

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE PROFILAGE MÉTABOLOMIQUE
SEMI-CIBLÉE DES MÉTABOLITES ENDOGÈNES CHEZ C. ELEGANS PAR
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE
MASSE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
YASMIN BOUKHEDIMI

JANVIER 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À mon père,

À ma mère,

À Mounir et Sarah,

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à ma directrice de mémoire Madame Lekha Sleno, qui m'a confié ce travail de recherche au sein de son laboratoire, pour les conseils prodigués et sa réactivité tout au long de cette expérience enrichissante. Je remercie également, Madame Sarah Jenna co-encadrante de ce travail, pour sa disponibilité et son aide.

J'adresse des remerciements tout particuliers à Monsieur André LeBlanc, collègue et ami, pour ses conseils, son appui ainsi que son aide tout au long de ma maîtrise.

Je remercie Madame Isabelle Marcotte et Monsieur Alex Parker, mes correcteurs pour la patience et tout l'intérêt porté dans la lecture de ce présent mémoire.

Je remercie mon université, le personnel pédagogique et professionnel pour tout le soutien et pour m'avoir guidée, dans le domaine de la biochimie et de la spectrométrie de masse.

Je remercie tous ceux qui de loin ou de près ont participé à la réalisation de ce mémoire.

Je remercie ma famille pour son soutien indéfectible.

Je vous remercie de m'avoir soutenue, encouragée dans les moments les plus difficiles de cette expérience qui s'achève et qui m'ouvre des horizons infinis.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations, sigles et acronymes	xi
Liste des symboles et des unités.....	xiv
Résumé	xv
CHAPITRE I	
MISE EN CONTEXTE	1
1.1 La métabolomique.....	1
1.2 Le métabolome	2
1.3 Les approches en métabolomique	4
1.4 Les aspects théoriques des différentes méthodes analytiques	5
1.4.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN).....	6
1.4.2 Le couplage chromatographie - spectrométrie de masse.....	6
1.4.3 Les caractéristiques des analyseurs	13
1.5 Le déroulement d'une étude métabolomique	21
1.6 Introduction de l'étude.....	24
1.7 La méthode d'analyse	25
1.8 Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> comme modèle biologique....	31
1.9 La sclérose amyotrophique latérale (SLA)	32
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	35
Matériel.....	35
1.11 Culture cellulaire	35
1.12 COPAS Biosort	35
1.13 Extraction, dérivation et analyse LC-MS.....	35
1.14 Souches de <i>C. elegans</i>	36
Méthodes	36

1.15	Culture de <i>C. elegans</i>	36
1.15.1	Préparation du milieu agar NGM	36
1.15.2	Milieu M9	37
1.15.3	Solution de synchronisation.....	37
1.15.4	Synchronisation des cultures de <i>C. elegans</i>	37
1.15.5	Conditions de culture de <i>C. elegans</i>	37
1.15.6	Prélèvement de <i>C. elegans</i>	38
1.15.7	Comptage automatique au Copas Bisort.....	38
1.16	Arrêt du métabolisme	39
1.17	Extraction des métabolites acides (vers comptés manuellement).....	39
1.17.1	Extraction liquide-liquide	39
1.17.2	Extraction par sonication	39
1.17.3	Extraction par mortier et pilon à l'éthanol (80°C).....	40
1.17.4	Extraction par billes	40
1.18	Méthode de dérivation	41
1.18.1	Optimisation du pH de l'étape d'activation des acides	41
1.18.2	Test d'optimisation de la température de la réaction de dérivation.	42
1.18.3	Test d'optimisation du temps de la réaction de dérivation	42
1.18.4	Réaction de dérivation optimisée.....	42
1.19	Validation de la méthode (acides standards)	42
1.20	Analyse des extraits non dérivés (vers comptés manuellement).....	43
1.21	Détection et quantification relative des métabolites acides de la souche TDP-43[A315].....	43
1.22	Comparaison des niveaux des métabolites acides identifiés dans la souche TDP-43[A315] avec les niveaux dans la souche contrôle TDP- 43 et sauvage (N2)	43
1.23	Évaluation et optimisation de la méthode d'extraction des métabolites acides endogènes (2500 vers/tube comptés au COPAS Biosort)	44

1.24	Évaluation de la méthode d'extraction des métabolites connus (2500 vers/tube comptés au COPAS Biosort).....	44
1.25	Quantification relatives des métabolites connus (2500 vers/tube comptés au COPAS Biosort).....	44
1.26	Analyse LC-MS et LC-MS/MS.....	44
1.26.1	Méthode 1	45
1.26.2	Méthode 2	45
1.26.3	Méthode 3	47
1.27	Analyse de données.....	47
CHAPITRE III		
RÉSULTATS ET DISCUSSION		
2 Optimisation de la réaction de dérivation.....		48
2.1	Concentrations des réactifs	49
2.1.1	Optimisation de l'étape d'activation des acides	50
2.1.2	Optimisation du pH de l'étape d'activation des acides	51
2.1.3	Optimisation de la température de réaction.....	54
2.1.4	Optimisation du temps de réaction	56
2.1.5	Conditions optimisées de la réaction de dérivation	57
2.2	Avantages de la dérivation en chromatographie liquide à phase inverse .	59
2.3	Caractéristiques chromatographiques des paires isotopiques.....	61
2.4	Caractéristiques spectrales des paires isotopiques	63
2.5	Validation de la méthode.....	64
2.6	Extraction des métabolites	68
2.6.1	Optimisation du solvant d'extraction	68
2.6.2	Évaluation de la méthode d'homogénéisation des tissus	71
2.7	Quantification relative des métabolites détectés chez la souche mutante TDP-43	74
2.7.1	Précision de la méthode.....	76
2.8	Concentrations relatives des métabolites dans les extraits de la souche mTDP-43	78

2.9	Évaluation de l'efficacité d'extraction	82
2.10	Évaluation de la reproductibilité d'extraction de métabolites connus	86
2.11	Quantification relative de métabolites connus.....	87
2.12	Identification de métabolites endogènes	91
CHAPITRE IV		
	CONCLUSION	94
	RÉFÉRENCES	97

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Schéma de la hiérarchie des sciences «omiques».....	2
1.2. Schéma des différentes approches et techniques analytiques employées en métabolomique.....	4
1.3.Schéma du fonctionnement du système de couplage chromatographie- spectrométrie de masse.	7
1.4. Schéma du fonctionnement de la source d'ionisation par électrospray (ESI)	11
1.5. Principe du temps de vol dans un analyseur de type linéaire.....	15
1.6. Analyseur de masse de type quadripôle	16
1.7. Analyseur de masse de type QqTOF	19
1.9. Illustration du principe de marquage isotopique et de quantification relative.	30
1.10. Construction du modèle transgénique de TDP-43 [A315T]..	33
2.1. Mécanismes de dérivation des métabolites carboxyliques.....	49
2.2. Effet du pH acide sur la réaction de dérivation des acides..	51
2.3. Effet du pH neutre sur la réaction de dérivation des acides.....	52
2.4. Effet du pH basique sur la réaction de dérivation des acides.....	53
2.5. Effet de la température sur la réaction de dérivation des acides.....	55
2.6. Évaluation de la dérivation des acides en fonction du temps.....	57
2.7. Réaction optimisée de la dérivation des acides par l'aniline.	58
2.8. Comparaison de la séparation d'acides non dérivés et dérivés.	60
2.9. Chromatogrammes d'ions extraits.....	62
2.10. Spectres de masse d'ions extraits.	64
2.11. Graphique log/log de corrélation des valeurs théoriques et expéri-mentales des ratios isotopiques..	66
2.12. Chromatogrammes du courant total ionique (TIC) en mode positif des extraits non dérivés..	69

2.13. Nombres de métabolites détectés en fonction du solvant d'extraction.	71
2.14. Chromatogrammes du courant total ionique (TIC) en mode positif comparatif des méthodes d'extraction	73
2.15. Graphique de corrélation (log/log) des métabolites endogènes présents dans la souche mutante mTDP-43.....	77
2.16. Concentrations relatives des métabolites détectés dans les extraits de la souche mTDP-43.....	80
2.17. Comparaison des concentrations relatives des métabolites présents dans la souche mutante (TDP-43) et sauvage (N2)	81
2.18. Évaluation de l'efficacité d'extraction de deux solvants et méthodes d'extractions différentes.....	83
2.19. Évaluation de la précision des ratios isotopiques dans les extraits la souche sauvage (N2).	84
2.20. Spectres ESI-MS/MS de la fragmentation du tryptophane dérivé en mode positif.	92
2.21. Spectres ESI-MS/MS de la fragmentation de l'acide fumarique dérivé en mode positif.....	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1. Quantification relative 15 acides standards.....	67
3.2. Résumé des métabolites détectés dans la souche mutante (mTDP-43).....	75
3.3. Évaluation de l'efficacité de l'extraction de métabolites sélectionnés dans les extraits de la souche sauvage (N2).....	87
3.4. Quantification relative de métabolites sélectionnés dans les extraits de la souche sauvage (N2).....	90

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AC	Courant alternatif
ACN	Acétonitrile
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (<i>atmospheric-pressure chemical ionization</i>)
APPI	Photoionisation à pression atmosphérique (<i>atmospheric-pressure photoionization</i>)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans
CE	Énergie de collision (<i>Collision energy</i>)
CES	Intervalle de l'énergie de collision (<i>collision energy spread</i>)
CID	Dissociation induite par collision (<i>collision-induced dissociation</i>)
CV	Coefficient de variation
DBS	Soustraction dynamique du bruit de fond (<i>dynamic background subtraction</i>)
Dc	Courant continu (<i>direct current</i>)
DIMS	Spectrométrie de masse par infusion directe (<i>direct infusion mass spectrometry</i>)
DP	Différence de potentiel
ELL	Extraction liquide-liquide
EI	Ionisation par impact électronique (<i>Electron ionization</i>)
ESI	Ionisation par électro-nébulisation (<i>Electrospray Ionisation</i>)
EtOH	Éthanol
FT-ICR	Résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>)
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GC	Chromatographie gazeuse (<i>gas chromatography</i>)

GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (<i>gas chromatography</i>)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HILIC	chromatographie à interaction hydrophile (<i>hydrophilic interaction chromatography</i>)
HMDB	Base de données du métabolome humain (<i>The Human Metabolome Database</i>)
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinity Tags</i>
IDA	<i>Independent dynamic acquisition</i>
IP	Iodure de propidium
ITRAQ	<i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
KE	Énergie cinétique
L	Longueur du tube à temps de vol
LC	Chromatographie liquide (<i>liquid chromatography</i>)
LC-ESI-MS	Chromatographie liquide par électro-nébulisation couplée à la spectrométrie de masse (<i>liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry</i>)
MeOH	Méthanol
METLIN	METabolite <i>LINK</i> (bases de données en métabolomique en ligne)
MS	Spectrométrie de masse (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (<i>tandem mass spectrometry</i>)
NLS	Domaine de localisation nucléaire (<i>nuclear localization domain</i>)
N-TERM	Domaine N-terminale (fonction amine libre d'une protéine)
N2	Souche sauvage de <i>C. elegans</i>
Q	Quadripôle
QqQ	Triple quadripôles

QqTOF	Spectromètre de masse hybride de type quadripôles-temps de vol (<i>hybrid quadrupole time of flight mass spectrometer</i>)
Rf	Radiofréquence (Radio frequency)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RRM	Motif de reconnaissance de l'ARN (<i>RNA recognition motif</i>)
RPLC	Chromatographie liquide à phase inverse (<i>Reverse phase liquid chromatography</i>)
SLA	Sclérose amyotrophique latérale (<i>amyotrophic lateral sclerosis</i>)
TDP-43[A315T]	Souche mutante de <i>C. elegans</i> de la sclérose amyotrophique latérale
TDP-43wt	Souche mutante contrôle de la sclérose amyotrophique latérale
TOF	Temps de vol (<i>Time Of-Flight</i>)
UPLC-MS	Chromatographie liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

°C	degrés Celsius
Micro (μ)	10^{-6}
Atto (a)	10^{-18}
cps	nombre d'ions qui frappent le détecteur par secondes
Da	Dalton
I	intensité du courant
Kilo (k)	10^3
M	moles/litres
Milli (m)	10^{-3}
m/z	m , étant la masse de l'ion et z , son nombre de charges électriques
min	minutes
mol	mole
Pico (p)	10^{-12}
ppm	parties par millions
psi	unité de pression (<i>pound per square inch</i>)
V	Volts
s	secondes

RÉSUMÉ

Le principal objectif de notre étude est d'établir un profil métabolomique chez le nématode *C. elegans*. La métabolomique est une science émergente qui implique la comparaison entre le métabolome (ensemble des métabolites d'un organisme) d'un contrôle et d'un état biologique différent. L'observation des changements métaboliques permet une meilleure compréhension des processus biologiques par l'identification de biomarqueurs impliqués dans des voies de signalisation spécifiques. Le nématode *C. elegans* est un système modèle présentant de nombreux attraits tel que son mode de reproduction hermaphrodite (réduction de la variabilité génétique) ou encore la collection de mutants disponibles. Notre méthode est basée sur l'étiquetage isotopique différentiel des métabolites carboxyliques. L'aniline ($^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$) est utilisée comme agent de dérivation pour améliorer la détection, l'identification ainsi que la quantification. Afin de développer notre méthode analytique, premier objectif de l'étude, nous avons employé la souche sauvage (N2) lors de l'optimisation de la méthode de prétraitement des échantillons et de dérivation des extraits. L'extraction des métabolites à l'aide d'éthanol chaud et d'un broyeur de type *Bead beater* a permis d'extraire le plus grand nombre de métabolites avec une bonne reproductibilité. Par la suite, une réaction de dérivation permet le marquage des métabolites acides par l'aniline ($^{12}\text{C}_6$ ou $^{13}\text{C}_6$). Les extraits dérivés ont été mélangés dans des ratios connus ($^{12}\text{C}_6:^{13}\text{C}_6$) afin de valider la méthode de quantification relative des métabolites. Pour réaliser le second objectif de cette étude, nous avons procédé au profilage métabolomique de la souche TDP-43[A315T], modèle transgénique de la sclérose en plaque amyotrophique latérale (SLA). Les extraits de la souche mutante et son contrôle TDP-43wt ont été dérivés séparément puis assemblés dans un ratio de 1:1 (aniline $^{12}\text{C}_6:^{13}\text{C}_6$), respectivement. La même approche fut appliquée pour la souche contrôle du mutant et la souche sauvage, afin de s'assurer que les changements observés sont dûs à la maladie et non à l'introduction de la mutation chez les vers. La séparation des métabolites a été effectuée par chromatographie liquide en phase inverse. La détection des métabolites a été réalisée par un spectromètre de masse à haute résolution de modèle TripleTOF5600 d'AB Sciex (muni d'un analyseur hybride quadripôle-temps de vol). Cette méthode a permis la détection de 42 métabolites endogènes dans la souche mutante parmi lesquelles 2 métabolites (m/z 205.10 et 206.08) présentant un niveau 3 fois inférieur à leur niveau dans la souche contrôle mutante et sauvage. Ces métabolites qui constituent des biomarqueurs potentiels de la SLA sont en cours d'identification et feront l'objet de futures investigations.

Mots clés : métabolomique, *C. elegans*, étiquetage isotopique différentiel, TDP-43

CHAPITRE I

MISE EN CONTEXTE

1.1 La métabolomique

L'avènement de la génomique au milieu des années 90 a fait basculer la biologie moléculaire dans une ère nouvelle. Cet incroyable bond en avant, qui débuta par le séquençage du premier génome en 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995), allait révolutionner le monde de la recherche scientifique tel qu'on le connaissait et changer incontestablement notre compréhension du vivant. Dès lors, le produit des gènes prenait un sens nouveau et suscitait un intérêt grandissant. Petit à petit, les sciences « omiques » faisaient leur apparition sur la scène scientifique et s'imposaient comme des outils précieux de l'étude globale des systèmes biologiques. La métabolomique est une science "omique" relativement jeune qui occupe une place particulière au sein de cet ensemble. Étant le plus en aval du génome, cette science analytique est complexe et comprend différentes classes de molécules (Figure 1.1). Contrairement à la protéomique qui s'intéresse à l'étude des protéines, la métabolomique se consacre aux produits des réactions métaboliques et se distingue par la grande diversité des propriétés physicochimiques des molécules. Cette méthode d'analyse se concentre sur l'identification et la quantification des métabolites (produits du métabolisme) d'un système biologique sous des conditions données (Dunn *et al.*, 2010). Étant une mesure quantitative de la réponse métabolique, elle se veut être une image figée dans le temps et un rapport fidèle des bouleversements qui se produisent au sein de l'organisme analysé. La métabolomique offre une vue globale et intégrée des

perturbations biologiques dans le but de découvrir des biomarqueurs qui d'une part permettront une meilleure compréhension des pathologies en identifiant les voies métaboliques impliquées (Dunn *et al.*, 2012) mais qui d'autre part, représentent aussi l'espoir d'un diagnostic précoce des maladies.

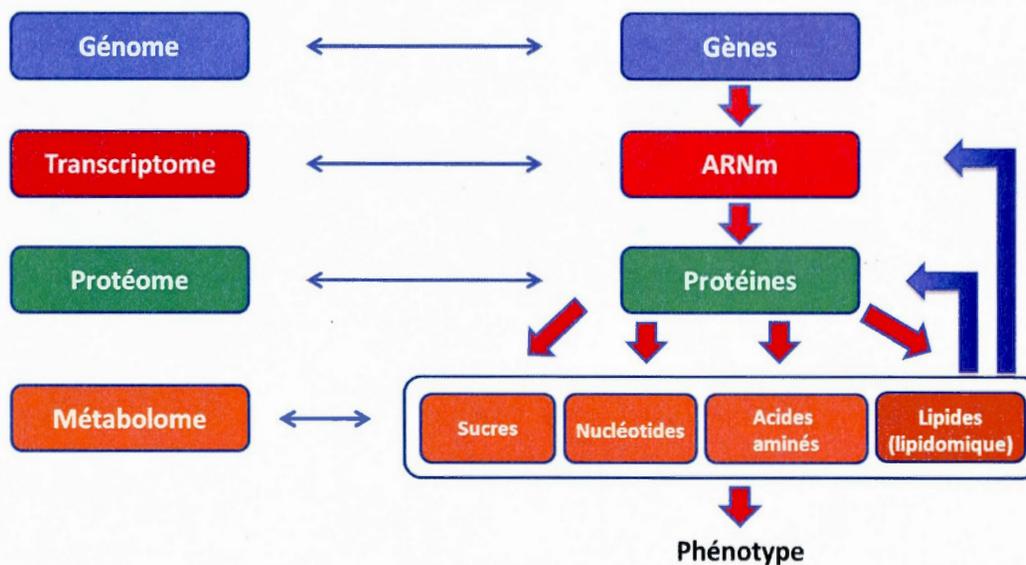


Figure 1.1. Schéma de la hiérarchie des sciences « omiques » (Dunn *et al.*, 2010).

1.2 Le métabolome

Le métabolome est constitué de milliers de métabolites organiques endogènes de faible poids moléculaire provenant des tissus ou fluides biologiques (sang, urine, salive) analysés (Wu *et al.*, 2008). Comme précédemment mentionné, ce dernier est extrêmement varié et est composé d'intermédiaires métaboliques, d'hormones et autres molécules de signalisation. Il couvre une très grande gamme de biomolécules

ayant des propriétés chimiques très différentes tels que les sucres, les acides, les bases, les acides aminés ou encore les lipides (Junot, 2010) (Figure 1.1). La taille du métabolome varie selon les espèces et à titre d'exemple, celui du règne végétale est estimé à environ 200 000 métabolites (Weckwerth, 2003). En comparaison, le métabolome humain est, quant à lui, évalué à environ 6500 métabolites (Dunn *et al.*, 2010). Il concerne toutes les molécules de poids moléculaire possédant une masse inférieure à 1500 Da (Hollywood *et al.*, 2006). La variabilité du métabolome ne se résume pas aux différences entre espèces mais est observée au sein d'une même espèce puisque ce dernier est dynamique et change dans le temps. La variabilité biologique résulte d'une combinaison de plusieurs facteurs tels que : l'environnement, le régime alimentaire, le stress, le sexe ou encore l'âge (Reinke *et al.*, 2010). Ces fluctuations métaboliques propres à chaque individu constituent l'une des limitations majeures des études en métabolomique. Il est recommandé d'apporter une attention rigoureuse quant au choix de contrôles appropriés afin que les résultats d'une étude ne soient pas biaisés et soient fiables. Astreindre un groupe d'individus au jeûne antérieurement à la collecte d'échantillons représente un moyen de réduire ce type de variations (Dunn *et al.*, 2005). L'augmentation du nombre d'échantillons examinés représente également un bon moyen de diluer ces variabilités biologiques individuelles et de mettre en évidence les véritables fluctuations du métabolisme. La variabilité analytique est un autre élément qui dissimule les phénomènes étudiés (Dunn *et al.*, 2010). Elle découle de l'instrumentation qui varie en fonction des conditions analytiques telle que le temps de rétention, par exemple. Elle reste tout de même moins importante que la variabilité biologique (Dunn *et al.*, 2005). Elle est corrigée par l'introduction de standards internes qui rectifient la fluctuation des mesures engendrées par cette dérive instrumentale.

Une autre difficulté concerne les quantités des biomolécules présentes dans les extraits biologiques. Cette dernière rend la quantification (relative ou absolue) des

métabolites assez ardue puisque l'intervalle de concentrations des molécules s'échelonne sur plusieurs ordres de magnitude et comprend des concentrations allant des picomolaires jusqu'à quelques millimoles (Dunn *et al.*, 2005). Cette grande diversité de structures et de quantités au sein des molécules constitue un défi de taille pour les différentes techniques analytiques employées en métabolomique.

1.3 Les approches en métabolomique

La variabilité du métabolome a conduit à la création de plusieurs stratégies d'analyses. L'approche préconisée découle essentiellement des objectifs de l'étude. On distingue deux principales approches en métabolomique : l'étude ciblée et l'étude non ciblée (Figure 1.2)

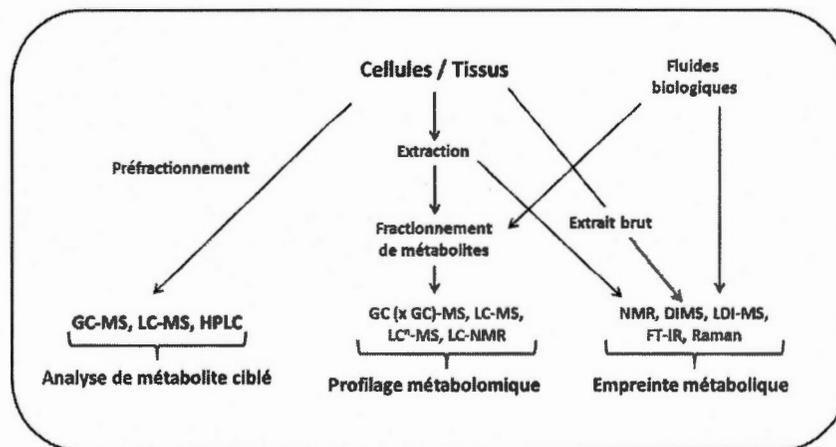


Figure 1.2. Schéma des différentes approches et techniques analytiques employées en métabolomique (Hollywood *et al.*, 2006).

L'approche ciblée est généralement employée lorsque les molécules étudiées sont connues. S'ensuit alors le développement de méthodes d'extractions et d'analyses sur

mesure s'adressant spécifiquement à cette classe de molécules. Ce type d'étude permet de vérifier une hypothèse ou d'explorer une voie métabolique donnée comme, par exemple, le métabolisme des lipides dans un état biologique spécifique (Hollywood *et al.*, 2006). L'approche non ciblée est un profilage global des métabolites constituant ce qu'on désigne par l'empreinte métabolique (Dunn *et al.*, 2012). Il s'agit là, d'une énumération de molécules connues ou inconnues présentes dans un échantillon. Le but de cette démarche est d'identifier rapidement un nombre maximal de métabolites afin de découvrir les voies de signalisation affectées par cette perturbation de l'état biologique (Lv, 2012).

1.4 Les aspects théoriques des différentes méthodes analytiques

Bien entendu, l'essor de la métabolomique au cours des 10 dernières années n'aurait pu être possible sans l'appui d'un soutien analytique et informatique en constante progression (Dunn *et al.*, 2012). De par sa complexité, une couverture complète du métabolome par une seule méthode analytique ne peut être envisagée. Plusieurs techniques sont employées à cet effet et l'outil d'analyse est sélectionné en fonction des besoins de la recherche en terme de rapidité, de caractérisation des molécules, de précision ou de sensibilité (Hollywood *et al.*, 2006). Il n'existe donc pas de méthode parfaite mais plutôt des méthodes adaptées. En prenant en considération le fait que chaque plateforme analytique possède des avantages et inconvénients, voici les techniques les plus employées dans le domaine.

1.4.1 La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de RMN est l'une des premières techniques analytiques utilisées en métabolomique (depuis environ une vingtaine d'années) et demeure l'une des plus employées en plus de la spectrométrie de masse (Dunn *et al.*, 2010). Elle représente un outil fiable et rapide permettant l'élucidation des structures chimiques des molécules organiques et inorganiques. Les principaux avantages de cette méthode résident dans le fait qu'elle soit non-destructive (réutilisation possible de l'échantillon), que les échantillons analysés ne nécessitent pas de prétraitement important, telle qu'une extraction liquide-liquide, ni de séparation comme c'est le cas pour la chromatographie en phase liquide (Barderas *et al.*, 2011). Un des domaines d'applications de la RMN est l'analyse structurale des toxines en toxicologie. Elle peut être couplée à un outil puissant tel qu'un spectromètre de masse et aider à l'élucidation de structures chimiques compliquées. Une autre application très intéressante de la RMN est le traçage de métabolites marqués tel que le glucose (^{13}C) et l'évaluation de leur taux d'incorporation dans des organismes vivants par étude du ^{13}C (Dunn *et al.*, 2005). Même si la RMN représente une technique robuste et donc appropriée pour les analyses à haut débit, elle souffre néanmoins de sa faible sensibilité (Junot, 2010). En effet, seules les molécules qui ont des concentrations élevées (10 $\mu\text{moles/L}$) peuvent être analysées (Spratlin *et al.*, 2009).

1.4.2 Le couplage chromatographie - spectrométrie de masse

Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse fait appel à deux techniques analytiques (Figure 1.3). 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) (De Hoffmann & Stroobant, 2005). Ce dernier permet de mesurer la masse des molécules présentes, de les identifier mais également de calculer leur quantité avec une très grande précision (Marinach *et al.*, 2011).

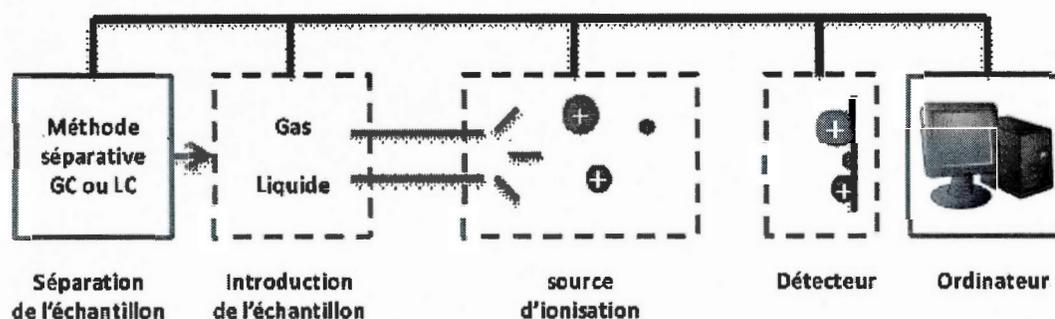


Figure 1.3. Schéma du fonctionnement du système de couplage chromatographie-spectrométrie de masse (Dunn, 2007).

1.4.2.1 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

La GC-MS est une technique d'analyse qui possède une longueur d'avance sur la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) puisqu'elle s'est développée tout au long des cinquante dernières années (Warwick, 2008). Le mode de fonctionnement de la GC-MS repose sur l'évaporation quasi instantanée de l'échantillon à une température élevée suite à son injection (Kamleh *et al.*, 2009). Ainsi, les molécules se retrouvent mêlées assez rapidement au

gaz transporteur (ex. hélium) et sont séparées le long d'une colonne capillaire (phase stationnaire) ayant une longueur variée (Dunn *et al.*, 2005).

