



Analyse du métabolome urinaire humain par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution

Aurélié ROUX

**Thèse dirigée par les Dr. Christophe JUNOT
et Pr. Jean-Claude TABET**



SOMMAIRE

énergie atomique • énergies alternatives

Généralités : Homéostasie – Biomarqueurs – Métabolites

Comment se déroule une analyse métabolomique?

Contexte et objectifs de la thèse

Présentation du travail de thèse

Construction d'une base de données spectrale

Impact de la variabilité biologique sur le métabolome urinaire

Prélèvement et conservation des échantillons d'urine

Conclusion-perspectives



Homéostasie et biomarqueurs

énergie atomique + énergies alternatives

Le **concept d'homéostasie** : capacité que peut avoir un système à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures.



Claude Bernard (1813-1878)



Walter Bradford Cannon (1871-1945)

The Wisdom of the Body (1932)

Un biomarqueur est une signature biologique de la présence d'une pathologie ou de l'exposition à un toxique.

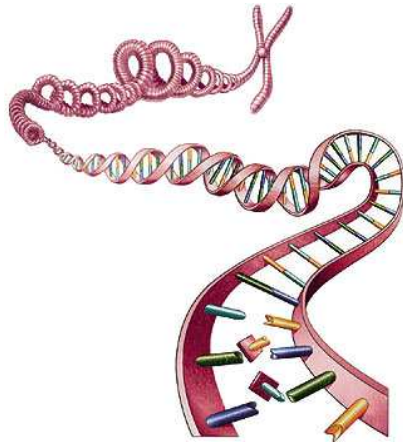
Biomarqueur d'exposition : exposition à un toxique, polluant...

Biomarqueur d'effet : suivre la réponse d'un l'organisme



Les approches globales «omiques»

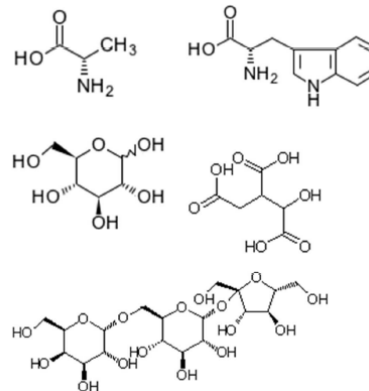
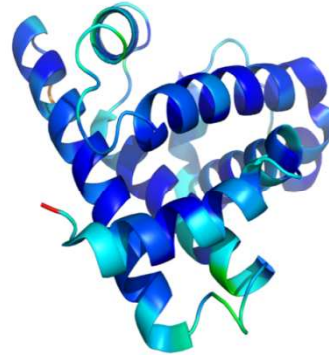
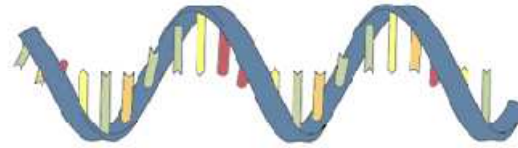
énergie atomique + énergies alternatives



Les gènes
Le génome

génomique
polymorphisme

GENOTYPE



PHENOTYPE

Les ARN messagers
Le transcriptome

transcriptomique

Les protéines
Le protéome

protéomique

Les métabolites
Le métabolome

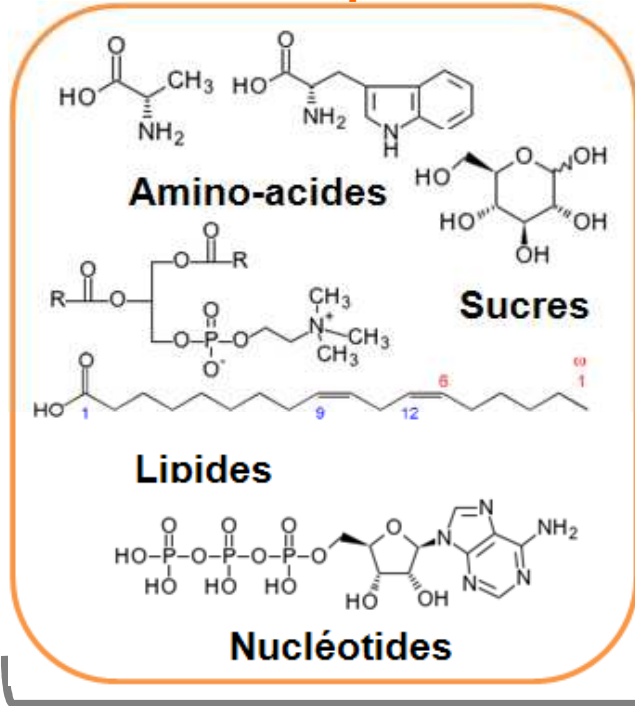
métabolomique



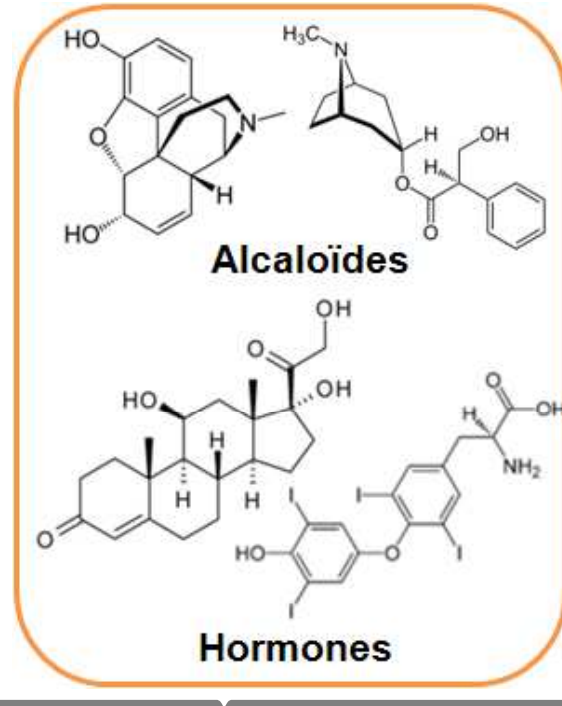
Métabolites et métabolome

énergie atomique

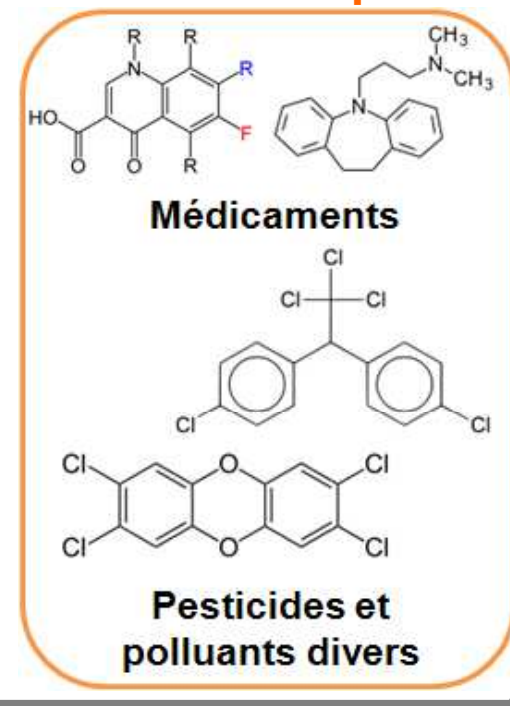
Métabolites primaires



Métabolites secondaires



Xénobiotiques

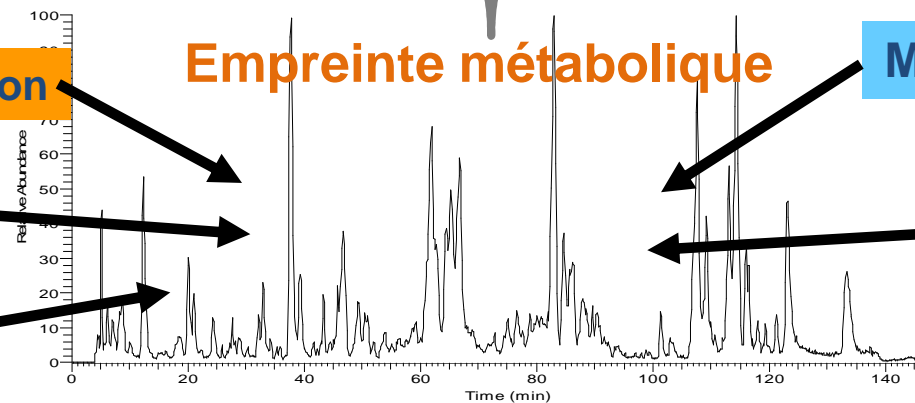


Alimentation / Boisson

Flore intestinale

Pathologie

Empreinte métabolique

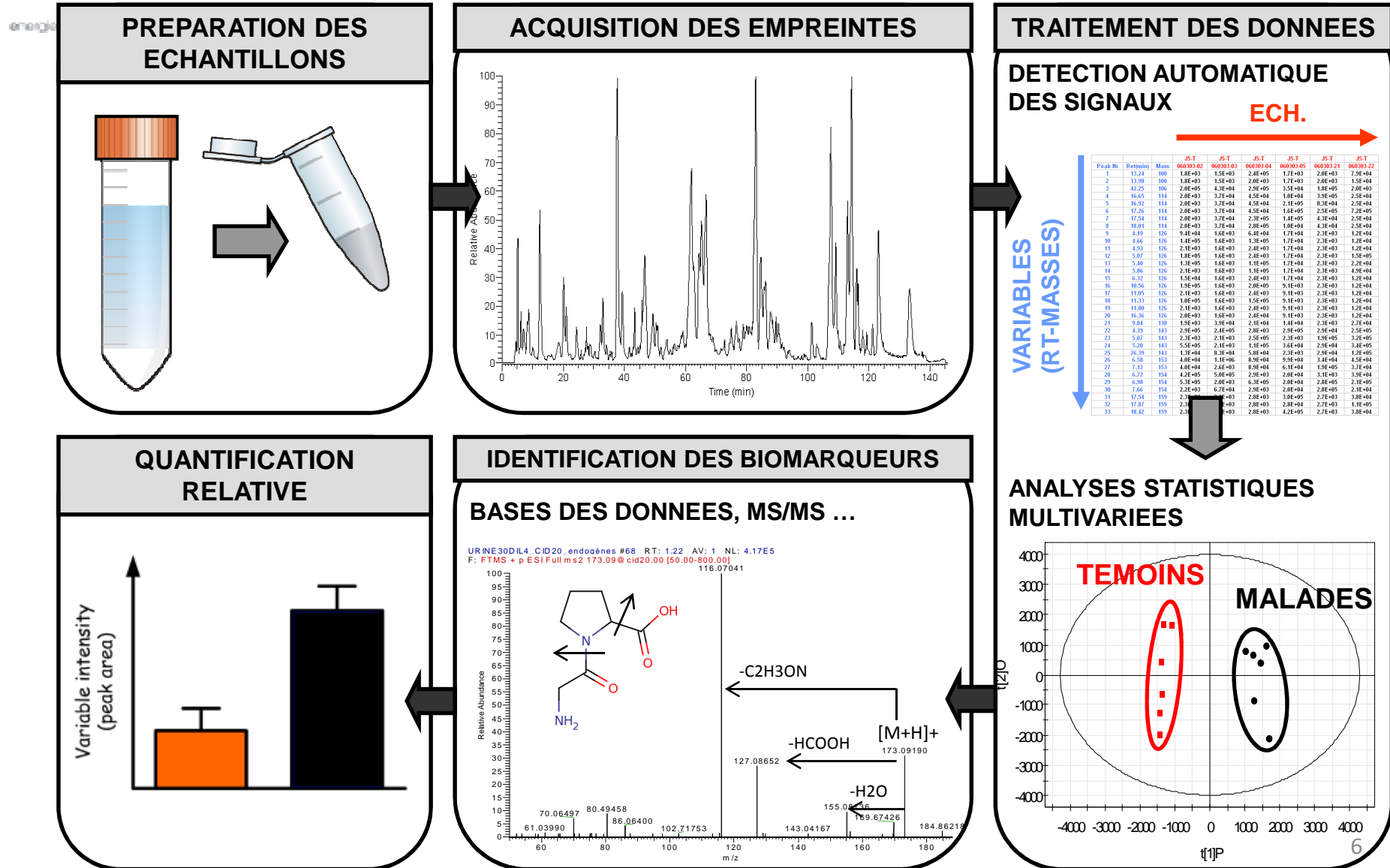


Métabolisme « central »

Environnement :
xénobiotiques
(polluants,
médicaments...)



Déroulement d'une analyse métabolomique

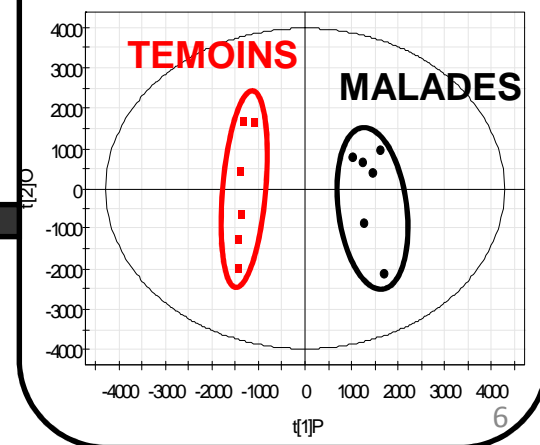
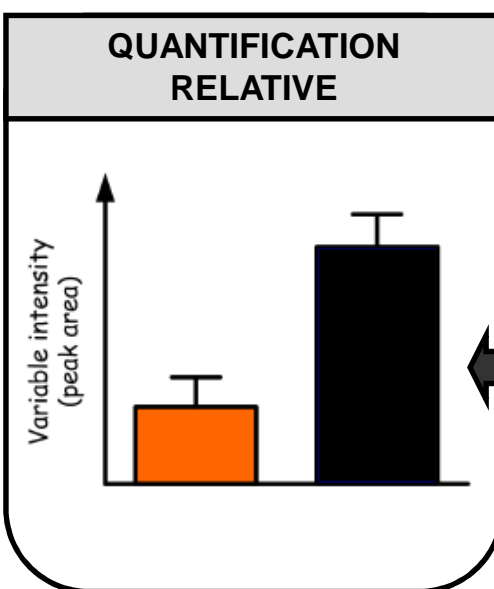
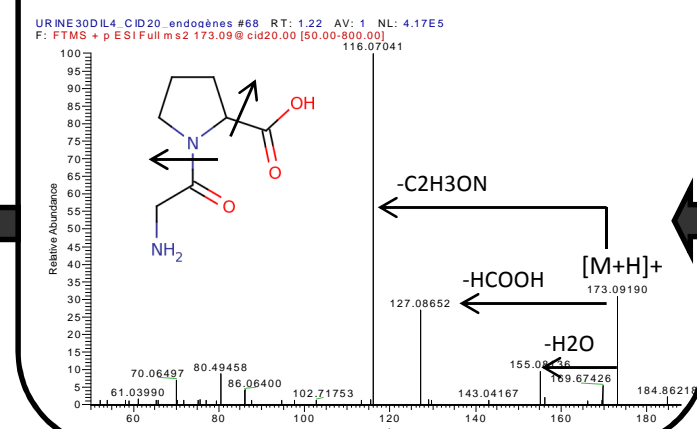


DETECTION AUTOMATIQUE DES SIGNAUX

ECH.

