

La Métabolomique

Le mot métabolisme provient du grec (metabo-lismo), qui signifie “changement »

Concept du métabolisme par Ibn al-Nafis (1213–1288):

« Le corps et ses parties sont en état perpétuel de dissolution et de reconstitution, de sorte qu'ils subissent inévitablement un changement permanent »

Le métabolome

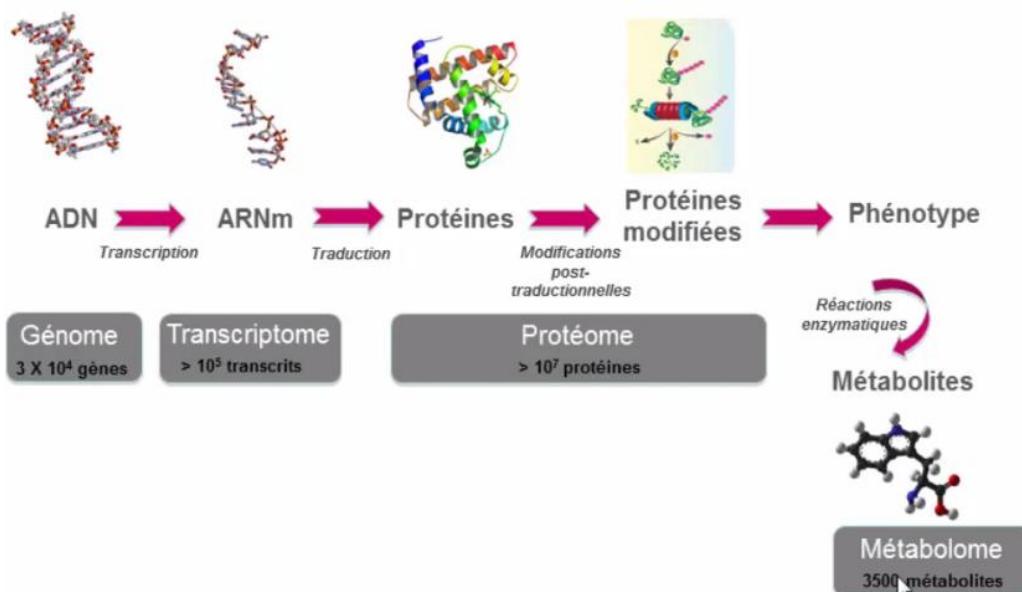
Métabolite

Petite molécule organique généralement <1500 Da détectable dans un organisme, incluant des molécules d'origine endogènes ou exogènes

Le Métabolome

Est un terme utilisé pour la première fois par Olivier et al en 1998 pour décrire *l'ensemble de métabolites synthétisés par un organisme à un instant donné*.

Du génome au protéome, au métabolome



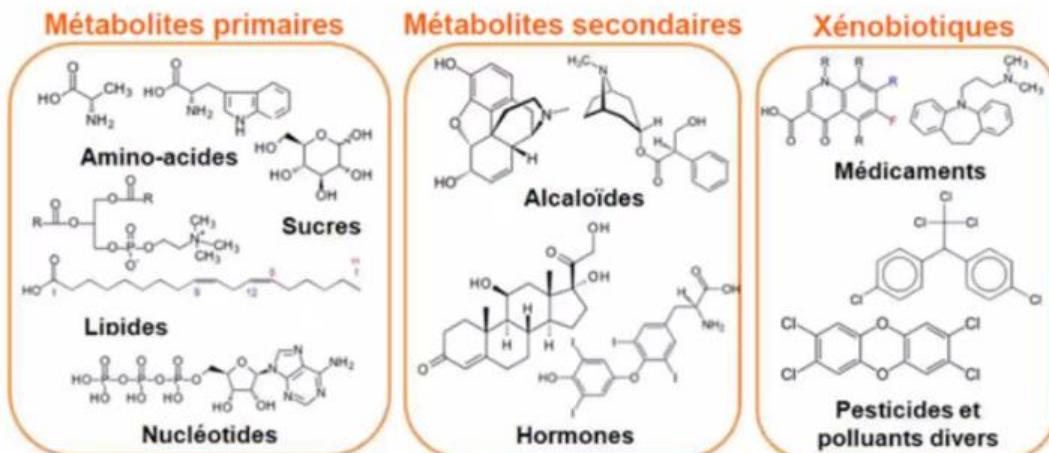
Le métabolome

Le métabolome se réfère aux:

- **Métabolites endogènes:** produits du métabolisme appelés « **endométabolome** », constitué de:
 1. *Métabolites issus du métabolisme primaire:* bien connu car essentiel au développement de l'organisme et commun à différentes espèces.
 2. *Métabolites issus du métabolisme secondaire:* plus complexe et spécifique aux espèces étudiées et à certaines fonctions secondaires.
- **Xénobiotiques:** substances chimiques exogènes retrouvés et parfois transformés dans un organisme appelés « **xénométabolome** »
- Le métabolome est donc un ensemble de métabolites de propriétés physicochimiques très variées (solubilité, volatilité, polarité) et un poids moléculaire compris entre 50 et 1500 Da couvrant une large gamme de concentration (picomole au millimole).