Les progrès réalisés en chromatographie gazeuse en font une méthode robuste et sensible. Contrairement à la LC-MS, elle bénéficie d'une importante base de données regroupant plus de 100 000 composés (Junot, 2010) ainsi qu'une excellente résolution chromatographique. Ainsi, l'identification directe et fiable des composés devient possible sans nécessiter un traitement de données laborieux. Malgré cet avantage majeur, cette plateforme analytique se heurte aux limitations de la nature chimique des molécules. Comme désigné dans son appellation, les molécules analysées doivent se trouver sous une forme gazeuse afin d'être séparées puis identifiées. Par conséquent, l'investigation des molécules volatiles et semi-volatiles, grâce à l'augmentation de leur volatilité par dérivation chimique, est aisée (Kamleh *et al.*, 2009). Cependant, l'analyse des molécules thermolabiles n'est pas possible et vient réduire le nombre de molécules analysables.

Un autre obstacle, inhérent à l'instrumentation cette fois-ci, rend la GC-MS moins convenable à la métabolomique. Le principe de la spectrométrie de masse est simple et repose sur l'acquisition de charges par les molécules (ionisation) dans le but d'être détectées. La méthode d'ionisation la plus employée en GC-MS est la source à impact électronique (EI). Cette technique est très efficace toutefois elle provoque une importante fragmentation des molécules rendant difficile l'observation de l'ion moléculaire (intact) (De Hoffmann & Stroobant, 2005). Dans le cadre de nouvelles molécules, leur identification devient quasi impossible puisqu'on ne dispose plus d'une information clé : la masse du composé.

1.4.2.2 La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Au cours des dernières années, la propulsion de la LC-MS au sommet des techniques analytiques a été fulgurante. L'arrivée de cet outil extrêmement performant au début des années 90 a révolutionné le domaine de la chimie analytique (Antignac *et al.*, 2005). L'ascension rapide de cet instrument analytique est compréhensible sachant qu'il fournissait à l'époque ce que la chromatographie en phase gazeuse peinait à réaliser depuis des années, soit l'analyse des macromolécules biologiques non volatiles (Mendham *et al.*, 2005). Ses champs d'applications sont extrêmement variés et se retrouvent dans différents domaines comme la nutrition, l'environnement, la toxicologie, la médecine (diagnostique) ou encore le développement de médicaments. Les systèmes de LC-MS sont considérés comme étant une technologie extrêmement sensible, très sélective et à haut débit (Taylor, 2005); des qualités qui confèrent à cet instrument analytique un rôle central dans les études en métabolomique. Contrairement à la GC, la LC repose sur la séparation des molécules en phase liquide. L'échantillon injecté est entraîné par la phase mobile (liquide) dans une colonne à un faible débit. La colonne contient la phase solide composée de microparticules (généralement à base de silice) permettant la séparation des molécules à haute pression (HPLC) (Dunn *et al.*, 2005).

En analyse métabolomique, les séparations chromatographiques en phase normale (interactions hydrophiles) et en phase inversée (interactions hydrophobes) ont été employées et évaluées. La chromatographie à phase inversée est de loin la plus employée actuellement (Kamleh *et al.*, 2009). Elle permet une séparation efficace des molécules non polaires et grâce à la dérivation chimique, il est possible d'augmenter l'hydrophobicité des molécules polaires et de les analyser. Le développement, au cours des dernières années de la chromatographie liquide à ultra-haute performance

(UHPLC), avec des colonnes composées de plus petites particules ($< 2\mu\text{m}$), a amélioré la séparation des composées. Opérant à des pressions élevées (au maximum 15 000 psi contre 6000 psi dans une colonne HPLC), ces colonnes présentent deux avantages : une meilleure résolution chromatographique et une réduction du temps d'analyse (Lei *et al.*, 2011).

Le couplage LC-MS, fut possible grâce à l'introduction des techniques d'ionisation à pression atmosphérique telles que: l'ionisation chimique à pression atmosphérique (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), l'ionisation par électronébulisation (*Electrospray Ionization*, ESI) ou encore l'ionisation photochimique à pression atmosphérique (*Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI). Le LC-MS employant la source d'ionisation de type électronébulisation (LC-ESI-MS) est considéré comme l'une des technologies les mieux adaptées à la métabolomique et la plus utilisée (Yanes *et al.*, 2011).

1.4.2.3 Fonctionnement de la source d'ionisation par électronébulisation (ESI)

Définie comme étant une méthode d'ionisation douce, elle a permis l'analyse des biomolécules (protéines). Son principe est simple, la molécule analysée est en solution et est introduite dans un capillaire métallique soumis à un fort champ électrique (De Hoffmann & Stroobant, 2005). Il en résulte la production de charges dans la solution analysée, s'en suit la vaporisation de la solution (spray) et la formation de gouttelettes chargées (Figure 1.4). Ces gouttelettes sont constituées des molécules de l'ion analyte (composé analysé), de molécules provenant de l'échantillon et éluant en même temps que ce dernier ainsi que de nombreuses charges (De Hoffmann & Stroobant, 2005). Répandues dans la chambre d'ionisation (avant l'entrée dans l'analyseur de masse), les gouttelettes de solvant sèchent causant

une diminution de leur taille mais en même temps une augmentation de leur densité de charges. Ce phénomène mène à leur division ou fission (limite de Rayleigh). Cette explosion est due à la rupture de l'équilibre entre la tension de surface et les forces de répulsions coulombiques des gouttelettes (De Hoffmann & Stroobant, 2005). Enfin, cette division se répète pour aboutir à la désorption des ions en phase gazeuse. Les ions produits peuvent être mono-chargés ou encore porter plusieurs charges. Plus il y a de sites ionisables présents sur l'analyte, plus ce dernier risque d'être multichargé. En contrepartie, pour les molécules moins polaires, elles peuvent s'ioniser en formant des adduits avec des éléments chimiques chargés tels que le sodium ou le potassium, par exemple (Cech & Enke, 2001). Il est à noter que cette source d'ionisation opère dans les deux modes: positif et négatif, créant respectivement des ions chargés positivement et négativement.

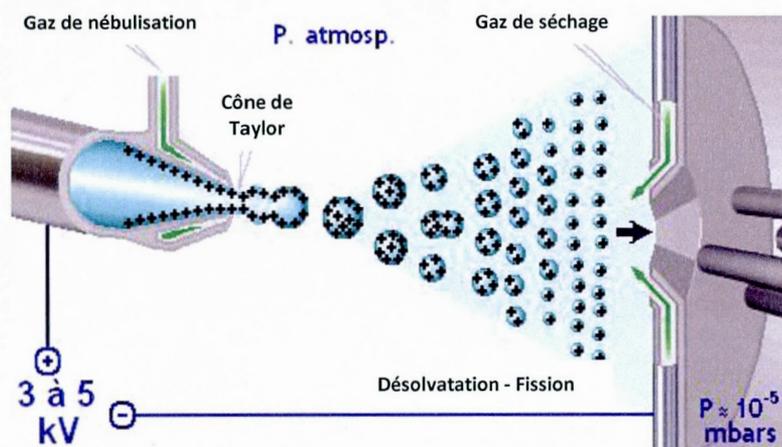


Figure 1.4. Schéma du fonctionnement de la source d'ionisation par électrospray (ESI) (www.lookfordiagnosis.com, 2013.07.30).

Le principal avantage en LC-MS est la variété des analyseurs de masse qui peuvent être couplés aux différentes sources d'ionisation. Cette versatilité propre à la spectrométrie de masse lui confère de nombreuses utilités en métabolomique. La

haute sensibilité de ces instruments permet la détection de biomolécules à leurs concentrations physiologiques (pM- μ M). De plus, la caractérisation des molécules est réalisée de différentes manières. Grâce à la mesure précise de la masse exacte des molécules (quelques ppm), il devient aisé de déterminer la formule chimique élémentaire. Mais encore, la fragmentation (MS/MS) du composé, donne une information cruciale sur sa structure et fournit par ce fait même, son patron de fragmentation, véritable carte d'identité d'une molécule (Warwick, 2008).

La source ESI peut être couplée à différents analyseurs, parmi eux l'analyseur à temps de vol (TOF) ou un quadripôle ou encore à une combinaison de ces deux analyseurs ou un analyseur à temps de vol est annexé à un analyseur quadripôle (QqTOF). Ces instruments hybrides bénéficient de l'association des avantages de deux analyseurs et donc augmentent la performance de l'appareil.

1.4.2.4 L'effet de matrice en ionisation ESI

Bien qu'adéquate pour l'étude des biomolécules, l'analyse LC-MS est confrontée à la complexité des échantillons biologiques qui contiennent un grand nombre de molécules. Ces dernières sont responsables de l'altération du signal de la molécule analysée en LC-ESI-MS. Ce phénomène est appelé l'effet de matrice et se traduit habituellement par une suppression d'ions de l'analyte qui diminue la réponse de ce dernier (Matuszewski *et al.*, 2003). L'effet de matrice résulte de la compétition pour l'acquisition de charges, entre l'analyte et les molécules présentes dans l'échantillon qui co-éluent avec ce dernier et qui se retrouvent donc en même temps dans la source. Les molécules responsables de ces interférences sont nombreuses, on retrouve parmi celles-ci les ions inorganiques, les sels, les sucres ou encore résidus de polymères. On en déduit donc que l'efficacité d'ionisation d'un composé en ESI dépend en grande

partie des composés présents dans la matrice et est intimement liée à la pureté de l'échantillon. L'effet de matrice est un inconvénient inhérent à la méthode d'ionisation ESI et doit être toujours pris en considération lors de l'analyse. C'est pour cette raison que la purification et le traitement des échantillons avant l'analyse sont une étape clé de la qualité de l'analyse. De plus, l'emploi d'un analogue de l'analyte comme standard interne est un autre moyen de pallier à la diminution de l'exactitude et de la précision de la mesure engendrée par l'effet de matrice. Cette méthode de calibration repose sur un principe simple : suite à l'ajout d'une quantité connue du standard interne dans l'échantillon, la mesure absolue du signal de l'analyte est remplacée par la valeur du rapport des signaux entre la molécule dosée et le standard interne. L'objectif étant de contrebalancer la perturbation du signal de l'analyte par une perturbation équivalente. Subissant les mêmes pertes dans la source grâce à leur similarité de structure et donc indépendamment des fluctuations analytiques, leur rapport reste inchangé.

1.4.3 Les caractéristiques des analyseurs

Les analyseurs en spectrométrie de masse permettent de séparer les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z). Il existe une grande variété d'analyseurs et leur performance est jugée en fonction de leur :

- Sensibilité : dépend de la transmission de l'appareil, c'est-à-dire sa capacité à détecter un nombre maximum d'ions en comparaison à la quantité de molécules ionisées (produites dans la source).
- Limite de masse : indique les valeurs maximales des rapports m/z mesurés.
- Précision : représente l'exactitude de la masse mesurée et est exprimée en ppm (partie par million).

- Résolution : est la capacité à mesurer deux m/z distincts mais adjacents avec la plus petite différence de masse possible.
- Vitesse de balayage (scan).

Tout au long de cette section, les capacités des analyseurs seront discutées en ces termes qui déterminent leur performance.

1.4.3.1 L'analyseur à temps de vol (TOF)

Dans un analyseur à temps de vol, les rapports m/z des ions sont déterminés en fonction du temps que ces derniers requièrent à parcourir une distance donnée. À leur sortie de la source d'ionisation, un champ électrique leur est appliqué dès l'entrée dans l'analyseur de masse et ils se retrouvent propulsés dans un tube libre de champ électrique (Figure 1.5). Grâce à la vitesse qu'ils acquièrent pendant l'accélération donnée par la tension, chaque ion possèdera la même énergie cinétique et, selon leur m/z , un temps de vol qui lui sont propres (De Hoffmann & Stroobant, 2005).

Voici, l'équation mathématique (De Hoffmann & Stroobant, 2005) qui décrit le lien entre l'énergie cinétique (E_k), la vitesse (v), la charge (q) et la masse des ions (m) :

$$\frac{1}{2} qV^2 = \frac{1}{2} mv^2 \quad (1.1)$$

où V est le potentiel appliqué.

$$\text{On en déduit que } v = \sqrt{2qV/m} \quad (1.2)$$

$$\text{Sachant que } L = vt \quad (1.3) \text{ où } L : \text{longueur du tube, on obtient : } t = \frac{L}{v} = \frac{L}{\sqrt{2qV/m}} \quad (1.4)$$

La masse (m) de l'ion devient définie par son temps de vol (t)

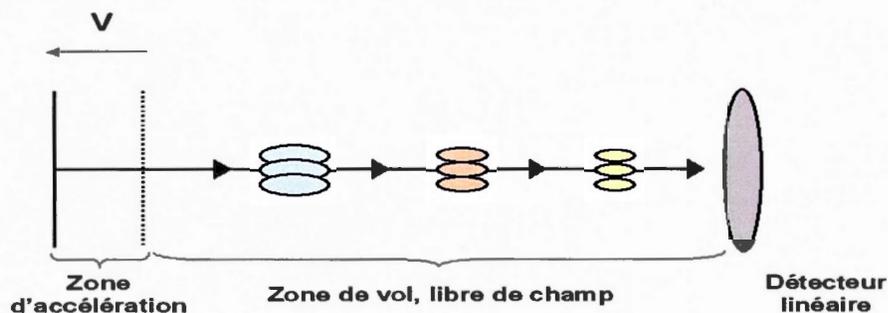


Figure 1.5. Principe du temps de vol dans un analyseur de type linéaire (www.doping.chuv.ch, 2013.07.29).

Les instruments munis d'analyseur à temps de vol (TOF-MS) se distinguent par une vitesse d'analyse très élevée couvrant un très grand domaine de masses (Dunn *et al.*, 2005). Ils sont également dotés d'une très haute résolution pouvant atteindre 40 000 et avec une calibration de masse adéquate de l'analyseur, une précision inférieure à 5 ppm devient possible (Lei *et al.*, 2011). Enfin leur haute transmission (% d'ions détectés par rapport à la quantité produite dans la source d'ionisation) en fait des appareils très sensibles avec une limite de masse pouvant atteindre 500 kDa (en mode linéaire) (Marinach *et al.*, 2011).

1.4.3.2 L'analyseur quadripolaire

Cet analyseur est composé de quatre électrodes cylindriques opposées les unes aux autres de charges positives et négatives (Figure 1.6). Les électrodes sont soumises à un potentiel opposé qui résulte de l'application d'un courant continu (U) et alternatif (V). L'ion se déplace alors selon l'axe des z en étant attiré par une charge qui lui est opposée. Étant donné le fait que la polarité des électrodes est alternée en permanence,

la trajectoire de l'ion est oscillante mais stable jusqu'à ce qu'il atteigne le détecteur. La sélection des ions est possible grâce à la modification des valeurs des tensions U et V qui définissent la zone de stabilité de la trajectoire des ions d'un m/z donné dans l'analyseur (de Hoffmann & Stroobant, 2005). Ceci permet à l'analyseur d'agir donc comme un filtre de masse. Les quadripôles bénéficient d'une bonne transmission mais souffrent d'une faible résolution (dite unitaire) ainsi que d'une faible limite de masse (environ 4000 Da, mais varie selon l'instrument).

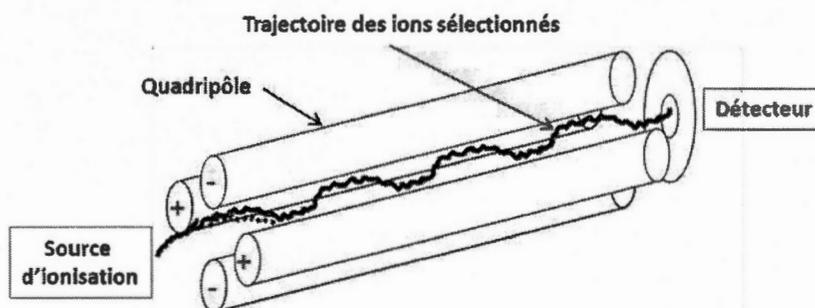


Figure 1.6. Analyseur de masse de type quadripôle

1.4.3.3 La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Les analyseurs quadripolaires ont permis le développement de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Cette méthode permet la fragmentation des ions. Dans un spectromètre de masse du type triple quadripôle (QqQ), deux analyseurs quadripôles (Q) sont séparés par une cellule de collision (q). Cette dernière est également un quadripôle mais qui ne fonctionne qu'en mode Rf (courant alternatif). Ceci permet d'isoler les ions dans un espace où ils entrent en collision avec un gaz inerte

(e.g. l'azote) induisant leur fragmentation (de Hoffmann & Stroobant, 2005). Cette technique d'activation est désignée par le terme CID (dissociation induite par collision). Habituellement, le premier quadripôle (Q1) sert à sélectionner les ions ciblés puis à les canaliser vers la cellule de collision (q2). Le second (Q3) permet de sélectionner un fragment ou des fragments et à diriger ces ions produits (résultant de la fragmentation) vers le détecteur.

Ce type d'instrument offre une multitude de combinaisons et différents modes de balayage possibles. Parmi eux :

-Balayage d'ions produits : Q1 sélectionne tous les ions correspondant à une valeur de m/z donnée (ion précurseur). Q3 est en mode balayage et guide les ions produits vers le détecteur.

-Balayage d'ions précurseurs : Q1 est en mode balayage et transmet tous les ions vers la cellule de collision. Q3 est fixé sur une valeur de m/z qui représente l'ion produit. Les deux analyseurs opèrent simultanément de façon à retracer et donc détecter tous les ions (précurseurs) qui, en se fragmentant, donnent l'ion ciblé.

-Balayage de perte de neutres : les deux analyseurs sont en mode balayage et vont détecter les ions parents dont la fragmentation occasionnera la perte d'un fragment neutre commun.

-La réaction d'ion sélectionné : Q1 est fixé sur une valeur de m/z d'un ion ciblé puis Q3 est fixé sur la valeur du m/z d'un ion fragment du parent qui lui est spécifique.

Même si le quadripôle effectue des balayages par intervalle de masse par opposition au TOF (de Hoffmann & Stroobant, 2005), il dispose tout de même d'une sensibilité élevée grâce à ces modes de balayage notamment le mode de réaction d'ion

sélectionné et est souvent employé pour la quantification des composés tels que les médicaments en milieu clinique.

De plus, il est important d'ajouter que le patron de fragmentation d'une molécule est unique et nous donne de l'information selon sa structure originelle (ion précurseur). Grâce à la MS/MS, il est possible de distinguer par exemple, deux acides gras insaturés qui possèderaient la même formule élémentaire et qui ne diffèreraient que par la position de leur insaturation (Dunn *et al.*, 2012). En métabolomique, cette étape est indispensable à l'identification des molécules. Elle se conclue par la superposition parfaite du spectre de fragmentation de la molécule biologique et de son homologue synthétique (« MS/MS match »).

1.4.3.4 L'analyseur hybride quadripôle-temps de vol (QqTOF)

Dans ce type d'appareil hybride, on assiste à une complémentarité d'analyseurs (figure 1.7). En effet si le triple quadripôle permet de fragmenter les molécules et bénéficie d'une grande sensibilité grâce à sa sélectivité, il souffre en revanche d'une faible résolution. L'analyseur TOF par son important pouvoir de résolution permet de pallier ce problème grâce à son exactitude de mesure. Le résultat donne un instrument robuste qui allie fragmentation et haute résolution. Il se caractérise par une sensibilité qui permet de détecter des molécules à l'état de traces (attomoles), une grande vitesse d'acquisition de données (jusqu'à 100 spectres/secondes), une précision inférieure à 5 ppm. Ce type d'appareils hybrides tel que le TripleTOF 5600, sont un outil de choix en métabolomique puisqu'ils permettent de déterminer la masse exacte et la fragmentation d'une molécule donnée presque simultanément.

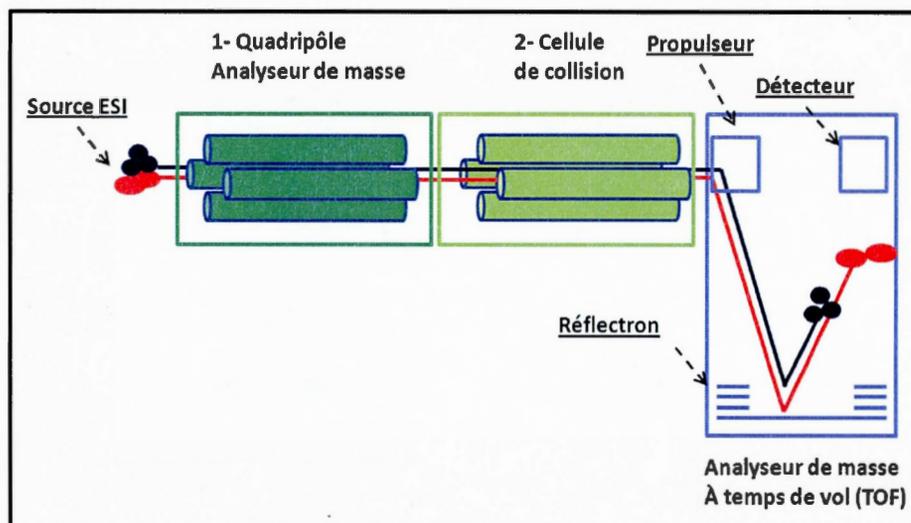


Figure 1.7. Schéma de la structure d'une spectromètre de masse de type QqTOF (Bocxlaer et al., 2005) .

1.4.3.5 La résolution

Le pouvoir de résolution en spectrométrie de masse a une grande importance dans l'identification des molécules. La haute résolution en métabolomique est un élément primordial qui permet de restreindre les possibilités de formules élémentaires et aider l'identification des métabolites (Lv, 2012). Sa grande vitesse d'acquisition, son large domaine de masse et de linéarité (10^4), sa précision de masse en plus de sa capacité MS/MS sont les qualités qui font du QqTOF un instrument de prédilection en métabolomique (Kamleh *et al.*, 2009). Il existe d'autres instruments capables de mesurer la masse avec une très grande exactitude tel que les spectromètres de masse à transformée de Fourier à résonance d'ions cyclotronique (FT-ICR, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*). Ces analyseurs se basent sur le mouvement

cyclotronique d'un ion sous l'influence d'un champ magnétique élevé pour calculer sa masse. Les ions en résonance ont un mouvement circulaire et frappent le détecteur en induisant un courant électrique. L'algorithme de transformée de Fourier traduit cette fréquence cyclotronique en m/z . Ces instruments disposent de la plus haute résolution connue et leur incertitude sur la masse peut être inférieure à 1 ppm (de Hoffmann & Stroobant, 2005). Cependant, le prix exorbitant de ces appareils réduit leur accessibilité. Ils sont surtout employés dans les analyses directes, désignées par le terme anglais DIMS (*direct infusion mass spectrometry*). Cette méthode consiste à l'injection d'extraits ou d'échantillons bruts directement dans le spectromètre de masse sans séparation chromatographique. Elle permet d'obtenir rapidement une empreinte métabolique caractéristique d'une population ou d'une mutation et s'impose lorsque le nombre d'échantillons est très important (Lei *et al.*, 2011). Le temps d'analyse dure entre 1 et 3 minutes et le nombre d'échantillons peut atteindre 1000/jour (Dunn *et al.*, 2005). Dans ce genre d'approche, la haute résolution d'un spectromètre de masse est indispensable vu la grande complexité des échantillons biologiques. Elle est un moyen d'obtenir la formule élémentaire des molécules (réduisant le nombre de structures possibles) tout en facilitant la recherche dans les bases de données (Junot, 2010).

Suite au survol de ces différentes techniques d'analyse, il apparaît évident que pour une meilleure couverture du métabolome, il est nécessaire de recourir à plusieurs plateformes analytiques (Dunn *et al.*, 2005). Malgré les avantages et inconvénients de ces méthodes, elles restent complémentaires.

1.5 Le déroulement d'une étude métabolomique

Une étude métabolomique comporte plusieurs étapes et une approche structurée et rigoureuse est nécessaire pour assurer la validité des résultats. En voici les grandes lignes :

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 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dunn *et al.*, 2005). Une attention particulière est apportée à la température de conservation des échantillons lors de leur traitement ou de leur stockage à long terme (à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) afin de prévenir toute dégradation.
2. **L'extraction des métabolites** : que cette dernière soit ciblée ou non, son efficacité peut être une source de variabilité importante et doit être validée avant son application. 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 protéine (Dunn *et al.*, 2010). Toutefois 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. Finalement, cette étape se conclue généralement en concentrant les 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 DIMS, 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. Il s'agit là de préférer un type d'ionisation à un autre ou une méthode séparative différente. À titre d'exemple : opter pour la chromatographie à interactions hydrophiles de type HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) au lieu de RPLC pour séparer des molécules très hydrophiles.
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. On comprend qu'étant donnée la quantité importante d'informations engendrées par les études métabolomiques, 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 discrimine en créant des groupes (Junot, 2010). Ces regroupements résultent de similitudes entre les différents échantillons et aide à identifier des biomarqueurs.

5. **L'identification des métabolites** : les logiciels de traitement de données utilisés en métabolomique sont munis d'algorithmes qui permettent d'apporter une identification estimée (*putative*) des molécules. Ils proposent une formule chimique possible associée à un pourcentage de confiance. Cette formule est déterminée à partir de la masse exacte ainsi que la distribution isotopique de la molécule. Quoique mesurée à très haute résolution, cette identité est provisoire et d'autres structures sont encore possibles. Il existe actuellement de nombreuses bases de données en ligne telle que : METLIN (« METabolite LINK ») ou HMDB (*The Human Metabolome Database*) qui sont régulièrement enrichies de nouvelles molécules. Il est donc possible d'effectuer une recherche en se servant de la masse exacte mesurée. Même si elles suggèrent souvent plusieurs possibilités, dépendamment du niveau d'incertitude indiqué, ces banques de données en ligne proposent une information complète sur les propriétés de la molécule en plus de faire le lien avec les voies métaboliques dans lesquelles la molécule est impliquée. HMDB par exemple, fournit même les concentrations physiologiques de certaines molécules dans les fluides biologiques humains (Dunn *et al.*, 2012). Toutes ces informations constituent des pistes à valider; les suggestions sont rejetées ou retenues dépendamment du contexte biologique de la recherche. L'étape finale consiste à l'identification

des molécules grâce à leur patron de fragmentation (spectre MS/MS) comme expliqué précédemment. Cette approche d'identification prend de plus en plus d'importance et on assiste aujourd'hui au développement accéléré de bases de données de spectrométrie de masse en tandem, comme celle de METLIN qui contient les spectres MS/MS d'environ 11 000 molécules à ce jour (Dunn *et al.*, 2012). Ces banques de données, constitueraient un gain de temps non négligeable dans le futur puisque l'identification pourrait se résumer à une seule étape, celle de la comparaison des spectres MS/MS du métabolite endogène et de son homologue synthétique.

1.6 Introduction de l'étude

La métabolomique est un outil d'exploration qui permet de comprendre la réponse d'un système biologique suite à une perturbation interne ou externe. Les mécanismes biologiques impliqués sont des processus extrêmement complexes. Le fractionnement du métabolome apparaît donc comme une solution idéale qui permettrait de développer des méthodes sur mesure pour chaque classe de molécules étudiées. Cette simplicité d'approche améliorerait la compréhension des voies métaboliques inter-reliées en les segmentant.

L'objectif de cette recherche est le développement d'une méthode de profilage métabolomique chez le nématode *C. elegans*. Cette étude est à caractère semi-ciblée puisqu'elle se concentre sur l'analyse par LC-MS de molécules endogènes polaires contenant un groupement carboxyle.

Cette étude se divise en deux volets. Dans un premier temps, nos efforts ont été axés sur l'optimisation de la méthode de dérivation et d'extraction des métabolites afin d'en assurer la reproductibilité et d'obtenir une méthode fiable et robuste d'identification et de quantification des métabolites carboxyliques. La seconde étape de ce travail est une tentative d'approche métabolomique où sont comparées deux souches de nématodes : sauvage (N2) et un modèle mutant (TDP-43) de la protéine TDP-43 impliquée dans la dégénérescence des cellules nerveuses dans la sclérose amyotrophique latérale, maladie neuro-dégénérative encore incurable. L'objectif étant de tester l'applicabilité de cette méthode développée en tant qu'outil d'investigation et d'en fixer les limitations.

