

Cédric Bovet¹

Applications et perspectives de la métabolomique par LC-MS en milieu clinique

Le but principal de la métabolomique est de caractériser les molécules de basse masse (généralement comprises entre 50–1000 g/mol) contenues dans des échantillons biologiques tels que l'urine, le sang ou les tissus. Leur détection par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est en train de révolutionner les applications en milieu clinique.

Ces molécules, appelées métabolites, sont les produits de nombreuses réactions biochimiques se produisant dans un organisme vivant. La mesure du profil métabolique d'un organisme à différentes périodes reflète les changements endogènes ou exogènes et permet ainsi de caractériser des mécanismes pathologiques ou thérapeutiques. Une telle information n'est pas rendue accessible par les autres membres de la grande famille «-omique» (génomique, transcriptomique et protéomique), l'expression de leurs produits (gènes, ARNm et protéines respectivement) ne se traduisant pas forcément par une activité.

Dans un laboratoire de chimie clinique comme celui de l'Hôpital Universitaire de Berne, des dizaines de métabolites sont mesurés quotidiennement. En se basant sur un premier examen du patient, le médecin sélectionne dans le catalogue d'analyses du laboratoire les différents tests à effectuer. Les résultats obtenus guident ensuite le médecin pour un choix de thérapie adéquate. Généralement, un nombre limité de métabolites est accessible par ces analyses, ce qui donne une information restreinte sur les diverses réactions métaboliques d'un organisme. Pour obtenir une vision globale, une gamme de métabolites aussi large que possible devrait être simultanément mesurée. Une des voies stratégiques se profilant en milieu clinique est l'utilisation de la LC-MS (en référence au terme anglais «liquid chromatography coupled to mass spectrometry»).

Principe de la LC-MS

Le principe général de la LC-MS, que ce soit en métabolomique ou dans un autre domaine d'analyse, est toujours le même: les molécules d'intérêt sont extraites de l'échantillon, séparées par LC, ionisées puis analysées par le spectromètre de masse. Actuellement, la grande majorité des applications LC-MS utilise l'ionisation ESI (en référence au terme anglais «electrospray ionisation»), une ionisation compatible avec la chromatographie liquide et permettant de mesurer la masse monoisotopique d'une molécule par spectrométrie de masse. Pour gagner de l'information structurale, les molécules peuvent parallèlement être fragmentées et la masse des fragments mesurée. En utilisant les quatre dimensions de sélectivités de la LC-MS (temps de rétention chromatographique, masse monoisotopique de la molécule et de ses fragments, abondance isotopique), il est possible de détecter et quantifier un grand nombre de métabolites en parallèle. L'introduction il y a une dizaine d'années de la chromatographie liquide à ultra haute performance a permis de diminuer drastiquement le temps d'analyse par échantillon (généralement moins de 5 minutes) ce qui a encore augmenté l'intérêt des milieux cliniques pour cette technologie.

LC-MS en milieu clinique: une réalité

Les instruments LC-MS sont chers et leur utilisation requiert une expertise scientifique pointue, deux obstacles majeurs pour son application en milieu clinique. Conscient de ces limitations et du potentiel de cette technologie, le Laboratoire Central d'Analyses

Médicales de l'Hôpital Universitaire de Berne a ouvert en 2014 un centre de compétences en LC-MS. Fonctionnant comme un service de support scientifique, les cliniciens peuvent contacter l'équipe de scientifiques qui les conseillera et développera une méthode appropriée à leurs applications sur les instruments à disposition. Parallèlement à ce service de recherche et de développement, des analyses de routine s'effectuent quotidiennement sur un parc d'instruments identiques. Cette synergie recherche-routine permet un transfert efficace de nouvelles méthodes bénéficiant directement aux patients.

Stratégies LC-MS en métabolomique

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales offre deux stratégies principales aux cliniciens: le profilage métabolique non ciblé (Figure 1) et la quantification de métabolites par LC-MS (Figure 2). Le profilage métabolique non ciblé permet de caractériser l'état métabolique global d'un échantillon biologique et d'identifier les différences entre des groupes distincts, comme entre des patients sains et malades. Ces expériences sont effectuées avec un spectromètre de masse à haute résolution mesurant la masse monoisotopique des métabolites avec précision. Les résultats obtenus par cette approche permettent de quantifier de manière relative les métabolites ou les chemins métaboliques. En revanche, lorsqu'un clinicien souhaite obtenir une concentration absolue de métabolites connus dans des échantillons biologiques, une méthode quantitative LC-MS est spécifiquement développée avec un spectromètre de masse de

¹ Dr. Cédric Bovet, Universitätsinstitut für Klinische Chemie, Inselspital Bern

type triple quadrupole. Ces méthodes quantitatives sont optimisées de telle sorte à analyser le plus grand nombre d'échantillons en un temps minimum. Par rapport au profilage métabolique non ciblé, elles permettent de détecter les métabolites avec une plus grande sensibilité.