Métabolome

Le métabolome



Le métabolome

- Le métabolome s'agit de molécules connues dont beaucoup sont déjà dosées dans les milieux biologiques comme l'urée, le glucose, les hormones etc. et de molécules encore inconnues ou inexplorées.
- Le métabolome représente l'ultime réponse d'un organisme à une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou toute cause environnementale (variable)
- Le métabolome d'un système peut ainsi à la fois permettre de lire la signature biologique d'une réponse adaptive ou pathologique, et également être le vecteur de cette réponse. Ce dernier aspect souligne l'implication directe du métabolome dans le déterminisme des phénotypes

La métabolomique

La Métabolomique

- Représente l'analyse qualitative et quantitative complète et non sélective de l'ensemble ou d'un ensemble de métabolites présents dans un milieu ou un tissu biologique à un moment donné.
- La métabolomique est une prise d'empreinte rapide. Cette empreinte est la dernière étape dans la réponse moléculaire à un stimulus qui nous informe directement sur la nature finale de la molécule chimique qui intervient dans un processus physiopathologique
- La particularité de la métabolomique est l'analyse simultanée d'un très grand nombre de substances.

Le métabolomique

La Métabolomique consiste en :

- **L'identification et la quantification des différents métabolites** (métabolome) d'une population cellulaire afin d'améliorer les connaissances sur le lien entre génotype et phénotype
- L'identification et la quantification des métabolites exprimés dans les situations pathologiques et de les explorer et les comparer par rapport à des cas sains, dans le but d'investiguer le mécanisme et la réponse biologique à l'origine de la pathologie et l'identification des biomarqueurs
- Explique les variations des empreintes métaboliques en fonction des perturbateurs environnementaux

Pourquoi faire de la métabolomique?

- Plus de 95% des diagnostics médicaux sont réalisés par dosages de petites molécules (urée, glucose, créatinine, hormones.....)
- La grande majorité des médicaments utilisés sont des petites molécules.
- Les métabolites servent de co-facteurs à plusieurs milliers de protéines.
- Un grand nombre de maladies génétiques sont dues à un dérèglement dans le métabolisme des petites molécules.
- Elle donne une image du métabolisme à un instant t qui permet de comprendre les mécanismes du métabolisme.

L'analyse métabolomique : une approche chimiométrique

La métabolomique utilise des techniques de spectroscopie et des outils statistiques pour l'identification des métabolites significativement modifiés entre des groupes d'individus.

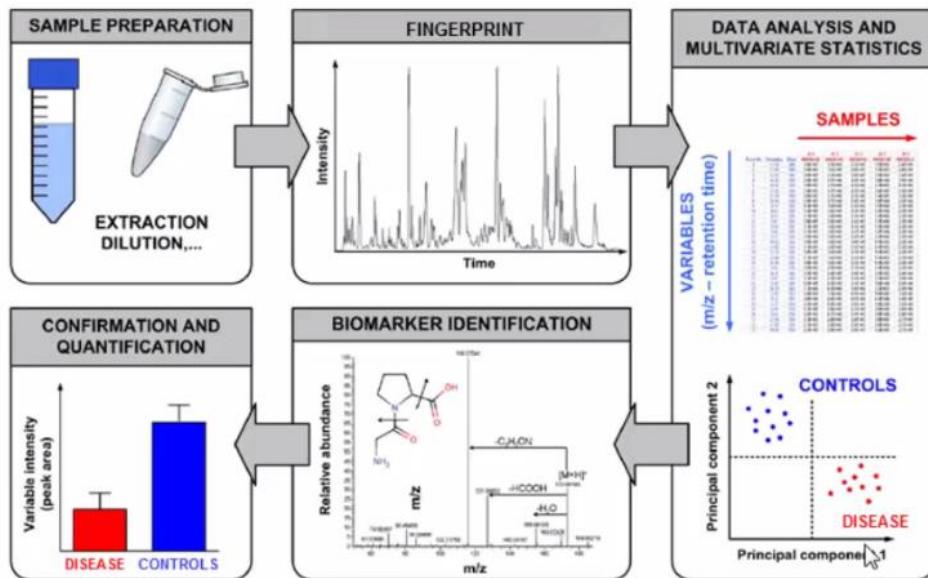
Il existe deux type d'approche **La métabolomique ciblée**

La métabolomique non-ciblée

La métabolomique ciblée permet de **quantifier** de manière très précise plusieurs métabolites dans un échantillon. Il est nécessaire de **connaître la structure des métabolites cibles**.