1.7 La méthode d'analyse

Chez l'homme, on connaît l'importance des acides organiques dans le cycle de Krebs, la glycolyse et leurs fonctions dans la dégradation de substrats et la production d'énergie (Yang *et al.*, 2008), sans oublier les acides gras qui jouent également un rôle important dans la signalisation cellulaire. Le profilage de cette classe de molécules comporte un intérêt réel puisqu'on estime que 65% des 5000 métabolites endogènes répertoriés chez l'être humain contiendraient au moins une fonction carboxylique (Guo & Li, 2010).

Chez *C. elegans*, il existe des molécules ayant des groupements carboxyliques très intéressantes en métabolomique. À titre d'exemple, l'identification de l'acide dafachronique et des ascarosides (classe de glycosides), impliqués dans le stade dauer (ralentissement du métabolisme lors de l'amenuisement des sources de nutriments (Gill *et al.*, 2004) suscitent un grand intérêt dans la compréhension des mécanismes régulant le développement et le vieillissement chez les eucaryotes (Held *et al.*, 2006).

Afin de cibler cette classe de molécule nous avons opté pour une stratégie basée sur le marquage isotopique différentiel des métabolites (DIL, *differential isotopic labeling*). Cet étiquetage permet à la fois de repérer, comparer et de quantifier les molécules analysées. Cette technique analytique a été développée initialement en protéomique et est employée pour déterminer le niveau d'expression relative des protéines dans différents échantillons (Mann, 1999). Cette approche de dérivation se caractérise par une chimie simple et repose sur l'emploi de réactifs contenant des isotopes stables. Ces derniers ne sont pas radioactifs et existent pour de nombreux éléments chimiques avec une abondance naturelle qui leur est spécifique et parmi eux : le carbone-13, l'azote-15, l'oxygène-18. Les isotopes se distinguent par le fait qu'ils contiennent un nombre distinct de neutrons qui occasionnent une différence de masse (Dunn *et al.*, 2010). C'est cette disparité de masses qui est exploitée par le DIL et qui consiste à employer deux versions, de composition isotopique différente, d'un même réactif pour marquer deux échantillons distincts et les quantifier. En voici les principales étapes: un premier échantillon réagit avec un agent de dérivation "léger" aura une composition "normale" et contiendra des ^1H , ^{12}C , ^{14}N ou ^{16}O , par exemple. En contrepartie, le second échantillon sera lui réagit avec un agent de dérivation "lourd" et contiendra des isotopes stables (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O). Les molécules ou protéines ayant intégrées l'agent de dérivation léger ou lourd, détiendront des masses distinctes (dépendamment du nombre d'isotopes) et il sera possible de les mélanger préalablement à l'analyse. Le rapport entre leurs abondances respectives permet de procéder à leur quantification relative (Yang *et al.*, 2007). Il devient donc aisé, d'une part, de visualiser les différences entre deux conditions biologiques (mutation versus état normal) et d'autre part, d'évaluer rapidement la sur ou sous-expression de la protéine ou molécule examinée. De plus, une fois identifiées, il est possible de procéder à la quantification absolue des molécules ou protéines en utilisant une des versions du réactif (léger ou lourd) comme standard interne et d'en déterminer la quantité exacte (Guo & Li, 2009).

Il existe différentes sortes de réactifs isotopiquement codés, néanmoins ils disposent d'une sélectivité chimique qui permet de cibler des groupements spécifiques, telles que les fonctions thiol des cystéines, par exemple. Ils sont de tailles variées et d'autres fonctionnalités peuvent leur être greffées tel que la biotine dans le cas des réactifs de type ICAT (*isotope coded affinity tags*) utilisés en protéomique. Profitant de l'affinité que possède la biotine pour l'avidine, les peptides marqués suite à leur digestion (trypsique) sont récupérés par chromatographie d'affinité. Suite à la fragmentation de ces peptides marqués, il est possible, grâce à des logiciels munis d'algorithmes élaborés, d'interroger de manière automatisée les bases de données en protéomique et d'identifier la protéine d'où est issu le peptide (Gygi *et al.*, 1999). Les réactifs du type ITRAQ (*isotope tags for absolute and relative quantification*), représentent un autre exemple d'approche employant ces agents de dérivation. Il s'agit de quatre réactifs codés isotopiquement qui permettent de marquer quatre échantillons de provenances différentes en réagissant avec leur groupement amine et de les analyser simultanément. La beauté de cette technique, réside dans le fait que les réactifs (dits isobariques) possèdent une même masse de départ mais produisent des fragments distincts en MS/MS grâce à un jeu d'isotopes différents (Figure 1.8).

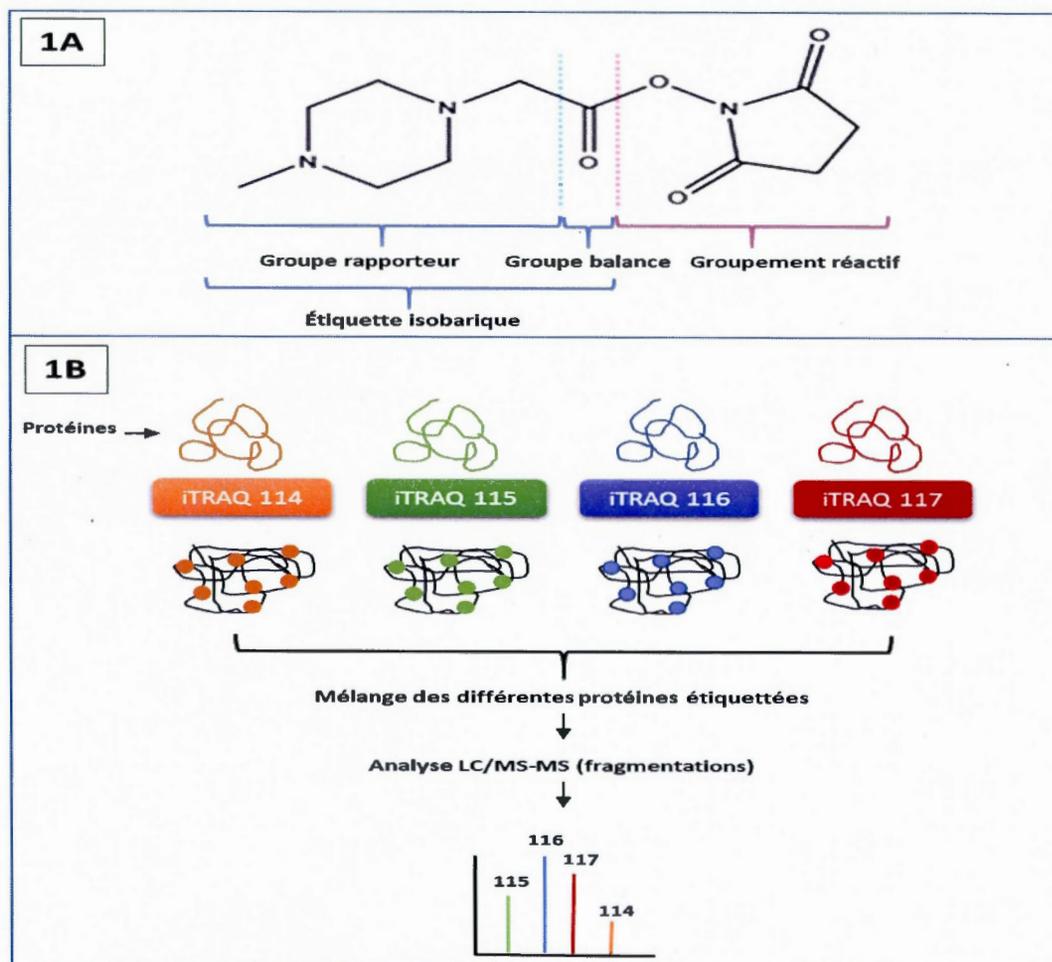


Figure 1.8. Principe des réactifs du type ITRAQ. (1A) Le réactif est une étiquette ITRAQ isobare constituée d'un groupe rapporteur chargé, un groupe réactif avec un peptide et une partie d'équilibre neutre (balance). Le groupe indicateur varie en masse de m/z de 114 à 117, alors que la masse varie de 28 à 31 Da, de telle sorte que la masse totale reste constante (145 Da) pour chacun des quatre réactifs. (1B) Les protéines ont été digérées et étiquetées avec différentes étiquettes isobares en parallèle à l'analyse MS avant leur mélange. Enfin, suite à la fragmentation (MS/MS) les ions rapporteurs (114, 115, 116, 117) permettent la quantification relative des protéines (Eyford *et al.*, 2011).

Même si au départ, l'usage de ces réactifs était exclusif au domaine de la protéomique, la transition vers la métabolomique s'est faite presque naturellement et il est aisé de le comprendre eu égard aux nombreux avantages que comporte cette méthode.

Dans le cadre de ce projet, l'aniline, une molécule ayant une amine primaire, est employée comme agent de dérivation pour cibler les acides organiques présents dans les extraits des nématodes. Sa structure comporte un anneau benzène qui sera utilisé sous deux versions : aniline- $^{12}\text{C}_6$ (réactif léger) et aniline- $^{13}\text{C}_6$ (réactif lourd) (Figure 1.9-A). Cette même méthode a déjà été utilisée dans une double approche protéomique et fut proposée comme une alternative à d'autres techniques de quantification plus coûteuses telle que l'ICAT et l'ITRAQ (Panchaud *et al.*, 2008). Une étude métabolomique a utilisé cette réaction de dérivation pour quantifier les métabolites impliqués dans le métabolisme énergétique (cycle du carbone) dans des extraits de levure (Yang *et al.*, 2008).

Nous avons vu précédemment que l'emploi de ces traceurs chimiques permettait à la fois de marquer et de quantifier les molécules, mais encore l'étiquetage isotopique d'un point de vue purement analytique, présente de nombreux avantages en LC-MS. Dans un premier temps, les molécules marquées, qu'on désignera comme paire isotopique ($^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$) à partir de maintenant, ont un comportement chromatographique semblable qui se traduit par leur co-élution (même temps de rétention). La présence d'isotopes ainsi que la différence de masse qu'ils occasionnent (6,02 Da) n'affectent pas leurs propriétés caractéristiques (Figure 1.9-B). Dans un second temps, cette paire isotopique possède un profil spectral caractéristique qui va permettre de la retracer. Vue la complexité des extraits biologiques et n'ayant aucune connaissance de l'identité des acides dérivés, cet aspect a toute son importance. L'espacement de 6,02 Da est observé dans le spectre de

masse et permet de distinguer les paires du reste des signaux provenant d'autres molécules.

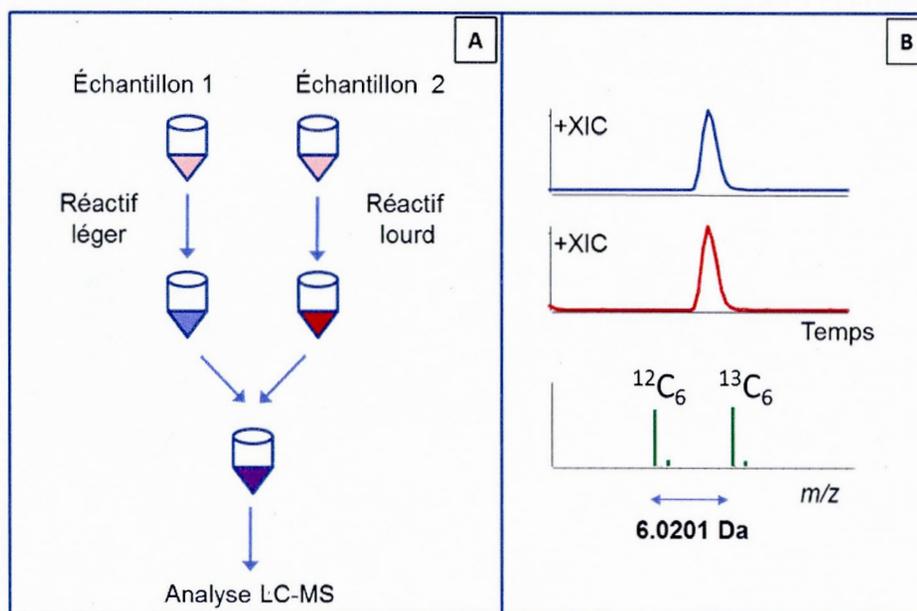


Figure 1.9. Illustration du principe de marquage isotopique et de quantification relative.

D'autre part, l'introduction de cette fraction hydrophobe (l'aniline) rend les acides parfaitement adaptés à la séparation par phase inverse qui s'avère être plus efficace et reproductible dans la séparation d'échantillons biologiques complexes, en comparaison avec d'autres type de colonnes (ex. HILIC (*chromatographie liquide à interactions hydrophiles*)) employées pour la séparation de molécules polaires (Guo & Li, 2009). Enfin, l'analyse simultanée de deux échantillons permet de s'affranchir des variations instrumentales qui sont observées d'une injection à l'autre. La variabilité analytique en LC-MS affecte la reproductibilité des résultats et se traduit par une suppression d'ionisation ou un changement du temps de rétention des analytes (Lamos *et al.*, 2007). Les échantillons ainsi marqués vont subir les mêmes fluctuations de l'appareil.

1.8 Le nématode *Caenorhabditis elegans* comme modèle biologique

Le nématode *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) est un système modèle comportant de riches attraits pour la recherche. Cet organisme est utilisé dans de nombreuses études portant sur la biologie développementale, la génétique, la neuroscience ainsi que le vieillissement (Geier *et al.*, 2011).

C. elegans est le premier organisme multicellulaire séquencé. Il comporte 19000 gènes et plus de 40% de leurs produits protéiques ont un homologue dans d'autres organismes dont l'humain (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Il est toutefois à noter que seuls 10-15% de ses gènes produisent des phénotypes observables suite à leur désactivation et aident ainsi à la compréhension de leur fonction (Blaise *et al.*, 2007). Les principaux avantages de l'emploi de cet animal en recherche sont les suivants : un cycle de reproduction court (2.5 jours à 25 C), l'existence d'une importante collection de mutants et enfin son mode de reproduction hermaphrodite (Reinke, *et al.*, 2010). Ce dernier élément rend ce système modèle parfaitement adéquat pour les études métabolomiques. En effet, l'autofécondation implique l'existence de clones, autrement dits spécimens isogéniques. La variabilité biologique, très importante en métabolomique, découlant des différences génétiques au sein d'une espèce se voit ainsi diminuée.

Au cours des cinq dernières années, plusieurs études en métabolomique ont été menées sur *C. elegans* et étant donné les nombreux attraits que cet organisme présente, leur nombre est amené à augmenter. Plusieurs plateformes analytiques ont été employées telle que la RMN (^1H), le GC-MS ou encore LC-MS. Parmi celles-ci, une étude sur le mutant comportant une délétion du récepteur hormonal NHR-49 a mis en évidence une augmentation du ratio des acides gras saturés et insaturés et de la concentration de lactate et d'alanine ainsi qu'une diminution des concentrations en

glucose par RMN (^1H) et GC-MS (Atheron *et al.*, 2008). Une autre étude, effectuée par RMN (^1H) et UPLC-MS a évalué les perturbations métaboliques occasionnées par une exposition au cadmium (polluant toxique) et évoque une diminution des concentrations de cystathionine impliquée dans le métabolisme des acides aminés soufrés indépendamment de la souche testée (sauvage ou mutante) (Hughes *et al.*, 2009). D'autres recherches ont évalué *C. elegans* en tant que système modèle en métabolomique et ont tenté de mettre en évidence les variations biologiques inhérentes à cet organisme (Reinke *et al.*, 2010; Szeto *et al.*, 2011). Enfin, une étude ayant comme objectif de montrer des phénotypes inexprimés chez les modèles mutant de *C. elegans* a réalisé un profilage métabolomique par RMN-HRMAS (^1H) (haute résolution à angle magique) (Blaise *et al.*, 2007). Le profilage du mutant *sod-1(tm776)* touchant la protéine superoxydase dismutase, responsable de la destruction du stress oxydatif dans les cellules et dont les mutations induisent la sclérose latérale amyotrophique, a démontré la réduction des niveaux de certains lipides chez le mutant dûe à l'augmentation des radicaux libres dans les cellules. Cette étude présentait un avantage dans le fait que les vers étaient directement introduits dans l'appareil sans exiger de prétraitement. Les résultats obtenus ont permis également de montrer que les variations biologiques (stade des vers, effet de mutation) excédaient d'un ordre de magnitude la variabilité analytique de la méthode (Blaise *et al.*, 2007).

1.9 La sclérose amyotrophique latérale (SLA)

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative progressive. Elle se caractérise par une détérioration et une perte sélective des

neurones moteurs supérieurs et inférieurs de la moelle épinière et du cerveau (Marchetto *et al.*, 2008). La SLA familiale est héréditaire et se caractérise par une transmission autosomique dominante dans 10% des cas, les 90% des cas restants sont sporadiques. Le risque de développer la maladie est de 1-3/100 000 (Kim *et al.*, 2009). À ce jour, les mécanismes responsables de cette détérioration prématurée des nerfs ne sont pas tout à fait élucidés. Le modèle transgénique de la SLA testé dans cette étude, exprime la protéine humaine TDP-43 dans les neurones GABA-ergiques du *C. elegans*. Cette protéine nucléaire est impliquée dans la transcription de l'ARNm (acide ribonucléique messager). Chez les patients atteints de la maladie, la TDP-43 mutée forme des agrégats protéiques insolubles dans les neurones moteurs. Ce mécanisme n'est pas très bien compris mais il fut établi que l'accumulation de cette protéine dans le cytoplasme contribue à la destruction des neurones moteurs.

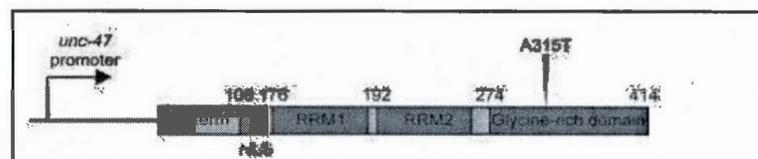


Figure 1.10. Construction du modèle transgénique de TDP-43 [A315T]. La séquence complète de la protéine type sauvage humaine TDP-43 et la mutation A315T clinique ont été clonées dans un vecteur d'expression dans les neurones moteurs par le promoteur *unc-47* puis injectés dans *C. elegans*. Les domaines : RRM (motif de reconnaissance de l'ARN), NLS (localisation nucléaire) suivi du domaine riche en glycine sont indiqués (Vaccaro *et al.*, 2012).

La souche mutante TDP-43 comporte la mutation [A315T] et contrairement à de nombreux modèles mutants existants, n'est pas associée à la GFP (*green fluorescent protein*). Cette protéine permet la localisation d'autres protéines auxquelles elle est

rattachée et peut potentiellement affecter le phénotype de la maladie (Vaccaro *et al.*, 2012) (Figure 1.10).

1.10 Objectif de l'étude

Dans le cadre de la SLA, ainsi que d'autres maladies neurodégénératives dont les mécanismes comportent encore des zones d'ombre, la métabolomique constitue un outil parfaitement adapté à l'investigation des perturbations causées par les mutations génétiques et permettrait l'identification des voies métaboliques impliquées. Même si cette méthode est développée à partir d'un modèle biologique relativement simple en comparaison à celui de l'homme, le but de cette étude est de parvenir à une technique de profilage métabolomique à usage universel qui est destinée à l'analyse globale des acides carboxyliques endogènes quelle que soit leur provenance biologique. Les différences métaboliques détectées durant l'étude du modèle de la SLA chez *C. elegans* peuvent éventuellement être validées en utilisant la même stratégie analytique, qu'on décrit ici, chez l'humain.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

1.1 Culture cellulaire

Le peptone et l'extrait de levure nécessaires à la préparation des milieux de culture ont été achetés chez BioShop (Burlington, Ontario, Canada). Tous les autres produits utilisés pour la préparation des milieux de culture ont été achetés chez Sarstedt (St-Léonard, Québec, Canada).

1.2 COPAS Biosort

La solution d'iodure de propidium (1mg/ml) a été achetée de Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). La solution Sheath été commandée chez Union Biometrica (Holliston, Massachusetts, États-Unis). L'eau nanopure provient du système d'eau Barnstead Nanopure (Thermo Scientific, Mississauga, Ontario, Canada).

1.3 Extraction, dérivation et analyse LC-MS

L'aniline, l'aniline-¹³C₆, N-hydroxysuccinimide (NHS), Sulfo-hydroxysuccinimide (NHSS), pyridine, hydrochlorure de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC), HCl, triéthylamine (TEA) et les standards (acide chenodéoxycholique,

acide cholique, acide lithocholique, acide déhydrocholique, acide lactique, acide fumarique, acide kynurénique, acide oxalique, acide 3-déhydroshikimique, acide shikimique, valine, leucine, isoleucine, proline, tryptophane, phénylalanine, alanine ont tous été achetés de Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH) sont des solvants de grade HPLC et proviennent de EMD Chemicals (Gibson, Massachusetts, États-Unis). L'eau nanopure provient du système Synergy UV (EMD Millipore, Massachusetts, États-Unis).

1.4 Souches de *C. elegans*

Les souches utilisées dans cette étude sont les suivantes : la souche sauvage N2 (Bristol), la souche mutante *xqIs133 [unc-47::TDP-43[A315T];unc-119(+)]* et la souche contrôle mutante *xqIs132 [unc-47::TDP-43- WT;unc-119(+)]*. Ces souches ont été obtenues du Dr Alex Parker (CRCHUM, Université de Montréal).

Méthodes

1.5 Culture de *C. elegans*

1.5.1 Préparation du milieu agar NGM

Toutes les souches de nématodes ont été cultivées sur un milieu NGM (Nematode growth media, Brenner, 1974). Ce milieu comprend : 3g NaCl, 2,5g peptone, 16g agar dans un volume de 1 litre d'eau Milli-Q puis passés à l'autoclave. Au milieu refroidi, les produits suivants sont ajoutés : 1,0 ml de cholestérol (5 mg/ml dans 95% éthanol), 1,0 ml MgSO₄ 1M, 1,0 ml CaCl₂ 1M, 1,0 ml KPO₄ pH 6,0 1M. Le mélange est immédiatement agité et versé dans des boîtes de pétries. Ces dernières sont

ensemencées à température ambiante pendant 48 heures avec une solution de bactérie *E. coli* (OP50) préalablement à leur utilisation.

1.5.2 Milieu M9

Les différentes manipulations d'entretien des vers ont été réalisées dans le milieu isotonique M9 (12,8g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 5g NaCl, 0,25g MgSO₄ dans un volume de 1L avec de l'eau nanopure puis autoclavé).

1.5.3 Solution de synchronisation

Cette solution doit toujours être fraîchement préparée et contient: 5ml NaOH 1M, 2ml d'eau de javel 4% (hypochlorite de sodium) puis ajusté au volume désiré avec de l'eau nanopure (volume final de 10 ml).

1.5.4 Synchronisation des cultures de *C. elegans*

Les nématodes sont prélevés avec du M9 et concentrés dans un tube (1,5ml). Les tubes sont centrifugés à 3500 rpm pendant 3 minutes. Au culot de vers est ajouté 1 ml de solution de synchronisation. Les tubes sont agités pendant 4 minutes puis centrifugés à 3500 rpm pendant 3 minutes. Le surnageant est enlevé suite à chaque centrifugation et 3 lavages au M9 sont réalisés. Enfin les œufs sont agités pendant 16h à 20°C dans le milieu M9 afin de synchroniser leur niveau de croissance en absence de nutriment.

1.5.5 Conditions de culture de *C. elegans*

Les larves de vers sont comptées manuellement pour avoir entre 3000 à 4000 par boîte pour toutes les souches utilisées. La souche (N2) est cultivée à 22°C et est récoltée après 4 jours au stade adulte. Les souches TDP-43wt et TDP43-[A315T] sont

cultivées à 18°C et atteignent le stade adulte après 5,5 jours (Les souches transgéniques étant beaucoup plus thermosensibles que la souche sauvage).

1.5.6 Prélèvement de *C. elegans*

Les vers adultes sont prélevés et lavés dans du M9 et finalement suspendus dans de l'eau nanopure. Lors du comptage manuel des vers, la solution est diluée de façon à avoir le nombre voulu (1000, 2500, 5000 ou 12500) de vers dans un aliquot de 1ml par tube. Le volume est réduit à 250 µl par tube et le surnageant prélevé sert d'échantillon contrôle de son tube respectif (Fig. 2.15-2.17).

1.5.7 Comptage automatique au Copas Bisort

Le COPAS Biosort (Union Biometrica, Somerville, Massachusetts, États-Unis), est un appareil à haut débit qui permet de trier les vers en fonction de leurs caractéristiques physiques et optiques. L'appareil est muni d'un laser (488 nm) qui est employé pour mesurer les paramètres physiques des vers comme leur longueur et leur densité optique afin de cibler un stade de croissance donné (adulte, larve, etc.). Suivant l'étape de récolte de vers, l'iodure de propidium (IP) (à une concentration finale de 10 µl/ml) est ajouté à la suspension des vers et incubée pendant 15 min préalablement à l'analyse. L'IP est utilisé pour distinguer les vers morts, puisqu'il ne pénètre que dans les cellules mortes. Les vers sont ensuite introduits dans l'appareil et distribués à raison de 2500 vers/puits (dans des plaques de 24 puits). Les vers sont ensuite transférés dans des tubes puis traités tel que mentionné dans la section 2.1.6 (Fig.2.18-2.19).

1.6 Arrêt du métabolisme

Les tubes de vers comptés (manuellement ou de façon automatisée) sont plongés pendant 10-15 secondes dans de l'azote liquide, se congèlent instantanément et sont ensuite conservés à - 80°C.

1.7 Extraction des métabolites acides (vers comptés manuellement)

Tous les tests d'optimisation de l'extraction liquide-liquide (LLE) ont été effectués avec la souche sauvage (N2) avec des tubes contenant des culots de 1000 vers/tube.

1.7.1 Extraction liquide-liquide

Des volumes de 400 µl CHCl₃, 200 µl MeOH et 200 µl NaOH 0,2 N (pH 11,0) sont ajoutés aux culots de vers. Les tubes sont soniqués dans l'Ultrasonic Branson cleaner 2510 (Cleansonic, Richmond, Virginie, États-Unis) pendant 15 min. Les tubes sont ensuite mélangés pendant 30 s suivis d'un temps de repos de 5 min pour aider à la séparation des phases. Après une centrifugation à 5000 rpm pendant 3 min, un prélèvement de 350 µl de la phase aqueuse est effectuée et transféré dans des nouveaux tubes puis une seconde extraction est réalisée et combinée aux premiers prélèvements. Les extraits sont évaporés à l'aide du SpeedVac Savant SPD 131 DDA (Thermo Scientific, Mississauga, Ontario, Canada) et reconstitués dans un volume de 120 µl de 10% d'ACN (Fig. 2.12-2.14).

1.7.2 Extraction par sonication

Pour l'extraction à l'EtOH (80°C) et à l'eau (80°C), un volume de 400 µl du solvant d'extraction est ajouté aux culots de vers et les tubes sont incubés pendant 2 min à 80°C avant d'être soniqués. Concernant l'extraction à l'EtOH 75% (80°C), 400 µl d'EtOH froid sont ajoutés aux culots dans un premier temps puis incubés pendant

3 min à 80°C. Enfin, pour l'extraction au MeOH 80%, un volume de 800 µl est ajouté aux culots de vers. Tous les tubes sont soniqués avec une sonde à ultrasons XL-2000 (QSonica, Newtown, Pennsylvanie, États-Unis) pendant 2 min (avec interruptions sur de la glace aux 30 s). Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 13000 rpm puis un premier prélèvement de 400 µl est effectué pour les solvants chauds, tandis que 600 µl sont transférés dans des nouveaux tubes pour l'extraction au MeOH 80%. Pour la deuxième extraction, 400 µl additionnels de solvants chauds ou 200 µl de MeOH 80% sont ajoutés aux tubes. Un prélèvement final de 400 µl pour les extractions à l'EtOH et à l'eau chaude et 200 µl pour l'extraction au MeOH est effectué après une deuxième ronde de sonication et de centrifugation. Les extraits sont traités tel qu'indiqué dans la section 2.3.1 (Fig. 2.12-2.14).