Perspectives cliniques

À l'heure actuelle, la LC-MS en milieu clinique permet de diagnostiquer

de nombreuses pathologies qui étaient difficilement accessibles avec des technologies d'analyses conventionnelles. Le dépistage des erreurs innées du métabolisme (profil des acylcarnitines) ou encore l'analyse de la malabsorption des acides biliaires (quantification du précurseur 7 α -hydroxy-4-cholestén-3-one) sont de tels exemples. La capacité de la LC-MS à détecter et quantifier une large variété de métabolites, sa sensibilité de détection (pouvant at-

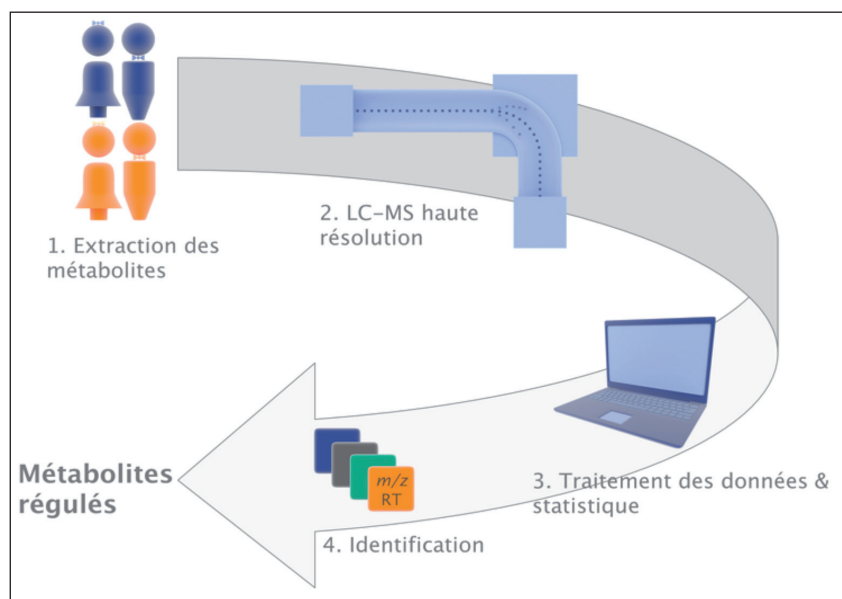


Figure 1: Principe du profilage métabolique non ciblé par LC-MS. Les métabolites de groupes distincts sont extraits des échantillons et analysés par LC-MS. L'analyse statistique des données isole les métabolites différenciant les groupes. Finalement, les métabolites sont identifiés en comparant leurs propriétés LC-MS à celles de bases de données.

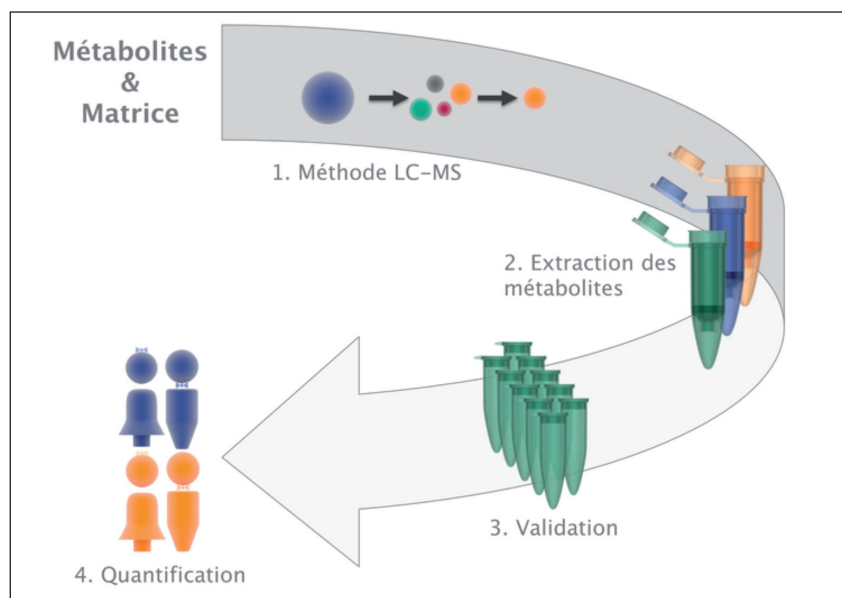


Figure 2: Principe de la quantification de métabolites par LC-MS. Une méthode LC-MS est spécifiquement développée pour les métabolites d'intérêt. Après optimisation de leur extraction, la méthode est validée. Les métabolites sont finalement quantifiés dans la matrice biologique.

Anwendung und Perspektiven der Metabolomik mittels LC-MS im klinischen Umfeld

Die Messung des metabolischen Profils eines Organismus zu verschiedenen Zeitpunkten spiegelt endogene oder exogene Veränderungen wieder und ermöglicht so die Beschreibung von pathologischen oder therapeutischen Mechanismen. Um sich ein genaueres Bild des metabolischen Profils machen zu können, müssen möglichst viele Metaboliten gleichzeitig quantifiziert werden können. Dabei eröffnet die Flüssigchromatografie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) im klinischen Umfeld neue Wege für derartige Charakterisierungen. Im Wissen um das enorme Potenzial dieser Technik hat das Zentrum für Labormedizin des Universitätsspitals Bern 2014 ein Kompetenzzentrum für LC-MS gegründet. Ein Team von Wissenschaftlern steht den Klinikern zur Seite, um sie fachkundig zu beraten und neue LC-MS-Verfahren zu entwickeln, welche zur Beantwortung ihrer Fragestellungen geeignet sind. Ähnliche Instrumente werden auch für die Routineanalytik verwendet, sodass ein effektiver Transfer der neuen im Zentrum entwickelten Methoden möglich ist.

teindre les picogrammes par millilitre) et son automatisation la rendent de plus en plus attrayantes pour son utilisation en milieu clinique. L'expertise pratique et scientifique requises pour ce genre d'analyses reste le principal désavantage de cette technique. Tant en routine qu'en recherche, l'équipe de laborants et de scientifiques doit posséder une connaissance de pointe dans le domaine. Les différents laboratoires cliniques utilisant la LC-MS démontrent que cette limitation est surmontable et promettent à l'analyse clinique de nouvelles perspectives de développement.

Correspondance:
Cedric.Bovet@insel.ch