La métabolomique est surtout **une approche non-ciblée** qui correspond à une analyse globale de toutes les molécules présentes dans un échantillon (à des concentrations mesurables), incluant des molécules inconnues à l'heure actuelle.

Approches non-ciblées

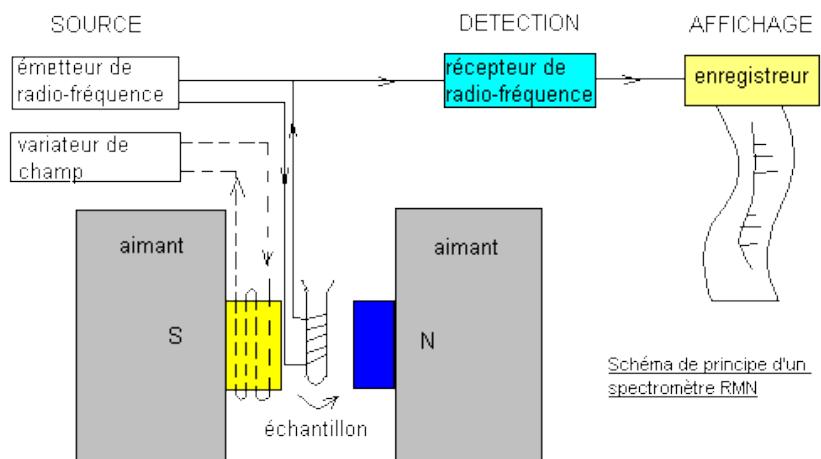


Techniques d'identification et de quantification

Les techniques spectroscopiques: la résonance magnétique nucléaire (**RMN**) et la spectrométrie de masse (**SM**) sont les techniques de choix utilisées pour l'identification et la quantification du métabolome.

Principe RMN

- La spectroscopie **RMN** utilise les propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique
- Elle consiste à observer les transitions entre 2 niveaux d'énergie très proches d'un noyau soumis à un champ magnétique



La résonance magnétique nucléaire (RMN)

Elle représente un outil fiable et rapide permettant l'élucidation des structures chimiques des molécules organiques et inorganiques

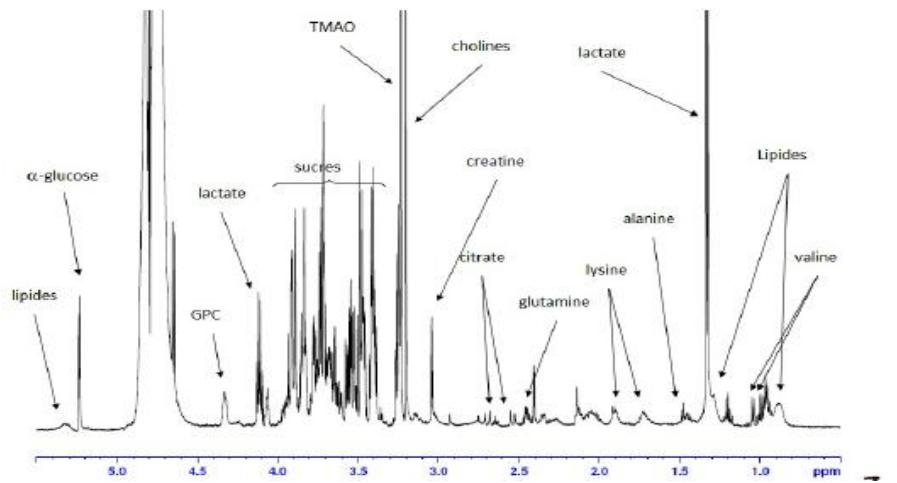
Avantages

- Méthode non-destructive (réutilisation possible de l'échantillon).
- Les échantillons analysés ne nécessitent pas de prétraitement important, tel qu'une extraction liquide-liquide, ni de séparation comme c'est le cas pour la chromatographie en phase liquide
- Peut être couplée à un outil puissant tel qu'un spectromètre de masse (aider l'élucidation de structures chimiques compliquées)

Inconvénients

Faible sensibilité (seules les molécules qui ont des concentrations élevées (10 µmoles/L) peuvent être analysées)