1.7.3 Extraction par mortier et pilon à l'éthanol (80°C)

Un volume de 400 µl d'EtOH est ajouté aux culots de vers. Les tubes sont incubés pendant 2 min à 80°C puis les vers sont broyés à l'aide d'un système de mortier et pilon électrique (VWR International, Ville Mont-Royal, QC) pendant 2 min (avec interruptions aux 30 secondes). Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 13000 rpm puis un prélèvement de 400 µl est effectué et transféré dans des nouveaux tubes. S'ensuit un second ajout de 400 µl d'EtOH (80°C) pour une deuxième extraction suivant les mêmes étapes précédentes. Un autre volume de 400 µl est prélevé et ajouté aux tubes. Les extraits sont traités tel qu'indiqué dans la section 2.3.1 (Fig. 2.14).

1.7.4 Extraction par billes

Des billes de silice (250 mg) de 0,1 mm de diamètre (Bertin technologies, Montigny, France) ou un mélange de billes de 0,1 et de 0,5 mm de diamètres sont ajoutées dans chaque tube contenant un culot de vers. Un volume de 400 µl de solvant (EtOH

(80°C), EtOH 75% ou MeOH 80%) est ajouté. Les tubes contenant de l'EtOH (80°C) sont incubés pendant 2 min à 80°C, tandis que les tubes contenant de l'EtOH 75% sont incubés pendant 3 min à 80°C avant l'homogénéisation à l'aide du Precellys Bead Beater (Bertin Technologies, Montigny, France) pendant un programme de 3 cycles d'une durée de 60 s. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 13000 rpm. Un prélèvement de 400 µl est ensuite effectué et transféré dans des nouveaux tubes, suivi d'un second ajout de 400 µl de solvant pour une deuxième extraction consécutive. Le deuxième prélèvement est combiné aux tubes précédents. Les extraits sont traités tel qu'indiqué dans la section 2.3.1 (Fig. 2.14, 2.18 et 2.19).

1.8 Méthode de dérivation

Pour la partie d'optimisation des conditions de réactions, un mélange de standards composé de : proline, tryptophane, acide malonique et l'acide déhydrocholique à 100 µM a été utilisé.

1.8.1 Optimisation du pH de l'étape d'activation des acides

Les solutions d'acides et d'EDC 0,2M sont préparées soit dans une solution de pyridine 1M, pH 5 (condition légèrement acide), d'eau (condition neutre) ou de TEA pH 8 (condition légèrement basique). Aux 25 µl d'acides standards mixtes sont ajoutés : 50 µl d'EDC 0,2 M et 25 µl d'eau (1), 50 µl d'EDC 0,2 M et 25 µl de NHS 25 mM (2) ou encore 50 µl 0,2 M d'EDC et 25 µl de Sulfo-NHSS 25 mM (3). Les réactions sont incubées pendant 1h préalablement à l'ajout de 50 µl d'aniline 200 mM (pyridine 1M, pH 5) et réagissent pendant 2h (Fig. 2.1).

1.8.2 Test d'optimisation de la température de la réaction de dérivation

25 μ l d'un mélange de quatre acides (proline, tryptophane, acide malonique et acide déhydrocholique) à 100 μ M est dérivée en ajoutant 50 μ l de 0,2 M d'EDC dans 50 mM TEA (pH 8.0) et 25 μ l 25 mM NHSS et incubé pendant 1h. Enfin, 50 μ l d'aniline 200 mM (1 M pyridine à pH 5.0) est ajouté pour un temps de réaction de 2h. Trois températures ont été testées : 25, 40 et 60 °C (Fig. 2.2).

1.8.3 Test d'optimisation du temps de la réaction de dérivation

25 μ l d'un mélange de quatre acides (proline, tryptophane, acide malonique et acide déhydrocholique) à 100 μ M, est dérivée en ajoutant 50 μ l de 0.2 M d'EDC dans 50 mM de TEA (pH 8.0) et 25 μ l de 25 mM de NHSS et incubé pendant 1h. Enfin, 50 μ l d'aniline 200 mM (1 M pyridine à pH 5.0) est ajouté pour un temps de réaction de : 1h, 2h ou 24h (Fig. 2.3).

1.8.4 Réaction de dérivation optimisée

À 25 μ l d'extraits ou d'acides standards sont ajoutés 50 μ l 0,2 M d'EDC dans 50 mM TEA (pH 8.0) et 25 μ l 25 mM NHSS et incubés pendant 1h. Enfin, 50 μ l de 200 mM d'aniline ou l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ dans 1 M pyridine (pH 5.0) sont ajoutés pour une durée de 2 h à température ambiante. Précédemment à l'analyse, les fractions d'aniline $^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ sont assemblées à raison de 50 μ l par échantillon en fonction du ratio souhaité (Fig. 2.7).

1.9 Validation de la méthode (acides standards)

Une solution de mixte d'acides contenant 15 acides a été préparée à des concentrations allant de : 10, 20, 50 mM puis dérivée par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$.

Les mélanges dérivés ont été assemblés dans les proportions $^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ suivantes : 1:5, 1:2, 1:1, 2 :1 et 5 :1. Les solutions d'acides dérivés et non dérivés ont été analysées (Fig. 2.8).

1.10 Analyse des extraits non dérivés (vers comptés manuellement)

40 μl des extraits non dérivés ont été ajoutés à 40 μl d'ACN 10% puis analysés par LC-MS (*voir détails dans la section 2.12*) (Fig. 2.8).

1.11 Détection et quantification relative des métabolites acides de la souche TDP-43[A315]

Les vers mutants ont été comptés manuellement à raison de : 2500, 5000 ou 125 000 vers/tubes. Les métabolites ont été extraits avec la méthode utilisant les billes et l'EtOH (80°C). Ils ont été dérivés séparément par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ puis mélangés ensemble afin d'obtenir des ratios suivants: 1:5, 2:5, 1:1, 5:2, 5:1 (Fig 2.15).

1.12 Comparaison des niveaux des métabolites acides identifiés dans la souche TDP-43[A315] avec les niveaux dans la souche contrôle TDP-43 et sauvage (N2)

Toutes les souches de vers ont été comptées manuellement à raison de 2500 vers/tubes. Les métabolites ont été extraits avec la méthode d'extraction aux billes et à l'EtOH (80°C). Deux aliquots de 25 μl ont été dérivés séparément par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$. Pour l'évaluation des niveaux des métabolites de la souche mutante, les extraits de TDP-43[A315T] et son contrôle TDP-43wt ont été dérivés par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$, respectivement, puis mélangés dans un rapport de 1:1. Pour les extraits de la souche TDP-43wt et sauvage (N2) nous avons procédé de la même manière (Fig, 2.16-2.17).

1.13 Évaluation et optimisation de la méthode d'extraction des métabolites acides endogènes (2500 vers/tube comptés au COPAS Biosort)

Les vers ont été extraits par 5 méthodes d'extraction différentes : (1) billes (mélange 0,1 et 0,5 mm) et MeOH 80%, (2) billes (mélange) et EtOH 75% (80°C), (3) billes (0,1mm) et EtOH 75% (80°C), (4) sonication et MeOH 80% et (5) sonication et EtOH 75% (80°C). Deux aliquots de 25 µl pour chaque méthode ont été dérivés séparément par l'aniline et l'aniline-¹³C₆ puis mélangés dans une proportion de 1:1 préalablement à l'analyse (Fig.2.18-2.19).

1.14 Évaluation de la méthode d'extraction des métabolites connus (2500 vers/tube comptés au COPAS Biosort)

Les vers sont extraits par la méthode à l'EtOH 75% (80°C) et aux billes (mélange). Les extraits sont traités comme mentionné dans la section 2.9 (Tableau 3.3).

1.15 Quantification relatives des métabolites connus (2500 vers/tube comptés au COPAS Biosort)

Les vers sont extraits par la méthode à l'EtOH 75% (80°C) et aux billes (mélange). Les extraits sont dérivés par l'aniline. Un mélange de standards à une concentration de 20 µM est dérivé par l'aniline-¹³C₆. Les extraits dérivés et les standards sont assemblés dans une proportion de (1:1) préalablement à l'analyse (Tableau 3.4).

1.16 Analyse LC-MS et LC-MS/MS

Pour les divers tests effectués, nous avons employé trois méthodes d'analyse différentes dépendamment du type d'échantillons analysés.

1.16.1 Méthode 1

Tous les extraits non-dérivés de *C. elegans* de la souche (N2) pour l'évaluation de la méthode d'extraction ont été analysés par la méthode qui suit.

La séparation par chromatographie en phase liquide a été effectuée sur un système HPLC de série 1200 d'Agilent (Agilent, Palo Alto, Californie, États-Unis), incluant une pompe binaire (G1312B), un auto-échantillonneur (G1367C) et un four à colonne (G1316B), sur une colonne C18 Cogent (2,1 mm x 150 mm) à phase inverse remplie de particules de 4,2 µm de diamètres acheté de MicroSolv Technology (Eatontown, New Jersey, États-Unis). Le gradient d'élution composé de la phase mobile A (eau avec 0,1% acide formique) et la phase mobile B (ACN avec 0.1% acide formique) débute à 5% de phase mobile (B) et est maintenu pendant 2min. À 6 min la phase mobile (B) est à 35%, à 70% à 15 min et atteint 90% à 18 min. La phase mobile B a ensuite été maintenu à 90% pendant 2 min et puis la colonne est rééquilibrée à 5% B pendant 7,5 minutes avant la prochaine injection. Le système opéré à un débit de 0,4 ml par minute avec un volume d'injection de 10 µl. La détection des métabolites est réalisée par un spectromètre de masse Agilent 6210 (Palo Alto, Californie, États-Unis) de type ESI-TOF en mode positif couvrant un domaine de masse de m/z 100-1000 comprenant une calibration interne (121.0504/922.0098). L'acquisition est contrôlée par le logiciel MassHunter B.03 (Agilent Technologies). Les paramètres de la source ont été les suivants : le voltage du capillaire à 4000 V, la pression du gaz nébuliseur à 35 psi, le débit du gaz de séchage à 11.5 l/min et la température du gaz à 350 °C. De plus, les voltages du fragmenteur et du skimmer étaient fixés à 100 V et 60V, respectivement.

1.16.2 Méthode 2

Les échantillons des tests d'optimisation et de validation de la méthode ainsi que les extraits dérivés de *C. elegans* pour l'optimisation de la méthode de quantification de

métabolites connus ainsi que du profilage métabolomique (toutes les souches), ont été analysés par cette méthode.

Les métabolites ou molécules standards ont été séparés par chromatographie en phase liquide sur un système HPLC de série Nexera (Shimadzu, Columbia, Maryland, États-Unis), comprenant deux pompes (LC-30AD), un auto-échantillonneur (SIL-30AC) et un four à colonne (CTO-30A) employant la même colonne qu'à la section 2.12.1. Les conditions chromatographiques étant les mêmes que la méthode 1 à l'exception d'une modification apportée au gradient d'élution ayant pour objectif l'amélioration de la séparation des métabolites dérivés face à la complexité des matrices biologiques (extraits de vers). Le gradient d'élution débute aux mêmes conditions que la méthode précédente et atteint 25% de la phase mobile (B) à 6 min, à 65% à 18 min et enfin 90% à 18 min. Le volume d'injection était de 20 μ l.

La détection des métabolites est réalisée par un spectromètre de masse type TripleTOF 5600 (AB Sciex, Concord, Ontario, Canada) équipé d'une source ESI de type DuoSprayTM en mode positif couvrant un domaine de masse de m/z 115-1000 et comprenant une calibration externe (121.0509/922.0098). L'appareil est opéré par le logiciel Analyst (version 1.5.1, AB Sciex) en mode générique IDA (*Information Dependent Acquisition*, comprenant un balayage en mode TOF-MS suivi de 5 balayages MS/MS (fragmentation) des 5 masses les plus abondantes et en utilisant le paramètre de filtrage DBS (*Dynamic Background Substraction*) permettant d'exclure les ions déjà fragmentés. Les paramètres de la source ont été les suivants : la pression de l'azote à l'entrée de l'analyseur est de 35 psi, le voltage du capillaire est de 5000 V, la pression du gaz du nébuliseur est de 50 psi, et la température est de 500 °C. Le fragmenteur (DP) était fixé à un voltage de 60 V et l'énergie de collision (CE) à 10V. Pour les balayages MS/MS, les paramètres sont identiques au balayage TOF-MS à l'exception de l'énergie de collision (CE) qui est fixée à 30V +/- 10V.

1.16.3 Méthode 3

Les échantillons dérivés d'extraits de *C. elegans* et de standards d'acides pour la partie de quantification relative de métabolites connus ont été analysés par cette méthode. L'analyse a été réalisée sous les mêmes conditions que la méthode 2. Une seule modification a été apportée au mode de balayage IDA (MS/MS) où les masses des standards dérivés ont été spécifiées à m/z 267.113 et 279.153 pour l'acide fumarique et à m/z 280.145 et 286.165 pour le tryptophane.

1.17 Analyse de données

Les extraits bruts de *C. elegans* ont été traités à l'aide du logiciel MassHunter Qualitative Analysis B.03 (Agilent Technologies) pour l'extraction des masses et la détection des pics chromatographiques. Le logiciel MetabolitePilot™ version 1.0 (AB Sciex) a été utilisé pour dresser une liste de métabolites dérivés potentiels avec un algorithme de filtrage basé sur la différence de masse des paires isotopiques de 6.0201 Da ($^{12}\text{C}_6$ - $^{13}\text{C}_6$) permettant la reconnaissance des métabolites dérivés en fonction de leur composition isotopique. Les logiciels PeakView™ 1.2 et MultiQuant™ 2.1 (AB Sciex) ont été utilisés pour l'extraction des métabolites ainsi que la quantification relative des aires provenant des pics chromatographiques des masses identifiées comme faisant partie d'une paire isotopique.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Pour réaliser l'objectif de cette étude, nous avons abordé le profilage métabolomique chez *C. elegans* sur deux fronts. Dans un premier temps, notre but consistait à s'assurer que la méthode de dérivation était fiable et robuste pour l'application que nous lui prévoyons. Bien qu'elle ait été employée avec succès dans des études précédentes (Panchaud *et al.*, 2008, Yang, *et al.*, 2008), on se devait de vérifier si cette technique de dérivation et de quantification était adaptée au type de molécules que nous ciblions soit les acides organiques. Dans la seconde partie nous avons testé l'applicabilité de cette méthode en métabolomique sur un modèle animal simplifié (*C. elegans*) pour évaluer ses avantages et inconvénients.

2 Optimisation de la réaction de dérivation

Afin d'optimiser la réaction de dérivation, nous avons utilisé un mélange simple composé de quatre acides qui selon nous seraient représentatifs des différentes biomolécules (métabolites) retrouvées dans les extraits biologiques, soit : la proline qui est un acide aminé non polaire, le tryptophane un acide aminé polaire (non chargé), l'acide malonique un diacide polaire et enfin l'acide déhydrocholique qui est un acide biliaire extrêmement hydrophobe.

2.1 Concentrations des réactifs

La réaction originale (Figure 2.1, A) a été optimisée en termes de concentration de l'agent de couplage (EDC) et d'aniline dans des travaux antérieurs. Les concentrations initiales de l'EDC et du réactif de dérivation ont été révisées à la baisse en comparaison à la littérature (Panchaud *et al.*, 2008). Les conclusions de ces tests ont établis les concentrations de l'EDC et de l'aniline à 0,2 M au lieu de 0,5 M et 0,3M respectivement, comme étant optimales et permettant d'obtenir une réaction de dérivation efficace et propre.

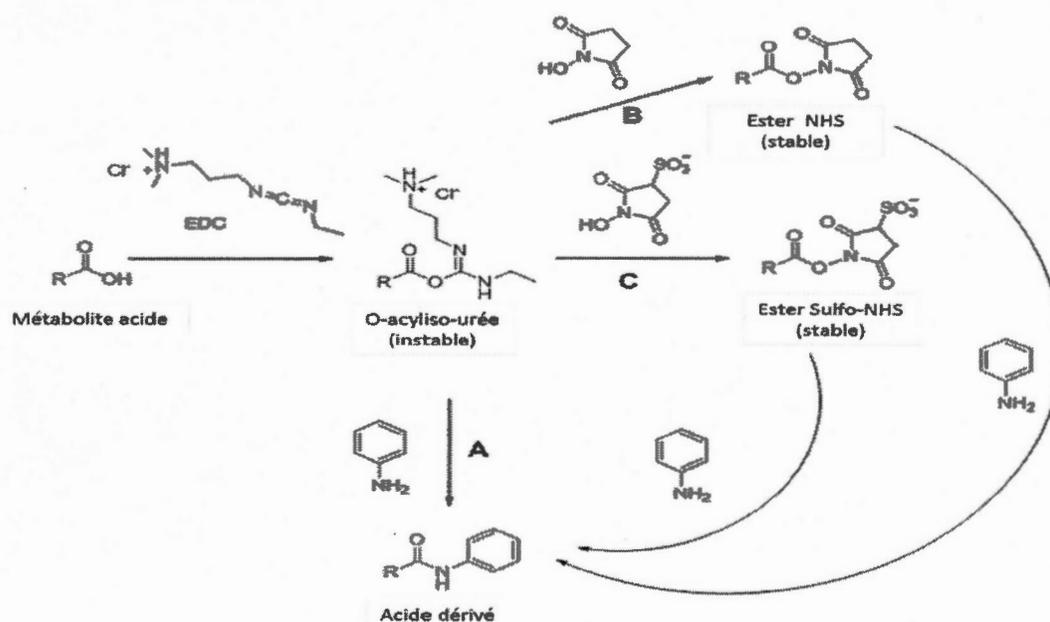


Figure 2.1. Mécanismes de dérivation des métabolites carboxyliques. (A) La fonction carboxyle est activée par l'agent de couplage (EDC), suivi par la dérivation de l'acide par l'aniline. L'intermédiaire formé par l'acide et l'agent de couplage est instable et est sujet à l'hydrolyse (B). L'activation de l'acide dans ce cas est possible par le biais d'additifs tels que le N-hydroxysuccinimide (NHS) ou le sulfo-N-hydroxysuccinimide (NHSS) (C). Cet élément est à prendre en considération dans le

contexte d'échantillons biologiques complexes tels que les extraits de nématodes afin de prévenir toute perturbation indésirable de l'analyse LC-MS.

2.1.1 Optimisation de l'étape d'activation des acides

Ayant rencontré certaines difficultés lors des tests de dérivation de standards notamment certains acides aminés, nous avons décidé de regarder de plus près le déroulement et les différentes étapes que comporte cette réaction. Cette dernière se fait en deux temps. L'EDC active le groupement carboxyle en premier puis l'aniline effectue une attaque nucléophile qui crée le lien amide (Figure 2.1, A). L'activation du carbonyle semble donc être une étape clé sans laquelle l'acide ne peut être dérivé. Les travaux publiés dans la littérature ayant employé ce type de réaction ne mentionnent aucune information à ce sujet et afin de résoudre notre problème nous devons étudier la chimie de la réaction. L'intermédiaire lors de l'activation de l'acide (*O*-acyliso-urée) est une espèce fragile qui est facilement hydrolysable. L'emploi d'additifs tel que le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ainsi que le sulfo-NHSS permet de pallier à ce problème (Jang *et al.*, 2012). Ces derniers prennent le relais de l'EDC et activent le groupement carboxyle en formant un intermédiaire plus stable (Figure 2.1, B et C). Cette approche de double activation est employée en synthèse peptidique et c'est pourquoi nous avons tenté d'en optimiser les conditions avec différents agents d'activation et puis en testant différents pH.

2.1.2 Optimisation du pH de l'étape d'activation des acides

Dans cette partie, nous avons comparé trois conditions différentes de pH (5,0, 7,0 et 8,0) et introduit une étape d'incubation d'une heure des acides avec l'agent de couplage (EDC) et les additifs (NHS et Sulfo-NHSS) préalablement à l'ajout de l'aniline. La réaction de dérivation originale se fait en ajoutant simultanément aux acides, l'EDC ainsi que l'aniline à un pH acide (5,0). Afin d'assurer cette condition, les solutions de mélange d'acides, le EDC ainsi que l'aniline ont été préparés dans la solution de 1M de pyridine à pH 5,0. On remarque une augmentation significative de la dérivation en présence d'additifs (Figure 2.2).

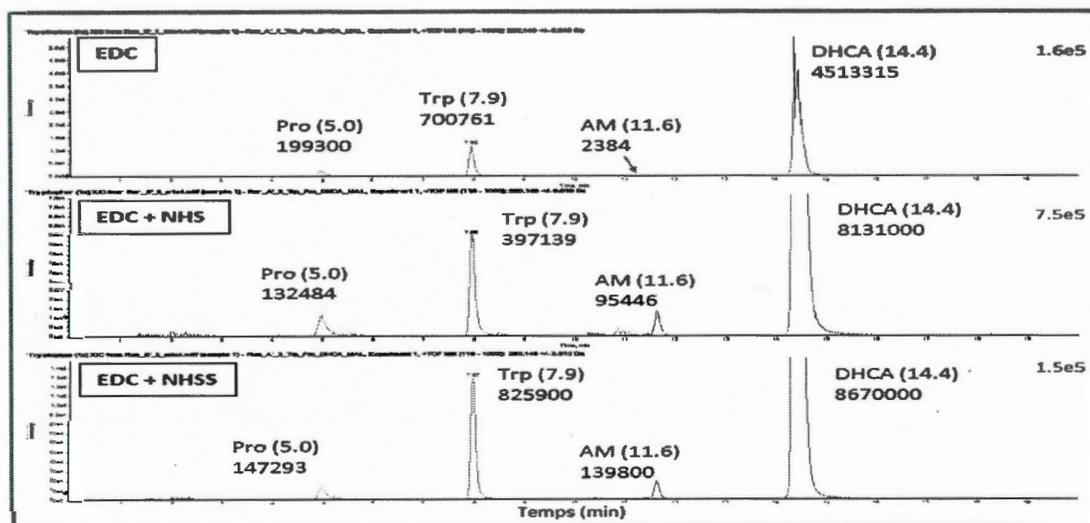


Figure 2.2. Effet du pH acide (5,0) sur l'étape d'activation des acides. Un mélange contenant 4 standards (proline, tryptophane, acide malonique (AM) et l'acide déhydrocholique (DHCA)) à 100 μ M est dérivé en deux additifs (NHS et Sulfo-NHSS) en plus de l'EDC (agent de couplage).

Pour le Sulfo-NHSS, l'amélioration des quantités d'acides dérivés (aires) est de l'ordre de 2 fois pour la proline, le tryptophane et l'acide déhydrocholique en comparaison avec l'EDC seul. Elle est d'autant plus importante (de l'ordre de 58 fois) dans le cas de l'acide malonique. Le phénomène d'hydrolyse de l'intermédiaire *O*-acyliso-urée est donc assez important en milieu acide. Lorsque les solutions d'acides ainsi que l'EDC sont préparés dans de l'eau (Figure 2.3) suivie de l'ajout de l'aniline (1M de pyridine pH 5,0), l'amélioration de la dérivation est frappante et l'augmentation des quantités détectées est supérieure à 6 fois pour tous les acides en comparaison aux conditions acides de couplage. L'ajout d'additifs ne semble améliorer la dérivation.

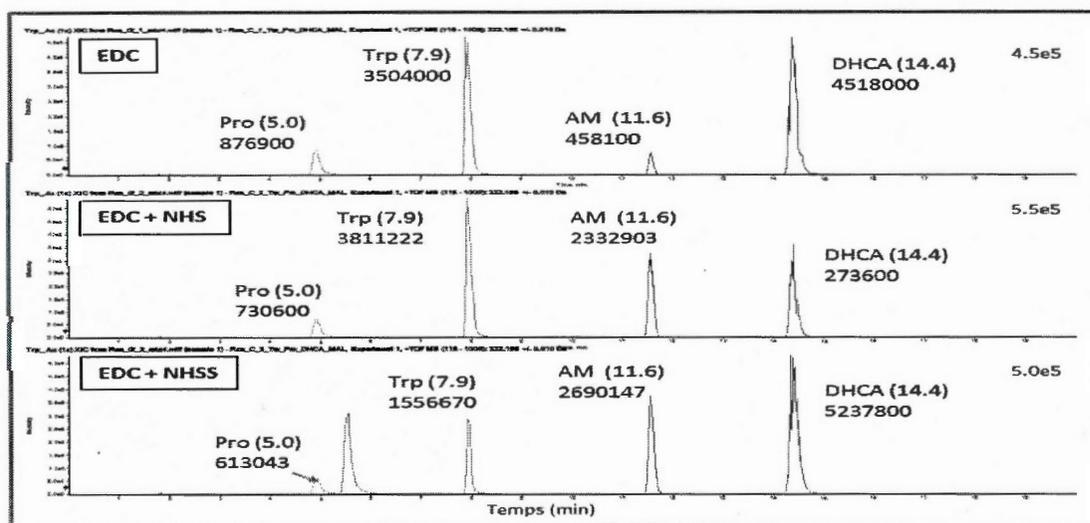


Figure 2.3. Effet du pH neutre sur l'étape d'activation des acides. Ce test est réalisé dans les mêmes conditions que la figure 2.2 à l'exception de la préparation des solutions du mélange d'acides et de l'EDC 0,2 M effectués dans de l'eau.

Enfin, en conditions basiques, les acides et le EDC sont préparés dans une solution de TEA 50 mM à pH 8,0 et on constate que la réaction est nettement améliorée par rapport aux conditions précédentes (Figure 2.4). L'acide malonique semble être

l'espèce chimique la plus sensible au pH basique et l'amélioration des quantités dérivées est supérieure à 4000 fois en comparaison aux conditions acides. Ce pH permet donc une bonne stabilité et prévient l'hydrolyse des intermédiaires d'acides activés. Ce résultat s'accorde avec ce qui est mentionné dans la littérature dans le cadre de la synthèse peptidique ou l'EDC et le Sulfo-NHSS qui est réalisée à un pH de 8,0-9,0 (Jang *et al.*, 2012). Le pH de 8,0 prévient également l'hydrolyse faible mais possible de l'intermédiaire du NHS avec l'acide (ester-NHS stable) et assure la dérivation des acides par l'aniline (Frey & Corn, 1996).

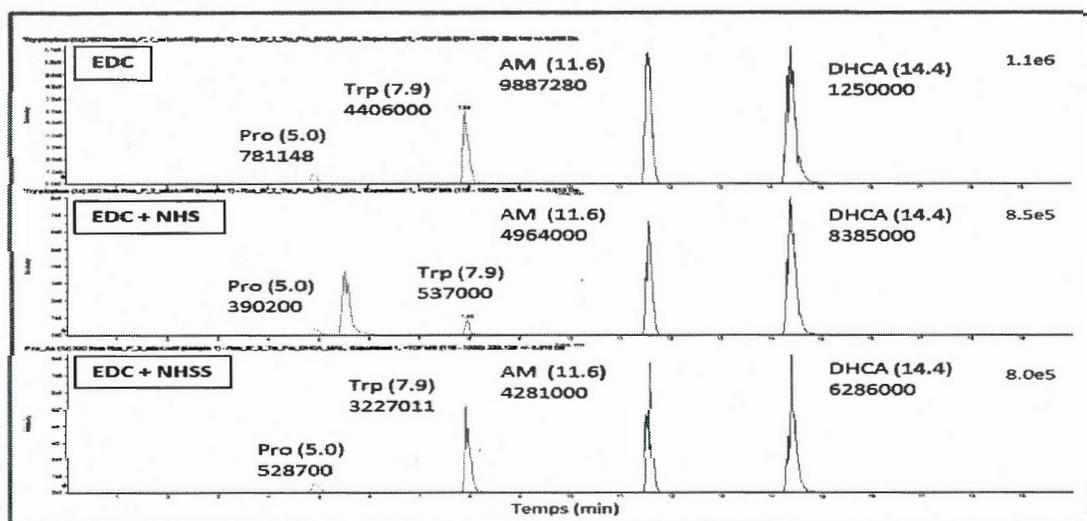


Figure 2.4. Effet du pH basique (pH 8,0) sur l'étape d'activation des acides. Ce test est réalisé dans les mêmes conditions que la figure 2.2 à l'exception de la préparation des solutions du mélange d'acides et de l'EDC 0,2M effectués dans une solution de TEA 50 mM (pH 8,0).

Les acides aminés (proline et tryptophane) illustrent bien le phénomène d'hydrolyse du complexe agent de couplage-groupement carboxylique en milieu acide. Les conditions neutres ou légèrement basiques sont nettement plus adéquates et l'emploi du sulfo-NHSS permet une meilleure dérivation dans le cas du tryptophane. En

contrepartie, l'acide déhydrocholique est très peu affecté par l'emploi d'additifs ou l'augmentation de pH et bénéficie d'une très bonne efficacité de dérivation en milieu acide ainsi que d'une bonne sensibilité en MS. Son pKa inférieur à 6, l'accessibilité de son groupement carboxyle et enfin sa grande hydrophobicité pourrait expliquer cette prédisposition.

