Optimisation de la prise d'essai pour la détermination de profils métaboliques plasmatiques chez des modèles animaux.

Mathieu Rambeau, Mélanie Pétéra, Charlotte Joly, Sergio Polakof, Jérémie David, Blandine Comte, Estelle Pujos-Guillot

▶ **To cite this version:**

Mathieu Rambeau, Mélanie Pétéra, Charlotte Joly, Sergio Polakof, Jérémie David, et al.. Optimisation de la prise d'essai pour la détermination de profils métaboliques plasmatiques chez des modèles animaux.. 8. Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique RFMF, May 2014, Lyon, France. 2014. hal-02740665

HAL Id: hal-02740665
https://hal.inrae.fr/hal-02740665

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Optimisation de la prise d'essai pour la détermination de profils métaboliques plasmatiques chez des modèles animaux

Mathieu RAMBEAU[1], Mélanie PETERA[1,2], Charlotte JOLY[1,2], Sergio POLAKOF[1], Jérémie DAVID[1], Blandine COMTE[1], Estelle PUJOS-GUILLOT[1,2]

[1] INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand
[2] INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, UNH, F-63000 Clermont-Ferrand

INTRODUCTION

Dans le cadre d'études nutritionnelles, la Plateforme d'Exploration du Métabolisme applique en routine une méthode d'analyse métabolomique non-ciblée par UPLC-ESI-QToF développée et validée à partir d'échantillons de plasma humain [Pereira et al, 2010]. Cette étude, portant notamment sur les conditions de prélèvement et de préparation de l'échantillon (étapes critiques de l'approche métabolomique), avait conclu qu'une précipitation lente à froid des protéines par ajout de 400 µL de méthanol à 200 µL de plasma prélevé sur héparine permettait l'extraction d'un maximum de métabolites avec une reproductibilité optimale.

Dans l'optique d'appliquer cette méthode aux études animales, il nous est apparu indispensable de réduire la prise d'essai initiale, car la quantité de plasma prélevée sur les animaux peut être limitée, surtout s'il s'agit de petits animaux et/ou si des prélèvements en cinétique sont effectués sur un laps de temps assez court lors d'études longitudinales. L'objectif de ce travail a donc été de vérifier si la transposition du protocole original à une prise d'essai initiale réduite de plasma donnait des résultats comparables en terme de richesse des profils métaboliques obtenus et de variabilité analytique. L'influence de la concentration d'héparine lors du prélèvement a également été étudiée.

MATÉRIELS & MÉTHODES

Prélèvement des échantillons

Animaux	Rats Sprague-Dowley	Mini-Porcs Yucatan
Nombre	9	5

Prélèvement du sang total sur Héparine Sodium à 3 concentrations différentes

[nb UI Héparine / ml sang total]			
	15	30	60

Centrifugation	3000 g – 4°C – 10 min
Aliquotage	14 x 3 = 42 échantillons
Stockage	à -80°C jusqu'à préparation

Préparation des échantillons

	« PE50 »	« PE200 »
Prise d'essai plasma	50 µL	200 µL
+ Méthanol « froid »	+ 100 µL	+ 400 µL
Homogénéisation	2 retournements manuels doux puis qqs sec Vortex	
Précipitation	30 min à -20°C	
Homogénéisation	qqs sec Vortex	
Centrifugation	13000 rpm – 10 min	
Prélèvement surnageant	75 µL	300 µL
Evaporation	sous Azote	
Reprise	125 µL	500 µL

Analyse

UPLC – ESI+ – QToF [m/z : 70-1000]
Colonne HSS T3 150 x 2,1 mm 1,8µm
Phase A : Eau + 0,1 % Acide formique
Phase B : Acétonitrile + 0,1 % Acide formique
Gradient :

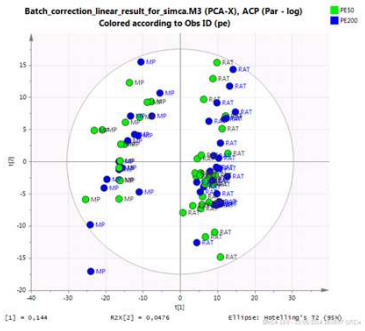
Temps (min)	Débit (mL/min)	% A	% B	Courbe
0	0,4	100	0	Linéaire
2	0,4	100	0	Linéaire
15	0,4	0	100	Linéaire
22	0,4	0	100	Linéaire
22,1	0,4	100	0	Linéaire
26	0,4	100	0	Linéaire

Traitement des données

Extraction des ions par XCMS sous R [Smith et al, 2006]
→ 2596 ions
Normalisation des signaux [Van der Kloet et al, 2009]

Traitements statistiques univariées (ANOVA sous R) et multivariées (PLS-DA sous SIMCA-P v13.0)

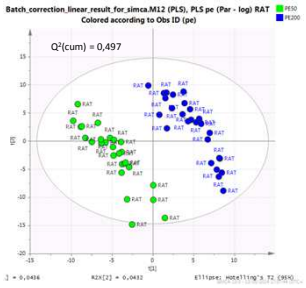
RÉSULTATS des ANALYSES STATISTIQUES

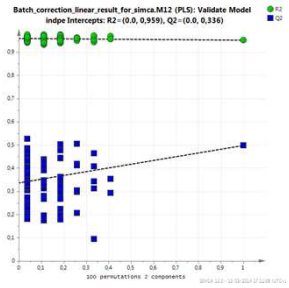


Une première analyse en composantes principales (ACP, cf. ci-contre) sur l'ensemble des données (ie : sur tous les ions extraits des profils des 2 espèces : mini-porcs « MP » et rats) ne fait pas apparaître de groupes discriminant les 2 prises d'essai. En revanche, la 1ère composante permet de révéler 2 groupes « espèces ».