Spectre RMN



Le couplage chromatographie - spectrométrie de masse

- Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse fait appel à deux techniques analytiques:
- En premier lieu, une méthode séparative est employée. Il peut s' agir d'une chromatographie gazeuse (GC), d'une chromatographie liquide (LC) ou encore d'électrophorèse capillaire (CE).
- Le résultat de cette première étape est la séparation des composés (en termes de leur volatilité, leur hydrophobicité ou de leur charge respectivement).
- La seconde étape, consiste en l'introduction de ces substances dans un spectromètre de masse (MS).
- Ce dernier permet de mesurer la masse des molécules présentes, de les identifier mais également de calculer leur quantité avec une très grande précision

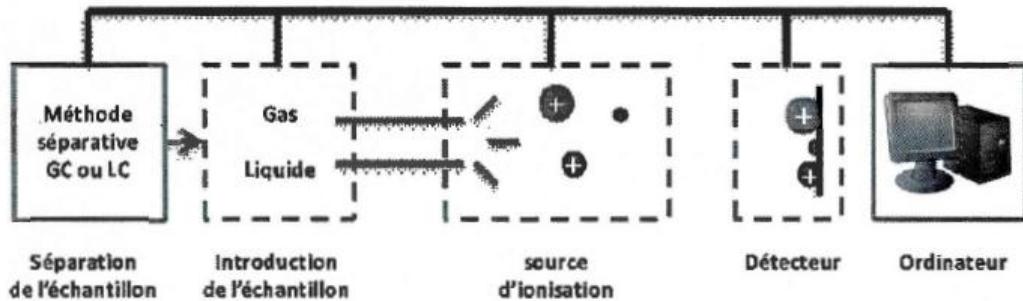


Figure 1.3. Schéma du fonctionnement du système de couplage chromatographie-spectrométrie de masse (Dunn, 2007).

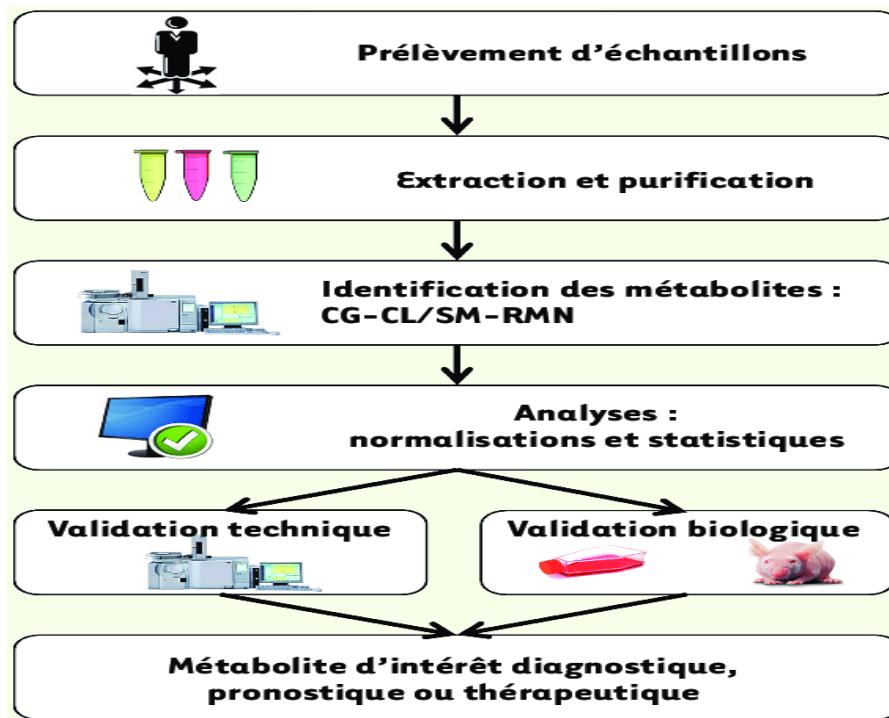
L'analyse métabolomique : une approche chimiométrique

Les résultats d'identification et de quantification du métabolome sont traités par des logiciels statistiques mono et multi variés.

La **chimiométrie** est donc l'utilisation de l'outil statistique, pour obtenir le maximum d'informations à partir de données physico-chimiques

La « chimiométrie » est une jeune discipline associant **initialement** analyse de données et chimie analytique. Aujourd'hui, il recouvre l'ensemble des applications de la chimie, de la physique, des sciences de la vie, de l'économie, de l'informatique.....

Aussi, on lui préfère souvent le terme moins restrictif (par rapport à la chimie) «**d'analyse multivariable** » (« multivariate analysis »),



Le parcours métabolomique

1. Le prélèvement de l'échantillon :

- Il s'agit d'une étape déterminante.
- Les conditions d'échantillonnage peuvent affecter le métabolome et biaiser les résultats de l'étude.
- Qu'il s'agisse de l'analyse de cellules ou de fluides biologiques, il est primordial de cesser toutes réactions métaboliques en cours en neutralisant l'activité enzymatique.
- Cette dernière transforme les métabolites (dégradation possible) et modifie leur concentration.
- L'arrêt du métabolisme est un moyen fiable de figer le métabolisme au temps du prélèvement.