VARIABLES (RT-MASSSES)

Peak No	Retention	Mass	06030302	06030303	06030304	06030305	06030306	06030307
1	13.24	100	1.5E+03	1.5E+03	2.4E+05	1.7E+03	2.0E+03	2.9E+04
2	13.98	100	1.8E+03	1.5E+03	2.0E+03	1.7E+03	2.0E+03	1.5E+04
3	42.25	106	2.8E+05	4.2E+04	2.0E+05	2.5E+04	1.0E+05	2.0E+03
4	46.65	111	2.0E+03	3.7E+04	4.5E+04	1.0E+04	3.0E+05	2.5E+04
5	46.92	111	2.0E+03	3.7E+04	4.5E+04	2.1E+05	0.3E+04	2.5E+04
6	47.26	111	2.0E+03	3.7E+04	4.5E+04	1.0E+05	2.3E+05	7.2E+05
7	47.54	111	2.0E+03	3.7E+04	2.3E+05	1.4E+05	4.3E+04	2.5E+04
8	48.01	111	2.0E+03	3.7E+04	2.0E+05	1.0E+04	4.3E+04	2.5E+04
9	4.19	126	9.4E+04	1.6E+03	6.4E+04	1.7E+04	2.3E+03	1.2E+04
10	4.66	126	1.4E+05	1.6E+03	1.3E+05	1.7E+04	2.3E+03	1.2E+04
11	4.93	126	2.1E+03	1.6E+03	2.4E+03	1.7E+04	2.3E+03	1.2E+04
12	5.07	126	1.8E+05	1.6E+03	2.4E+03	1.7E+04	2.3E+03	1.5E+05
13	5.40	126	1.3E+05	1.6E+03	1.1E+05	1.7E+04	2.3E+03	2.2E+04
14	5.86	126	2.1E+03	1.6E+03	1.1E+05	1.7E+04	2.3E+03	4.9E+04
15	6.32	126	1.5E+04	1.6E+03	2.4E+03	1.7E+04	2.3E+03	1.2E+04
16	10.56	126	1.5E+05	1.6E+03	2.0E+05	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04
17	11.05	126	2.1E+03	1.6E+03	2.4E+03	9.1E+03	2.3E+03	1.5E+04
18	11.33	126	1.6E+05	1.6E+03	1.5E+05	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04
19	11.60	126	2.4E+03	1.6E+03	2.4E+03	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04
20	46.36	126	2.0E+03	1.6E+03	2.4E+04	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04
21	9.04	138	1.5E+03	3.9E+04	2.1E+04	1.4E+04	2.3E+03	2.7E+04
22	4.39	143	2.5E+05	2.4E+05	3.0E+03	2.9E+05	2.9E+04	2.5E+05
23	5.07	143	2.3E+03	2.1E+03	2.5E+05	2.3E+03	1.9E+05	3.2E+05
24	5.20	143	5.5E+05	2.1E+03	1.1E+05	3.6E+04	2.9E+04	3.4E+05
25	26.39	143	1.1E+04	0.3E+04	5.0E+04	2.3E+03	2.9E+04	1.2E+05
26	6.58	153	4.0E+04	1.1E+06	8.9E+04	9.9E+04	3.4E+04	4.5E+04
27	7.32	153	4.0E+04	2.6E+03	9.0E+04	6.1E+04	1.9E+05	3.7E+04
28	6.72	154	4.2E+05	5.0E+05	2.9E+03	3.1E+03	3.9E+04	3.9E+04
29	6.98	154	5.3E+05	2.0E+03	6.3E+05	2.0E+04	2.8E+05	2.1E+05
30	7.66	154	2.2E+03	6.7E+04	2.9E+03	2.0E+04	2.8E+05	2.1E+04
31	17.54	159	2.3E+03	2.8E+03	3.0E+05	2.7E+03	3.8E+04	3.8E+04
32	17.87	159	2.3E+03	2.8E+03	2.8E+04	2.7E+03	1.1E+05	1.1E+05
33	18.42	159	2.3E+03	2.8E+03	4.2E+05	2.7E+03	3.8E+04	3.8E+04





Acquisition des empreintes métaboliques

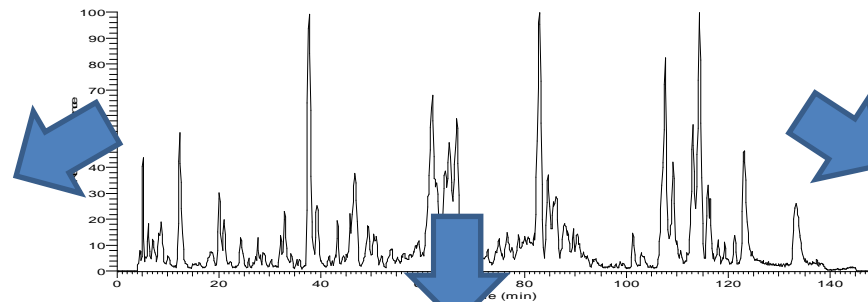
énergie atomique • énergies alternatives

Empreinte métabolique



RMN

- Simple, non invasif
- Rapide
- Applicable à des biomatériaux intacts et aux grandes séries
- Sensibilité limitée
- Difficulté d'identification de composés inconnus en milieu complexe



GC-EI-MS

- Sensible
- Reproductible
- Bibliothèques de spectres de masse
- Modification chimique requise pour les composés non volatils
- Composés non thermosensibles



API-MS

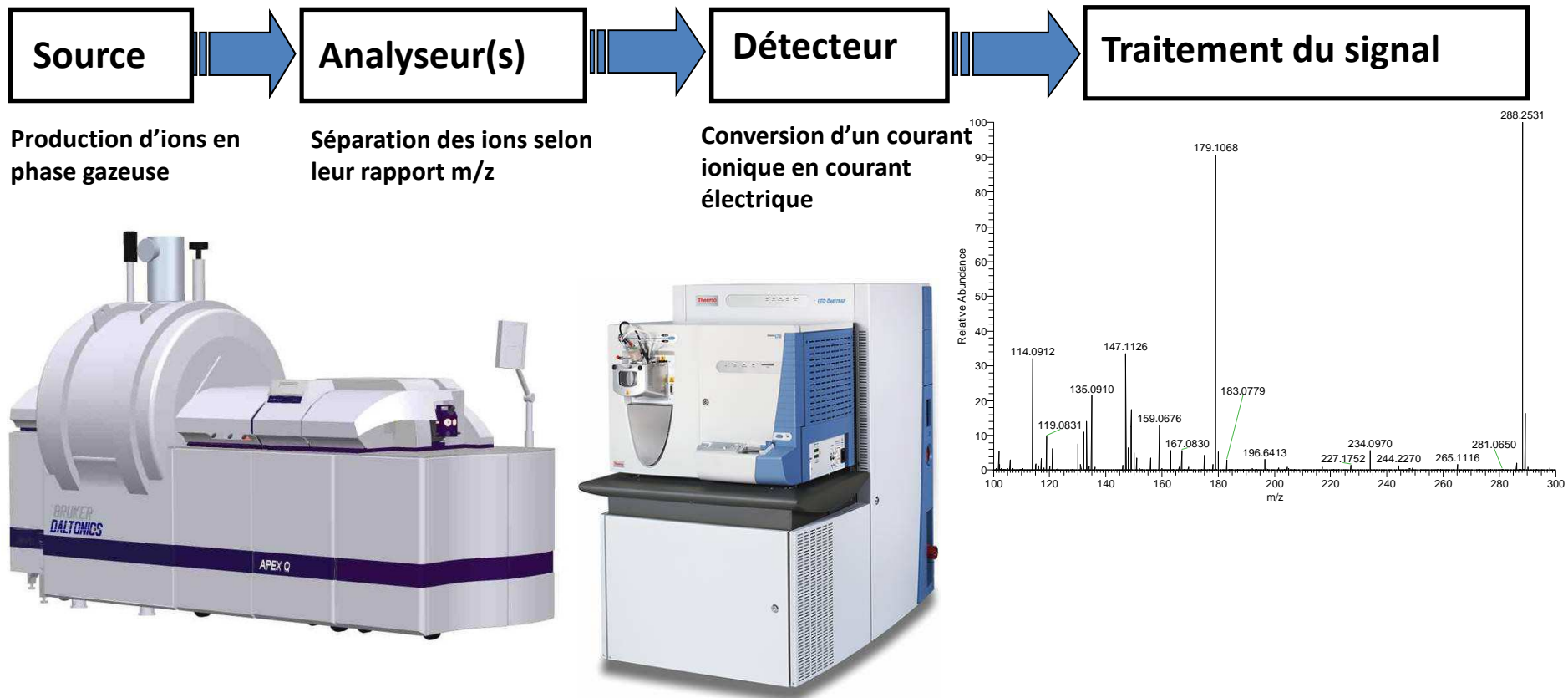
- Accès à la masse moléculaire (identification++)
- Analyse des molécules thermolabiles
- Couplages à la LC (plus résolutif et sensible que l'introduction directe, mais aussi plus long)
- Mais peu reproductible



La spectrométrie de masse

énergie atomique • énergies alternatives

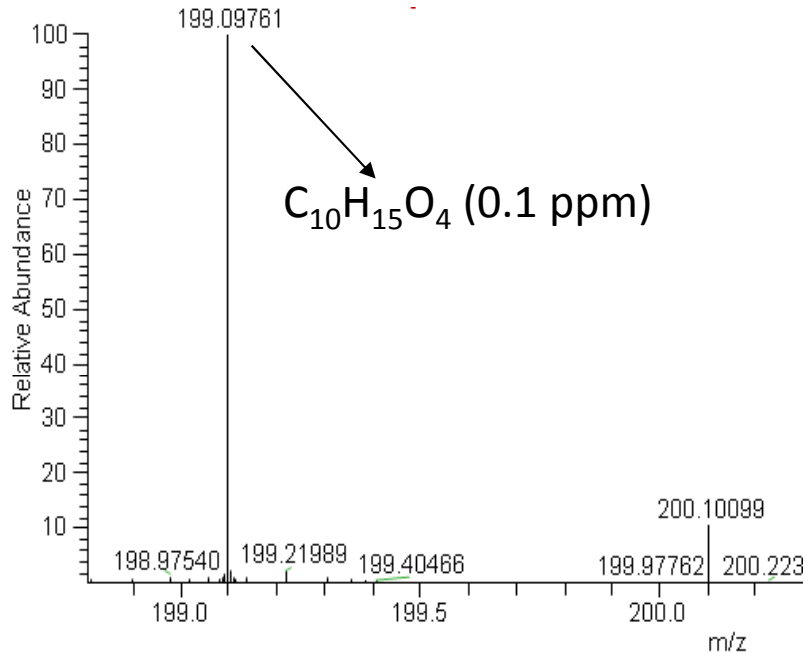
Pour détecter et identifier les molécules par mesure de leur masse



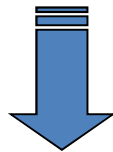


La spectrométrie de masse haute résolution

Précision en masse



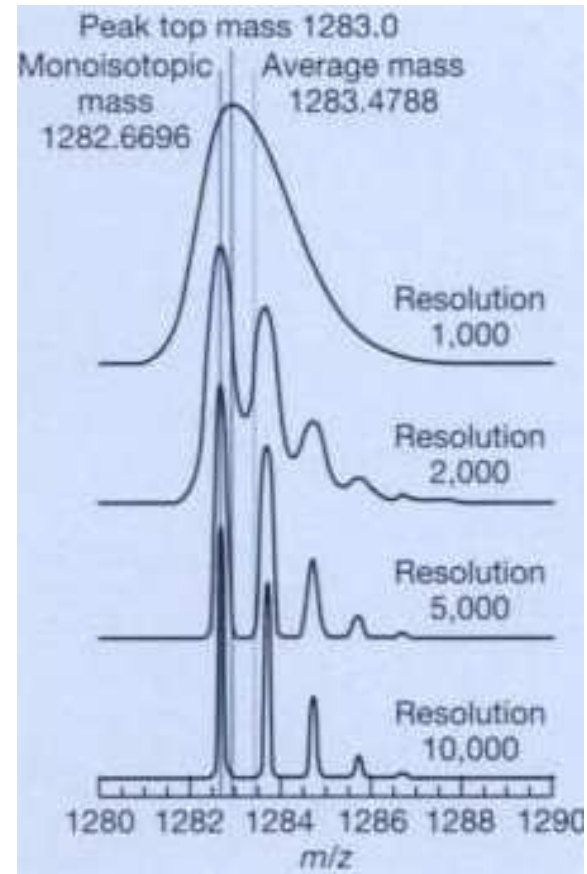
1 ppm: 100,000



Banques de données

Résolution

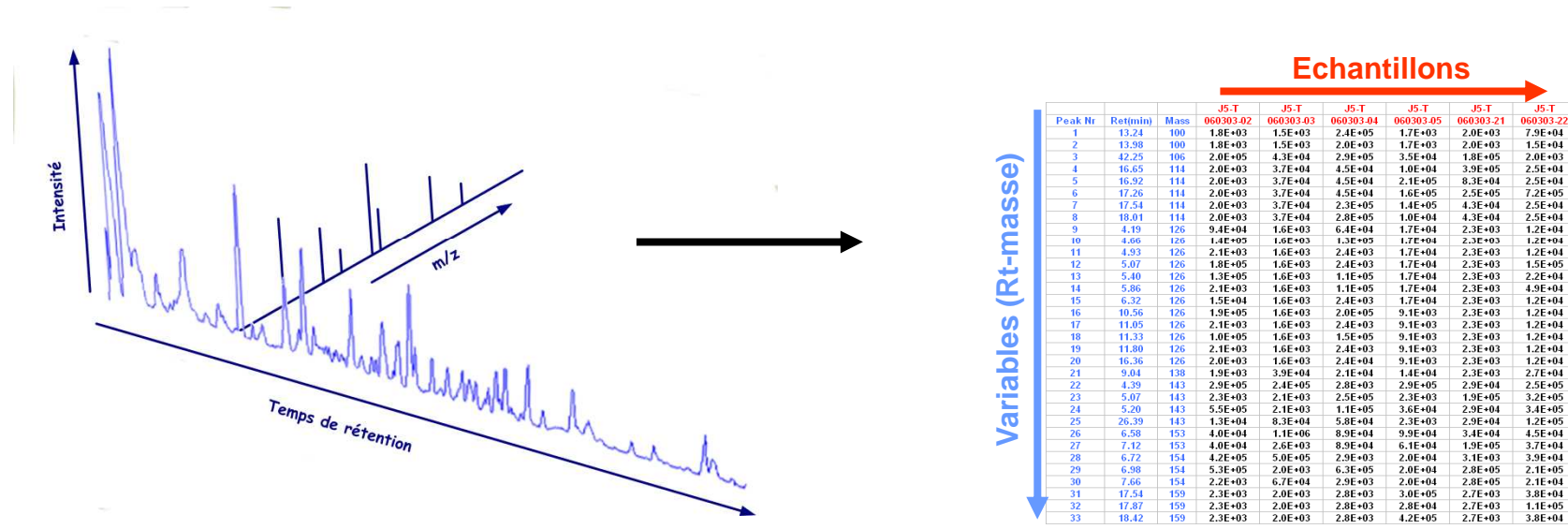
La résolution d'un analyseur est sa capacité à séparer des ions de rapport m/z proches mais différents.





