

Cédric Bovet¹

Métabolomique: où en est-on?

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) permet une caractérisation détaillée du métabolisme. Malgré cela, le manque de standardisation des protocoles analytiques et la complexité d'intégration des données freinent toujours son expansion. Certaines évolutions permettent de penser que ceci changera.

L'intérêt principal en métabolomique est de mesurer l'abondance des métabolites d'un échantillon afin de comprendre les mécanismes de régulations d'un système biologique. Ces dernières années, la LC-MS utilisant l'ionisation ESI (en référence au terme anglais «electrospray ionisation») s'est confirmée comme étant la technique de choix dans ce domaine. Grâce à sa haute sensibilité et à l'absence de dérivation, elle surpasse en termes d'applications les principales approches utilisées dans ce domaine qui sont la résonance magnétique nucléaire, la chromatographie en phase gazeuse et l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse. Malgré ces avantages, un profilage LC-MS détaillé du métabolome nécessitera toujours différentes stratégies de préparation d'échantillon, de séparation et d'ionisation (mode positif, négatif, ESI, APCI, etc.) dues à l'énorme gamme de concentrations et de propriétés physico-chimiques des métabolites.

Le profilage métabolique à grande échelle

Ces dernières années, la métabolomique par LC-MS s'est orientée vers la recherche de solutions optimales pour caractériser le profil métabolique le plus complet possible avec un volume minimal d'échantillon. Généralement, moins de 100 µL de plasma/sérum sont nécessaires pour obtenir l'abondance de centaines de métabolites. On parle alors de profilage métabolique à grande échelle dont le but est de faciliter l'identification de voies métaboliques régulées. Dans ce domaine, deux philosophies semi-quantitatives s'affrontent: le non-ciblé utilisant des spectromètres

de masse hybrides à haute résolution (principalement Q-TOF et Q-Orbitrap) et le ciblé utilisant les triples quadripôles. Ces approches ont démontré une excellente robustesse, et l'utilisation de standards internes et d'échantillons de contrôle qualité permet d'étendre leurs applications à des centaines d'échantillons. En revanche, elles ne remplacent pas les méthodes quantitatives de référence LC-MS utilisant des calibrants et des standards internes.

De la complexité du non-ciblé ...

En non-ciblé, le signal chromatographique de la masse mono-isotopique exacte du métabolite chargé (précision <3–10 ppm) est utilisé pour la quantification. Les bases de données comme METLIN [1] et HMDB [2] permettent d'identifier les métabolites en utilisant les masses exactes de l'ion moléculaire et de ces fragments. Bien que l'approche non ciblée permette d'isoler de nouvelles voies métaboliques, elle nécessite un traitement complexe des données qui demande en plus de logiciels spécifiques des compétences avancées en programmation informatique.

... à la «simplicité» du ciblé

En revanche, l'approche ciblée consistant à mesurer un set de métabolites connu peut se faire relativement simplement en intégrant le signal de fragments spécifiquement sélectionnés. En restreignant le temps d'acquisition des métabolites à leur fenêtre d'éluion et en utilisant la capacité accrue de changement de polarité des triples quadripôles, des centaines de métabolites peuvent être alors mesurés en une analyse, et ceci de manière plus sensible et reproductible qu'en non-ciblé [3]. Il y a quelques années, une des limitations principales des approches ciblées

Metabolomik: Wo stehen wir?

Momentan stellt die Flüssigkeitschromatographie (UH-PLC) in Verbindung mit der Massenspektrometrie (LC-MS) in der Metabolomik die Methode der Wahl dar. Dank zweier semiquantitativer Ansätze können grundsätzlich hunderte Metaboliten in einer Messung profiliert werden: der nicht gezielte Ansatz mit dem Einsatz von hochauflösenden Massenspektrometern und der gezielte Ansatz unter Verwendung von Triple-Quadrapolen. Während das hochauflösende Verfahren besser zur Identifizierung neuer Stoffwechselwege geeignet ist, führt der gezielte Ansatz zu einer detaillierteren Charakterisierung bereits bekannter Stoffwechselwege. Obwohl standardisierte chromatografische Verfahren nicht zur Verfügung stehen, lassen der Ausbau der Datenbanken und die vereinfachte Bereitstellung von Integrationswerkzeugen hoffen, dass diese Strategien bald in einer grösseren Anzahl an Labors eingesetzt werden können.