Les différences entre le NHS et le sulfo-NHSS ne sont pas significatives mais nous avons opté pour l'utilisation du sulfo-NHSS car ce dernier donnait un résultat légèrement meilleur que le NHS à cause de son caractère hydrophile qui le rend plus soluble. Étant donné le fait que l'efficacité de dérivation dépend des propriétés chimiques des molécules et ne connaissant pas la nature des acides présents dans les extraits biologiques nous avons décidé de conserver l'ajout du Sulfo-NHSS. Cet additif, est reconnu pour augmenter le nombre de réticulations (*crosslinking*) acides/amines et il est établi que l'ester-NHS (complexe formé avec l'acide) est plus stable et s'hydrolyse moins que l'*O*-acyl-iso-urée (Frey & Corn, 1996). Quoique n'ayant pas conduit à une amélioration significative de la dérivation par l'ajout des additifs, ces tests ont permis l'optimisation des conditions du couplage de l'aniline et des acides par l'EDC. Pour la seconde partie de l'optimisation, la réaction de dérivation sera réalisée à pH légèrement basique (8,0) en présence de l'agent de couplage EDC et de l'additif sulfo-NHSS pendant 1h préalablement à l'ajout d'aniline (pH 5,0).

2.1.3 Optimisation de la température de réaction

Afin de déterminer si le chauffage permettait d'augmenter la cinétique de la réaction, nous avons testé trois températures différentes : 25, 40 et 60 °C (Figure 2.5). Nos résultats montrent que l'augmentation de la température à 60°C est inversement

proportionnelle à l'efficacité de dérivation qui se voit réduite. L'acide malonique et l'acide déhydrocholique semblent être très sensibles à la chaleur en comparaison aux acides aminés et affichent une diminution significative de l'efficacité de dérivation à 40°C et 60°C. Cependant selon la littérature, à une température supérieure à 25°C, on assiste à une instabilité des intermédiaires d'acides activés et à leur hydrolyse ce qui a comme conséquence la régénération des acides (Xia *et al*, 2013). En revanche, la dérivation des acides aminés ne présente pas de différences significative entre 25°C et 40°C. Par ce test, nous confirmons donc qu'une température ambiante (25°C) est optimale et permet une dérivation efficace des acides.

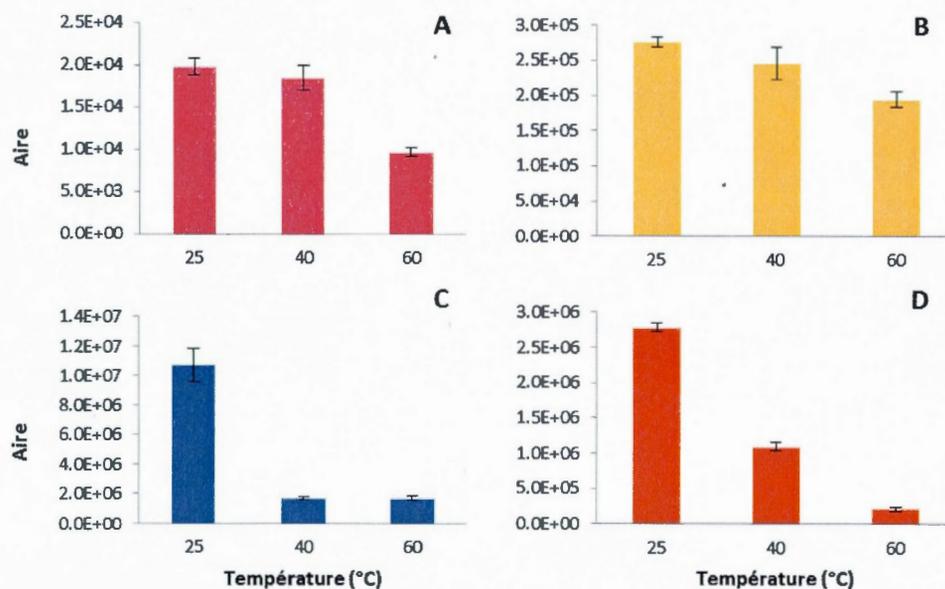


Figure 2.5. Effet de la température sur la réaction de dérivation des acides. L'efficacité de dérivation est évaluée à 3 températures différentes : 25, 40 et 60°C pour les acides suivants : la proline (A), le tryptophane (B), l'acide déhydrocholique (C) et l'acide malonique (D) (n=3).

2.1.4 Optimisation du temps de réaction

Un des objectifs de l'étude est de développer une méthode de dérivation et de quantification des métabolites acides rapide et efficace. Ce test a comme but de déterminer un temps de réaction des acides qui réunirait ces deux conditions. Des temps de réaction de 2, 3 et 24h ont été évalués (Figure 2.6). Comme on pourrait s'y attendre, la dérivation des acides pendant 24h indique les quantités d'acides dérivées les plus importantes pour la majorité des acides. Cependant, les aires sous les pics des acides à 24h, sont seulement deux fois plus importantes (A, B, D) et la réaction semble atteindre une forme de saturation (plafond). Ceci peut-être expliqué par la stabilité de l'agent de couplage (EDC) dont le temps de demi-vie n'est que de 6h à un pH de 5,0 (Gilles *et al.*, 1990). La dégradation de l'EDC rendrait ainsi la réaction de couplage impossible. Il est à noter également que la présence de sulfo-NHS ne semble pas apporter une contribution significative à la dérivation. En effet, le complexe formé entre le sulfo-NHS et le groupement carboxylique possède une stabilité maximale de 12h (Xia *et al.*, 2013). L'acide déhydrocholique (C) présente un comportement différent des autres molécules acides testées. En effet, au bout de 2 h de réaction, la quantité d'acide détectée par l'appareil est très importante en comparaison à l'intensité (quantité détectées) des autres acides pour ce même temps de réaction. Ceci peut être dû au fait que cet acide s'ionise très facilement (de par sa nature chimique et son temps d'élution) qui se traduit par une importante intensité qui dénoterait d'une grande sensibilité en MS. Il accuse une légère diminution après 3 et 24 h de réaction qui n'a pas été examinée de plus près puisqu'elle ne constitue pas une différence significative. La réaction d'une durée de 3 h semble être un bon compromis entre efficacité et temps de dérivation.

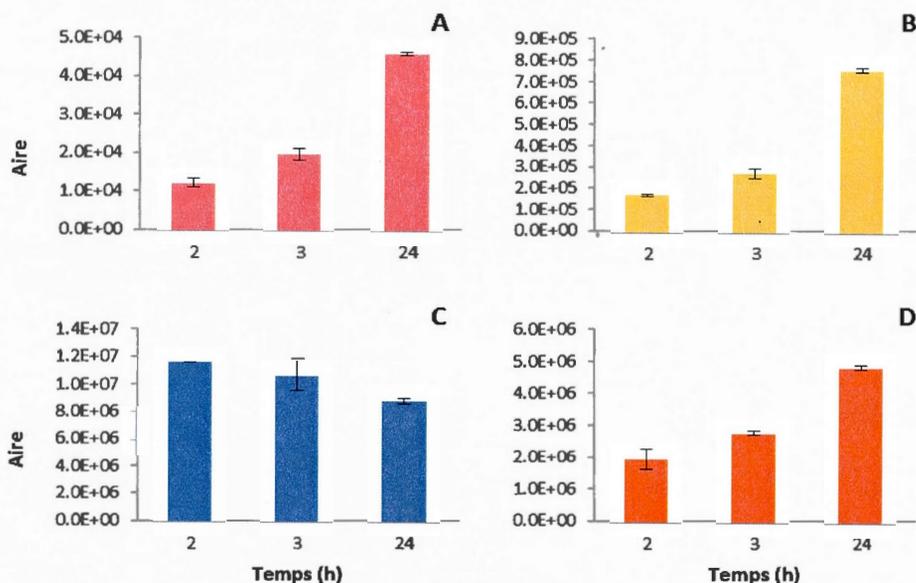


Figure 2.6. Évaluation de la dérivation des acides en fonction du temps. L'efficacité de dérivation est évaluée à 3 temps de réaction différents : 2, 3 et 24 h pour la proline (A), le tryptophane (B), l'acide déhydrocholique (C) et l'acide malonique (D) (n=3).

2.1.5 Conditions optimisées de la réaction de dérivation

L'approche que nous proposons est unique dans le cadre de l'étiquetage isotopique d'acides employant l'EDC et l'aniline. Grâce aux différents tests effectués, nous sommes les premiers à introduire une distinction entre l'étape d'activation (incubation d'une 1h à pH 8.0 en présence de sulfo-NHSS en plus de l'EDC) et l'étape de dérivation par l'aniline (incubation de 2h à pH 5.0) pour une durée totale de réaction de 3h à 25°C (Figure 2.7). L'étape d'activation du groupement carboxylique a été améliorée dans le but d'augmenter l'efficacité de dérivation en agissant sur la stabilité du complexe de l'acide activé. D'une part, en employant un

pH basique afin de contrer l'hydrolyse du complexe en milieu acide et d'autre part en ajoutant un additif (sulfo-NHSS) pour relayer l'EDC.

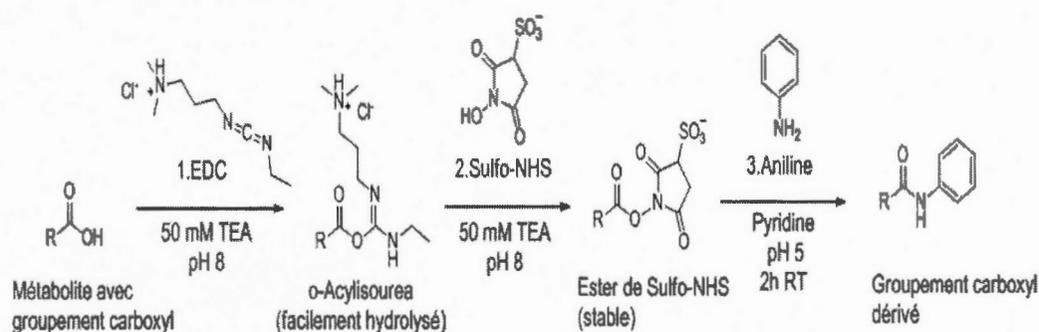


Figure 2.7. Réaction optimisée de la dérivation des acides par l'aniline.

Néanmoins, nous n'avons pas été en mesure de détecter les amides formés par certains acides aminés tel que : la tyrosine ou la cystéine, par exemple. Dans ce cas particulier, l'EDC pourrait réagir avec le groupement hydroxyle de la tyrosine et le groupement sulfhydryle de la cystéine et la suite de la réaction serait difficile à prédire (Gilles, *et al.*, 1990). De plus, bien que l'ajout d'aniline concentrée favoriserait la réaction avec les carboxyles activés (complexe formé avec le EDC ou le Sulfo-NHSS), rien n'exclut que d'autres amines présentes dans le mélange (extraits biologiques) puissent s'introduire à leur tour et former le lien amide. À titre d'exemple, le groupement amine de la chaîne latérale des résidus lysine de par son accessibilité serait un bon candidat pour dériver d'autres acides. Un autre agent limitant de cette méthode est la formation du N-acylurée. Un composé stable qui résulte du réarrangement de l'O-acyliso-urée (acide-EDC) et qui empêche la formation de l'amide entre l'acide et l'aniline (Xia *et al.*, 2013).

Avantages de la dérivation en chromatographie liquide à phase inverse

Au-delà de permettre la séparation de molécules polaires par chromatographie liquide à phase inverse (RPLC) par l'introduction d'une fraction hydrophobe dans ces molécules, la réaction de dérivation présente de nombreux avantages en LC-MS (Figure 2.8). Dans la figure 2.8 A, à l'exception de quelques molécules suffisamment hydrophobes telles que les acides biliaires (1-4), les acides aminés hydrophobes (11,13-14) et certains acides organiques (7 et 16), les autres molécules (trop hydrophiles) ne sont pas retenues par la colonne. Grâce à la formation du lien amide avec l'aniline, les acides deviennent hydrophobes et sont mieux séparés par la colonne. Ce changement de nature chimique les rend mieux adaptés à ce type de séparation et la sélectivité ainsi que la résolution de la chromatographie sont améliorées (affinement des pics) (Yang *et al.*, 2008). Enfin, l'amplification du signal MS est une dernière conséquence de cette hydrophobicité nouvellement acquise.

L'augmentation de la sensibilité en MS est due à plusieurs éléments. Parce qu'ils deviennent moins polaires, les acides sont plus retenus par la colonne et sont par conséquent élués plus tard. Ceci permet de les éloigner du volume mort de la colonne, une zone située au début de gradient et qui est sujette à une suppression du signal à cause de toutes les molécules non retenues par la colonne qui éluent à ce moment-là. De plus, au fur et à mesure que le temps d'analyse progresse, la proportion de solvant organique (acétonitrile) augmente et permet une meilleure efficacité d'ionisation en ESI-MS. Rappelons que l'ionisation ESI, se fait par la vaporisation des analytes (molécules) qui se retrouvent emprisonnés dans de petites gouttelettes chargées. L'azote présent dans l'aniline se protone plus facilement qu'un acide carboxylique en mode d'ionisation positif mais de plus, l'acétonitrile s'évapore plus rapidement que l'eau et ainsi l'étape de passage en phase gazeuse en acquérant une charge est améliorée (Guo & Li, 2009).

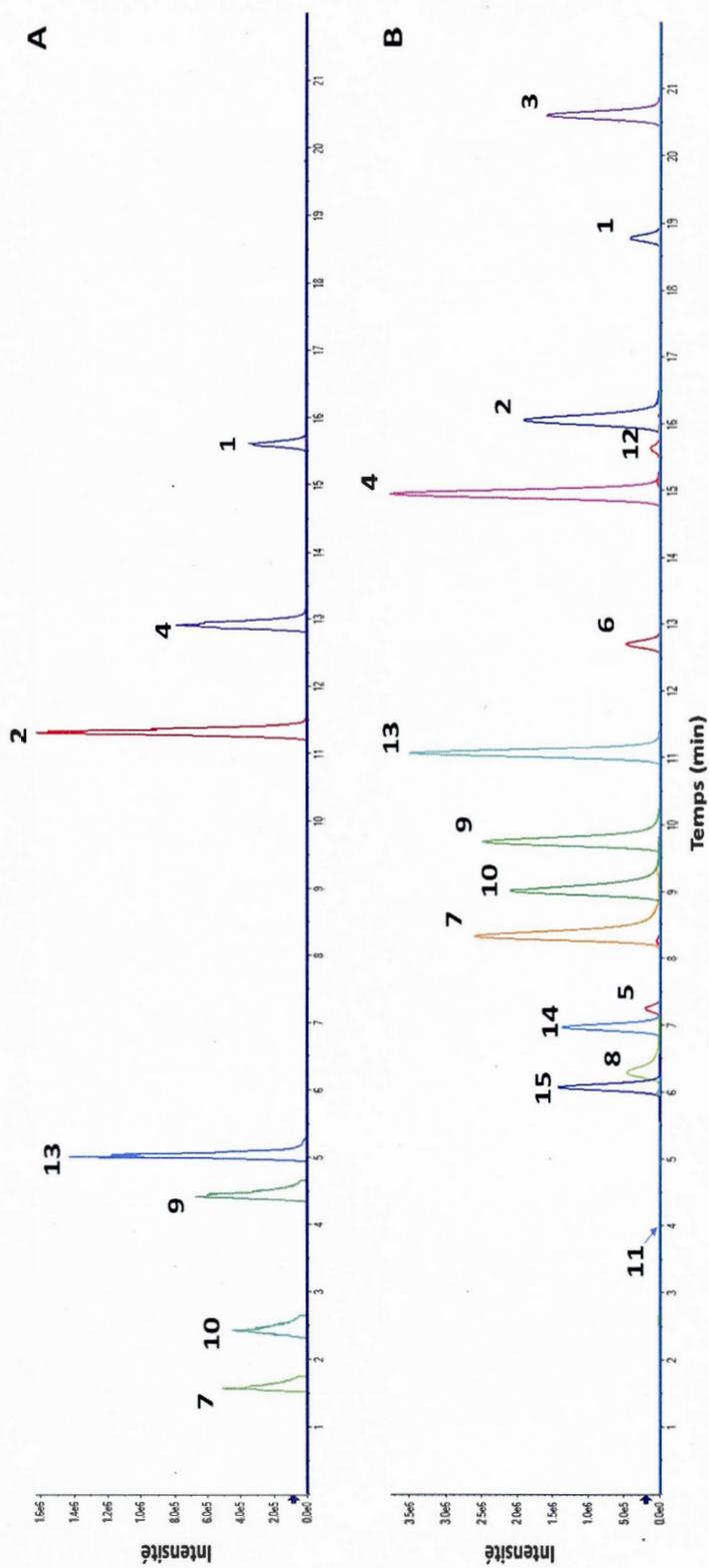


Figure 2.8. Comparaison de la séparation d'acides standards (200uM) non dérivés (A) et dérivés (B) par LC/MS en phase inversée. Standards: (1), acide chenodéoxycholique; (2), acide cholique; (3), acide lithocholique; (4), acide déhydrocholique; (5), acide lactique; (6), acide fumarique; (7), leucine, (8), proline; (9), tryptophane; (10), phénylalanine; (11), alanine; (12), acide oxalique, (13), acide kynurénique; (14), acide déhydroshikimique; (15), acide shikimique.

2.2 Caractéristiques chromatographiques des paires isotopiques

La présence de l'aniline n'affecte en rien les propriétés physicochimiques des molécules; au contraire elle fournit une information supplémentaire pour les retracer, à savoir leur co-élution (Figure 2.9). De plus, les intensités des pics chromatographiques des paires $^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ sont représentatives des ratios utilisés à savoir : 1:5, 1:2, 1:1, 2 :1 et 5 :1. Tout comme les spectres de masses, les intensités des chromatogrammes sont représentatives des proportions de l'acide déhydrocholique dérivé par une des deux versions isotopiques de l'aniline. Cette particularité permet de rapidement distinguer les métabolites dérivés ainsi que de donner une indication sur les quantités présentes notamment dans le cas de deux échantillons différents. À titre d'exemple la comparaison entre un échantillon mutant et son contrôle. (Figure page suivante).

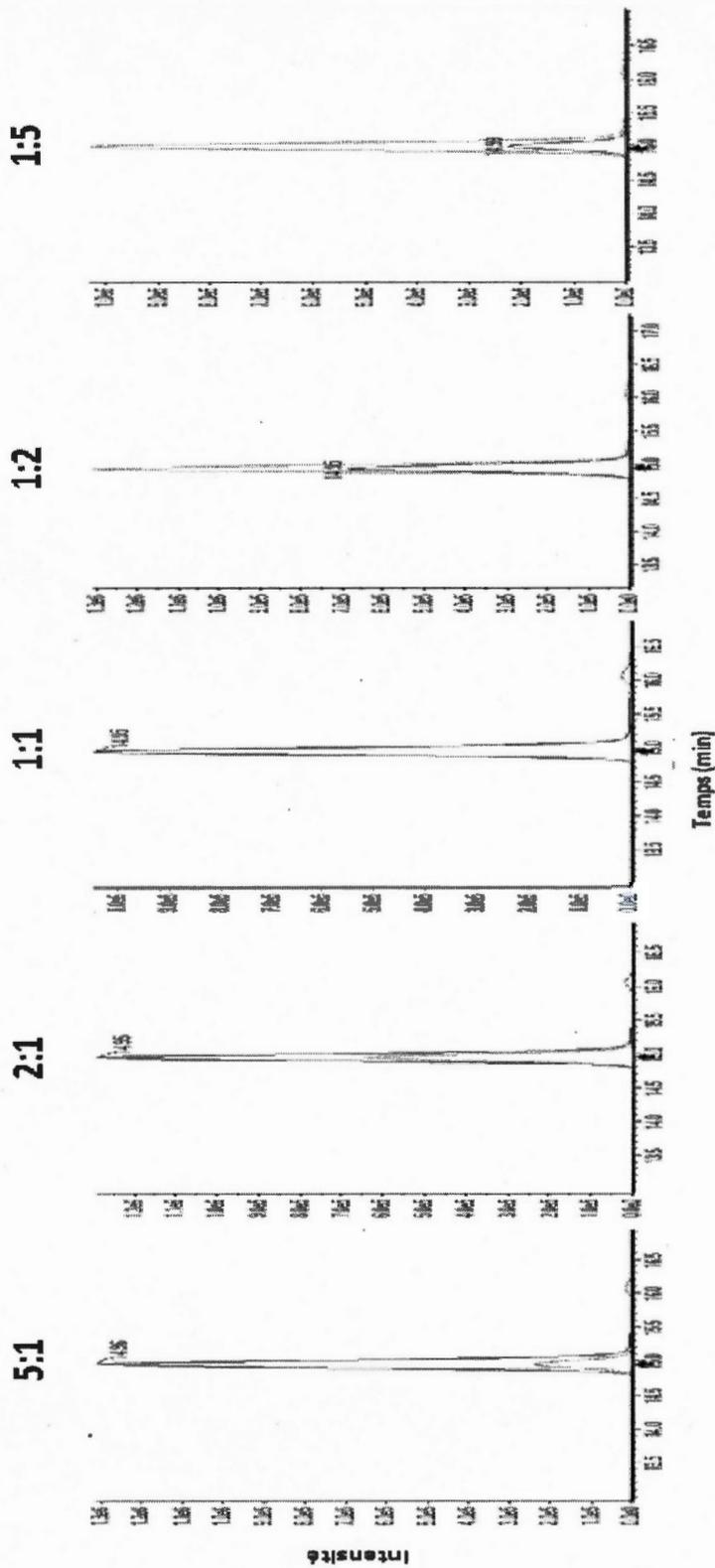


Figure 2.9. Chromatogrammes d'ions extraits pour la paire isotopique de l'acide déhydrocholique aux m/z 468 et 472, mélangés à différents ratios d'aniline $^{12}\text{C}_6$ (bleu) et $^{13}\text{C}_6$ (rose). Les mélanges d'acides dérivés par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ sont assemblés selon les ratios suivants : 1:5, 1:2, 1:1, 2:1 et 5:1. Cette figure met en évidence la co-élution (même temps de rétention) des paires.

2.3 Caractéristiques spectrales des paires isotopiques

L'étiquetage isotopique des acides permet de retracer les paires $^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ dans un spectre de masse complexe. Ces molécules dérivées disposent d'une différence de masse qui leur est propre et qui est égale à 6,02 Da (Figure 2.10). Tout comme pour les pics chromatographiques, on remarque que les intensités des pics de paires sont relatives à la quantité présente dans chaque échantillon.

Dépendamment de la valeur du ratio ($^{12}\text{C} / ^{13}\text{C}$), l'intensité du pic reflète les proportions de l'acide marqué par l'aniline ou l'aniline- $^{13}\text{C}_6$. De plus, la différence de masse de 6,02 Da est nécessaire et permet de prévenir une superposition des pics isotopiques naturels de la molécule contenant le réactif léger et le réactif lourd (Lamos et al., 2007). En spectrométrie de masse chaque molécule possède un patron isotopique qui reflète l'abondance naturelle de ses isotopes. Ainsi le pic monoisotopique (MH^+) d'une molécule est généralement suivi d'un pic supplémentaire indiquant l'abondance du carbone 13 dans cette molécule. Sa masse est égale à (MH^++1) et son intensité équivaut à 1,1% de l'intensité du pic monoisotopique multiplié par le nombre de carbones contenus dans la molécule. Ce patron isotopique dépend du nombre et des masses des isotopes des molécules. Dans le cadre de la quantification relative des molécules dérivées, il est important de prévenir toute interférence des signaux qui peuvent fausser la précision de l'analyse quantitative.

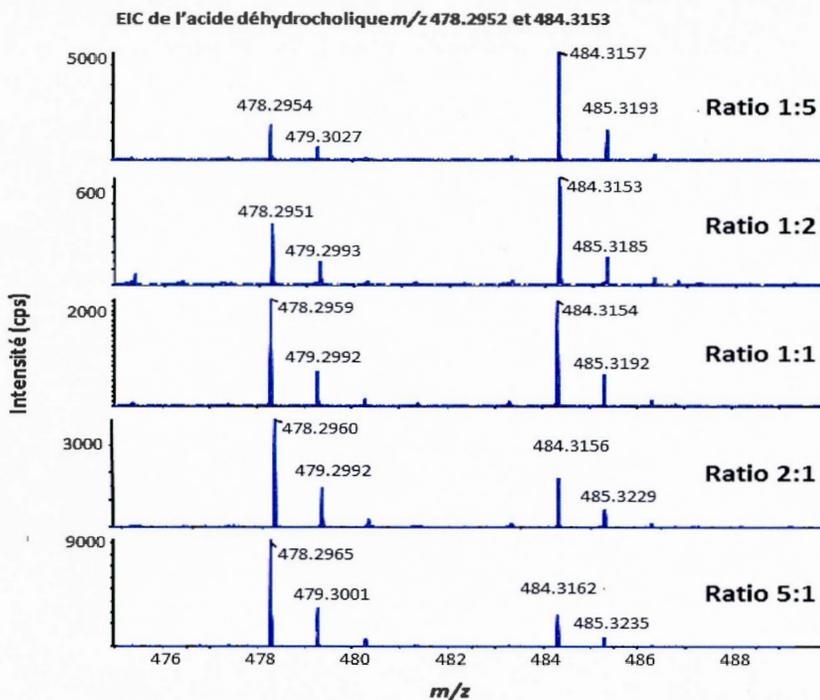


Figure 2.10. Spectres de masse d'ions extraits pour la paire isotopique de l'acide déhydrocholique aux m/z 478 (étiquetage par $^{12}\text{C}_6$) et 484 (étiquetage par $^{13}\text{C}_6$) mélangés à différents ratios. Les pics chromatographiques en bleu illustrent les intensités de l'acide dérivé. Il est possible d'observer le déplacement de masse (*mass shift*) caractéristique entre l'acide marqué par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ équivalent à 6,02 Da.

2.4 Validation de la méthode

Pour évaluer la faisabilité de la quantification relative des métabolites, nous avons procédé à une simulation de quantification relative pour des valeurs de ratios ($^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$) comprises entre 0,2 et 5. Un mélange d'acides variés (différentes propriétés chimiques) et représentatif d'acides organiques que nous pourrions

retrouver dans nos échantillons biologiques a été utilisé. La précision et l'exactitude de la quantification relative ont donc été évaluées et indiquent une bonne corrélation avec les valeurs théoriques (Figure 2.11). Les moyennes des ratios isotopiques ($^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$) des standards calculés sont de : 0,19, 0,41, 0,93, 2,25 et de 4,11 avec des déviations standards relatives de (n=3) de : 5,4%, 5,1%, 5,5%, 7,4% et 9,9% respectivement. L'exactitude des ratios est excellente pour les valeurs comprises entre 0,2 et 1,0 (Tableau 3.1). Pour les valeurs supérieures, la détermination des ratios est moins précise cependant les valeurs reflètent l'augmentation souhaitée. Une variabilité de l'efficacité de dérivation entre les réactifs léger et lourd n'est pas à exclure et pourrait être dues à des différences de solubilité, par exemple (Lamos *et al.*, 2007). La dérivation de grandes concentrations d'acides (50 mM) dans un cadre de métabolomique met en évidence l'efficacité de dérivation qui varie d'un acide à un autre en fonction de ses propriétés physicochimiques. Cette imprécision pourrait être corrigée ultérieurement suite à l'identification des métabolites détectés par la correction du ratio expérimental à l'aide de standards (Lamos *et al.*, 2007) et ne réduit en rien la capacité de cette méthode à évaluer les variations présente dans le métabolome.