Détection automatique des signaux

énergie atomique • énergies alternatives



1. Alignement des variables en temps de rétention et en mesures de masses
2. Suppression du bruit de fond
3. Détection et mesure des pics
4. Présentation des données sous forme matricielle

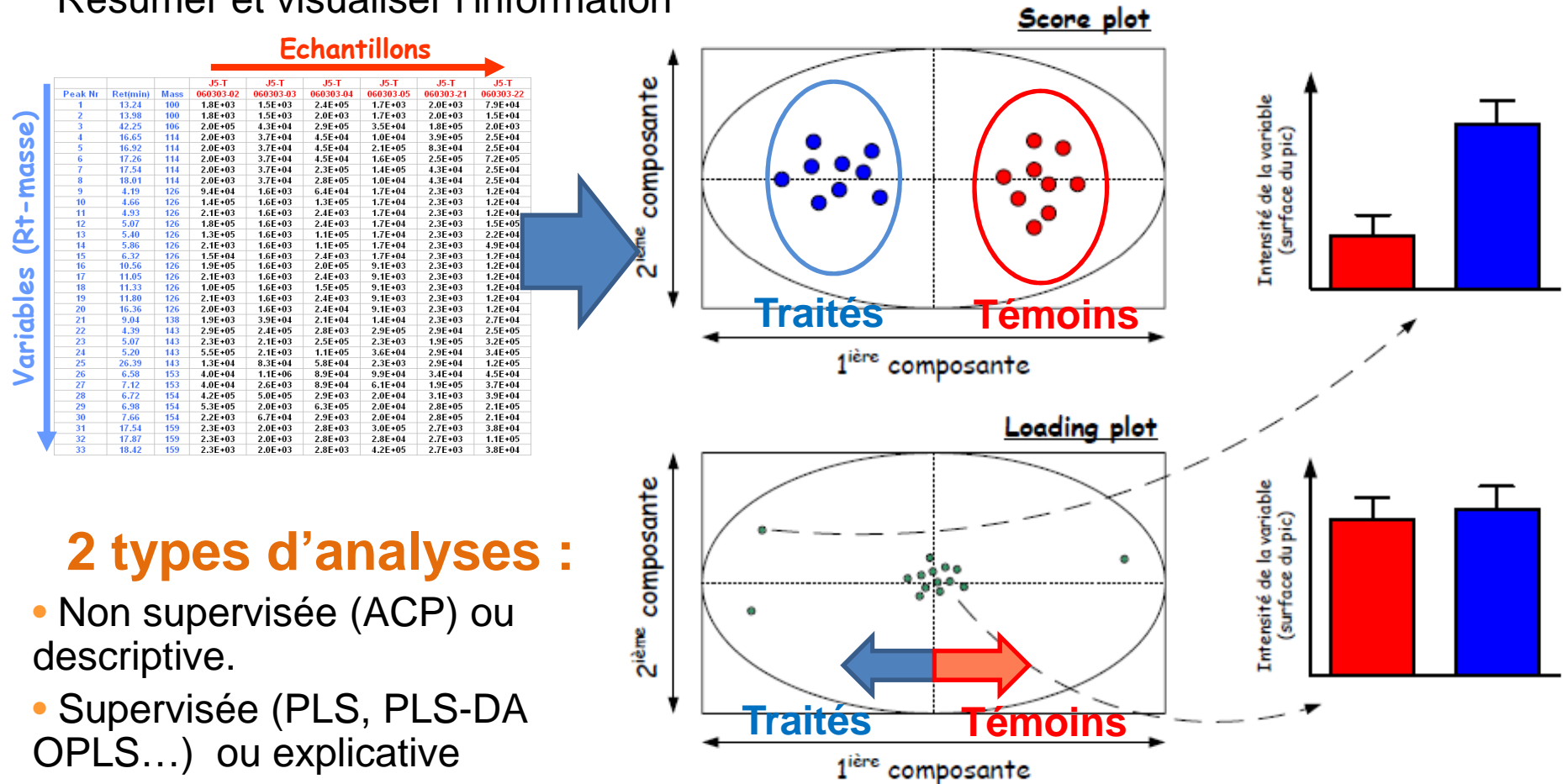


Analyses statistiques multivariées

énergie atomique + énergies alternatives

Faciliter la comparaison des données

Résumer et visualiser l'information



2 types d'analyses :

- Non supervisée (ACP) ou descriptive.
- Supervisée (PLS, PLS-DA OPLS...) ou explicative



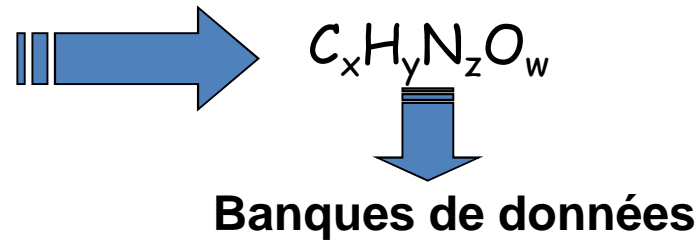
Identification des métabolites en MS

énergie atomique • énergies alternatives

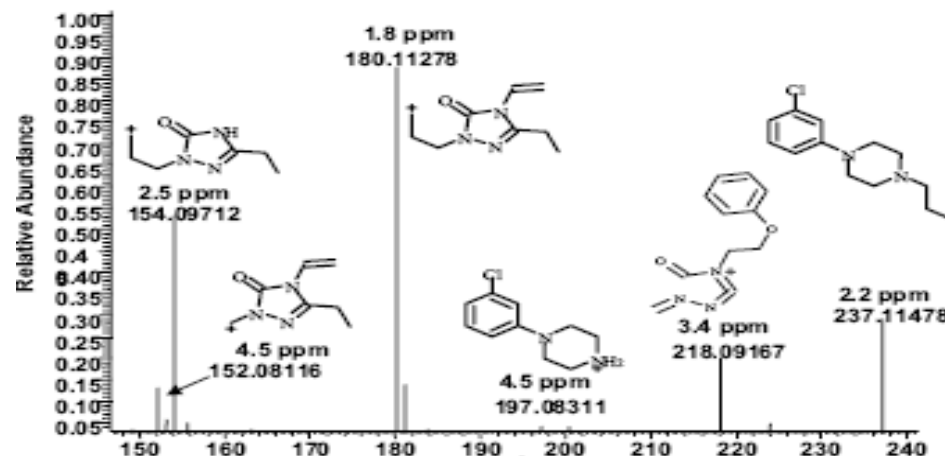
1. Obtenir des information sur la masse moléculaire

La précision en masse

< 5ppm avec les analyseurs à haute résolution



2. Obtenir des informations structurales avec les expériences de MS/MS





Contexte et objectifs de la thèse

énergie atomique • énergies alternatives

- les profils métaboliques peuvent contenir quelques centaines à des milliers de signaux dont la majeure partie demeure jusqu'à présent inconnus, ou du moins inexploitées car non caractérisée par les systèmes analytiques utilisés, ce qui limite l'obtention de données biologiquement pertinentes
- Il faut pouvoir identifier les métabolites mais également pouvoir distinguer ceux discriminants pour des conditions particulières (maladie, exposition à un toxique...) de ceux fluctuants avec les nombreuses sources de variabilité environnementales, biologiques ou analytiques



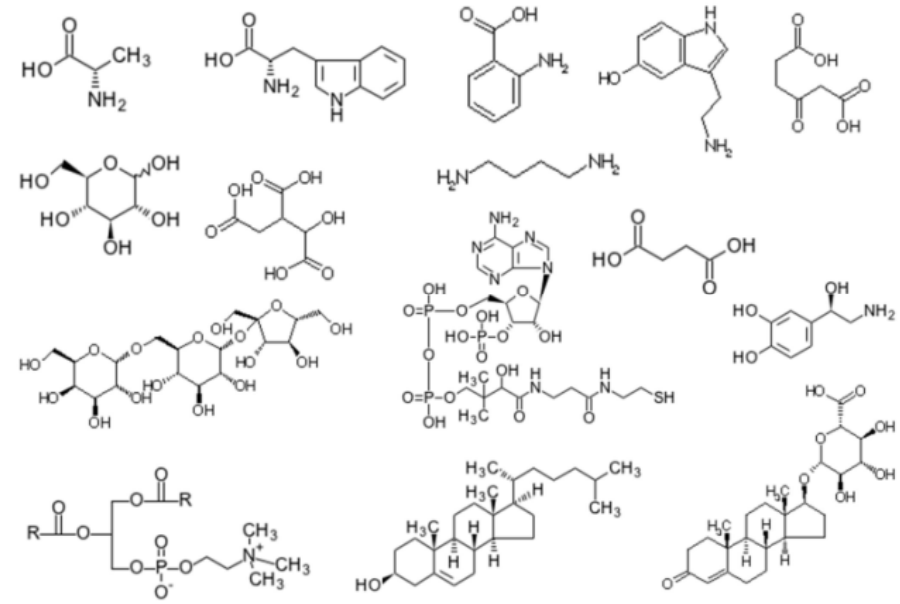
Contexte et objectifs de la thèse

énergie atomique + énergies alternatives

Echantillons →

Variables (Rt-masse) ↓

Peak Nr	RetTime	Mass	Echantillons						
			J5-T 060303.02	J5-T 060303.03	J5-T 060303.04	J5-T 060303.05	J5-T 060303.21	J5-T 060303.22	
1	13.24	100	1.8E+03	1.5E+03	2.4E+05	1.7E+03	2.0E+03	7.9E+04	
2	13.99	100	1.8E+03	1.5E+03	2.0E+03	1.7E+03	2.0E+03	1.5E+04	
3	42.25	106	2.0E+05	4.3E+04	2.9E+05	3.5E+04	1.8E+05	2.0E+03	
4	16.65	114	2.0E+03	3.7E+04	4.5E+04	1.0E+04	3.9E+05	2.5E+04	
5	16.92	114	2.0E+03	3.7E+04	4.5E+04	2.1E+05	8.3E+04	2.5E+04	
6	17.26	114	2.0E+03	3.7E+04	4.5E+04	1.6E+05	2.5E+05	7.2E+05	
7	17.54	114	2.0E+03	3.7E+04	2.3E+05	1.4E+05	4.3E+04	2.5E+04	
8	18.01	114	2.0E+03	3.7E+04	2.8E+05	1.0E+04	4.3E+04	2.5E+04	
9	4.19	126	9.4E+04	1.6E+03	6.4E+04	1.7E+04	2.3E+03	1.2E+04	
10	4.66	126	1.4E+05	1.6E+03	1.3E+05	1.7E+04	2.3E+03	1.2E+04	
11	4.93	126	2.1E+03	1.6E+03	2.4E+03	1.7E+04	2.3E+03	1.2E+04	
12	5.07	126	1.8E+05	1.6E+03	2.4E+03	1.7E+04	2.3E+03	1.5E+05	
13	5.40	126	1.3E+05	1.6E+03	1.1E+05	1.7E+04	2.3E+03	2.2E+04	
14	5.86	126	2.1E+03	1.6E+03	1.1E+05	1.7E+04	2.3E+03	4.9E+04	
15	6.32	126	1.5E+04	1.6E+03	2.4E+03	1.7E+04	2.3E+03	1.2E+04	
16	10.56	126	1.9E+05	1.6E+03	2.0E+05	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04	
17	11.05	126	2.1E+03	1.6E+03	2.4E+03	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04	
18	11.33	126	1.0E+05	1.6E+03	1.5E+05	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04	
19	11.80	126	2.1E+03	1.6E+03	2.4E+03	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04	
20	16.36	126	2.0E+03	1.6E+03	2.4E+04	9.1E+03	2.3E+03	1.2E+04	
21	9.04	138	1.9E+03	3.9E+04	2.1E+04	1.4E+04	2.3E+03	2.7E+04	
22	4.39	143	2.9E+05	2.4E+05	2.8E+03	2.9E+05	2.9E+04	2.5E+05	
23	5.07	143	2.3E+03	2.1E+03	2.5E+05	2.3E+03	1.9E+05	3.2E+05	
24	5.20	143	5.5E+05	2.1E+03	1.1E+05	3.6E+04	2.9E+04	3.4E+05	
25	26.39	143	1.3E+04	8.3E+04	5.8E+04	2.3E+03	2.9E+04	1.2E+05	
26	6.58	153	4.0E+04	1.1E+06	8.9E+04	9.5E+04	3.4E+04	4.5E+04	
27	7.12	153	4.0E+04	2.6E+03	8.9E+04	6.1E+04	1.9E+05	3.7E+04	
28	6.72	154	4.2E+05	5.0E+05	2.9E+03	2.0E+04	3.1E+03	3.9E+04	
29	6.98	154	5.3E+05	2.0E+03	6.3E+05	2.0E+04	2.8E+05	2.1E+05	
30	7.66	154	2.2E+03	6.7E+04	2.9E+03	2.0E+04	2.8E+05	2.1E+04	
31	17.54	159	2.3E+03	2.0E+03	2.8E+03	3.0E+05	2.7E+03	3.8E+04	
32	17.87	159	2.3E+03	2.0E+03	2.8E+03	2.8E+04	2.7E+03	1.1E+05	
33	18.42	159	2.3E+03	2.0E+03	2.8E+03	4.2E+05	2.7E+03	3.8E+04	



Plusieurs milliers de variables...

...plusieurs centaines de métabolites ??



Methodologie utilisée

énergie atomique • énergies alternatives

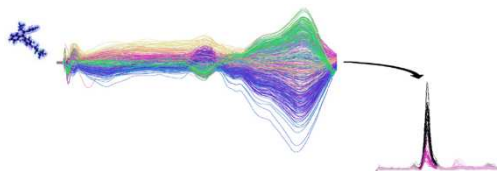
- Choix du fluide biologique : l'urine humaine, très utilisée dans les études toxicologiques et cliniques.



- Choix de la méthode analytique : Chromatographie liquide (C₁₈) couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LTQ Orbitrap)



- Traitement des données : XCMS R package et Logiciels développés au laboratoire
- Analyses statistiques : SIMCA P et Prism GraphPad





Présentation du Travail de thèse

énergie atomique • énergies alternatives

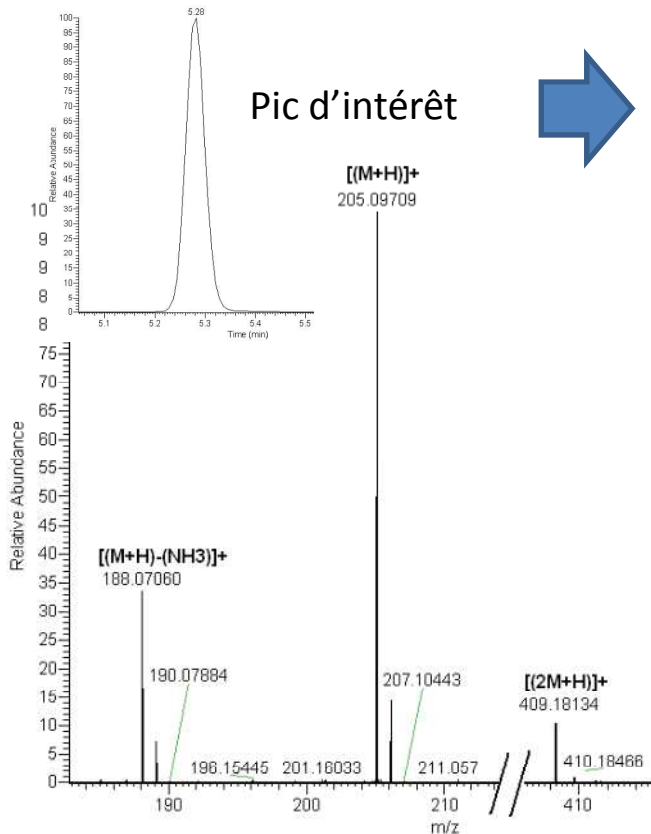
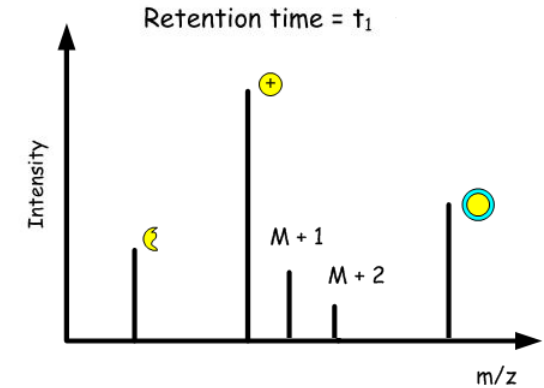
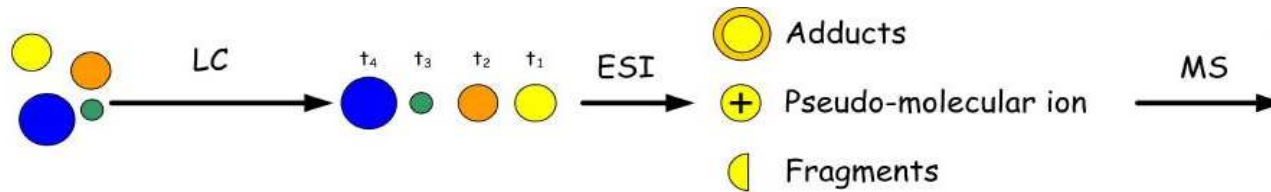
- 1. Construction d'une base de données spectrale pour l'annotation de jeux de données biologiques**
- 2. Evaluation de l'impact de la variabilité biologique sur le métabolome urinaire**
- 3. Conditions de prélèvement et de stockage à court terme des urines et leur impact sur le métabolome urinaire**



Pourquoi une base de données spectrale ?