était le besoin d'optimiser les conditions de fragmentations pour chaque métabolite (m/z des fragments, énergie de collision, voltage de transfert, etc.). Depuis 2017, METLIN offre avec son option METLIN-MRM une base de données contenant les transitions de plus de 15000 molécules permettant un développement accéléré de ces méthodes. En combinant cette source d'information avec les nombreuses procédures de la littérature, il devient relativement simple d'établir sur tout triple quadripôle une analyse spécifique à tout système biologique.

Le problème de la standardisation

Que ce soit en ciblé ou non ciblé, l'analyse d'un standard reste souvent nécessaire pour confirmer l'identité d'un métabolite. Cette limitation est liée au fait que le temps de rétention d'un analyte dépend des phases mobile et stationnaire qui varient entre laboratoires. Cette hétérogénéité chromatographique est une barrière à la propagation du profilage métabolique par LC-MS, et aucun consensus ne semble actuellement se profiler. Les différents formats de données générées par les instruments freinent également cette expansion, mais à ce niveau, des solutions universelles d'intégration et de visualisation apparaissent. Des efforts pour mettre ces outils à disposition de manière simplifiée sont en cours, comme le démontrent les plateformes XCMS Online [4] et MetaboAnalyst [5]. Au niveau de la visualisation des données, la métabolomique bénéficie

¹ Hôpital de l'île Berne, Institut universitaire de chimie clinique, INO F-513, 3010 Berne

SHIMADZU
Excellence in Science

50th ANNIVERSARY
Shimadzu
th Europa

Quadrupole Time-of-Flight
Liquid Chromatograph Mass Spectrometer
LCMS-9030

aussi des avancées introduites par Skyline [6]. Ce logiciel libre d'accès développé originellement pour les analyses protéomiques par LC-MS/MS permet de s'affranchir des solutions d'intégration de chaque fabricant. Une utilisation standardisée de Skyline pourrait donc encourager le transfert de méthodes d'intégration entre laboratoires.

Profilage ciblé ou non ciblé?

En pesant les avantages et inconvénients de ces stratégies LC-MS, il paraît évident que chacune d'elles garde son importance selon les buts du projet: une analyse avec triple quadripôle sera favorisée pour une caractérisation

détaillée des voies métaboliques, alors que l'identification de nouvelles voies se fera par spectrométrie de masse à haute résolution. Dans l'avenir, l'augmentation de la vitesse d'acquisition de la haute résolution permettra certainement de combiner les acquisitions non ciblées et ciblées. Mais dans tous les cas, le succès d'études métaboliques restera intimement lié à deux facteurs indépendants des plateformes analytiques: la qualité des échantillons collectés et la mise en relation des résultats dans leur contexte biologique.

Correspondance
Cedric.Bovet@insel.ch

Références

1. Guijas, C. et al. METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. *Analytical chemistry* 90, 3156-3164, doi:10.1021/acs.analchem.7b04424 (2018).
2. Wishart, D. S. et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic acids research* 46, D608-D617, doi:10.1093/nar/gkx1089 (2018).
3. Chen, S. et al. Pseudotargeted metabolomics method and its application in serum biomarker discovery for hepatocellular carcinoma based on ultra high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical chemistry* 85, 8326-8333, doi:10.1021/ac4016787 (2013).
4. Gowda, H. et al. Interactive XCMS Online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Analytical chemistry* 86, 6931-6939, doi:10.1021/ac500734c (2014).
5. Chong, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic acids research* 46, W486-W494, doi:10.1093/nar/gky310 (2018).
6. MacLean, B. et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966-968, doi:10.1093/bioinformatics/btq054 (2010).

Effortless performance

The LCMS-9030 quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer integrates the world's fastest and most sensitive quadrupole technology with TOF architecture. It delivers high resolution accurate-mass detection with incredibly fast data acquisition for routine applications.

Greater accuracy and higher sensitivity
based on patented Ultra-Fast technologies

Identify and quantify more compounds with greater confidence
in food applications, forensics, drug identification, proteomics and metabolomics

Effortless performance
with less recalibration and easy switching between ionization units

Small footprint
due to a simple and compact floor-standing design

www.shimadzu.ch/effortless-performance