Cette manipulation doit se faire très rapidement et peut être réalisée de deux manières différentes :

- en plongeant l'échantillon dans l'**azote liquide** ou,
- en ajoutant à l'échantillon du **méthanol à -40°C**.

Une attention particulière est apportée à la température de conservation des échantillons lors de leur traitement ou de leur stockage à long terme (à -80 °C) afin de prévenir toute dégradation.

2. L'extraction des métabolites (préparation des échantillons)

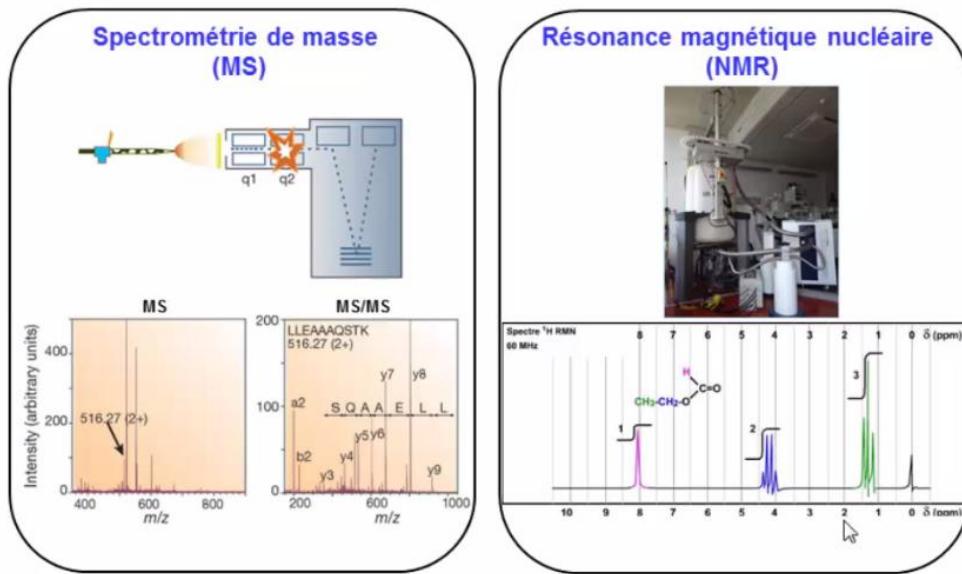
- De par leur nature non spécifique, les études **non ciblées** ne nécessitent pas énormément de prétraitement. Les échantillons peuvent être dilués ou subir une simple précipitation de protéines.
- Cette étape peut être un facteur limitant puisque de nombreuses études rapportent des phénomènes de co-précipitation de certains métabolites et de protéines
- Dans le cadre d'études **ciblées** où une classe de molécules est examinée, l'extraction implique l'emploi de différents solvants et de méthodes d'homogénéisation (mortier, sonde de sonication, etc.) des tissus biologiques.
- Ces manipulations sont aussi des sources possibles de variabilité en termes de nombre et de quantité de molécules extraites.

- La concentration des extraits par évaporation en prévision de l'analyse chimique.
- Les traitements pré-analytiques doivent être réalisés avec beaucoup de rigueur et d'assiduité afin d'assurer une bonne reproductibilité des résultats.

3. Le choix d'une technique d'analyse appropriée :

- Elle est réalisée par une ou par la combinaison de plusieurs méthodes analytiques telles que l'analyse RMN, LC-MS ou LC-MS/MS, par exemple.
- Elle est adaptée aux propriétés physicochimiques des molécules ciblées et facilite la validation des hypothèses de l'étude.

Techniques analytiques



4. L'analyse statistique

- Elle permet d'interpréter les résultats en mettant en évidence les différences et similitudes qui existent entre des conditions ou des états biologiques distincts.
- Ainsi, des biomarqueurs sont repérés et des voies métaboliques perturbées peuvent être identifiées et mieux comprises.
- Plusieurs logiciels sont disponibles pour effectuer ces analyses statistiques qui se divisent en deux catégories:
 - **L'analyse univariée** telle que le test *t*-student ne s'adresse qu'à une seule variable à la fois et sert essentiellement à lister les métabolites détectés
 - **Les analyses multivariées** sont plus appropriées. À titre d'exemple, l'analyse en composantes principales (ACP) permet de visualiser la distribution des métabolites et les discriminer en créant des groupes.
 - Ces regroupements résultent de similitudes entre les différents échantillons et aide à identifier des biomarqueurs.