énergie atomique = énergies alternatives

Une molécule = plusieurs ions = redondance du signal



Extraction des ions : liste de variables annotée

M/Z	RT	Formula	Compound	Attribution	Annotations (HMDB, KEGG, METLIN)
188.0709	5.28	C11H10NO2	Tryptophan	[(M+H)-(NH3)]+	Deethylatrazine 3-amino-2-naphthoic acid Indoleacrylic acid
189.0757	5.28	C10[13C]H10NO2	Tryptophan	[(M+H)-(NH3)]+ (13C)	Ethyl Oxalacetate
190.0787	5.28	C9[13C]2H10NO2	Tryptophan	[(M+H)-(NH3)]+ (13C2)	
205.0975	5.28	C11H13N2O2	Tryptophan	[(M+H)]+	Tryptophan ethotoin Vasicinol Idazoxan Nirvanol
206.1010	5.28	C10[13C]H13N2O2	Tryptophan	[(M+H)]+ (13C)	N-Acetyl-D-fucosamine N-Acetyl-D-quinovosamine
207.1051	5.28	C9[13C]2H13N2O2	Tryptophan	[(M+H)]+ (13C2)	
409.1902	5.28	C22H25N4O4	Tryptophan	[(2M+H)]+	Gly Trp Phe (and isomers) Lys Met Met (and isomers)
410.1938	5.28	C21[13C]H25N4O4	Tryptophan	[(2M+H)]+ (13C)	Tyr Leu Asp (and isomers) Ile Tyr Asp (and isomers) Val Tyr Glu (and isomers)



Plusieurs approches complémentaires

énergie atomique + énergies alternatives

Interprétation des spectres de masse de composés de référence

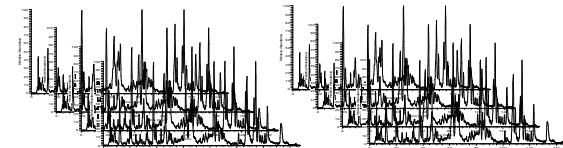


- m/z des ions générés (adduits, isotopes, fragments)
- Temps de rétention
- spectres de CID



Approche insuffisante car un bon nombre de métabolites ne sont pas commercialement disponibles

Caractérisation de nouveaux métabolites à partir des données biologiques



Témoins

Malades

Base de données spectrale

Données brutes

Nouveaux métabolites identifiés

**Données traitées
Liste de variables annotées**

- Analyses statistiques
- Regroupement de variables
- bases de données
- Expériences de CID



Analyse d'un composé de référence

Pantothenic acid [M+H]⁺

Temps de rétention

M/Z	Intensity	Relative	M/Z (theo)	Delta (ppm)	RDBE	Composition	Attribution							
72.04431	7.7E+04	0.82	72.04439	-1.11	1.5	C3 H6 O N	[(M+H)-(C6H10O3)-(H2O)]+	1.80	4.77	11.17				
90.05482	3.6E+05	3.78	90.05496	-1.55	0.5	C3 H8 O2 N	[(M+H)-(C6H10O3)]+	1.80	4.77	11.17				
116.034	2.7E+04	0.29	116.03422	-0.22	2.5	C7 H10 O N	[(M+H)-(C2H6O3)-(H2O)]+	1.80	4.77	11.17				
Fragments (+isotopes)				626	-2.85	2.5	C7 H12 O2 N	[(M+H)-(C2H6O3)]+	1.80	4.77	11.17			
				247	-0.3	1.5	C8 H16 O3 N	[(M+H)-(HCOOH)]+	1.80	4.77	11.17			
				682	0.26	3.5	C9 H14 O3 N	[(M+H)-2(H2O)]+	1.80	4.77	11.17			
				738	-0.46	2.5	C9 H16 O4 N	[(M+H)-(H2O)]+	1.80	4.77	11.17			
Moléculaire (+isotopes)				795	0.18	1.5	C9 H18 N O5	[(M+H)]+	1.80	4.77	11.17			
				305	0.2	1.5	C8 13C H18 N O5	[(M+H)]+ (13C)	1.80	4.77	11.17			
				194	-2.4	1.5	C9 H18 N O4 18O	[(M+H)]+ (18O)	1.80	4.77	11.17			
				549	2.2	1.5	C8 13C H18 N O4 18O	[(M+H)]+ (13C+18O)	1.80	4.77	11.17			
				238.12923	1.76E+03	0.02	238.128515	3	0.5	C9 H20 N O6	[(M+H)+(H2O)]+	1.80	4.77	11.17
				242.09992	6.61E+06	68.15	242.099895	0.1	1.5	C9 H17 N Na O5	[(M+Na)]+	1.80	4.77	11.17
				243.10331	4.44E+05	4.58	243.10325	0.25	1.5	C8 13C H17 N Na O5	[(M+Na)]+ (13C)	1.80	4.77	11.17
				244.10363	1.79E+04	0.18	244.104139	-2.09	1.5	C9 H17 N Na O4 18O	[(M+Na)]+ (18O)	1.80	4.77	11.17
				258.07386	1.29E+05	1.33	258.073833	0.1	1.5	C9 H17 K N O5	[(M+K)]+	1.80	4.77	11.17
				259.07731	1.49E+03	0.02	259.077188	0.47	1.5	C8 13C H17 K N O5	[(M+K)]+ (13C)	1.80	4.77	11.17
				264.082	1.68E+05	1.74	264.08184	0.61	1.5	C9 H16 N Na2 O5	[(M-H+2Na)]+	1.80	4.77	11.17
				265.08498	3.08E+03	0.03	265.085195	-0.81	1.5	C8 13C H16 N Na2 O5	[(M-H+2Na)]+ (13C)	1.80	4.77	11.17
				310.08654	1.10E+03	0.01	310.08732	-2.52	1.5	C10 H18 N Na2 O7	[(M+Na)+(HCOONa)]+	1.80	4.77	11.17
				569	1.22	2.5	C18 H34 N2 Na O10	[(2M+Na)]+	1.80	4.77	11.17			
Adduits (+isotopes)				924	0.99	2.5	C17 13C H34 N2 Na O10	[(2M+Na)]+ (13C)	1.80	4.77	11.17			
				279	0.26	2.5	C16 13C2 H34 N2 Na O10	[(2M+Na)]+ (13C2)	1.80	4.77	11.17			
				514	0.1	2.5	C18 H33 N2 Na2 O10	[(2M-H+2Na)]+	1.80	4.77	11.17			

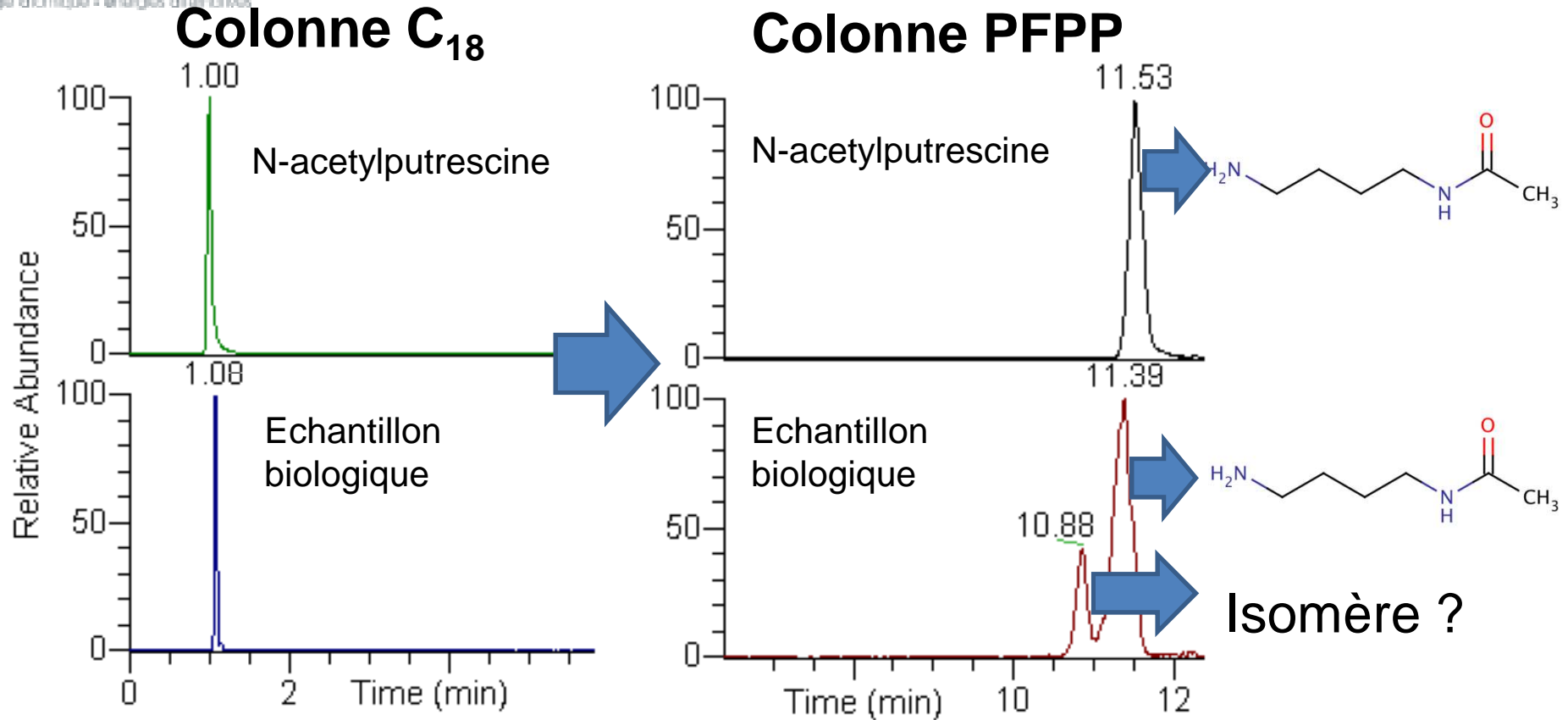
Annotation d'urines humaines

RT	MZ	#	Masse	Composé	Composition	Attribution	UPLC (C18)
4.72	202.107624	1	202.10738	pantothenic acid	C9 H16 O4 N	[(M+H)-(H2O)]+	4.77
4.73	90.054915	1	90.05496	pantothenic acid	C3 H8 O2 N	[(M+H)-(C6H10O3)]+	4.77
4.74	220.117542	1	220.11795	pantothenic acid	C9 H18 N O5	[(M+H)]+	4.77
4.74	221.12168	1	221.121305	pantothenic acid	C8 13C H18 N O5	[(M+H)]+ (13C)	4.77
4.74	222.122088	1	222.122194	pantothenic acid	C9 H18 N O4 18O	[(M+H)]+ (18O)	4.77
4.74	242.100637	1	242.099895	pantothenic acid	C9 H17 N Na O5	[(M+Na)]+	19 4.77
4.74	258.075314	1	258.073833	pantothenic acid	C9 H17 K N O5	[(M+K)]+	4.77



Résolution chromatographique

énergie atomique • énergies alternatives



- **38 pics en C₁₈** (dont 37 dans le volume mort) = **83 pics avec une colonne de type en PFPP.** (et donc à au moins 83 métabolites)
- Plusieurs isomères pour un seul pic = **pas d'interprétation statistique possible**

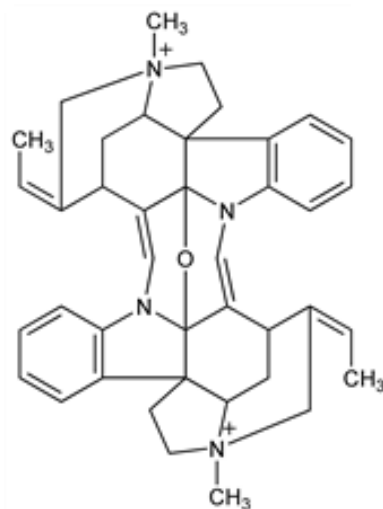


Identification en milieu biologique

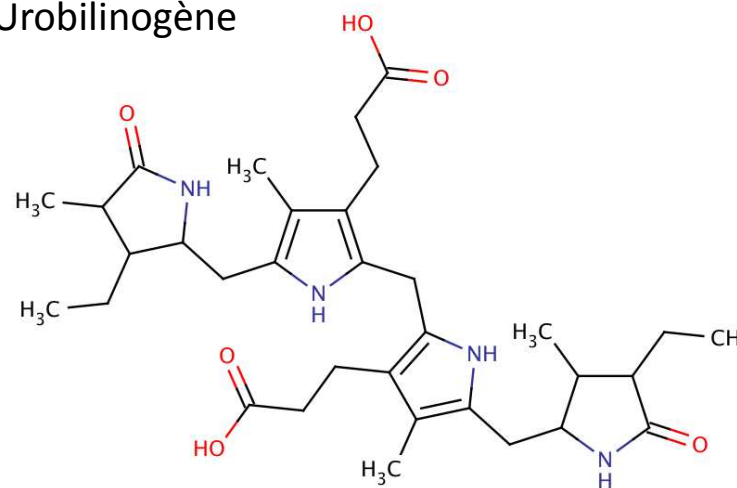
énergie atomique + énergies alternatives

X	m/z	RT	ANNOTATION CAMERA			Correlation entre échantillons	Annotation par les bases de données publiques
			isotopes	adduct	pcgroup		
1806	303.144298	9.33	**	**	531	NA	**
4663	593.331209	9.34	[681][M]+	**	512	NA	L-Urobilin
4668	594.336833	9.34	[681][M+1]+	**	512	NA	**
4679	595.346349	9.40	[650][M]+	[M-H]-	394	1.00	C-Curarine / L-Urobilinogen
4682	596.351361	9.40	[650][M+1]+	**	394	0.98	**
4878	631.32561	9.40	**	[M+CL]-	394	0.96	**
3797	481.278887	9.46	**	**	552	NA	GPCho(10:0/4:0) / GPCho(12:0/2:0)
2763	381.190985	9.53	**	**	627	NA	**
3834	485.179201	9.61	**	**	544	NA	Rutaevin / Nafenopinglucuronide
1255	253.144008	9.67	**	**	556	NA	**

