



Validation d'une méthode de dosage spécifique du 2-Hydroxyglutarate dans les lignées cellulaires

I.Fayache, A. Desmons, E.Messedi, J.Y. Hautem, B.Baudin.

Laboratoire de biochimie, Hôpital Armand Trousseau, Département de biochimie-hormonologie et suivi thérapeutique-DMU Biogem, AP-HP Sorbonne Université



INTRODUCTION

Le 2-hydroxyglutarate (2HG) fait partie des acides organiques hydroxylés à chaîne courte. L'augmentation du 2HG est retrouvée dans une maladie métabolique héréditaire connue sous le nom d'acidurie 2-hydroxyglutarique ainsi que dans l'acidurie glutarique de type II ou « MADD pour Multiple Acyl-CoA Deficiency »(1). Plus récemment, le rôle du 2HG en tant qu'oncométabolite a été démontré. En effet, des mutations de gènes codant des enzymes appelées les isocitrate déshydrogénases 1 et 2 (IDH1 et IDH2), ont été mises en évidence dans les astrocytomes et les glioblastomes secondaires, ainsi que dans les leucémies myéloïdes aiguës (LAM). Ces mutations IDH1/2 sont responsables de l'augmentation des concentrations de 2HG (Figure 1), ce qui joue un rôle fondamental dans la tumorigenèse (2-3).

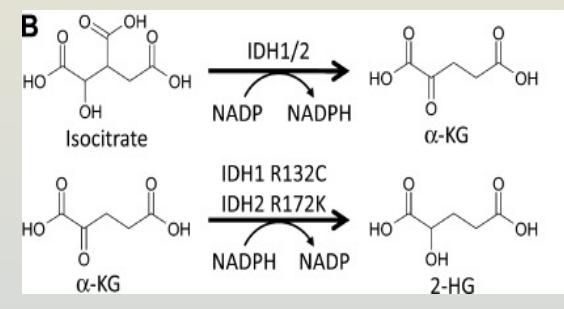


Figure 1 : Les IDH1 R132C et IDH2 R172K recombinants produisent du 2-HG.

OBJECTIFS

Dans le cadre de recherches faites en collaboration avec l'institut du cerveau et de la moelle « ICM » à l'hôpital Pitié Salpêtrière, sur le rôle de l'oncométabolite 2-HG dans les cellules cérébrales, notre travail a consisté à mettre au point le dosage du 2HG par CG-MS par une méthode fiable et rapide afin de pouvoir quantifier cet oncométabolite dans différentes lignées cellulaires.

MATERIELS ET METHODES

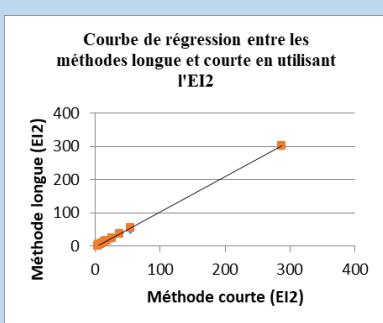
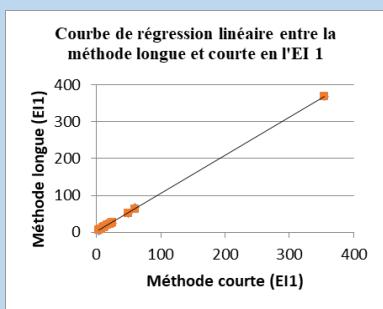
Pour valider cette méthode de dosage, nous avons étudié :

- La linéarité
 - La répétabilité
 - La fidélité intermédiaire
 - La limite de quantification du 2HG
- Une comparaison de méthodes avec la méthode de quantification utilisée pour le dosage des acides organiques urinaires (Méthode longue).

La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été déterminées à partir d'échantillons de contrôle de 2 niveaux et en utilisant les deux étalons internes le 4-Phénylbutyrate (E11) et du 2HG marqué «2-OH-GLU-D3» (E12).

RESULTATS

- Les CV obtenus étaient inférieurs à 10%.
- La limite inférieure de quantification a été fixée à 0,4 $\mu\text{mol/L}$ avec des CV obtenus en utilisant les deux étalons internes « E11 » et « E12 » inférieurs à 20%.
- la méthode a été définie comme étant linéaire sur une gamme de concentrations de 2HG comprises entre 0 $\mu\text{mol/L}$ et 200 $\mu\text{mol/L}$ avec l'«E12».
- En comparant les deux méthodes de dosage du 2HG (courte et longue), tous les biais calculés étaient inférieurs à 20%.



CONCLUSION

La méthode courte de dosage du 2HG a donc été mise au point et validée dans notre laboratoire afin d'étudier le rôle de cet oncométabolite dans les cellules cérébrales. Des premières expériences ont été réalisées avec des lignées cellulaires cérébrales dans différentes conditions (incubation sans et avec différentes concentrations de 2HG) et n'ont pas mis en évidence d'accumulation de 2HG dans ce type cellulaire.

Références:
 1/ Eduard A Struys, Gajja S Salomons, Younes Achouri, Emile Van Schaftingen, Salvatore Grosso, William J Craigen, Nanda M Verhoeven, Cornelis Jakobs. Mutations in the D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene cause D-2-hydroxyglutaric aciduria. Am J Hum Genet. 2005 Feb;76(2):358-60.
 2/Cara Reiter-Brennan, Lukas Semmler, Andreas Klein. The effects of 2-hydroxyglutarate on the tumorigenesis of gliomas. Contemporary Oncology. 2018; 22(4):215-222
 3/Laurence M Gagné, Karine Boulay, Ivan Topisirovic, Marc-Étienne Huot, Frédérick A Mallette. Oncogenic Activities of IDH1/2 Mutations: From Epigenetics to Cellular Signaling. Trends Cell Biol. 2017 ;27(10):738-752.