Thapa, B. R.; Wai, C. T.; Yuen, M. F., Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL). *Hepatology international* **2009**, 3, (1), 269-82.

230. Dunn, W. B.; Broadhurst, D. I.; Atherton, H. J.; Goodacre, R.; Griffin, J. L., Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Society reviews* **2011**, 40, (1), 387-426.

231. Martinez-Granados, B.; Morales, J. M.; Rodrigo, J. M.; Del Olmo, J.; Serra, M. A.; Ferrandez, A.; Celda, B.; Monleon, D., Metabolic profile of chronic liver disease by NMR spectroscopy of human biopsies. *International journal of molecular medicine* **2011**, 27, (1), 111-7.

232. Yu, K.; Sheng, G.; Sheng, J.; Chen, Y.; Xu, W.; Liu, X.; Cao, H.; Qu, H.; Cheng, Y.; Li, L., A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus. *Journal of proteome research* **2007**, 6, (7), 2413-9.

233. Yu, K.; Sheng, G.; Sheng, J.; Chen, Y.; Xu, W.; Liu, X.; Cao, H.; Qu, H.; Cheng, Y.; Li, L., A metabonomic investigation on the biochemical perturbation in liver failure patients caused by hepatitis B virus. *J Proteome Res* **2007**, 6, (7), 2413-9.

234. Jimenez, B.; Montoliu, C.; MacIntyre, D. A.; Serra, M. A.; Wassel, A.; Jover, M.; Romero-Gomez, M.; Rodrigo, J. M.; Pineda-Lucena, A.; Felipe, V., Serum metabolic signature of minimal hepatic encephalopathy by (1)H-nuclear magnetic resonance. *Journal of proteome research* **2010**, 9, (10), 5180-7.

235. Qi, S.; Tu, Z.; Ouyang, X.; Wang, L.; Peng, W.; Cai, A.; Dai, Y., Comparison of the metabolic profiling of hepatitis B virus-infected cirrhosis and alcoholic cirrhosis patients by using (1) H NMR-based metabonomics. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **2012**, 42, (7), 677-85.

236. Qi, S. W.; Tu, Z. G.; Peng, W. J.; Wang, L. X.; Ou-Yang, X.; Cai, A. J.; Dai, Y., (1)H NMR-based serum metabolic profiling in compensated and decompensated cirrhosis. *World journal of gastroenterology : WJG* **2012**, 18, (3), 285-90.

237. Tripathi, P.; Bala, L.; Saxena, R.; Yachha, S. K.; Roy, R.; Khetrpal, C. L., 1H NMR spectroscopic study of blood serum for the assessment of liver function in liver transplant patients. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD* **2009**, 18, (3), 329-36.

238. Saxena, V.; Gupta, A.; Nagana Gowda, G. A.; Saxena, R.; Yachha, S. K.; Khetrapal, C. L., ¹H NMR spectroscopy for the prediction of therapeutic outcome in patients with fulminant hepatic failure. *NMR in biomedicine* **2006**, 19, (5), 521-6.
239. Dellinger, R. P.; Levy, M. M.; Carlet, J. M.; Bion, J.; Parker, M. M.; Jaeschke, R.; Reinhart, K.; Angus, D. C.; Brun-Buisson, C.; Beale, R.; Calandra, T.; Dhainaut, J. F.; Gerlach, H.; Harvey, M.; Marini, J. J.; Marshall, J.; Ranieri, M.; Ramsay, G.; Sevransky, J.; Thompson, B. T.; Townsend, S.; Vender, J. S.; Zimmerman, J. L.; Vincent, J. L., Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Critical care medicine* **2008**, 36, (1), 296-327.
240. Vincent, J. L.; de Mendonca, A.; Cantraine, F.; Moreno, R.; Takala, J.; Suter, P. M.; Sprung, C. L.; Colardyn, F.; Blecher, S., Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Critical care medicine* **1998**, 26, (11), 1793-800.
241. Pugh, R. N.; Murray-Lyon, I. M.; Dawson, J. L.; Pietroni, M. C.; Williams, R., Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *The British journal of surgery* **1973**, 60, (8), 646-9.
242. Kamath, P. S.; Wiesner, R. H.; Malinchoc, M.; Kremers, W.; Therneau, T. M.; Kosberg, C. L.; D'Amico, G.; Dickson, E. R.; Kim, W. R., A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* **2001**, 33, (2), 464-70.
243. Trygg, J.; Wold, S., Othogonal projections to latent structure (OPLS). *J Chemometrics* **2002**, 16, 116-28.
244. Bernal, W.; Donaldson, N.; Wyncoll, D.; Wendon, J., Blood lactate as an early predictor of outcome in paracetamol-induced acute liver failure: a cohort study. *Lancet* **2002**, 359, (9306), 558-63.
245. Shangraw, R. E.; Rabkin, J. M.; Lopaschuk, G. D., Hepatic pyruvate dehydrogenase activity in humans: effect of cirrhosis, transplantation, and dichloroacetate. *The American journal of physiology* **1998**, 274, (3 Pt 1), G569-77.
246. Rastogi, A.; Kumar, A.; Sakhuja, P.; Bihari, C.; Gondal, R.; Hissar, S.; Garg, H.; Sarin, S. K., Liver histology as predictor of outcome in patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF). *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **2011**, 459, (2), 121-7.