C-Curarine



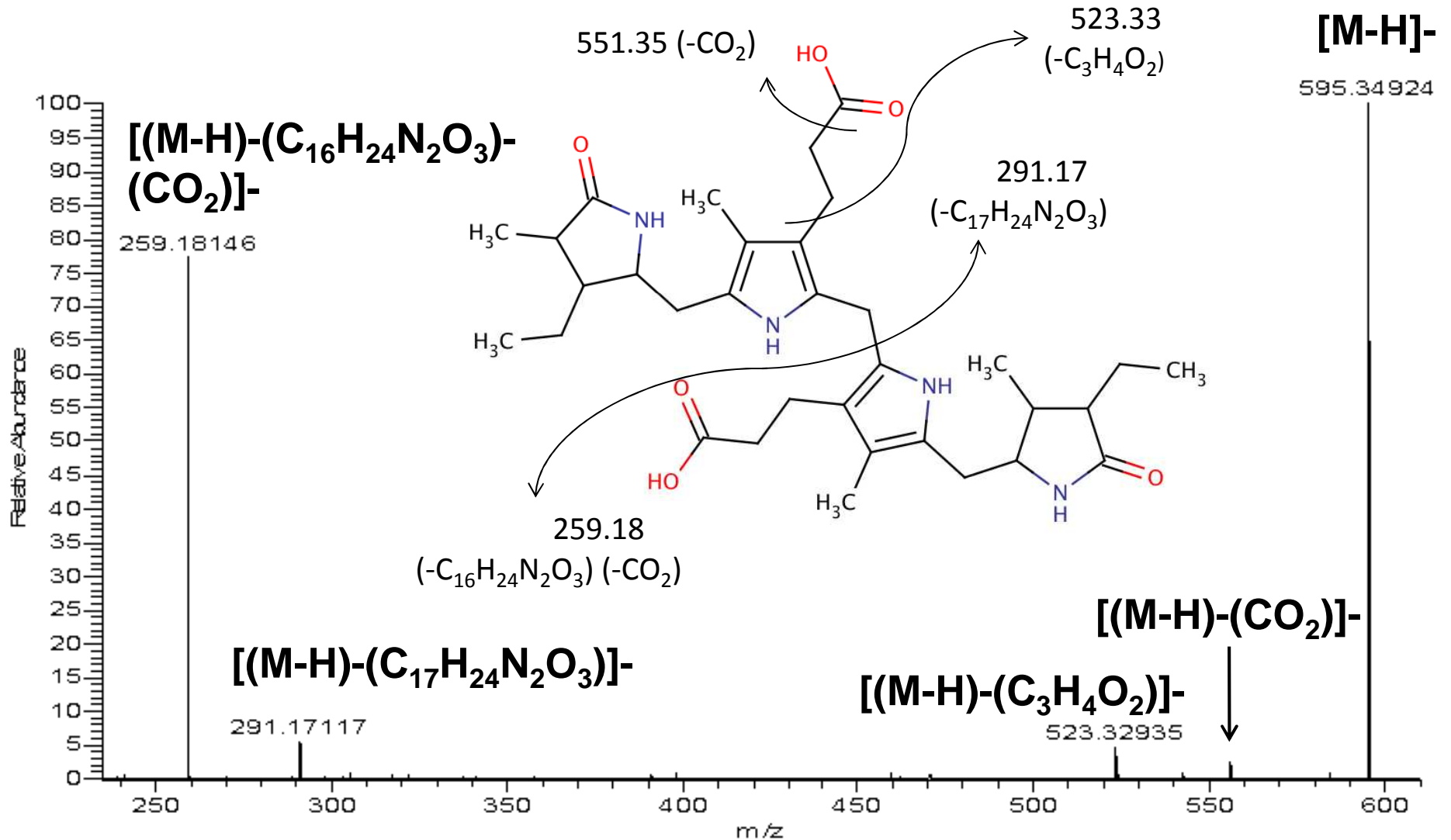
L-Urobilinogène





Identification en milieu biologique

énergie atomique • énergies alternatives





Conclusion : métabolites identifiés

énergie atomique • énergies alternatives

383 Métabolites caractérisés



Conclusion : métabolites identifiés

énergie atomique • énergies alternatives

Base de données spectrale

383 Métabolites caractérisés

244

Métabolites identifiés

139



Conclusion : métabolites identifiés

énergie atomique • énergies alternatives

Chimiothèque

Base de données spectrale

383 Métabolites caractérisés

163

Métabolites
identifiés à
partir des
composés de
référence

81

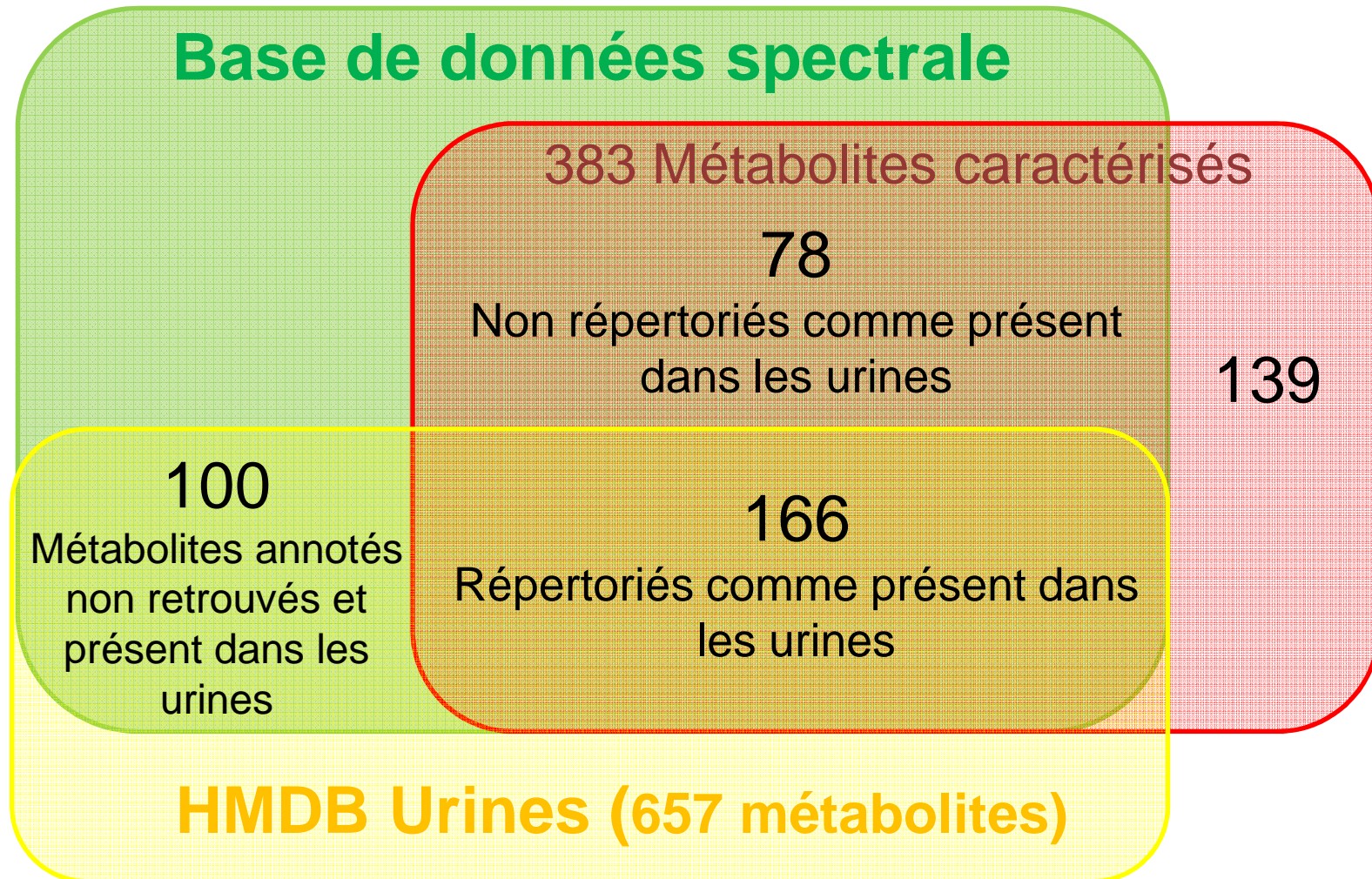
Métabolites
identifiés à partir
des données
biologiques

139



Conclusion : métabolites identifiés

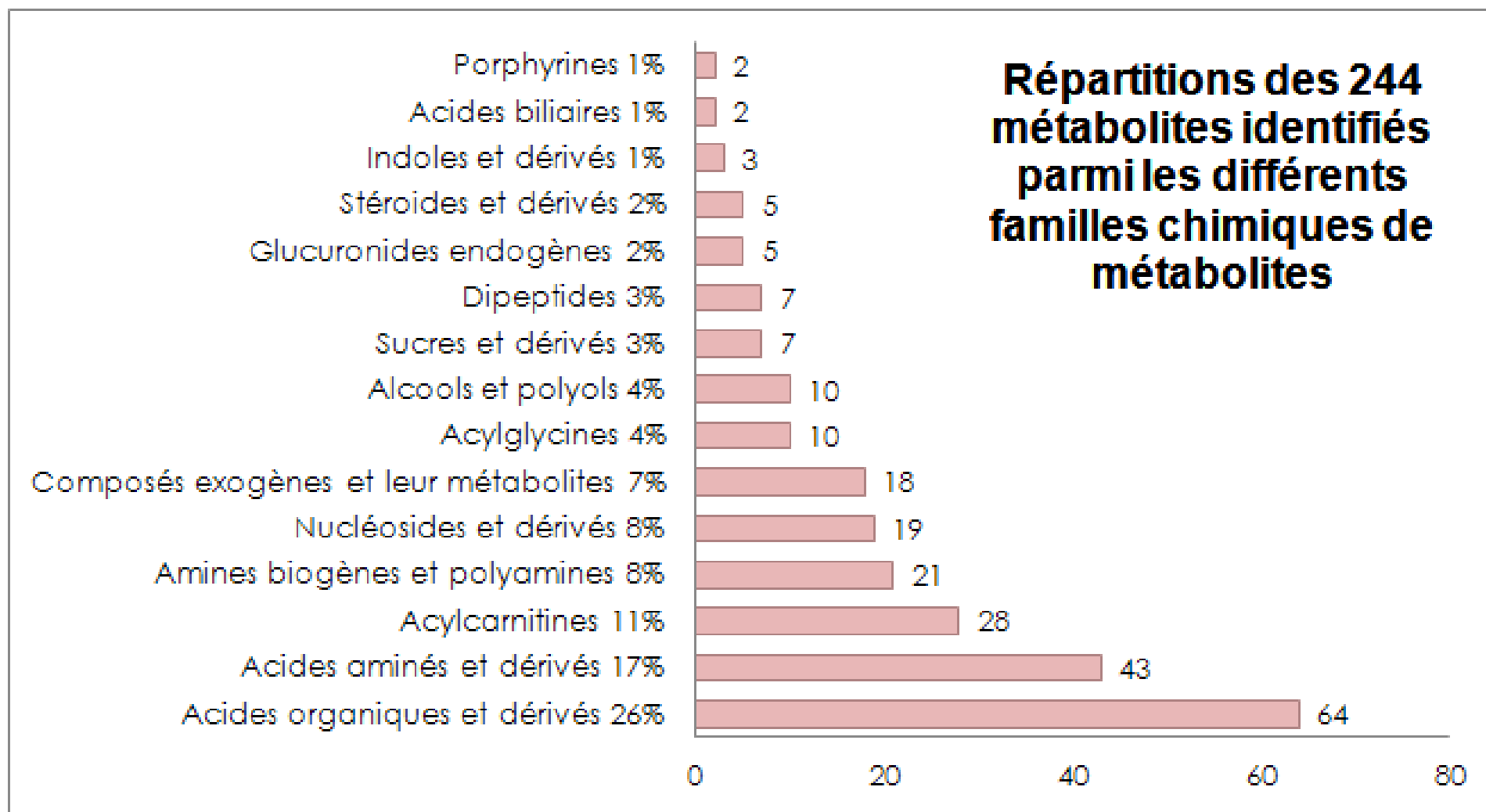
énergie atomique • énergies alternatives





Conclusion : familles chimiques

energie atomique • énergies alternatives





Présentation du Travail de thèse

énergie atomique • énergies alternatives

- 1. Construction d'une base de données spectrale pour l'annotation de jeux de données biologiques**
- 2. Evaluation de l'impact de la variabilité biologique sur le métabolome urinaire**
- 3. Conditions de prélèvement et de stockage à court terme des urines et leur impact sur le métabolome urinaire**



Cohorte étudiée

énergie atomique • énergies alternatives

- 227 Urines humaines (volontaires du CEA)
- Utilisation des facteurs physiologiques pour étudier la variabilité (âge, genre et IMC)

Age (années)	18-35			36-45			>46			TOTAL AGE		
Genre*	F	H	Total	F	H	Total	F	H	Total	F	H	Total
Indice de Masse Corporelle (IMC**)												
Maigreur (<18.5)	3	0	3	2	0	2	0	2	2	5	2	7
Normal (18.5-24.9)	29	34	63	23	22	45	24	18	42	76	74	150
Surpoids (25-29.9)	2	11	13	8	9	17	8	22	30	18	42	60
Obésité (>30)	0	0	0	2	1	3	5	2	7	7	3	10
TOTAL IMC	34	45	79	35	32	67	37	44	81	106	121	227

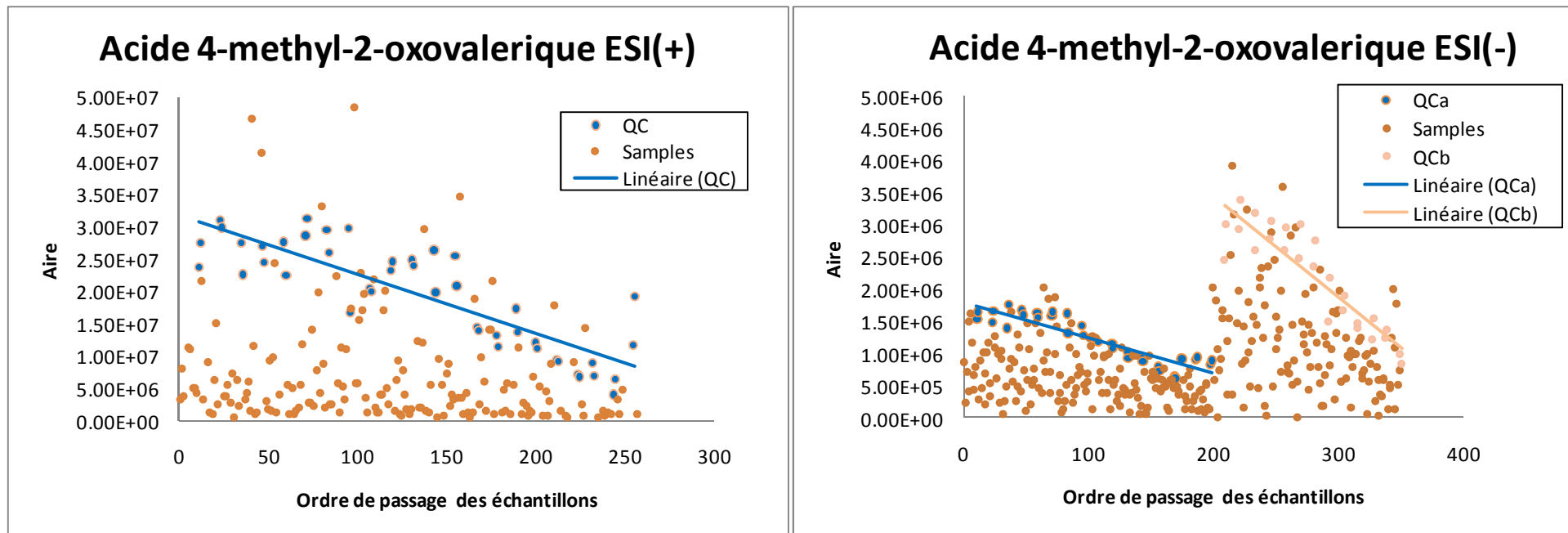
- * F : Femme; H : Homme / ** IMC = poids (kg) / taille (m²)



Manque de reproductibilité de l'ESI-MS

énergie atomique + énergies alternatives

- Beaucoup d'échantillons à analyser = **encrassement de la source ESI-MS**
- Perte de signal proportionnelle au nombre d'échantillons → **nécessité de normalisation**