Identification des métabolites par SM

La valeur de m/z :

Elle est le premier élément dans le processus d'identification des métabolites. Une bonne mesure de cette valeur est primordiale et c'est pour cette raison que les appareils utilisés pour les études métabolomiques permettent une mesure précise de cette valeur ($\Delta < 5$ ppm).

Elle permet de déterminer la formule brute du métabolite d'intérêt.

Exemple de la proline

$m/z = 115.06333$ avec une erreur de 5 ppm:

- deux possibilités $C_5H_9NO_2$ ou $C_3H_7N_4O$

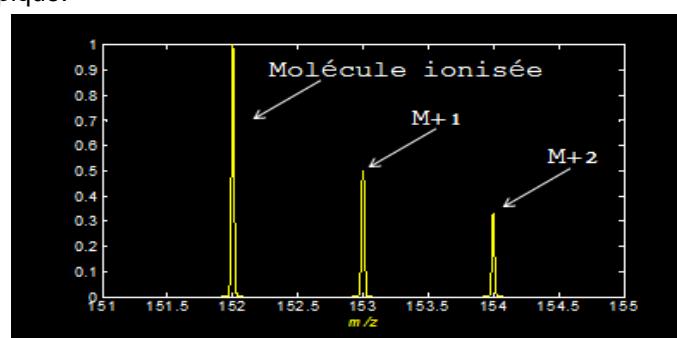
Attention!!!

Identification des métabolites par SM

Le spectre masse (SM)

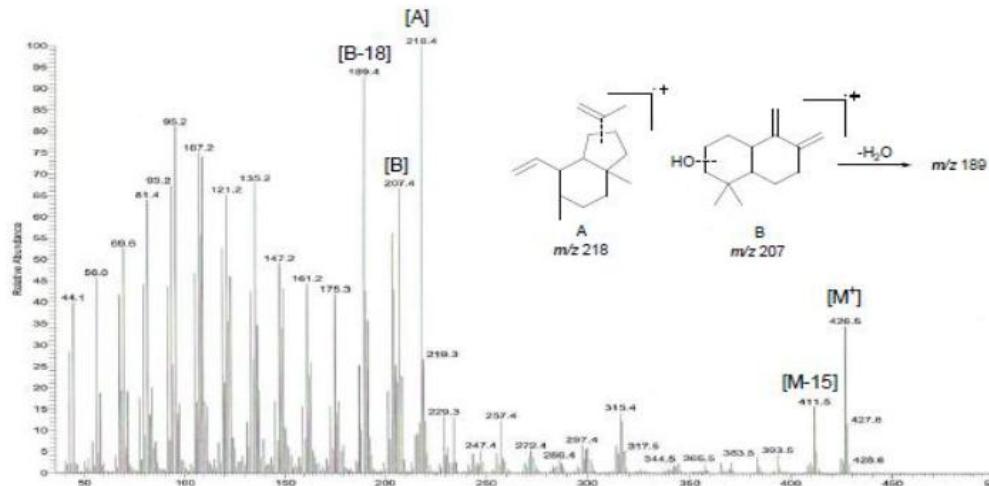
Plusieurs éléments sont visibles sur le spectre de masse:

- La valeur m/z de la molécule ionisée (en fonction du type et du mode d'ionisation utilisé)
- L'abondance isotopique (rapport des pics M , $M+1$ et $M+2$) qui définit le massif isotopique.



Exemple d'identification des métabolites par MS

- La mesure du spectre de masse en ionisation impact électronique (EI) en mode positif des triterpènes des feuilles de *Agauriak polyphylla* montre un ion à m/z 426 qui correspond à l'ion moléculaire M^+ .

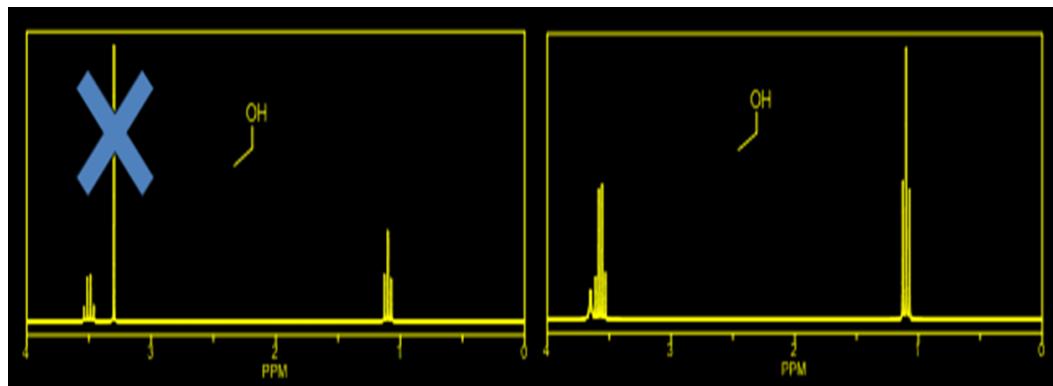


- Le spectre présente également des ions résultant de la fragmentation de la molécule et notamment l'ion B à m/z 207 qui est caractéristique des cycles A et B d'un triterpène.
- La perte par cet ion d'une molécule d'eau indique que les cycles A et B portent un groupement hydroxyle, très probablement en position 3 pour des raisons biogénétiques.