247. Ranjan, P.; Gupta, A.; Kumar, S.; Gowda, G. A.; Ranjan, A.; Sonker, A. A.; Chandra, A.; Ramakant, Detection of new amino acid markers of liver trauma by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **2006**, 26, (6), 703-7.
248. Cazzaniga, M.; Dionigi, E.; Gobbo, G.; Fioretti, A.; Monti, V.; Salerno, F., The systemic inflammatory response syndrome in cirrhotic patients: relationship with their in-hospital outcome. *Journal of hepatology* **2009**, 51, (3), 475-82.
249. Sen, S.; Davies, N. A.; Mookerjee, R. P.; Cheshire, L. M.; Hodges, S. J.; Williams, R.; Jalan, R., Pathophysiological effects of albumin dialysis in acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled study. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* **2004**, 10, (9), 1109-19.

TITRE

Applications de la métabolomique par spectrométrie par résonance magnétique nucléaire du proton dans les maladies graves du foie et leurs complications

RESUME

La métabolomique ouvre de nouvelles perspectives en médecine que cela soit dans le domaine du diagnostic, de l'évaluation du pronostic ou la gravité ou bien de la réponse à un traitement. Dans ce mémoire de thèse, nous nous sommes intéressés à l'application de la métabolomique en spectrométrie par résonance magnétique nucléaire du proton dans les maladies graves du foie d'origine alcoolique. A partir d'une sérothèque, la première étape de ce travail a été de déterminer les variations du métabolome en fonction du degré d'insuffisance hépatique chronique. Les profils métaboliques RMN des patients étaient différents en fonction de la gravité et pourraient permettre d'améliorer l'évaluation de la maladie. La seconde étape décrit les profils métabolomiques en fonction de la présence d'un carcinome hépatocellulaire ou non. Différents profils métabolomiques ont été trouvés en cas de carcinome hépatocellulaire et pourraient être prédictifs d'une récurrence de la maladie après traitement curatif. Enfin dans une troisième étude, une signature métabolomique permettant d'identifier les patients présentant une aggravation aiguë de leur maladie et hospitalisés en réanimation a été trouvée. L'intérêt principal de ce dernier travail est de permettre un diagnostic précoce de l'insuffisance hépatique aiguë sur cirrhose. Ces trois études ouvrent la voie à des véritables applications cliniques de la métabolomique, à condition qu'une validation sur de grandes cohortes confirme ces résultats. La métabolomique par RMN permettrait une évaluation plus précise de la gravité des patients présentant une cirrhose et une prise en charge mieux adaptée.

MOTS CLES

Métabolomique, RMN, cirrhose, insuffisance hépatique, carcinome hépatocellulaire

TITLE

Metabolomic approach by proton nuclear magnetic resonance in severe liver diseases and their complications

ABSTRACT

Metabolomics shows new perspectives in medicine in the field of diagnosis, prognosis or severity assessment and therapeutic response. In this thesis manuscript, we applied proton nuclear magnetic resonance spectrometry in sera of patients with alcoholic liver cirrhosis. The aim of our first study was to find out metabolome variation according to chronic liver failure in cirrhotic patients. Metabolomic fingerprint of patients may increase the accuracy of the evaluation of the liver disease severity. The second study describes metabolomic perturbations in patients with hepatocellular carcinoma. Interestingly, patients with hepatocellular carcinoma displayed various metabolomic fingerprints. Some patients have potential predictive metabolomic fingerprint of hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment. The aim of the third study was to assess the metabolomics profiles in ICU patients with acute on chronic liver failure. The metabolomic fingerprint of acute on chronic failure was found out and allowed an early diagnosis. Before clinical applications, these results should be validated in large cohort of patients. Metabolomic approach could improve evaluation of the severity of the liver disease and ensure early care-management if confirmed with large cohorts evaluation.

KEY WORDS

Metabolomic, NMR, liver cirrhosis, liver failure, hepatocellular carcinoma