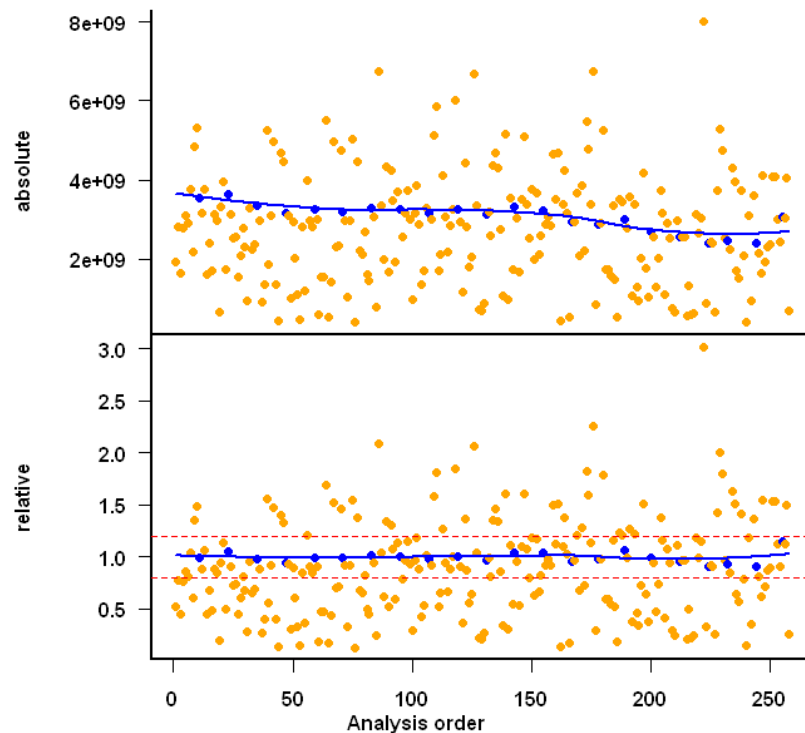


Normalisation

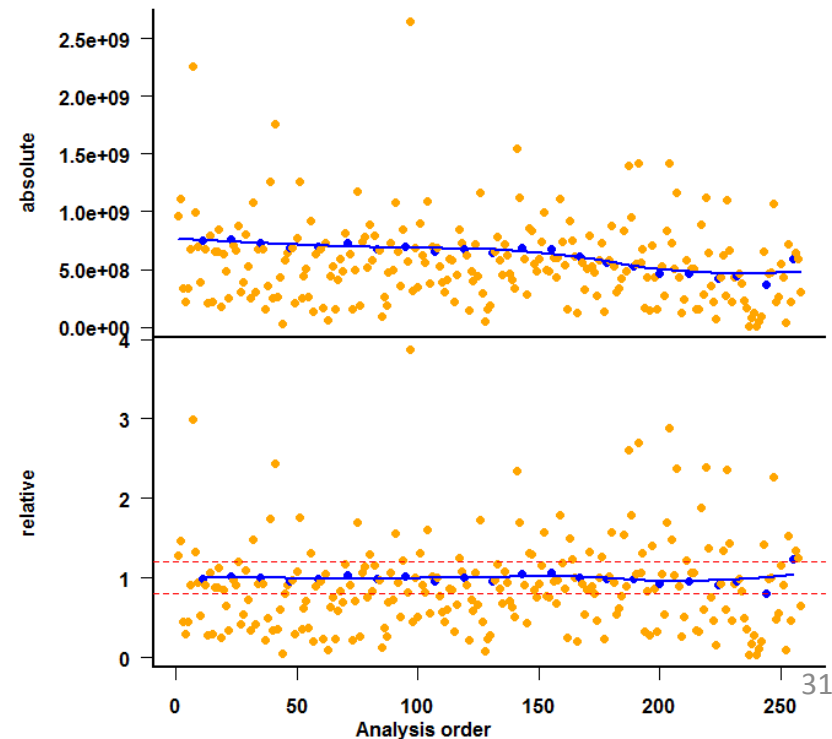
énergie atomique + énergies alternatives

- Utilisation d'échantillon de contrôle qualité (QC) pour modéliser le biais analytique pour chaque métabolite
- (Dunn WB et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Nature Protocols 2011;6: 1060-83.)
- Normalisation par régression locale LOWESS.
- (Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. Cleveland WS. JASA 1979;74: 829-36.)

Butyrylcarnitine [87]



Panhotenic_acid [78]





Test statistiques

énergie atomique • énergies alternatives

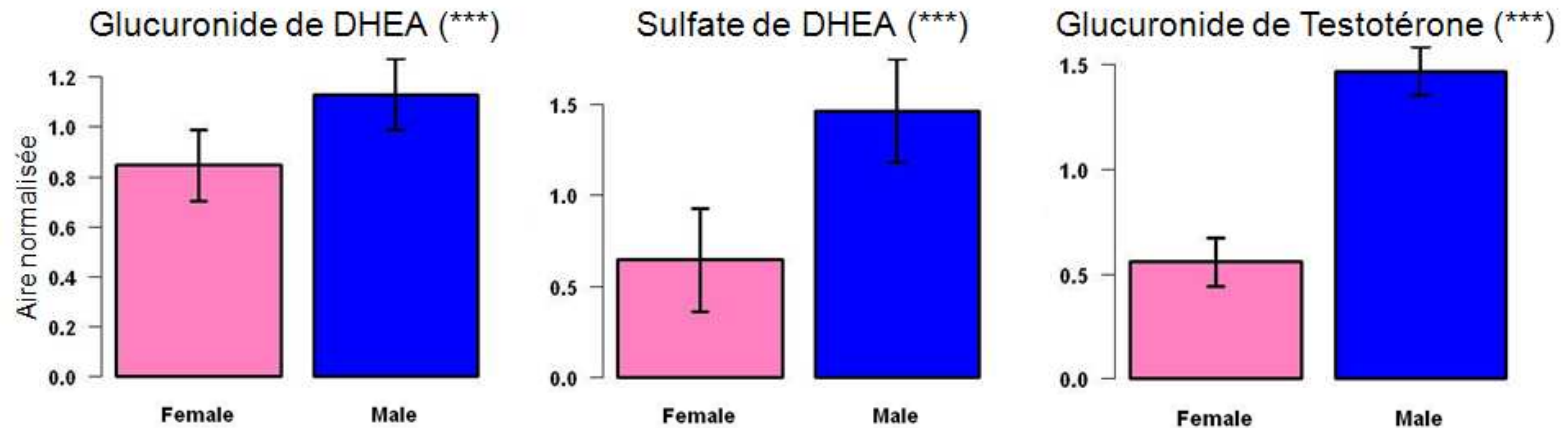
- tests statistiques en fonction du type de variable
- Tests **non paramétriques** car population d'origine impossible à définir (Loi normale, égalité des variances)
- La variable «genre» étant catégorielle (ou qualitative) à deux classes → test de comparaison des médianes de Mann-Whitney-Wilcoxon
- Les variables «âge» et «IMC» étant des variables quantitatives → tests de corrélation de Spearman (régression)
- Application de la **Correction des test multiples**



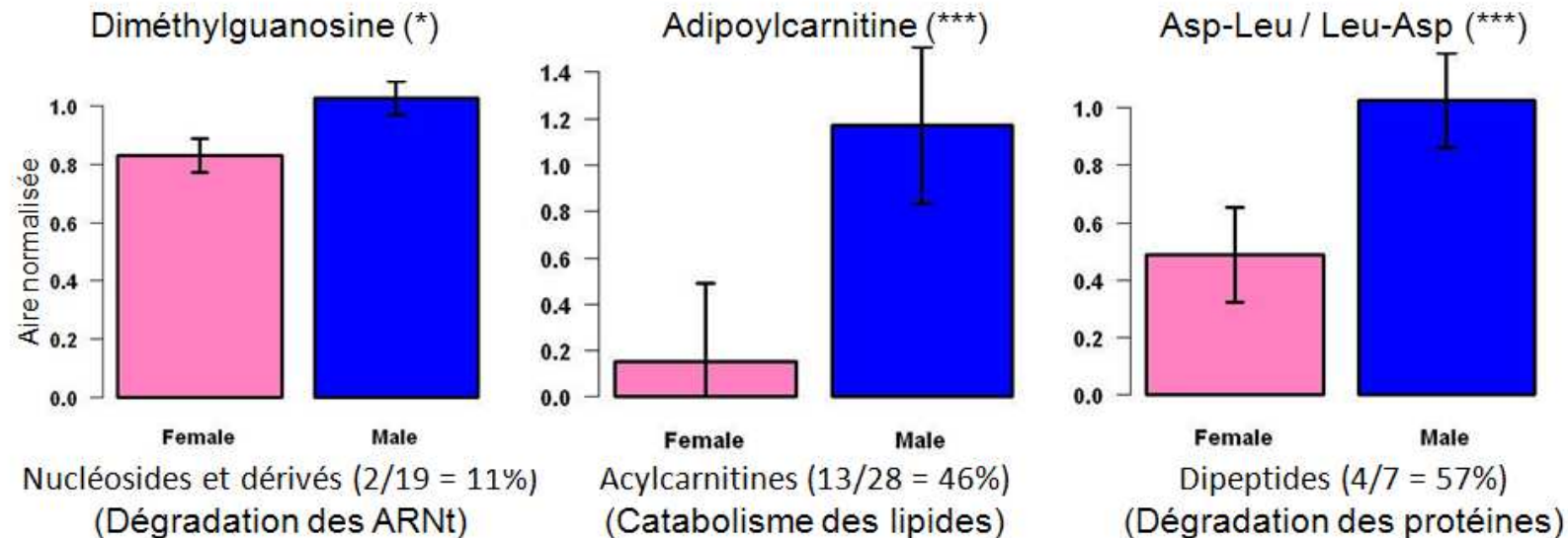
Variations liées au genre

énergie atomique = e

Hormones stéroïdiennes (3/5 = 60%)



Métabolisme énergétique

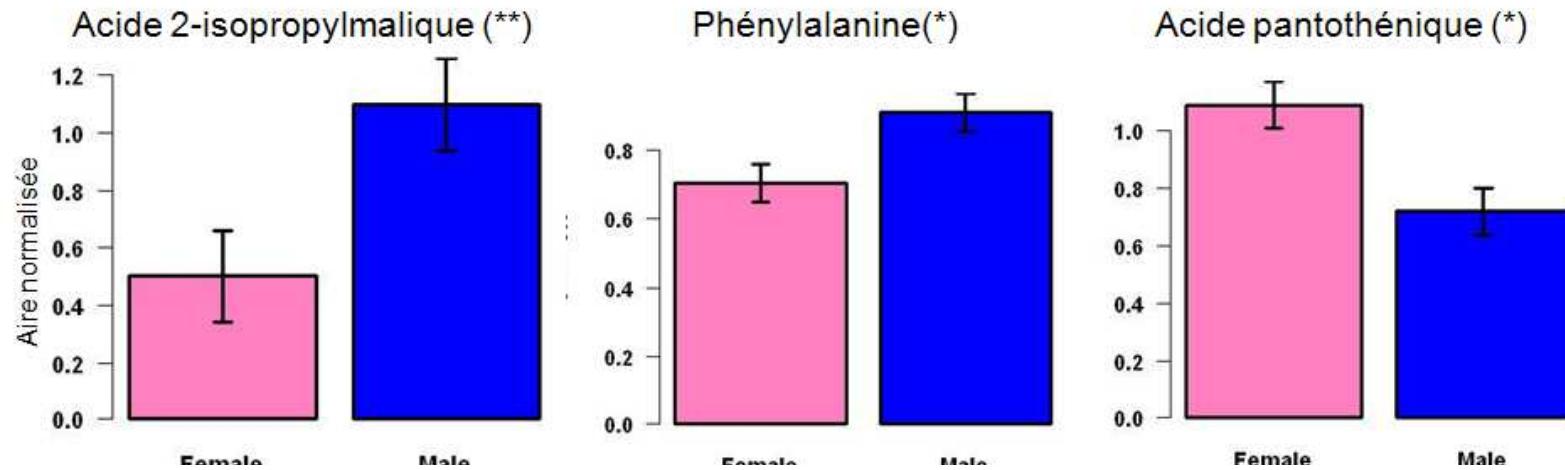




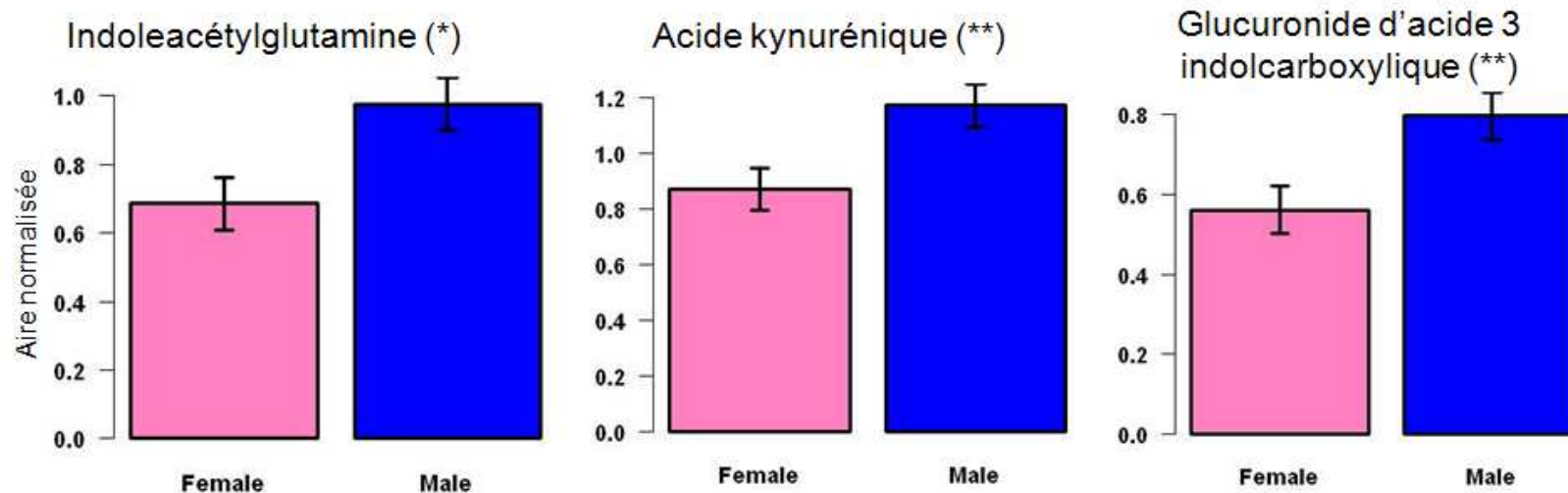
Variations liées au genre

énergie atomique • er

Métabolisme des acides aminés (6/43 = 14%)



Métabolisme du tryptophane

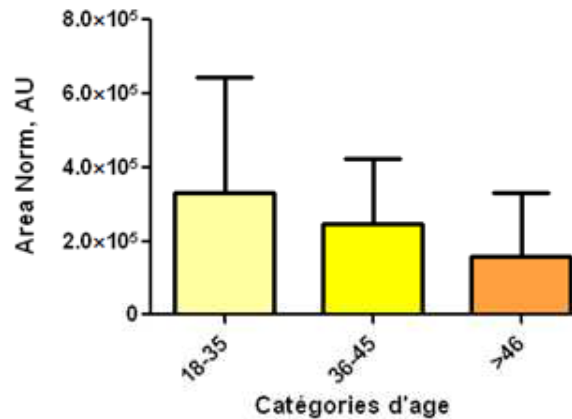




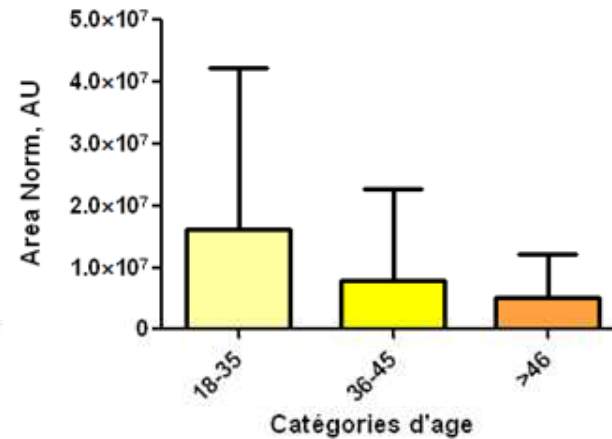
Variations liées à l'âge

Hormones stéroïdiennes (3/5 = 60%)