Identification des métabolites par RMN

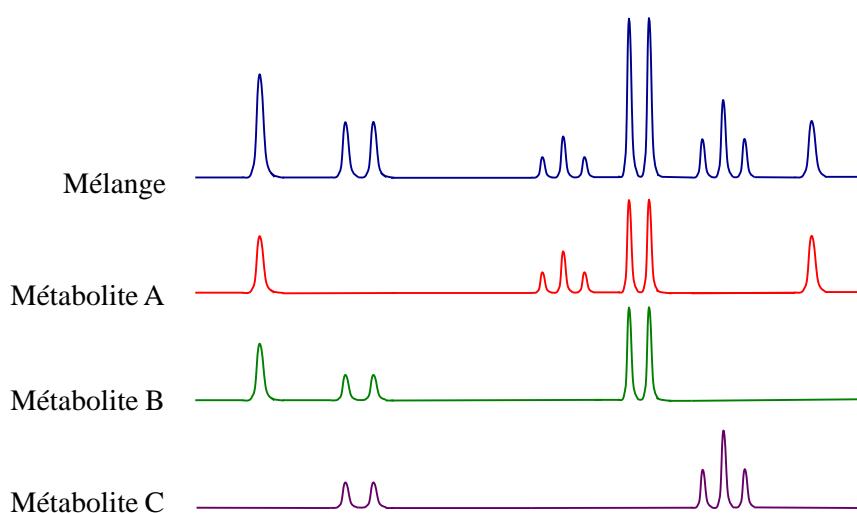
- Dans les données spectrales, les variables utilisées ne sont pas directement les métabolites mais des signaux, qui sont largement corrélés entre eux car pouvant appartenir à la même molécule.
- En RMN du proton, un signal présent à un déplacement chimique donné correspond à la quantité de proton ayant le même environnement chimique et est proportionnel à la concentration de la molécule à laquelle appartient le (ou les) proton(s) en question.
- Ce signal est donc corrélé à tous les autres signaux du spectre correspondant aux autres protons de la même molécule.
- L'identification des métabolites par RMN requiert l'utilisation d'une base de données (HMDB, nmrdb, nmrshiftdb2).

- Les valeurs de déplacements chimiques sont comparées avec les valeurs présentes dans les bases de données pour permettre l'identification.
- La RMN est une méthode quantitative, ce qui implique que tous les signaux d'un même métabolite doivent être présents sur le spectre. Cette propriété permet de discriminer des métabolites possédant des mêmes déplacements chimiques.



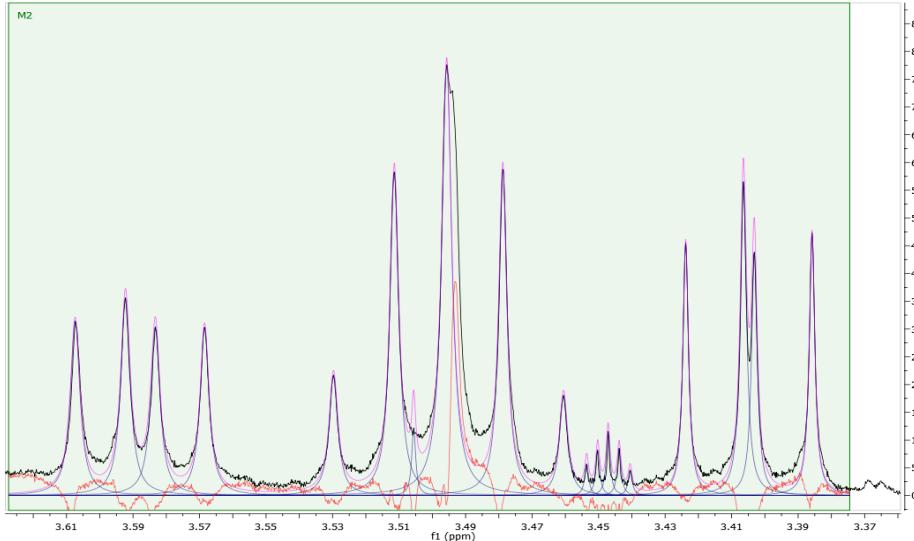
Identification des métabolites par RMN

L'étape clé de l'identification par RMN est la déconvolution du spectre.