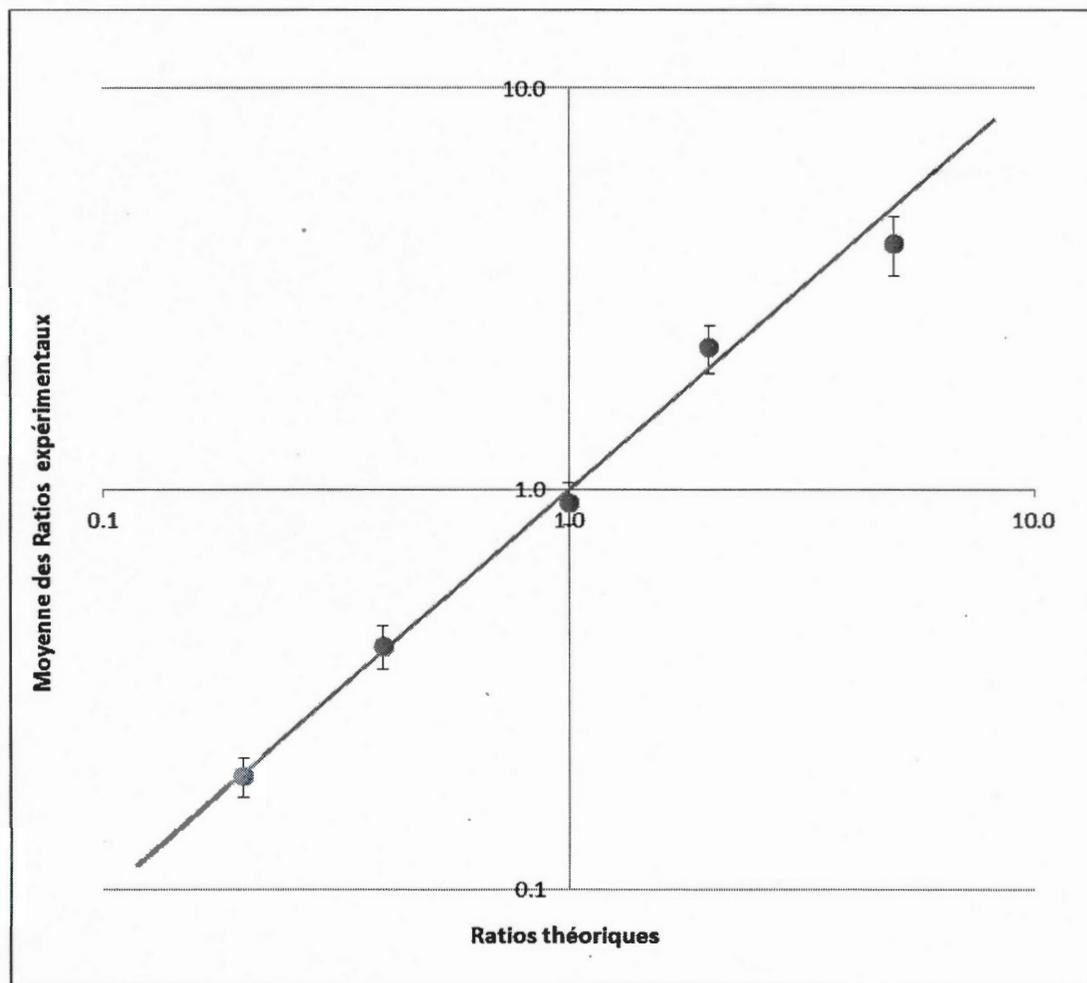


Figure 2.11. Graphique log/log de corrélation des valeurs théoriques et expérimentales des ratios isotopiques de 15 molécules standards. Les mélanges dérivés ont été assemblés dans les proportions $^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$ suivantes : 1:5, 1:2, 1:1, 2 :1 et 5 :1. Ce graphique compare l'exactitude des ratios expérimentaux aux valeurs théoriques. On observe que pour les ratios compris entre 0,20 et 1,0, la méthode demeure précise. Cependant, pour les ratios au-dessus de 1,0, la variabilité des résultats devient importante et s'écarte des valeurs théoriques.

Table 3.1. Quantification relative (valeurs expérimentales des ratios en comparaison à leurs valeurs théoriques) de 15 acides aux ratios $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ suivants : 1:5, 1:2, 1:1, 2:1 et 5:1.

Analytes standards	Rt (min)	Ratio expérimental	Précision CV(%)								
		Ratio = 0.20		Ratio = 0.50		Ratio = 1.00		Ratio = 2.00		Ratio = 5.00	
Acide cholique	16.1	0.17	7.4	0.34	6.7	0.96	8.1	3.25	12.5	6.01	10.8
Acide déhydrocholique	14.9	0.20	8.0	0.36	3.9	1.05	4.9	3.05	8.0	5.16	10.3
Alanine	4.6	0.20	7.3	0.45	7.5	0.77	4.0	1.62	9.1	3.06	9.4
Acide chenodéoxycholique	18.8	0.10	2.7	0.28	3.1	0.93	7.3	3.36	17.9	6.68	19.8
Acide fumarique	12.7	0.25	5.8	0.28	6.5	0.93	8.2	3.03	7.5	3.05	10.1
Acide kynurenique	11.1	0.23	3.9	0.50	2.7	0.91	4.8	1.87	2.1	3.75	2.9
Acide Lactique	7.2	0.21	2.7	0.43	10.5	0.81	5.8	1.59	2.8	3.00	7.0
Leucine	8.3	0.21	2.8	0.47	3.4	0.85	2.6	1.70	2.3	3.61	4.6
Acide lithocholique	20.6	0.16	1.3	0.35	6.2	1.22	9.4	2.59	20.7	3.80	23.3
Acide oxalique	15.1	0.17	14.0	0.40	4.4	0.97	9.9	2.21	11.4	3.72	14.1
Phénylalanine	9.0	0.22	3.2	0.49	3.8	0.90	3.3	1.82	1.5	3.75	4.3
Proline	6.3	0.21	3.9	0.44	2.9	0.80	4.8	1.67	1.1	3.58	1.2
Acide Déhydroshikimique	7.0	0.14	9.5	0.39	5.0	0.90	3.6	2.00	5.6	4.04	9.3
Acide shikimique	6.1	0.19	6.2	0.41	6.1	0.95	3.6	2.18	5.9	4.42	6.5
Tryptophane	9.7	0.22	2.4	0.51	4.1	0.94	2.2	1.88	2.9	3.98	6.0

2.5 Extraction des métabolites

2.5.1 Optimisation du solvant d'extraction

Le profilage métabolomique global exige une méthode d'extraction de métabolites qui puissent extraire le plus de molécules possible tout en réduisant au maximum les risques de dégradation de ces dernières (Winder *et al.*, 2008). Pour ce premier test, nous avons utilisé une quantité de 1000 vers adultes (comptés manuellement) de la souche sauvage (N2) par échantillon. Une fois lavés, les vers sont rapidement plongés dans de l'azote liquide. Cette méthode est assez répandue en métabolomique et n'a pas fait l'objet de plus amples investigations. Le choc thermique tue instantanément les vers et les échantillons sont évaporés pour prévenir toutes pertes de métabolites et permet d'assurer une meilleure reproductibilité des résultats. Plusieurs solvants ont été testés pour évaluer l'importance de la polarité de ces derniers ainsi que l'effet de la température (Figure 2.12). Le MeOH (80%) (C), l'eau (80°C) (D) et l'EtOH (80°C) (B) sont employés pour l'extraction des métabolites en utilisant une sonde à ultrasons pour homogénéiser les tissus de *C. elegans*. Concernant l'extraction liquide-liquide, un système composé de 3 solvants est utilisé (MeOH/CHCl₃/0,2N NaOH (pH 11,0)) aux proportions suivantes 2:2:1 et les tissus sont broyés par sonication régulière.

Le courant total ionique (TIC) est un chromatogramme qui représente la somme des intensités des ions détectés tout au long de l'analyse LC-MS pour un domaine de masse donné (m/z 100-1000). Les TIC des 3 méthodes employant la sonde à ultrasons se distinguent par la présence d'un pic à 2,5 min important représentatif des molécules polaires extraites mais sans rétention importante sur la colonne. En comparaison avec la sonication régulière utilisée pour l'extraction liquide-liquide en (A) où ce pic semble beaucoup moins intense.

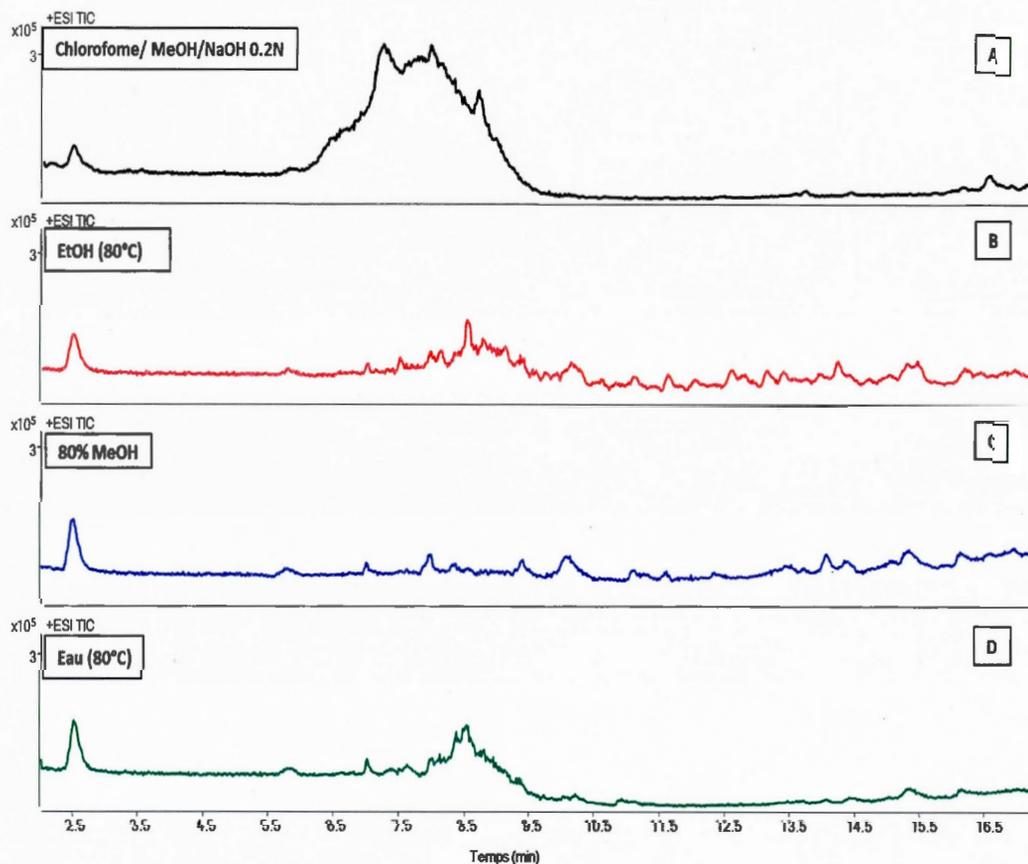


Figure 2.12. Chromatogrammes du courant total ionique (TIC) en mode positif des extraits non dérivés de la souche sauvage de *C. elegans* (N2) de différents solvants d'extraction (m/z de 100-1000). En (A) est employée ELL (25°C), en (B) l'EtOH (80°C), en (C) le MeOH 80% et en (D) l'eau à (80°C). La sonde à ultrasons est employée pour l'homogénéisation des nématodes pour tous les tests.

Si on observe les TIC de ces quatre méthodes d'extraction, le nombre de pics (d'ions) détectés pour l'éthanol chaud (B) est assez significatif en comparaison aux pics du TIC de l'extraction liquide-liquide (ELL) (A) et encore plus important que pour les deux autres solvants le MeOH 80% en (C) et l'eau à (80 °C) en (D). Ce résultat confirme ce que rapporte la littérature pour ce qui est de l'augmentation de l'efficacité d'extraction grâce à l'emploi de solvants chaud (Yanes, *et al.*, 2011).

Nous avons également procédé à la détermination du nombre de métabolites détectés pour chaque méthode (Figure 2.13) et ces données renforcent les résultats observés dans les TIC (Figure 2.12). En totalité une moyenne de 55, 103, 140 et 268 pics chromatographiques (potentiellement des métabolites) ont été détectés avec des coefficients de variations de : 13,7%, 24,9%, 9,5% et 10,5 % pour les méthodes d'extraction liquide-liquide (ELL) à 25°C, à l'eau (80°C), 80% de MeOH (température ambiante car trop réactif à température élevée) et l'EtOH (80°C), respectivement. On constate que la variabilité est d'autant plus importante lorsque le solvant est chaud et plus sujet à l'évaporation. L'ELL semblait être une approche intéressante de par sa sélectivité. L'emploi de deux phases (polaire/non-polaire) de séparation des molécules devait améliorer l'extraction. De plus, le pH basique (11,0) utilisé avait comme rôle d'assurer la déprotonation des acides et leur inclusion dans la phase polaire. Il s'est avéré que cette méthode n'a pas abouti à l'extraction d'un plus grand nombre de métabolites en plus d'introduire de la variabilité à cause des transferts de volume.

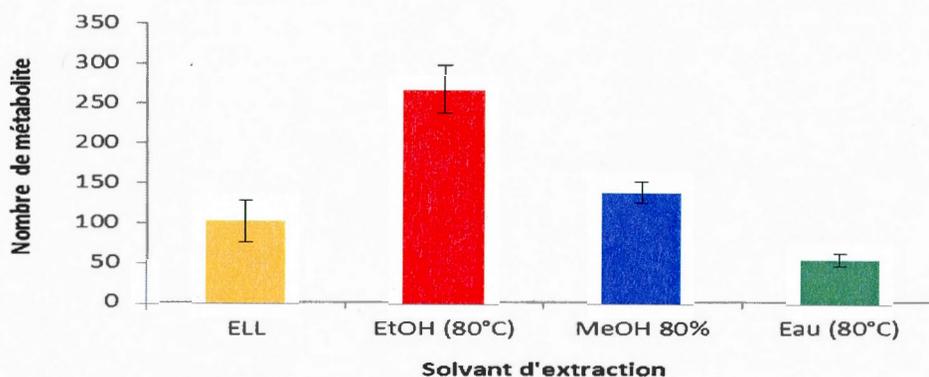


Figure 2.13. Métabolites (pics chromatographiques) détectés en fonction du solvant d'extraction. Comparaison des différentes méthodes d'extraction (n=3)

D'autre part, nous avons constaté que l'emploi de la sonication ne constitue pas une bonne méthode d'homogénéisation des tissus. Des carcasses de vers intactes résiduelles au microscope ont été observées. C'est pour cette raison que nous avons tenté d'améliorer le procédé de destruction des carcasses des vers dans la section 3.2 qui suit. Enfin, la méthode d'extraction avec l'EtOH chaud s'est distinguée des autres méthodes par une augmentation du nombre de métabolites extraits et une bonne reproductibilité. Nous avons donc décidé de conserver cette méthode pour la suite des tests.

2.5.2 Évaluation de la méthode d'homogénéisation des tissus

C. elegans est un animal doté d'une carcasse assez rigide nommée cuticule. Cette enveloppe externe très résistante est formée de glycoprotéines et de lipides (Strange, 2006). Nous avons donc testé quatre méthodes d'homogénéisation des tissus pour déterminer laquelle serait la plus apte à extraire les métabolites. Pour se

faire, nous avons employé les trois méthodes d'homogénéisation des tissus suivantes : la sonde à ultrasons (A), le mortier (B) et le Bead beater (D) et (C). En termes de solvant, nous avons comparé l'EtOH (80°C) et le MeOH (80%). Comme démontré précédemment, nous avons procédé à la comparaison des TIC des extraits obtenus de ces 4 méthodes pour déterminer la meilleure approche (Figure 2.14). L'extraction à l'EtOH chaud employant le Bead beater (C), permet d'obtenir un TIC avec un nombre de pics (ions) détectés significatifs ayant une grande intensité en comparaison avec la sonde à ultrasons (A) et le mortier (B). De plus, l'emploi du bead beater en (C) et (D) indique la présence d'un pic à environ $t_r=2$ min important représentatif des molécules polaires extraites qui est beaucoup moins important pour les deux autres dispositifs d'homogénéisation des tissus et ce, indépendamment du solvant ou de la température (EtOH chaud ou 80% MeOH). Le Bead beater s'avère être une méthode rapide qui opère par l'introduction de billes de silice (0.1 mm) dans les échantillons qui sont secoués dans l'appareil à grande vitesse et semble être très efficace. Ce résultat est renforcé par les conclusions établies par une étude similaire de métabolomique non ciblée chez *C. elegans* (Geier, *et al.*, 2011). En combinaison avec les données de la section précédente, nous avons donc conclu que l'extraction à l'EtOH chaud employant le Bead beater était l'approche d'extraction préconisée.

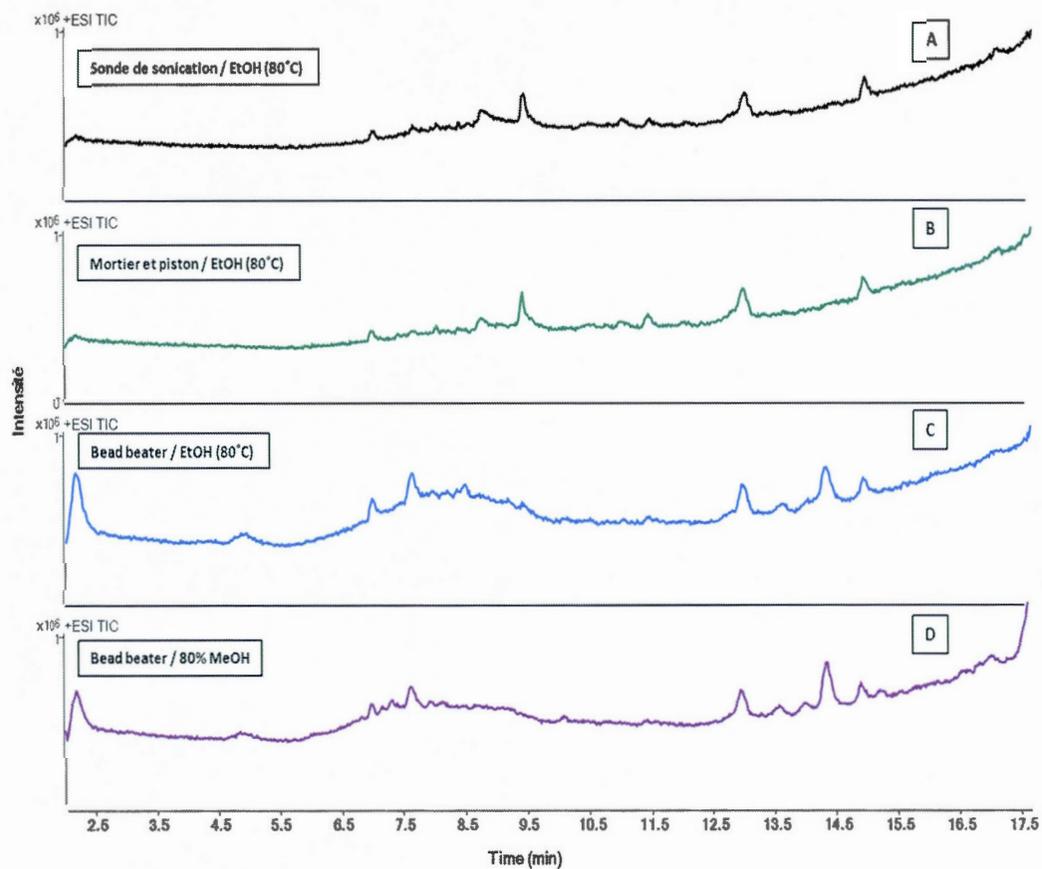


Figure 2.14. Chromatogrammes du courant total ionique (TIC) en mode positif des extraits de la souche sauvage de *C. elegans* (N2) non dérivé pour 3 différentes méthodes d'homogénéisation des tissus et deux solvants d'extraction (m/z de 100-1000). L'extraction a été réalisée avec de l'EtOH (80°C) et à la sonde à ultrasons (A), au mortier (B) et au Bead beater pour (C) et (D) avec du l'EtOH (80°C) et du MeOH 80% (25°C).

2.6 Quantification relative des métabolites détectés chez la souche mutante TDP-43

Suite à l'optimisation de notre méthode de profilage métabolomique avec la souche sauvage de *C. elegans*, nous avons procédé à son application à la souche mutante TDP-43 que nous désirions étudier. Dans un premier temps, nous avons tenté d'évaluer si cette méthode permettait de détecter un grand nombre de métabolites mais surtout, d'évaluer les variations métaboliques de ces dernières comparé à la souche contrôle TDP-43 (sans mutation). Suivant la même approche que pour les solutions standards de mélanges d'acides, les vers mutants ont été comptés manuellement à raison de : 2500, 5000, 125 000 vers/tubes puis dérivés séparément par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ afin d'obtenir les mélanges des ratios suivants: 1:5, 2:5, 1:1, 5:2, 5:1. Nous avons été en mesure de détecter 42 métabolites (Tableau 3.2). Ces métabolites ont été identifiés à l'aide du logiciel Metabolite PilotTM et d'un algorithme performant qui procède à un filtrage des données basé sur le marquage isotopique des paires de métabolites (masse de l'aniline - $^{12}\text{C}_6$ et $^{13}\text{C}_6$ ajoutée à l'acide original), le temps de rétention (identique), la différence entre les paires (6,02 Da) et enfin la valeur du ratio isotopique. Le logiciel fournit une formule potentielle des métabolites accompagnée de l'exactitude de la masse (en ppm) par rapport à la masse mesurée du métabolite dérivé. Pour la grande majorité des métabolites, les valeurs des ppm se situent entre 0,3 et 10 ppm. Ces identités sont possibles mais pas certaines et nécessitent des vérifications dans les bases de données ainsi qu'une confirmation de leur structure avec son homologue synthétique par LC-MS/MS. Pour ce qui est des autres structures suggérées avec une importante différence de ppm (entre 12-30 ppm), elles sont moins probables. La métabolomique est en science en cours de développement. Énormément de molécules doivent être caractérisées et les études actuelles apportent une contribution nécessaire et non négligeable à ce domaine en termes de nouvelles molécules caractérisées.

Table 3.2. Résumé des métabolites détectés dans la souche mutante (mTDP-43) de *C. elegans* par LC/MS.

Métabolite	Formule (métabolite non- dérivé)	t _r (min)	m/z (¹² C ₆)	m/z (¹³ C ₆)	Exactitude ¹² C ₆ (ppm)	Exactitude ¹³ C ₆ (ppm)
1	C4H8O2	10.5	164.1083	170.1283	8.2	6.8
2	C3H7NO2	4.5	165.1028	171.1227	3.4	1.7
3	C5H9NO2	6.2	191.1183	197.1386	1.9	3.0
4	C5H11NO2	7.1	193.1346	199.1548	5.5	5.8
5	C2H7O4P	5.7	202.0630	208.0831	1.0	1.2
6	C5H7NO3	6.8	205.0982	211.1184	5.2	5.3
7	C5H6O4	8.4	206.0822	212.1026	5.2	6.0
8	C6H13NO2	8.4	207.1499	213.1702	3.7	4.2
9	C6H13NO2	8.6	207.1503	213.1705	5.2	5.7
10	CH14NO4P	13.9	211.1228	217.1427	10.2	9.1
11	C6H9NO3	7.4	219.1137	225.1338	4.0	3.7
12	C3H3N7O	14.7	229.0984	235.1187	7.2	7.6
13	C9H11NO2	9.2	241.1352	247.1554	7.0	7.0
14	C3H11NO7	13.6	249.1034	255.124	-18.8	-16.8
15	C3H13NO7	16.1	251.1197	257.1397	-16.2	-16.2
16	C9H10O4	7.9	258.1138	264.1335	5.3	3.3
17	C5H12N6O3	10.0	280.1468	286.1668	-17.3	-17.3
18	C5H13N5O4	10.4	289.1644	283.1449	-14.3	-12.8
19	C7H13N5O3	8.6	291.1495	297.1691	-23.8	-25.1
20	C6H22N2O4S	6.0	294.1811	300.2017	-12.0	-10.2
21	C7H14N2O4S	2.5	298.1228	304.142	2.8	-0.2
22	C8H17NO4S	11.0	299.1403	305.1607	-7.1	-6.1
23	C6H12N2O6S	5.6	316.0958	322.116	-1.2	-1.1
24	C3H17NO5P2S	4.6	317.0813	323.1011	-11.0	-11.9
25	C5H12N3O4PS	4.5	317.0809	323.1010	-7.2	-7.2
26	C9H23O5P	9.1	318.1815	324.2021	-4.3	-2.9
27	C7H9NO7S	5.3	327.0655	333.0858	3.0	3.3
28	C10H26NO5P	7.9	347.2092	353.2299	-0.6	1.1
29	C4H19O7PS2	5.3	350.0804	356.0996	-14.8	-16.9
30	C19H16N2O3	15.0	396.1731	402.1936	0.3	6.9
31	C6H16N2O5P2S2	2.7	398.0448	404.0638	-18.6	-20.9
32	C9H22N3O5PS2	4.7	423.1198	429.1396	-20.3	-20.8
33	C10H14N5O8P	4.6	439.1131	445.1335	1.1	1.8
34	C8H26N5O5PS2	4.5	443.1678	449.1892	4.4	7.0
35	C10H29N5O8S2	4.5	487.1955	493.2155	-9.9	-9.9
36	C10H30O10S4	2.8	514.1184	520.1381	-16.3	-16.8
37	C14H36N9O7PS	8.6	581.2752	587.2969	1.8	4.5
38	C13H34N3O12PS2	7.4	595.1865	601.2069	-0.3	0.1
39	C3H4O3	12.7	239.1189	251.1588	4.1	2.8
40	CH6N8O2	11.1	313.1563	325.196	-22.0	-23.1
41	C7H9NO4	14.7	322.1569	334.1972	5.9	5.8
42	C11H33N10O9PS3	9.4	727.2356	739.2767	0.8	1.9

2.6.1 Précision de la méthode

Pour ce qui est de l'évaluation de l'exactitude de la méthode, les ratios ne sont pas précis et présentent une grande dispersion de valeurs (Figure 2.15). Cette variabilité est très significative et les coefficients de variations des ratios sont compris entre 5 et 40% pour une majorité des paires et dans les cas extrêmes sont supérieurs à 55%. Cette variabilité est assez importante en comparaison aux valeurs rapportées dans d'autres études métabolomiques chez *C. elegans* employant différentes méthodes de profilage qui situent la variabilité entre 15-30% (Geier *et al.*, 2011). L'inexactitude des ratios est trop importante pour pouvoir valider cette méthode de quantification relative des métabolites. Cette partie est essentielle dans une étude métabolomique dont l'objectif est de quantifier les variations du métabolome. Par la nature semi-ciblée de cette étude, l'identité des molécules dérivées n'est pas connue, ce qui complique l'interprétation des résultats de ce test. Nous attribuons donc cette variabilité essentiellement à l'imprécision qui découle du comptage manuel approximatif des vers. Les vers prélevés sont synchronisés et cultivés dans des conditions similaires, mais ceci n'exclut pas la présence de vers à différents stades de développement. Toutefois, il est à noter qu'en dépit de cette variabilité, les résultats obtenus indiquent une diminution et une augmentation des ratios qui reflètent les quantités (nombre) différentes de vers. C'est pourquoi nous avons décidé de poursuivre l'optimisation en axant nos efforts sur un moyen de comptage des vers plus précis en utilisant le Copas Biosort, un appareil qui compte les vers avec précision.