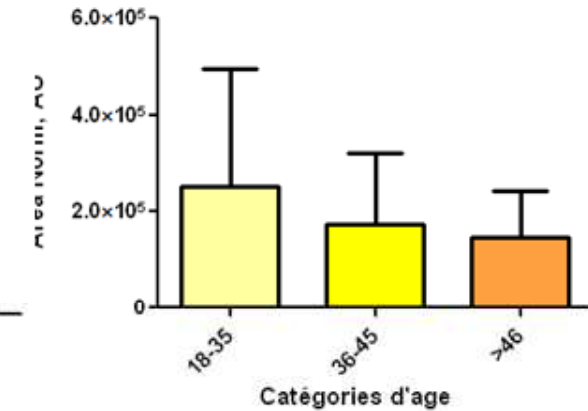
Glucuronide de DHEA (***)



Sulfate de DHEA (***)

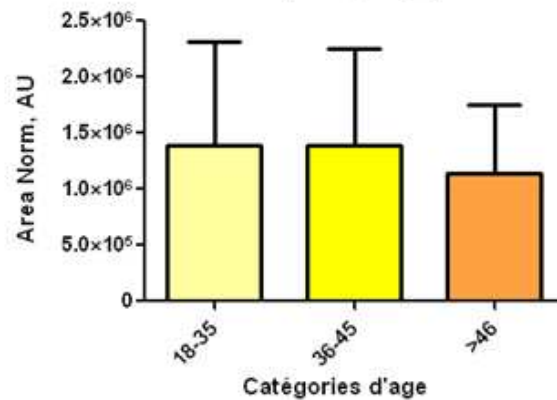


Glucuronide de testostérone (*)

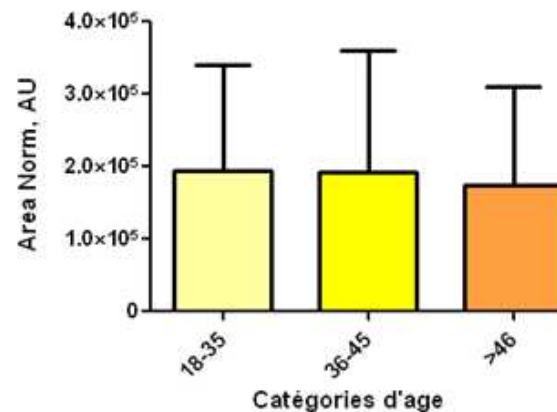


Métabolisme des acides aminés (+ tryptophane) (4/43 = 9%)

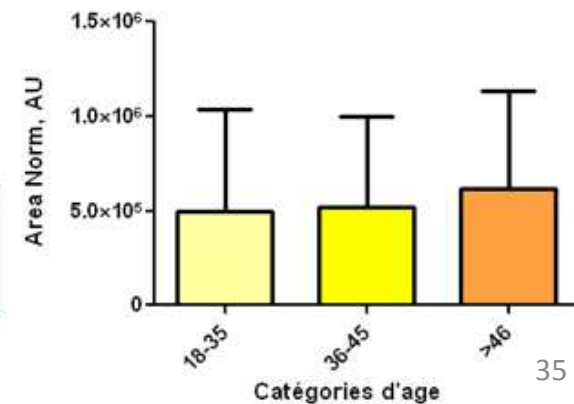
Acide aspartique (**)



Acide 5-hydroxyindolacétique (*)



N-acetylphenylalanine (**)

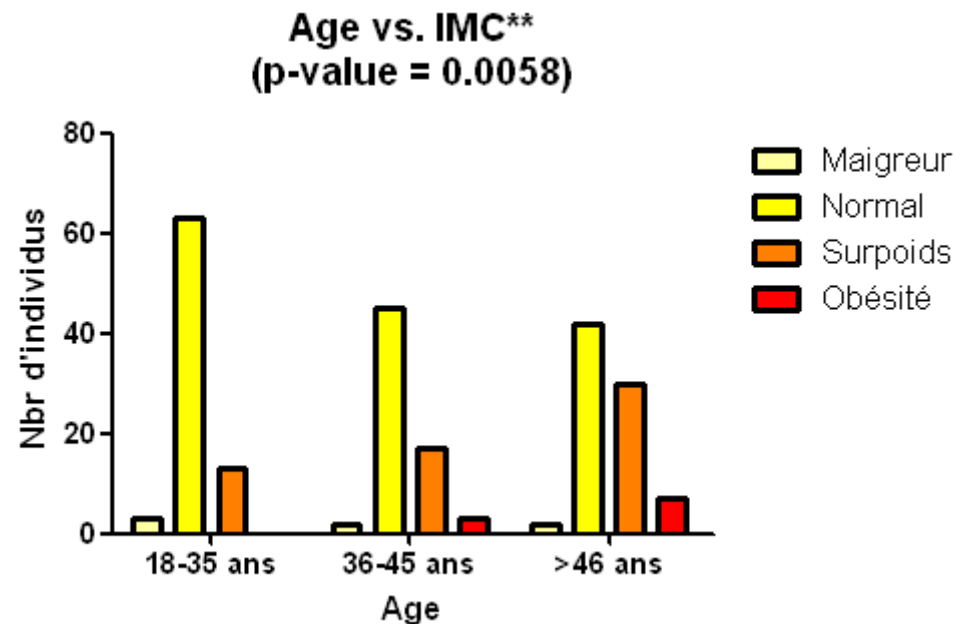




Variations liées à l'IMC

énergie atomique + énergies alternatives

- **Pas de variations spécifiques** : variations également liées à l'âge (métabolites exogènes)
- L'âge et l'IMC étant deux **paramètres corrélés**, il est impossible de savoir si ces variations avec l'IMC sont **artéfactuelles ou pas**.





Présentation du Travail de thèse

énergie atomique • énergies alternatives

- 1. Construction d'une base de données spectrale pour l'annotation de jeux de données biologiques**
- 2. Evaluation de l'impact de la variabilité biologique sur le métabolome urinaire**
- 3. Conditions de prélèvement et de stockage à court terme des urines et leur impact sur le métabolome urinaire**



Contexte

énergie atomique + énergies alternatives

- l'urine est un fluide biologique complexe dont les conditions de prélèvement et de stockage peuvent modifier la composition métabolique
- il est possible de réaliser des prélèvements ponctuels ou des recueils sur une période de temps déterminée pouvant aller jusqu'à 24h ou 48h
- Quelles sont les meilleures conditions ?
- Peu de publications, Résultats chimométriques et parfois contradictoires
- Urines individuelles = forte variabilité inter-individuelle
- Liste de métabolites impactés rares et seulement par RMN



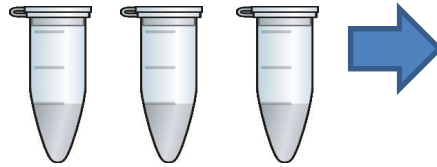
Plan expérimental



**Mélange
d'urines
fraîches**



Sans conservateur



RT 4°C



RT 4°C



**Prélèvements à
intervalles réguliers
entre 0 et 72h**



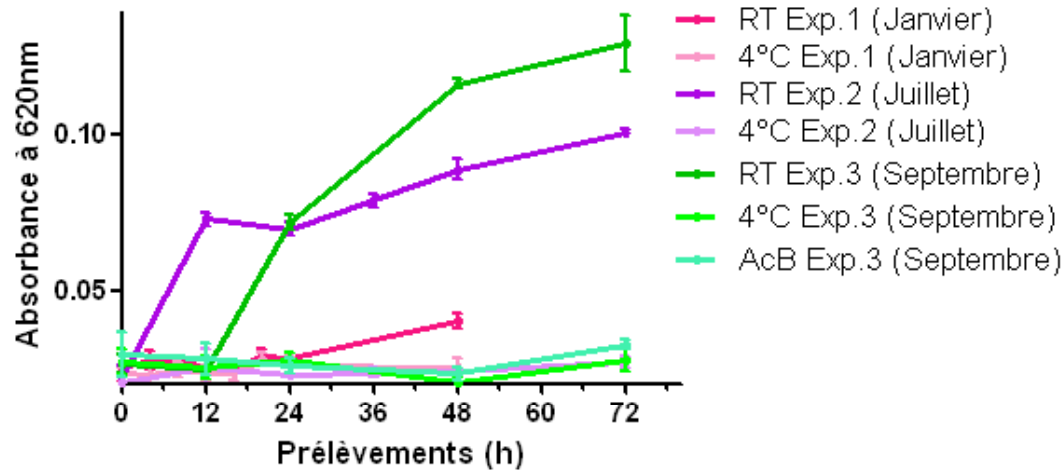
**Spectrométrie de
masse (empreinte
métabolomique) (+ RMN)**

**Turbidimétrie
(croissance
bactérienne)**



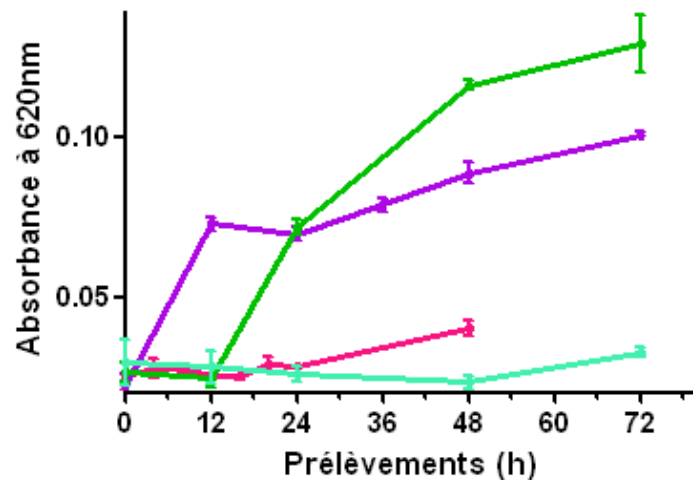
Evolution de la croissance bactérienne

A. Evolution de la croissance bactérienne

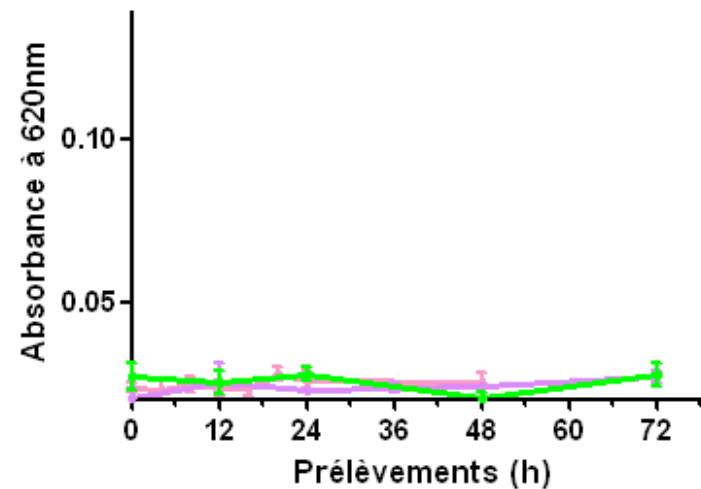


La croissance bactérienne n'est pas reproductible et dépendante de la température

B. Evolution de la croissance bactérienne à température ambiante

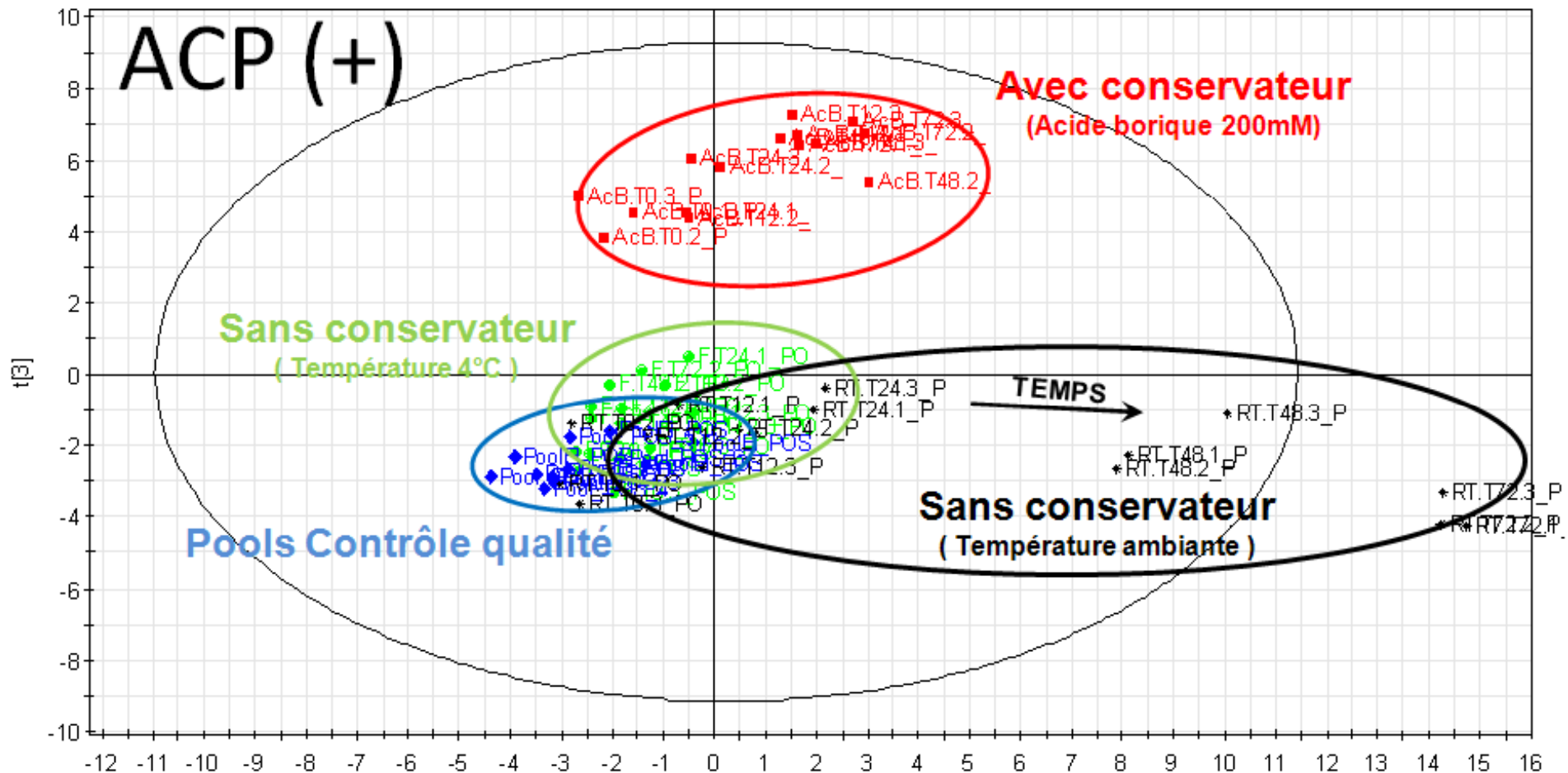


C. Evolution de la croissance bactérienne à froid (4°C)





Analyses statistiques multivariées



- Quels métabolites sont responsables de la clusterisation ?
- Quels métabolites sont liés à la croissance bactérienne ou l'instabilité en solution ?