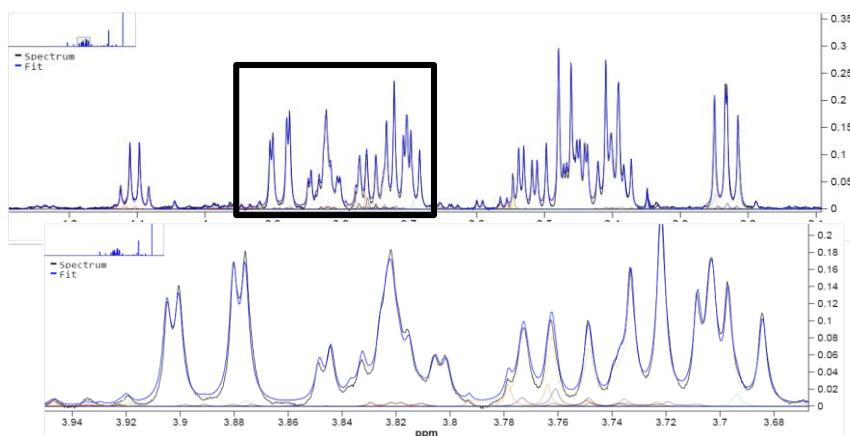
Identification des métabolites par RMN

La déconvolution consiste à déterminer la contribution de chaque métabolite sur le spectre observé.



Identification des métabolites par RMN

Exemple (réalisé avec Bayesil):



Il est ainsi possible de quantifier un grand nombre de métabolites présents dans l'échantillon.

Facteurs de variations des empreintes métabolomiques chez l'homme

Le métabolome étant le reflet du fonctionnement d'un organisme, on peut s'attendre à ce qu'un certain nombre de caractéristiques individuelles liées au style de vie et à la physiologie aient des conséquences directes sur les profils métaboliques des individus.

Les principaux facteurs intervenant dans la variation du métabolomes chez l'homme est :

➤ **Alimentation**

➤ **Le style de vie:** le tabagisme (modifications des acides amines et glycerophospholipides sériques), la consommation d'alcool (impact sur le métabolisme lipidique) , ou encore l'activité physique (augmentation des concentrations sériques des acides amines)

➤ **Les origines culturelles et l'ethnie :** consommation du porc, l'alcool, les OGM....ect

➤ **Les caractéristiques génotypiques:** mis en lien avec des pathologies ou des facteurs de risques (évaluation de la fonction rénale, diabète, pathologies cardiovasculaires)

➤ **L'âge**

➤ **Le sexe**

➤ **L'IMC**

Les empreintes métaboliques peuvent être réalisées sur tout type de liquides, de cellules ou de tissus organiques (sang, urines, salive, biopsie, sperme...)

Applications de la métabolomique

Sont très nombreuses, essentiellement:

- **En nutrition:** pour connaître les qualités nutritives des aliments, en biologie végétale; pour étudier les phénomènes d'adaptation
- **En agronomie:** notamment pour l'étude des variétés de cultivars et plus récemment en sécurité alimentaire, en particulier pour l'étude des plantes transgéniques
- **En pharmacologie:** pour le screening de la toxicité de nouvelles molécules
- **En recherche clinique:** dans l'identification de nouveaux biomarqueurs
- **En toxicologie:** en matière de santé environnementale (étude des expositions à des contaminants environnementaux plus ou moins représentatifs des expositions humaines)

Utilité de la métabolomique en santé environnementale (application actuelle)

La métabolomique en santé environnementale, permet de conclure l'intérêt de cet outil à la fois pour:

- **Identifier des biomarqueurs:** d'exposition complexes directement sur des populations humaines.
- Pour suggérer des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la genèse des pathologies environnementales.
- Elle est fondée sur l'analyse des résultats des expérimentations toxicologiques et des études épidémiologiques. Ces deux stratégies apportent des éléments complémentaires en raison de leurs avantages respectifs : expositions contrôlées chez l'animal, permettant de réduire la variabilité inter- et intra-individuelle, définition de groupes d'exposition contrastée chez l'homme, permettant d'évaluer directement des expositions complexes à faibles doses.

Utilité de la métabolomique en santé environnementale (application actuelle)

L'étude des conséquences biochimiques d'expositions environnementales complexes reste un challenge (épreuve périodique) qui nécessite la mise en œuvre de protocoles pertinents prenant en compte les facteurs de confusion éventuels. Ainsi, le choix des populations d'étude, les stratégies d'échantillonnage, les conditions de stockage des échantillons, et les outils statistiques utilisées méritent d'être étudiés avec attention.