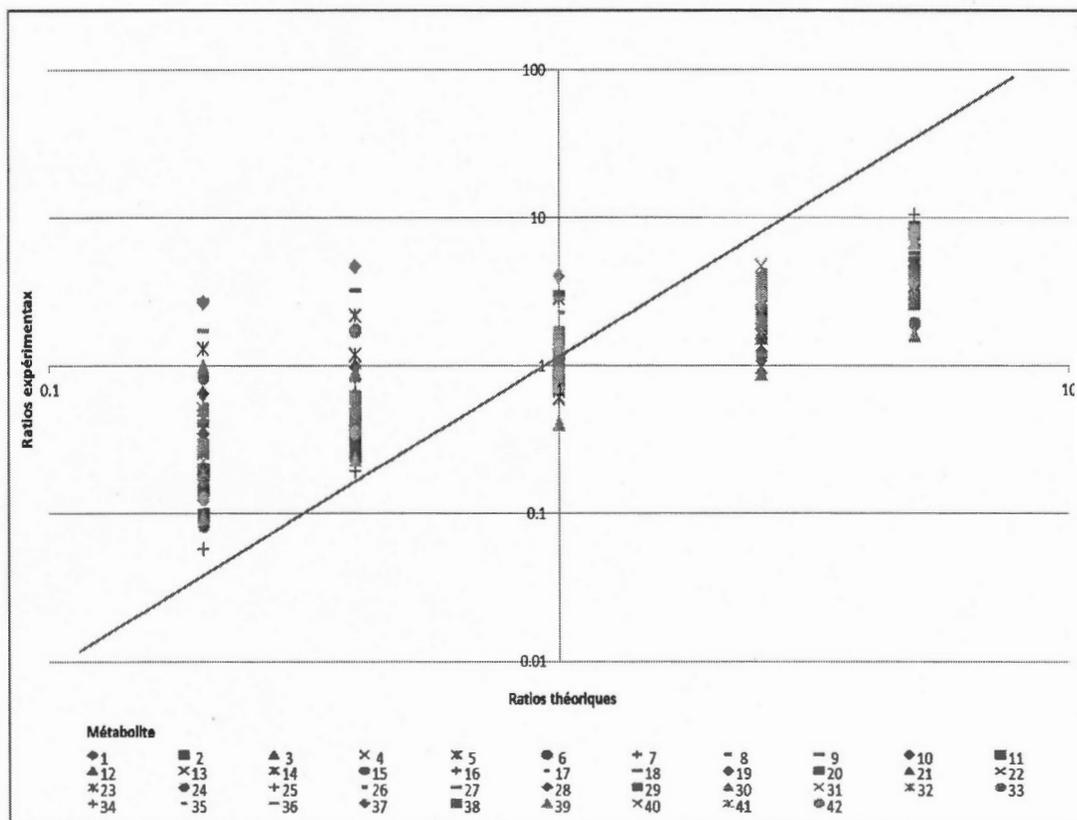


Figure 2.15. Graphique de corrélation (log/log) des métabolites endogènes présents dans la souche mutante mTDP-43 (n=6). Les extraits de la souche m-TDP-43 ont été dérivés par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ et mélangés dans les ratios suivants: 1:5, 2:5, 1:1, 5:2, 5:1. Le graphique log/log situe les valeurs des ratios expérimentales par rapport aux valeurs théoriques et permet de visualiser la variabilité observée dans les extraits biologiques.

2.7 Concentrations relatives des métabolites dans les extraits de la souche mTDP-43

Dans un premier temps nous avons procédé à l'évaluation des niveaux des métabolites détectés chez la souche mutante de TDP-43 et son contrôle TDP-43wt. Les extraits mutants et le contrôle ont été dérivés par l'aniline- $^{12}\text{C}_6$ et aniline- $^{13}\text{C}_6$, respectivement, et ont été mélangés 1:1, de manière à déterminer si le métabolite est sur ou sous-exprimé chez les mutants (Figure 2.16). Un ratio proche de 1 équivaldrait à un taux semblable chez le mutant et le contrôle; c'est le cas pour un bon nombre de métabolites. Néanmoins, un petit nombre de ces métabolites affichent une baisse (métabolites #6 et #7) ou une augmentation (#42) de leurs niveaux qui est trois fois au contrôle. Dans une seconde partie, nous avons entrepris de vérifier que les variations observées chez la souche mutante (Figure 2.16) étaient une conséquence de la pathologie et non de l'introduction de la protéine mutante chez *C. elegans*. Pour ce faire, nous avons comparé les extraits mutants avec les niveaux d'expression de ces mêmes métabolites dans la souche sauvage (N2) (Figure 2.17). Tous les métabolites n'étaient pas détectés dans la souche sauvage mais pour ceux qui ont été détectés, nous avons évalué leur niveau d'expression dans la souche contrôle TDP-43wt en comparaison avec la souche sauvage (N2) (Figure 2.17). Si les ratios avoisinent 1, on fait face à des niveaux similaires dans les souches contrôle TDP-43wt et N2 et donc le changement observé chez la souche mutante (s'il y a lieu) est dû réellement à la mutation. Pour ce qui est des métabolites dont les quantités varient dans la souche contrôle TDP-43wt en comparaison avec la souche sauvage (N2), l'introduction de la mutation pourrait être en cause puisque la quantité des dits métabolites diffère de son niveau normal dans la souche sauvage. Nous avons donc pu conclure que les métabolites #6 et #7 qui possèdent des niveaux d'expression normaux dans la souche contrôle TDP-43wt, qu'ils constituaient des cibles potentielles sans pouvoir pour le moment, quantifier avec exactitude leur variation

réelle dans la souche mutante. Il serait intéressant de poursuivre les recherches dans le but d'une éventuelle identification et l'établissement d'un lien avec le développement de la SLA.

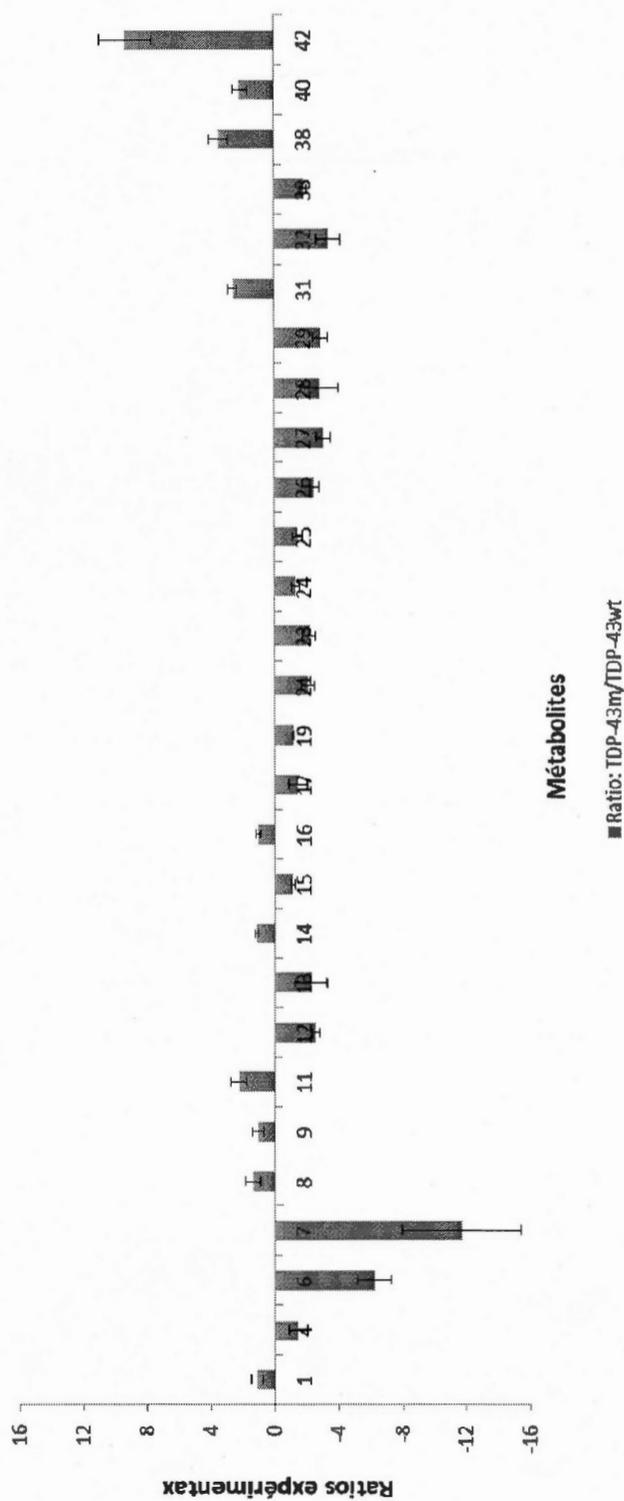


Figure 2.16. Concentrations relatives des métabolites détectés dans les extraits de la souche mTDP-43 (n=5). Les extraits de *C. elegans* de la souche mTDP-43 et la souche contrôle TDP-43wt ont été dérivés par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ et respectivement. Ils ont par la suite été mélangés dans une proportion de 1:1. Les ratios ayant une valeur inférieure à 1, sont exprimés en (-1/Ratio) et représentent des métabolites qui sont moins abondants chez la souche mutante que la souche sauvage. Les niveaux d'une majorité de métabolites sont en baisse en comparaison à leur contrôle. La diminution dans le cas des métabolites #6 et #7 ou l'augmentation pour les métabolites #42 sont significative.

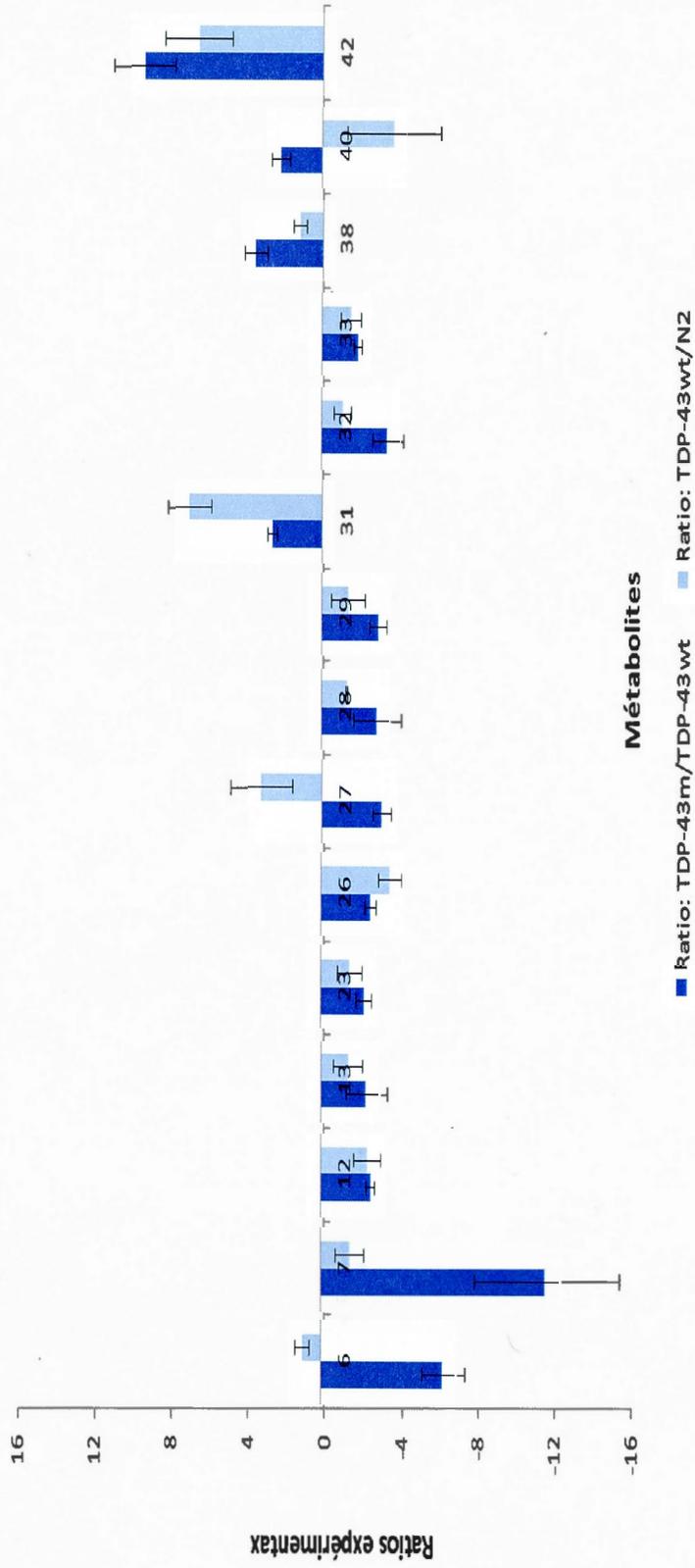


Figure 2.17. Comparaison des concentrations relatives des métabolites présents dans la souche mutante (TDP-43) et sauvage (N2) (n=5). Les niveaux des métabolites dans les extraits mutants avec leurs niveaux d'expression dans la souche sauvages (N2).

2.9 Évaluation de l'efficacité d'extraction

Suite aux résultats préliminaires de l'application de notre méthode de profilage métabolomique chez la souche mutante TDP-43, nous avons réexaminé notre méthode d'extraction de métabolites à l'EtOH chaud en employant le Bead beater comme méthode d'homogénéisation des tissus. Pour ce faire, le nombre de vers est compté à l'aide du Biosort Copas, un appareil qui a permis de compter les vers de type sauvage (N2) avec précision à raison de 2500 vers/tube tout en sélectionnant uniquement les vers à un stade adulte. De plus, nous avons employé lors de cette extraction une solution de 75% d'EtOH froid ajouté aux tubes et incubé à 80°C pendant 3 min. Contrairement à une solution d'EtOH pure à 80°C, ce pourcentage d'EtOH est suffisant pour une extraction optimale des métabolites (Gonzalez *et al.*, 1997) et prévient l'évaporation du solvant (si préalablement chauffé) lors des manipulations. Les extraits de vers ont été maintenus à une température de 4 °C en dehors des manipulations pour prévenir toute dégradation des métabolites. Nous avons également réévalué l'extraction par sonication (sonde à ultrasons) et l'extraction au MeOH 80%. Ces résultats ont mis encore une fois en évidence, la grande efficacité d'extraction de la méthode employant l'EtOH chaud et le Bead beater (Figure 2.18). Cette méthode se distingue des autres méthodes par une quantité maximale (aires sous les pics) de métabolites extraites et une très bonne reproductibilité avec des coefficients de variation se situant entre 3 et 25% pour une majorité de métabolites. L'extraction employant la sonication présente une très grande variation de résultats pour les deux solvants testés (MeOH ou EtOH). Cette méthode génère plus variabilité à cause des manipulations qui lui sont inhérentes (introduction de la sonde à plusieurs reprises et évaporation du solvant). Enfin, l'emploi du MeOH lors de l'extraction au Bead beater bien que recommandé par la littérature (Sellick *et al.*, 2010) ne permet pas d'obtenir de meilleurs résultats que l'extraction à l'EtOH.

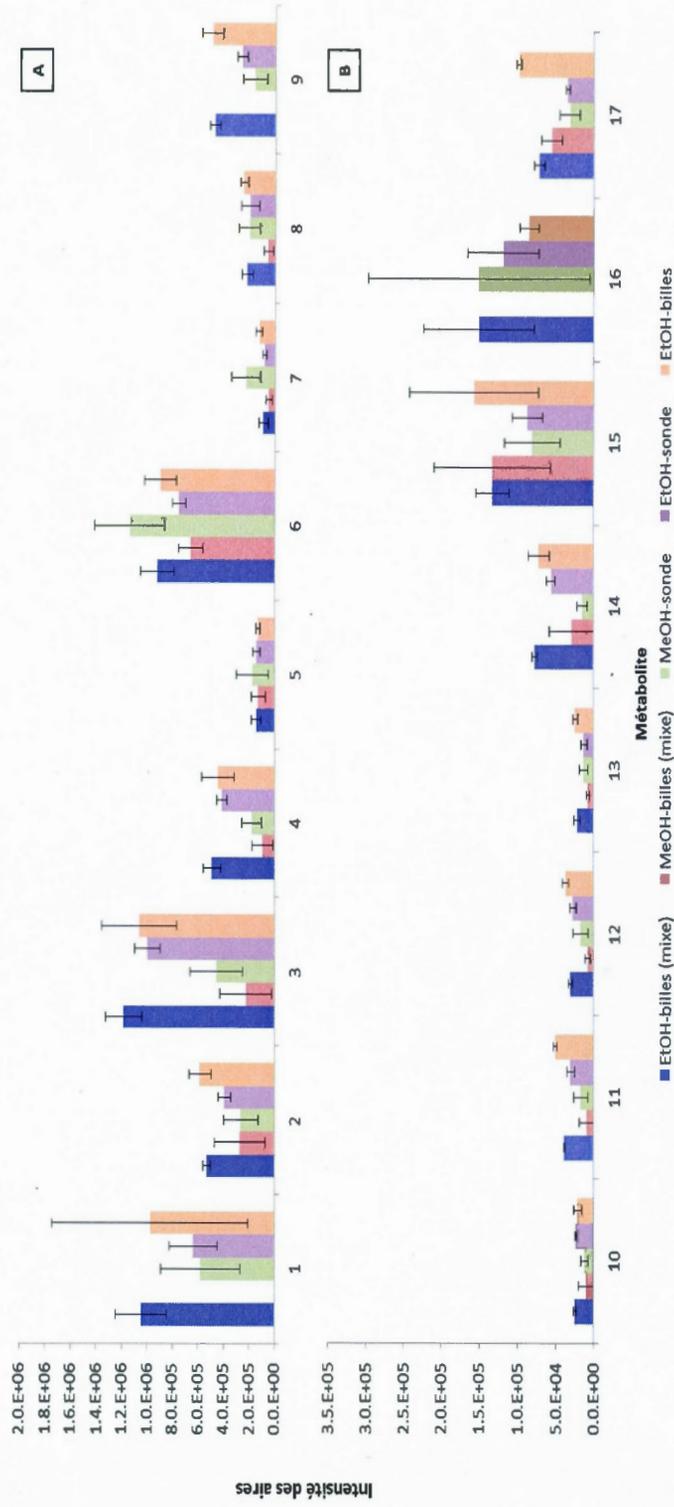


Figure 2.18. Évaluation de l'efficacité d'extraction de deux solvants et méthodes d'extractions différentes de métabolites sélectionnés détectés dans la souche sauvage (N2) (n=3). Ce test met en évidence les quantités de métabolites extraites en fonctions des méthodes réparties selon leur intensité en (A) et (B).

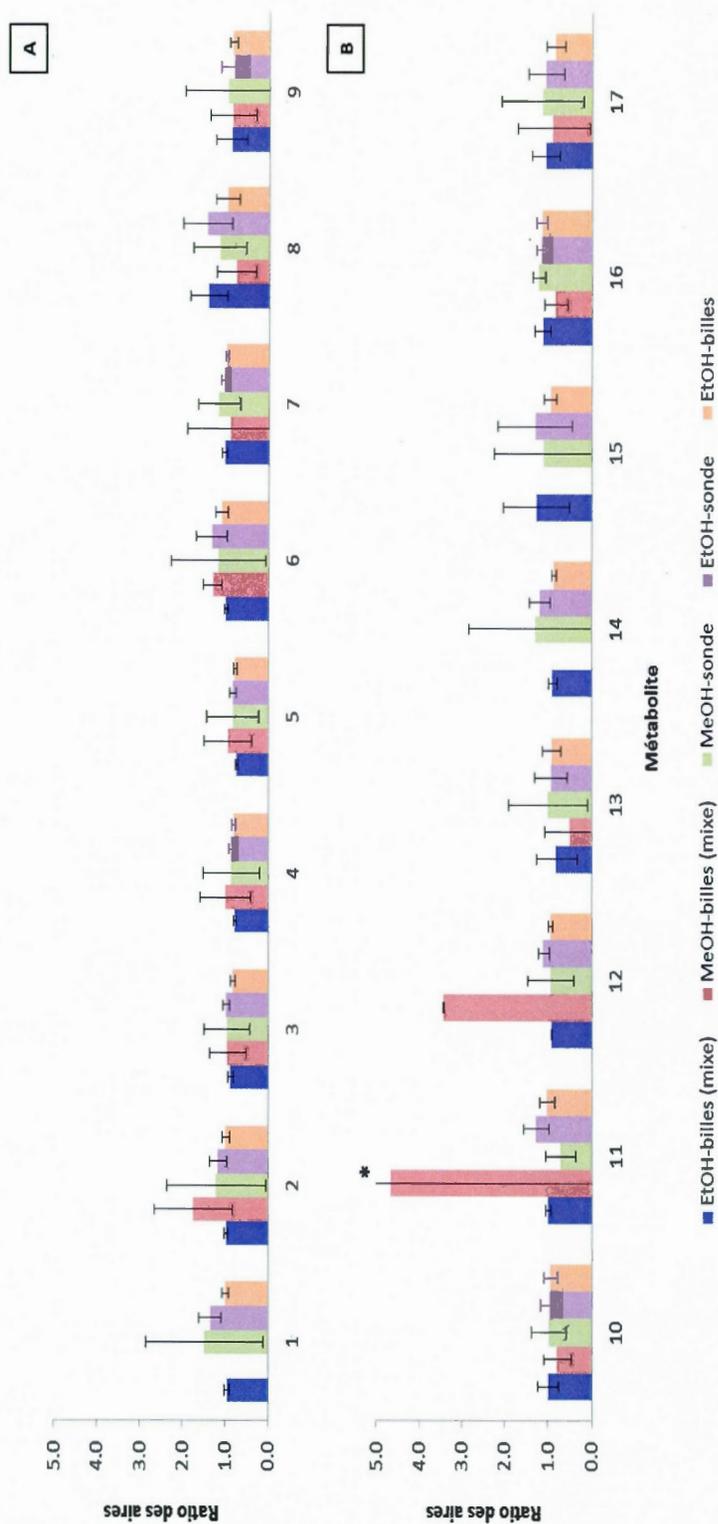


Figure 2.19. Évaluation de la précision des ratios isotopiques dans les extraits la souche sauvage (N2) pour deux solvants et deux méthodes d'extractions différentes de métabolites sélectionnés. Pour des raisons de clarté les données sont réparties sur deux graphiques (A) et (B). *Pour le métabolite #11 le %CV est supérieur à 100%.

Pour ce qui est des ratios isotopiques de ces métabolites sélectionnés, cette tendance se confirme (Figure 2.19). Quoique proche de la valeur théorique (ratio = 1), les coefficients de variation des ratios sont imprécis pour l'extraction employant le MeOH (80%) pour les deux méthodes d'homogénéisation des tissus. Ces derniers sont supérieurs à 40% pour une majorité de métabolites. Concernant la méthode d'extraction à l'EtOH et au Bead beater, les %CV sont < 16.9% pour une grande proportion de métabolites, tel que le métabolite #10 (6.9%) mais présentent une plus grande variabilité pour d'autres molécules avec des hauts %CV comme le métabolite #7 (39.1%). Cette variabilité pourrait provenir de l'emploi d'un mélange de billes composé de deux diamètres différents (0.1 et 0.5 mm). Cette approche est recommandée par le manufacturier pour améliorer l'homogénéisation des tissus. Même si un poids équivalent de mélange de billes (250 mg) est introduit dans les tubes, l'homogénéité de ce mélange n'est pas constante.

Ce problème a été examiné dans la seconde partie de cette expérience ou nous avons comparé l'extraction à l'EtOH au Bead Beater avec un seul type de billes de silice (0.1mm) et le mélange de billes. En termes de quantités extraites, elles sont équivalentes pour les deux approches ou légèrement mieux pour le mélange de billes (Figure 2.18). A titre d'exemple, pour le métabolite #6, les aires sous les pics (quantité extraite) sont de 9.0×10^5 et de 9.3×10^5 pour l'extraction avec le mélange simple (0.1 mm) et le mélange de billes, respectivement, avec des coefficients de variations correspondants de 14.1% et 14.2%. Ce résultat peut s'expliquer par la taille des billes (0.5 mm) qui seraient plus efficaces au broyage des tissus. En termes de reproductibilité, l'extraction avec un seul type de billes présente une variabilité faible et similaire à celle du mélange de billes. Toutefois le %CV sur les ratios pour l'extraction avec un type de bille est inférieur voir significativement plus bas pour tous les métabolites présentant une variation élevée avec le mélange de billes. Le métabolite #6 illustre bien ce phénomène avec un ratio de 1,00 (24,4%) et un ratio de

0,88 (39,1%) pour l'extraction avec le mélange simple et le mélange de billes respectivement (Figure 2.19). Il est donc préférable d'opter pour un seul type de billes pour réduire la variabilité d'extraction et obtenir une meilleure reproductibilité des résultats. Même si les ratios sont assez précis compris entre (0,6 et 1,8) pour la majorité de métabolites, la variabilité est très importante pour les méthodes employant le MeOH 80% (indépendamment de la méthode d'homogénéisation) ainsi que la sonde à ultrasons qui est aussi non négligeable. L'extraction avec l'EtOH chaud et les billes (mélange simple ou mixte) se distinguent par une bonne précision et reproductibilité des ratios.

2.9 Évaluation de la reproductibilité d'extraction de métabolites connus

Afin d'étudier un peu plus cette méthode d'extraction nous avons évalué la reproductibilité en ciblant des métabolites connus. Ces derniers ont été identifiés en fonction de la concordance de leur temps de rétention et de leur m/z respectifs avec des molécules standards. Dans l'ensemble, nous avons obtenu des valeurs de ratios assez précises allant de 0,82 à 1,08 à l'exception de l'acide fumarique (0,67) avec une très bonne reproductibilité des ratios pour les molécules identifiés comprise entre 15,2 et 25,5 % (Tableau 3.3). La variabilité des ratios rencontrée dans les extraits biologiques peut être corrigée par la valeur du ratio (1 :1) des standards dérivés (Lamos *et al.*, 2007). En comparaison aux tests effectués précédemment par comptage manuel des vers, ces résultats reflètent l'ensemble des mesures et précautions que nous avons appliquées lors du prétraitement et de l'extraction des métabolites. La variabilité observée comprend une variation biologique et analytique. Le comptage des vers à l'aide du Copas Biosort quoique précis et sélectif (nématodes adultes de même taille) ne distingue pas les vers adultes gravides de ceux qui ne le sont par exemple. Également l'imprécision de l'appareil est possible et il doit être

calibré régulièrement. Il faut ajouter à cela le fait que les vers comptés proviennent de différentes boîtes de cultures sous des conditions plus au moins similaires (température, quantité d'*E. coli*) mais pas identiques. Sur le plan analytique, les erreurs inhérentes à la méthode telles que l'extraction des métabolites, la dérivation ainsi que l'analyse LC-MS sont une source de variabilité qui ne peut être réduite mais jamais totalement éliminée.

Table 3.3. Évaluation de l'efficacité de l'extraction de métabolites sélectionnés dans les extraits de la souche sauvage (N2) (n=8).

Métabolite	Rt	Aire _{moy}	% Cv	Ratio _{moy}	%Cv
Alanine (¹² C ₆)	3.9	97820	25.3	0.82	15.2
Alanine (¹³ C ₆)	3.9	121115	30.2		
Proline (¹² C ₆)	5.4	16762	16.3	1.08	25.2
Proline (¹³ C ₆)	5.4	16480	29.6		
Isoleucine (¹² C ₆)	7.1	41515	23.6	0.89	24.8
Isoleucine (¹³ C ₆)	7.1	47786	22.4		
Leucine (¹² C ₆)	7.3	134034	31.5	0.93	22.5
Leucine (¹³ C ₆)	7.3	149529	38.6		
Tryptophane (¹² C ₆)	8.2	22263	105.9	0.97	16.7
Tryptophane (¹³ C ₆)	8.2	25097	110.1		
Acide fumarique (¹² C ₆)	12.2	28689	24.8	0.67	25.5
Acide fumarique (¹³ C ₆)	12.2	45007	33.8		

2.10 Quantification relative de métabolites connus

Afin d'évaluer la variabilité de notre méthode d'extraction, nous avons procédé à la quantification relative de ces métabolites identifiés en dérivant ces derniers avec le réactif léger et les standards avec le réactif lourd séparément puis nous les avons mélangé ensemble préalablement à l'analyse LC-MS (Tableau 3.4). Les extraits de

C. elegans ainsi qu'une solution d'acides standards à une concentration de 20 μM sont dérivés séparément par l'aniline et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ respectivement. Pour chaque échantillon ($n=8$), l'extrait dérivé est mélangé avec la solution standard dérivée dans une proportion de (1:1).

Pour les standards dérivés, dans la majorité des cas on obtient une très bonne reproductibilité de dérivation (aires) et les % CV sont inférieurs à 15% mis à part l'alanine et la proline qui sont de 22,7 et 29,0%, respectivement. Concernant les métabolites biologiques, la variabilité des quantités extraites (aires) est comprise entre 24,8 et 37,4%. L'acide lactique et le tryptophane varient énormément en comparaison aux autres métabolites (44,6% et 44,2%). Ces métabolites sont peut-être plus sensibles aux conditions de prétraitement telle que l'extraction (température d'extraction, solubilité, ...etc.) d'un échantillon à l'autre et qui pourraient expliquer cette variabilité en termes de quantité extraites.