La PLS-DA effectuée sur ce même jeu de données vis-à-vis de la variable prise d'essai (« PE ») ne retient aucune composante par cross-validation. Quand ce modèle est forcé à 2 composantes, le test de permutation ne permet pas de conclure à un modèle valable pour discriminer les 2 prises d'essai.

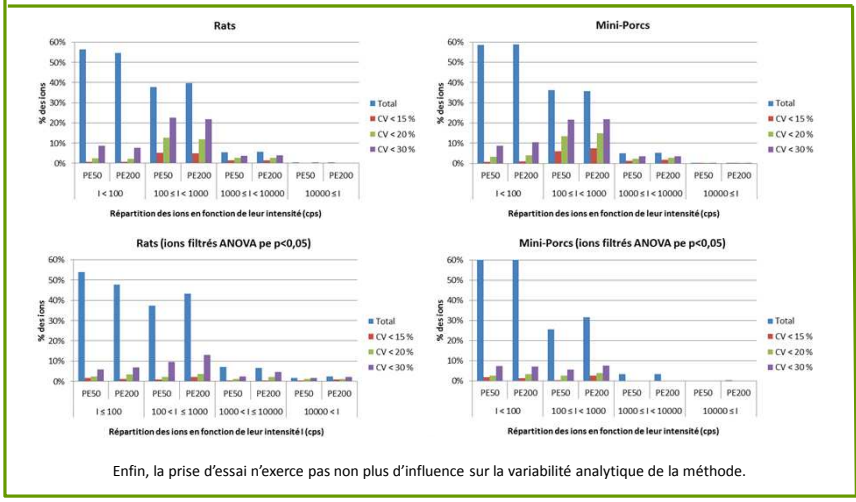
La variable « espèces » ressortant fortement sur l'ACP initiale, les mêmes modèles sont ensuite construits sur les données « mini-porcs » d'une part, puis sur les données « rats » d'autre part.





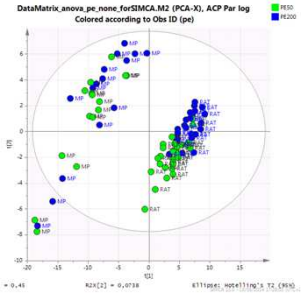
Chez le mini-porc comme chez le rat (cf. ci-dessus), les tests de permutation ne permettent pas de conclure à des modèles PLS-DA valides tendant initialement à discriminer les 2 prises d'essai (Q^2(cum) = 0,497 pour le cas du rat).

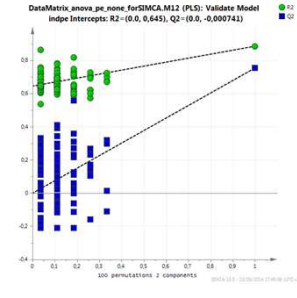
Afin d'éprouver plus avant ces modèles statistiques, les ions significatifs de l'effet « prise d'essai » sont filtrés par ANOVA (→ 244 ions), puis servent de base pour reconstruire les modèles comme précédemment.



Enfin, la prise d'essai n'exerce pas non plus d'influence sur la variabilité analytique de la méthode.

A nouveau, chez le mini-porc comme chez le rat (cf. ci-dessous), les tests de permutation ne permettent pas de conclure à des modèles PLS-DA valides tendant initialement à discriminer les 2 prises d'essai (Q^2(cum) = 0,754 pour le cas du rat). Les mêmes conclusions sont tirées lorsque la variable considérée est la concentration d'héparine lors du prélèvement.





CONCLUSION et PERSPECTIVES

L'adaptation (gamme de concentration en héparine lors du prélèvement comprise entre 15 et 60 UI / mL de sang total, réduction de la prise d'essai à 50 µL) de notre mode opératoire habituel aux prélèvements plasmatiques effectués sur mini-porcs et rats, n'affecte ni la richesse des profils métaboliques obtenus, ni la variabilité analytique de la méthode. Ces résultats ouvrent ainsi des perspectives de miniaturisation des protocoles de préparation d'échantillons issus de différentes matrices lors des études métabolomiques utilisant des modèles animaux.

Références :

Pereira H et al. Development and validation of a UPLC/MS method for a nutritional metabolomic study of human plasma. Metabolomics (2010) 6 : 207-208
Smith CA et al. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using Nonlinear peak alignment, matching, and identification. Analytical Chemistry (2006) 78 : 779-787
Van der Kloet FM et al. Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping. Journal of Proteome Research (2009) 8 : 5132-5141