Métabolites et contamination bactérienne

énergie atomique • énergies alternatives

Métabolites liés à la croissance bactérienne (observés en RMN)

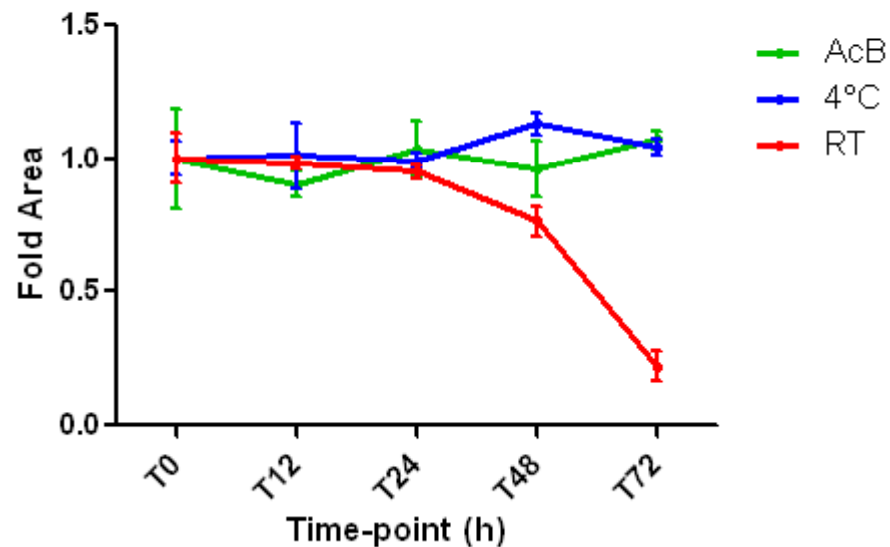
Metabolite	Variation attendue	Observation en MS + Mode d'ionisation	JUILLET 2010		SEPTEMBRE 2010		
			q.val ANOVA RT	q.val ANOVA 4°C	q.val ANOVA RT	q.val ANOVA 4°C	q.val ANOVA AcB
Acide benzoïque	↑	/	/	/	/	/	/
Créatine	↑	ESI(+)	ns	ns	0.0042 (↑T72)	ns	ns
Créatinine°	↓	ESI(+)	ns	ns	ns	ns	ns
Acid lactique	↑	ESI(-)	ns	ns	0.0285 (↑T48)	ns	ns
Acide citrique	↓	ESI(-)	ns	ns	0.0037 (↓T48)	ns	ns
Acide hippurique	↓	ESI(-)	ns	ns	ns	ns	ns
Acide succinique	↑	/	/	/	/	/	/
Acide malonique	↑	ESI(-)	/	/	0.0054 (↑T12)	ns	ns
Acide acétique	↑	/	/	/	/	/	/
Acide formique	↑	/	/	/	/	/	/
Triméthylamine	↑	/	/	/	/	/	/
Glycine	↑	/	/	/	/	/	/
Alanine	↑	(autre isomère)	/	/	/	/	/
Urée	↓	ESI(+)	ns	ns	ns	ns	ns



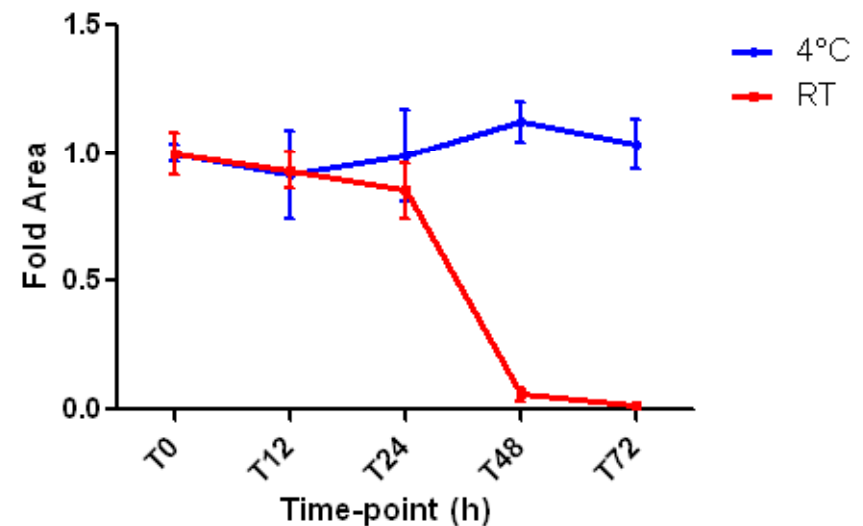
Métabolites et contamination bactérienne

- Métabolites qui varient à température ambiante mais ni à 4 C ni en présence de conservateurs :

3-indole carboxylic acid glucuronide



TMAO

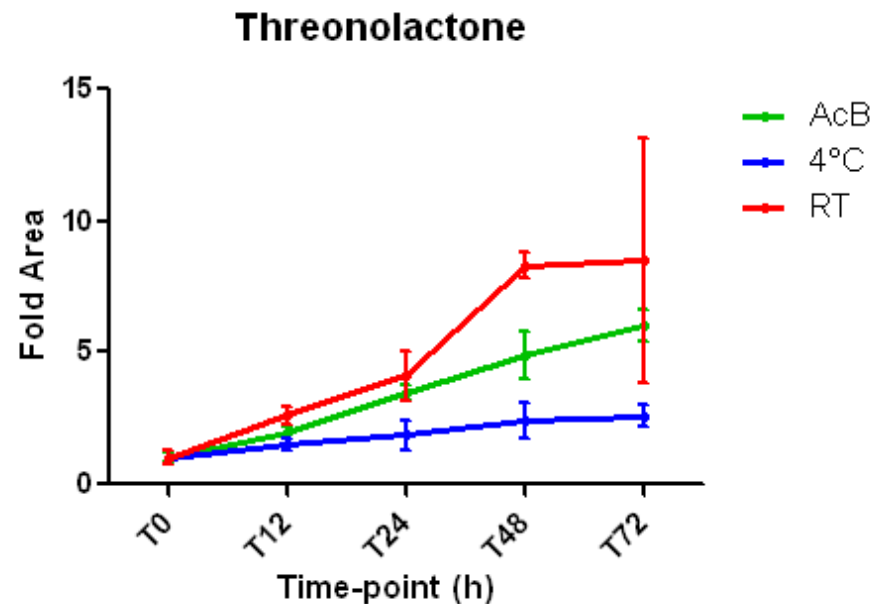
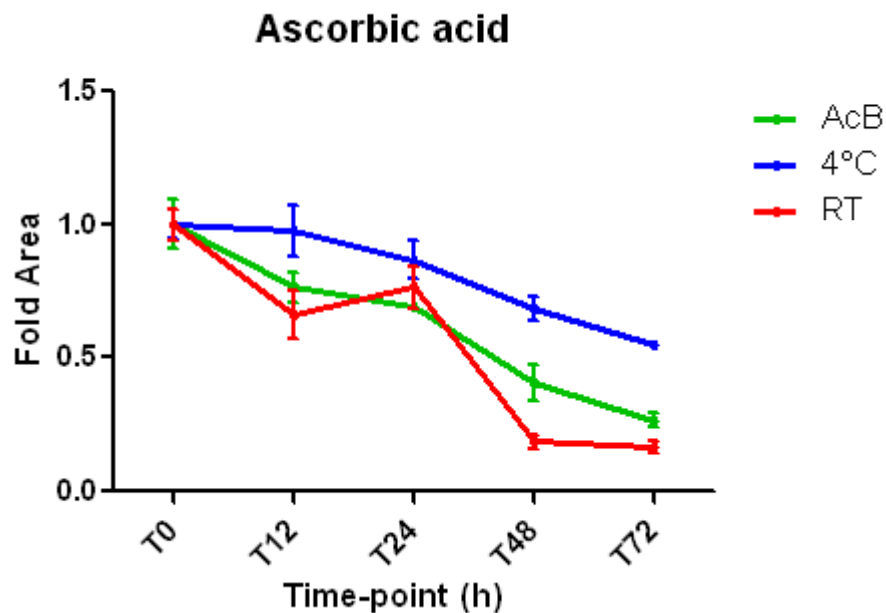


- Méthylguanosine, Diméthylguanosine, méthylinosine, Bétaine, choline... + d'autres non identifiés.



Métabolites et instabilité chimique

- Métabolites qui varient au cours du temps indépendamment de la croissance bactérienne :

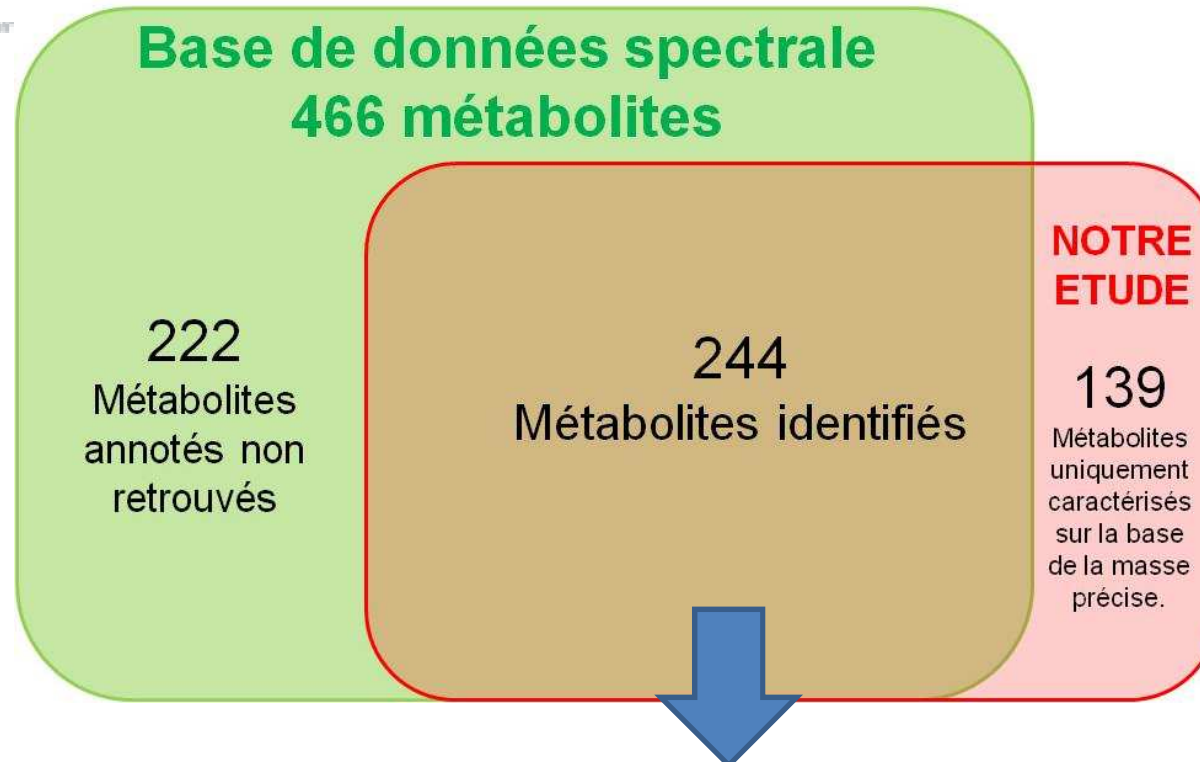


- L-Urobilinogène, L-Urobiline, acide α -kétoglutarique, acide pyruvique... + d'autres non encore identifiés.



Conclusion

énergie atomique • énergies alternatives



- 237 métabolites détectés (97%)
- 27 impactés (11%) par la croissance bactérienne, et 8 instables en solution (3.3%)
- Conditions idéales de prélèvement : à 4 C (sur glace)

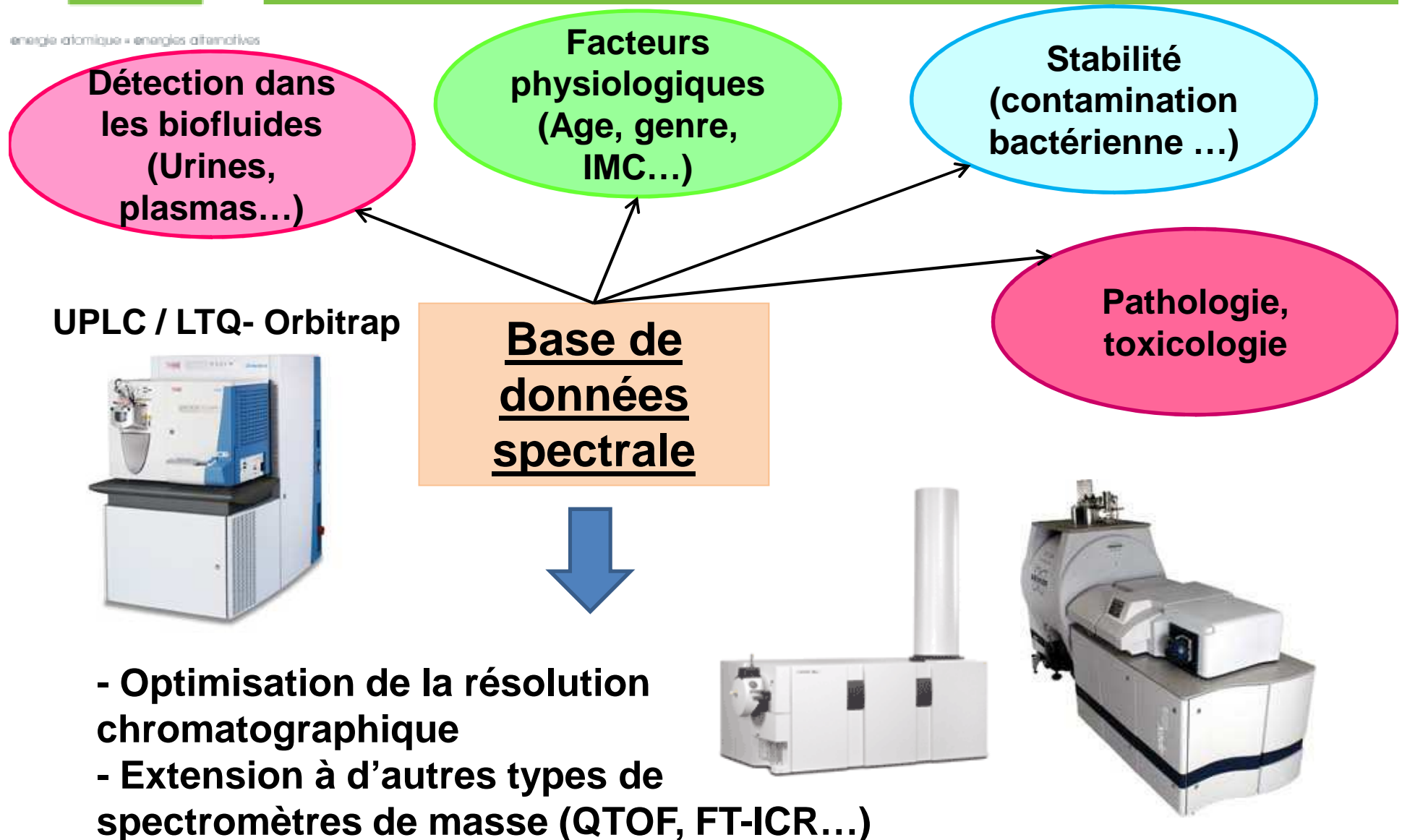


Conclusion et Perspectives : Construction d'une base de données relationnelle métabolomique



Base de données relationnelle

énergie atomique • énergies alternatives



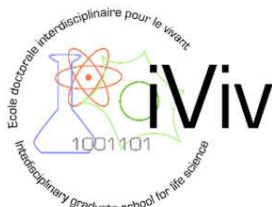


Remerciements

energie atomique • énergies alternatives



energie atomique • énergies alternatives



CEA/DSV/SPI/LEMM

Christophe CREMINON

Eric EZAN

Christophe JUNOT

Jean-François HEILIER

Ying XU

Marie-Françoise OLIVIER

Samia BOUDAH

Benoit COLSCH

Ainsi que l'ensemble du SPI

Ministère de la Défense

Délégation Générale pour l'Armement

L'ED interdisciplinaire du Vivant (iViv)

Germain TRUGNAN

Karine GHERDI

**Laboratoire de Chimie Structurale Organique
et Biologique (Paris 6, CNRS)**

Jean-Claude TABET

CEA/DSV/GIPSI

Arnaud MARTEL

Cyrille PETAT

Médecine du travail

Catherine BOURCIER

Xavier MILLOT

CEA/DRT/LIST/DCSI

Etienne THEVENOT