Pour ce qui est des ratios, les quantités relatives des métabolites dans les extraits biologiques se retrouvent dans le domaine de linéarité de la méthode et sont compris entre (0,14-1,88). La méthode de quantification relative a été évaluée comme étant précise et nous pouvons dire que la variabilité des ratios découle essentiellement des variations biologiques. Ils restent tout de même inférieurs à 30% à l'exception du tryptophane et de l'acide lactique. La quantification de l'acide malonique, bien que détecté est impossible à déterminer par la méthode car il se trouve en trop petite concentration. Son ratio (0,004) est trop bas et sort du domaine de linéarité évalué pour la méthode. Il en est de même pour l'acide fumarique. Une simple réduction de la concentration des standards permettrait de calculer leur concentration. Ce test a permis de situer les concentrations des métabolites endogènes identifiés entre 0,2 et 3,1 μM . Enfin, la quantité de vers utilisée pourrait être augmentée à 5000 pour une meilleure sensibilité. En effet, les profilages métabolomique chez *C. elegans*

mentionnent une quantité approximative de 5000 en culture liquide tous stades confondus (Geier *et al.*, 2011). Ces résultats restent concluants et dans le cadre de cette étude semi ciblée, nous nous donnons comme objectif de développer une méthode qui serait appliquée à un nombre maximal de métabolites tout en essayant de réduire au mieux les sources de variabilité.

Table 3.4. Quantification relative de métabolites sélectionnés dans les extraits de la souche sauvage (N2) (n=8) compté à au Biosort Copas (2500 vers/tube).

Analyte	Aire _{moy} Métabolite ¹² C ₆	%CV	S/N	Aire _{moy} Standard ¹³ C ₆	%CV	S/N	Ratio _{moy}	%CV
Alanine	96368	25.4	543	53144	22.7	365	1.88	25.8
Acide fumarique	32013	27.2	258	696774	14.5	703	0.05	16.4
Isoleucine	47709	31.2	170	84486	7.8	433	0.56	26.3
Acide lactique	12321	44.6	155	88622	6.6	346	0.14	41.5
Leucine	172912	24.8	571	280859	6.0	1765	0.61	21.7
Acide malonique	24925	25.3	157	5659510	7.6	9343	0.004	27.3
Phénylalanine	501962	35.2	4565	1492688	12.5	9834	0.33	29.1
Proline	40757	30.5	203	169485	8.7	295	0.24	27.3
Tryptophane	372511	44.2	2998	1773166	6.0	12205	0.20	39.4
Valine	32980	37.4	239	51458	29.0	121	0.66	30.2

2.11 Identification de métabolites endogènes

Comme mentionné précédemment cette partie constitue l'aboutissement final d'une étude métabolomique. Nous avons donc procédé à l'identification de deux métabolites (tryptophane et acide fumarique) présents dans les extraits de vers (N2). Dans le cadre de l'étiquetage isotopique, les extraits et les standards sont dérivés séparément par les deux versions isotopiques de l'aniline puis fragmentés par analyse LC-MS/MS. S'il y a superposition des spectres (MS/MS) alors l'identité des molécules est confirmée. Pour ce qui est du tryptophane (Figure 2.20), on peut constater que la molécule endogène dérivée par l'aniline en (C) et dérivée par l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ en (F), est fragmentée exactement de la même manière que le tryptophane standard marqué en (A et B). On retrouve également des ions produits (fragments) communs entre les deux molécules aux m/z : 115,06, 130,07, 132,07, 142,06, 159,09 et 170,06. De plus, il est possible d'observer les fragments contenant l'aniline et espacés de 6,02 Da aux m/z suivants : 235,13 / 241,15 ou encore 263,12 / 269,14. Le même phénomène est observé pour le cas de l'acide fumarique endogène (Figure 2.21). Les molécules endogènes en (C) et en (F) fragmentent exactement comme leurs homologues synthétiques respectifs (A) et (B). Pour ce diacide, il est possible d'observer des fragments communs ayant une différence de 6,02 Da aux m/z suivants : 77,04 / 83,06, 94,06 / 100,08 et 128,05 / 134,0 ou de 12,04 Da (double dérivation) aux m/z : 221,11 / 233,14 ou encore à 249,15 / 261,15 avec une précision en dessous de 5 ppm. Suite à ce test concluant, il est donc possible de procéder à l'identification des molécules endogènes en se basant sur leur patron de fragmentation grâce à cette méthode.

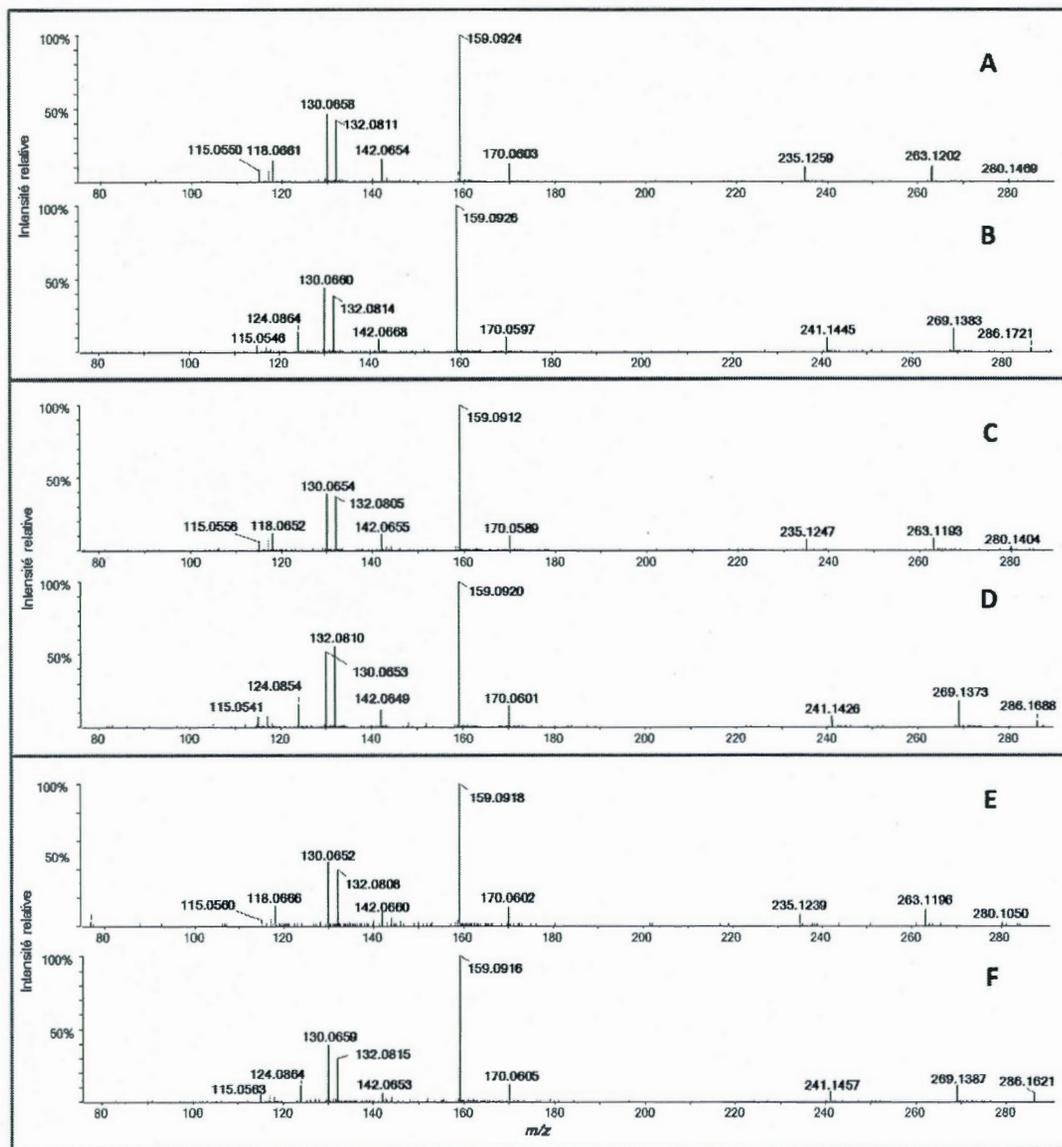


Figure 2.20. Spectres ESI-MS/MS de la fragmentation du tryptophane dérivé en mode positif. Les spectres MS/MS du tryptophane dérivé par l'aniline (m/z 280.145) et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ (m/z 286.165) formant les paires $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$. Le mélange est composé soit d'une solution standard de tryptophane (20 μM) dérivée séparément puis assemblée en (A) et (B), de l'extrait de *C. elegans* de souche sauvage (N2) en (C) et de la solution standard de tryptophane (20 μM) en (D) ou enfin de la solution standard de tryptophane (20 μM) en (E) et de l'extrait de *C. elegans* en (F).

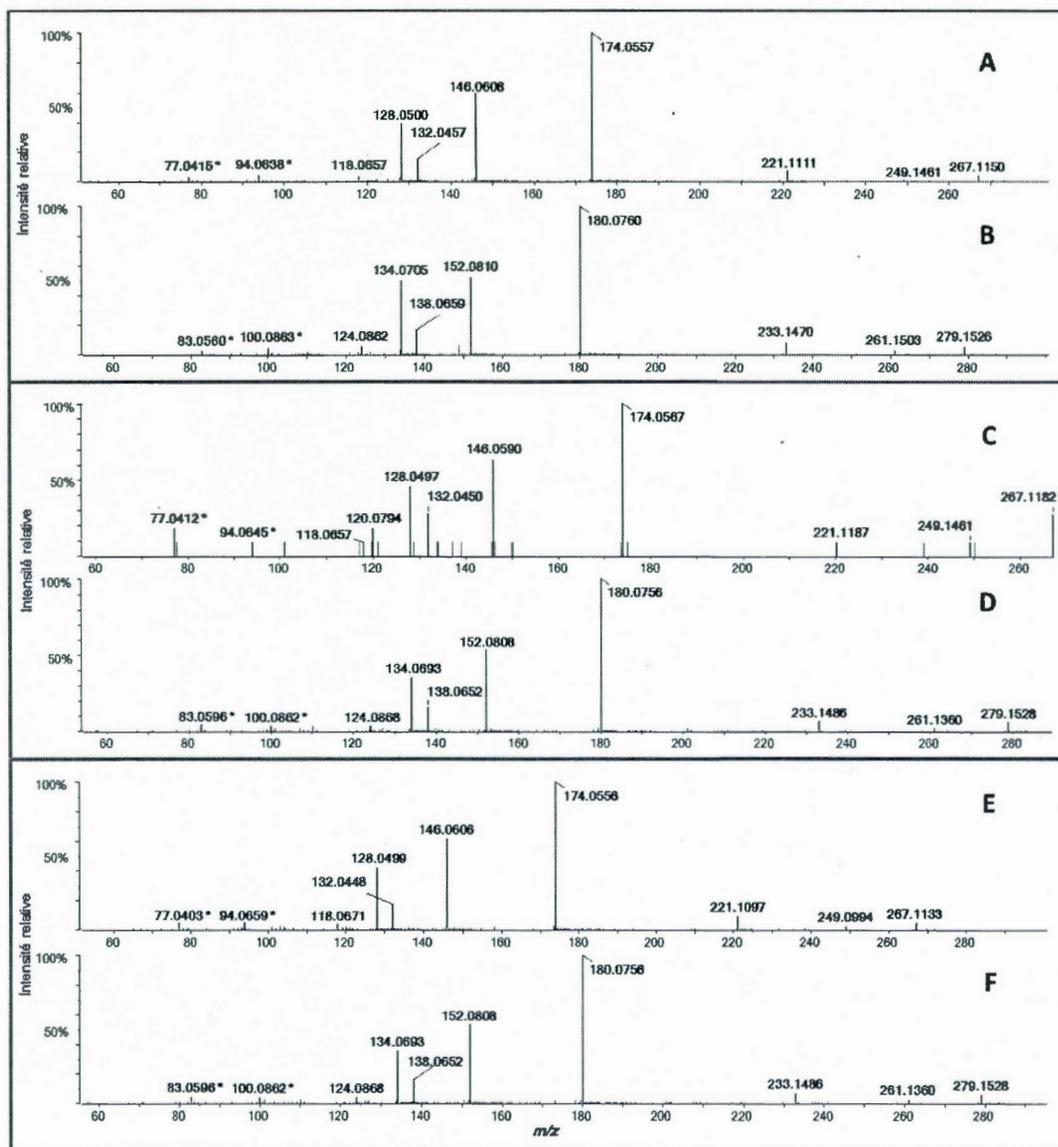


Figure 2.21. Spectres ESI-MS/MS de la fragmentation de l'acide fumarique dérivé en mode positif. Sont illustrés les spectres MS/MS de l'acide fumarique dérivé par l'aniline (m/z 267.113) et l'aniline- $^{13}\text{C}_6$ (m/z 279.153) formant les paires $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$. Le mélange est composé soit d'une solution standard d'acide fumarique (20 μM) dérivée puis assemblée en (A) et (B), de l'extrait de *C. elegans* de souche sauvage (N2) en (C) et solution standard de l'acide fumarique (20 μM) en (D) ou enfin de la solution standard de l'acide fumarique (20 μM) en (E) et de l'extrait de *C. elegans* en (F).

CHAPITRE IV

CONCLUSION

La métabolomique est une science émergente qui implique la comparaison entre le métabolome (ensemble des métabolites d'un organisme) d'un contrôle et d'un état biologique différent. L'objectif de notre recherche était le développement d'une méthode de profilage métabolomique semi-ciblée des métabolites endogènes carboxyliques chez le nématode *C. elegans* par analyse LC-MS. Nos travaux ont permis dans un premiers temps, d'améliorer la méthode d'étiquetage isotopique ($^{12}\text{C}_6/^{13}\text{C}_6$) des métabolites par l'aniline. L'activation des acides carboxyliques par l'EDC et le sulfo-NHS en condition basiques (pH 8) suivi de leur dérivatation par l'aniline (pH 5), se sont avérées être plus efficaces pour l'étiquetage des métabolites et leur quantification relative. L'extraction employant un solvant chaud (EtOH 75% (80°C)) associée au Bead beater (broyage des vers) a permis d'extraire un nombre maximal de métabolites acides avec une reproductibilité acceptable (>30%). L'extraction fut une des parties de la recherche qui a présenté le plus de difficultés.

En effet, si *C. elegans* exposait un modèle très intéressant quant à sa convenance à la métabolomique, son emploi constituait un défi de taille. D'un point de vue purement structurel la carcasse externe de ce nématode a nécessité l'essai de divers procédés de dégradation de tissus. Même si les résultats obtenus restent concluants, des améliorations supplémentaires pourraient être apportées pour une homogénéisation totale des tissus et, par ce fait même, une meilleure extraction des métabolites. Un autre problème inhérent à ce modèle biologique réside dans le fait que de par sa taille (1 mm), il n'était pas possible de cibler directement les tissus nerveux. Ceci a eu

comme conséquence d'élargir la taille du métabolome et possiblement dissiper les métabolites d'intérêt dans un vaste bassin de métabolites provenant de l'ensemble des tissus de l'animal tels que les carcasses, les intestins ou encore les muscles. Il est à noter que l'emploi du COPAS Biosort comme moyen de comptage précis des vers a permis de compenser la variabilité découlant de l'extraction des vers et il est à recommander pour les tests futurs. Bien que toute méthode comporte une incertitude, celle de cet appareil est certainement moindre que le comptage manuel qui reste très approximatif. Dans cette première partie de la recherche, l'optimisation de la méthode a permis de montrer que l'efficacité d'extraction et de dérivation des métabolites étaient intimement liées à la nature chimique de ces dernières. Nous entendons par ceci, que de meilleurs résultats pourraient être obtenus si cette méthode était appliquée à des molécules connues. L'emploi d'une méthode d'extraction et de dérivation sur mesure pourrait être conçue et donnerait des résultats d'une meilleure qualité analytique. Néanmoins, pour une étude métabolomique semi-ciblée nous considérons, suite à l'optimisation, que notre méthode reste bien adaptée pour ce modèle et nos résultats demeurent satisfaisants.

Ce travail de longue haleine nous avons tenté de nous assurer que la méthode était optimisée et adaptée à *C. elegans*, nous a permis de procéder au profilage métabolomique de la souche mutante TDP-43[A315T] modèle transgénique associée à la sclérose amyotrophique latérale. Nous avons été en mesure de détecter 42 métabolites présents dans les extraits des vers mutants qui sont en cours d'identification. Parmi ces métabolites, deux molécules (m/z 205.10 et 206.08) présentent des niveaux trois fois plus bas que dans la souche contrôle (TDP-43wt) et sauvage (N2). Des investigations futures de ces changements métaboliques observés telle que l'identification de ces molécules, jetteraient de la lumière sur les mécanismes de la SLA encore mal compris et permettrait l'identification de biomarqueurs potentiels propres à ce type de mutation. En conclusion, nous avons été

en mesure de développer et d'optimiser une méthode de profilage métabolomique des métabolites carboxyliques chez *C. elegans* et d'en fixer les limitations. L'applicabilité de cette méthode en tant qu'outil d'investigation des différences métaboliques dans le modèle de la SLA chez *C. elegans* pourrait s'élargir à d'autres systèmes biologiques tels que l'humain. Nous pouvons envisager l'emploi de cette méthode pour le dépistage ou le suivi de certaines maladies dont un acide organique serait un biomarqueur. Grâce un échantillon d'urine ou de sang et à l'aide de cette méthode d'analyse rapide (environ 4 heures), les spécialistes de la santé seront en mesure d'effectuer un meilleur suivis de leur malade. Cependant, cette méthode pourrait éprouver certaines limitations du au fait que les molécules analysées ou les fluctuations de métabolites seraient des quantités infiniment petites qui se retrouveraient à l'extérieur des limites de détection et de quantification de la méthode. Aujourd'hui, la complexité des matrices biologiques ainsi que le manque de bases de données complètes constituent un défi de taille en métabolomique et ralentissent considérablement l'avancée de cette science mais demeurent surmontables dans un futur proche.

RÉFÉRENCES

- Antignac J.-P., de Wasch K., Monteau F., De Brabander H., Andre F., Le Bizec B. 2005. *Analytica Chimica Acta* 529:129-136
The Ion Suppression Phenomenon in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and Its Consequences in the Field of Residue Analysis
- Atheron H. J., Jones O. A. H., Malik S., Miska E. A., Griffin J. L. 2008. *FEBS Letters* 582:1661-1666
A Comparative Metabolomic Study of NHR-49 in Caenorhabditis elegans and PPAR-945; In the Mouse
- Barderas M. G., Laborde C. M., Posada M., de la Cuesta F., Zubiri I., Vivanco F., Alvarez-Llamas G. 2011. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*
Metabolomic Profiling for Identification of Novel Potential Biomarkers in Cardiovascular Diseases
- Bocxlaer J. F. V., Castele S. R. V., Poucke C. J. V., Peteghem C. H. V. 2005. *Analytica Chimica Acta* 529:65-73
Confirmation of the Identity of Residues using Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry
- Blaise J. B., Giacomotto J., Elena B., Dumas M-E., Toulhoat P., Ségalat L., Emsley L. 2007. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 104:19808-19812
Metabotyping of Caenorhabditis elegans Reveals Latent Phynotypes
- Cech N. B., Enke C. G. 2001. *Mass Spectrometry Reviews* 20:362-387
Practical Implications of Some Recent studies in Electrospray Ionization Fundamentals
- C. elegans Sequencing Consortium T. C. e. S. 1998. *Science* 282:2012-2018
Genome Sequence of the Nematode C. elegans: A Platform for Investigating Biology
- Dunn W., Erban A., Weber R. M., Creek D., Brown M., Breitling R., Hankemeier T., Goodacre R., Neumann S., Kopka J., Viant M. 2012. *Metabolomics*:1-23
Mass appeal: Metabolite Identification in Mass Spectrometry-Focused Untargeted Metabolomics

- Dunn W. B., Bailey N. J. C., Johnson H. E. 2005. *Analyst* 130:606-625
Measuring the Metabolome: Current Analytical Technologies
- Dunn W. B., Broadhurst D. I., Atherton H. J., Goodacre R., Griffin J. L. 2010. *Chemical Society Reviews* 40: 387-426
Systems Level Studies of Mammalian Metabolomes: the Roles of Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
- Eyford B. A., Sakurai T., Smith D., Loveless B., Hertz-Fowler C., Donelson J. E., Inoue N., Pearson T. W. 2011. *Molecular and Biochemical Parasitology* 177:116-125
Differential Protein Expression Throughout the life cycle of Trypanosoma congolense, a Major Parasite of cattle in Africa
- Fleischmann R., Adams M., White O., Clayton R., Kirkness E., Kerlavage A., Bult C., Tomb J., Dougherty B., Merrick J., al. e. 1995. *Science* 269:496-512
Whole-genome Random Sequencing and Assembly of Haemophilus influenzae Rd
- Frey B. L., Corn R. M. 1996. *Analytical Chemistry* 68:3187-3193
Covalent attachment and derivatization of poly(l-lysine) monolayers on gold Surfaces as characterized by Polarization-Modulation FT-IR Spectroscopy
- Geier F. M., Want E. J., Leroi A. M., Bundy J. G. 2011. *Analytical Chemistry* 83:3730-3736
Cross-Platform Comparison of Caenorhabditis elegans Tissue Extraction Strategies for Comprehensive Metabolome Coverage
- Gill M. S., Held J. M., Fisher A. L., Gibson B. W., Lithgow G. J. 2004. *Aging Cell* 3:413-421
Lipophilic Regulator of a Developmental Switch in Caenorhabditis elegans
- Gilles M. A., Hudson A. Q., Borders Jr C. L. 1990. *Analytical Biochemistry* 184:244-248
Stability of Water-Soluble Carbodiimides in Aqueous Solution
- Gonzalez B., François J., Renaud M. 1997. *Yeast* 13:1347-1355
A Rapid and Reliable Method for Metabolite Extraction in yeast using Boiling Buffered Ethanol
- Guo K., Li L. 2009. *Analytical Chemistry* 81:3919-3932
Differential ¹²C/¹³C-Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome

- Guo K., Li L. 2010. *Analytical Chemistry* 82:8789-8793
High-Performance Isotope Labeling for Profiling Carboxylic Acid-Containing Metabolites in Biofluids by Mass Spectrometry
- Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R. 1999. *Nature biotechnology* 17:994-999
Quantitative Analysis of Complex Protein Mixtures Using Isotope-Coded Affinity Tags
- Held J. M., White M. P., Fisher A. L., Gibson B. W., Lithgow G. J., Gill M. S. 2006. *Aging Cell* 5:283-291
DAF-12-dependent Rescue of Dauer Formation in Caenorhabditis Elegans by (25S)-Cholestenic Acid
- Hoffmann (de) E., Stroobant V. 2005. *Dunod Spectrométrie de Masse*
- Hollywood K., Brison D. R., Goodacre R. 2006. *PROTEOMICS* 6:4716-4723
Metabolomics: Current technologies and future trends
- Hughes S. L., Bundy J. G., Want E. J., Kille P., Stürzenbaum S. R. 2009. *Journal of Proteome Research* 8:3512-3519
The Metabolomic Responses of Caenorhabditis elegans to Cadmium Are Largely Independent of Metallothionein Status, but Dominated by Changes in Cystathionine and Phytochelatins
- Jang W., Choi S., Kim S. H., Yoon E., Lim H.-G., Kim Y. J. 2012. *Korean Circ J* 42:154-163
A Comparative Study on Mechanical and Biochemical Properties of Bovine Pericardium After Single or Double Crosslinking Treatment
- Junot C. 2010. *Bio tribune magazine* 34:10-15
L'analyse Métabolomique par Spectrométrie de Masse: Un Nouvel Outil Pour La Biochimie Clinique ?
- Kamleh M. A., Dow J. A. T., Watson D. G. 2009. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 8:28-48
Applications of Mass Spectrometry in Metabolomic Studies of Animal Model and Invertebrate Systems

Kim S. H., Shi Y., Hanson K. A., Williams L. M., Sakasai R., Bowler M. J., Tibbetts R. S. 2009. *Journal of Biological Chemistry* 284:8083-8092

Potential of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)-associated TDP-43 Aggregation by the Proteasome-targeting Factor, Ubiquilin 1

Lamos S. M., Shortreed M. R., Frey B. L., Belshaw P. J., Smith L. M. 2007. *Analytical Chemistry* 79:5143-5149

Relative Quantification of Carboxylic Acid Metabolites by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Using Isotopic Variants of Choline

Lei Z., Huhman D. V., Sumner L. W. 2011. *Journal of Biological Chemistry* 286:25435-25442

Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics

Lv H. 2012. *Mass Spectrometry Reviews*.

Mass Spectrometry-Based Metabolomics Towards Understanding of Gene Functions with a Diversity of Biological Contexts

Mann M. 1999. *Nature biotechnology* 17:954-955

Quantitative proteomics?

Marchetto M. C. N., Muotri A. R., Mu Y., Smith A. M., Cezar G. G., Gage F. H. 2008. *Cell stem cell* 3:649-657

Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1G37R Astrocytes on Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells

Marinach-Patrice C., Pionneau C., Mazier D. 2011. *Bio tribune magazine* 40:4-12

Spectrométrie de Masse en Biologie Médicale: Principes et Applications

Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng C. M. 2003. *Analytical Chemistry* 75:3019-3030

Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS

Mendham J., Denney R. C., Barnes J. D., Thomas M. J. K. 2005. De Boeck

Analyse Chimique Quantitative de Vogel

Xia N., Xing Y., Wang G., Feng Q., Chen Q., Feng H., Sun X., Liu L. 2013. *International Journal of Electrochemical Science* 8:2459-2467

Panchaud A., Hansson J., Affolter M., Bel Rhid R., Piu S., Moreillon P., Kussmann M. 2008. *Molecular & Cellular Proteomics* 7:800-812

ANIBAL, Stable Isotope-based Quantitative Proteomics by Aniline and Benzoic Acid Labeling of Amino and Carboxylic Groups

Reinke S. N., Hu X., Sykes B. D., Lemire B. D. 2010. *Molecular Genetics and Metabolism* 100:274-282

Caenorhabditis Elegans Diet Significantly Affects Metabolic Profile, Mitochondrial DNA Levels, Lifespan and Brood Size

Sellick C., Knight D., Croxford A., Maqsood A., Stephens G., Goodacre R., Dickson A. 2010. *Metabolomics* 6:427-438

Evaluation of Extraction Processes for Intracellular Metabolite Profiling of Mammalian Cells: Matching Extraction Approaches to Cell Type and Metabolite Targets

Spratlin J. L., Serkova N. J., Eckhardt S. G. 2009. *Clinical Cancer Research* 15:431-440

Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review

Strange K. 2006. Humana Press

C. elegans: Methods and Applications

Szeto S., Reinke S., Lemire B. 2011. *Journal of Biomolecular NMR* 49:245-254

(1)H NMR-Based Metabolic Profiling Reveals Inherent Biological Variation in Yeast and Nematode Model Systems

Taylor P. J. 2005. *Clinical Biochemistry* 38:328-334

Matrix effects: the Achilles Heel of Quantitative High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry

Vaccaro A., Tauffenberger A., Aggad D., Rouleau G., Drapeau P., Parker J. A. 2012. *PloS one* 7:e31321

Mutant TDP-43 and FUS Cause Age-Dependent Paralysis and Neurodegeneration in C. elegans

Warwick B. D. 2008. *Physical Biology* 5:011001

Current Trends and Future Requirements for the Mass Spectrometric Investigation of Microbial, Mammalian and Plant Metabolomes

Weckwerth W. 2003. *Annual Review of Plant Biology* 54:669-689

Metabolomics in Systems Biology

Winder C. L., Dunn W. B., Schuler S., Broadhurst D., Jarvis R., Stephens G. M., Goodacre R. 2008. *Analytical Chemistry* 80:2939-2948

Global Metabolic Profiling of Escherichia coli Cultures: an Evaluation of Methods for Quenching and Extraction of Intracellular Metabolites

Wu H., Southam A. D., Hines A., Viant M. R. 2008. *Analytical Biochemistry* 372:204-212

High-Throughput Tissue Extraction Protocol for NMR- and MS-Based Metabolomics

Yanes O., Tautenhahn R., Patti G. J., Siuzdak G. 2011. *Analytical Chemistry* 83:2152-2161

Expanding Coverage of the Metabolome for Global Metabolite Profiling

Yang W.-C., Adamec J., Regnier F. E. 2007. *Analytical Chemistry* 79:5150-5157

Enhancement of the LC/MS Analysis of Fatty Acids through Derivatization and Stable Isotope Coding

Yang W.-C., Sedlak M., Regnier F. E., Mosier N., Ho N., Adamec J. 2008. *Analytical Chemistry* 80:9508-9516

Simultaneous Quantification of Metabolites Involved in Central Carbon and Energy Metabolism Using Reversed-Phase Liquid Chromatography–Mass Spectrometry and in Vitro ¹³C Labeling