



HAL
open science

Challenge autour d'un développement d'une méthode de quantification large échelle

Charlotte Joly, Laura Collon, Stéphanie Durand, Estelle Pujos-Guillot

► To cite this version:

Charlotte Joly, Laura Collon, Stéphanie Durand, Estelle Pujos-Guillot. Challenge autour d'un développement d'une méthode de quantification large échelle. 16èmes Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique, Jun 2024, St Malo, France. hal-04611705

HAL Id: hal-04611705

<https://hal.inrae.fr/hal-04611705v1>

Submitted on 13 Jun 2024

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.



Challenge autour d'un développement d'une méthode de quantification large échelle

Charlotte Joly, Laura Collon, Stéphanie Durand, Estelle Pujos-Guillot

Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, MetaboHUB Clermont, Clermont-Ferrand, France

CONTEXTE

L'enjeu aujourd'hui en métabolomique non ciblée, dans les domaines de la santé et nutrition, est de découvrir de potentiels biomarqueurs de pathologie ou état nutritionnel. Afin de les valider et comparer les études menées entre elles, une grande importance est donnée à la quantification absolue de ces métabolites. Une combinaison de biomarqueurs peut donner une plus grande robustesse et spécificité qu'un biomarqueur unique, aussi le challenge actuel est de développer une méthode de quantification large échelle de plusieurs dizaines/centaines de composés d'intérêt.

Il existe de nombreux paramètres de validation selon les deux principaux référentiels, EMA (European Medicines Agency) et FDA (Food and Drug Administration) en bionalyse : exactitude, précision, courbes d'étalonnage, LOQ, LOD, stabilité de l'analyte à doser, rendement d'extraction, effet matrice, coûts, robustesse...Les recommandations à suivre sont similaires mais non identiques aussi comment évaluer et la qualité et fiabilité des essais en métabolomique ciblée ??

➡ objectif : montrer les **difficultés rencontrées** et les **points clés** dans le développement d'une méthode de quantification large échelle

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Développement de méthode (> 100 standards)

Standards

- En solvant
- En matrice (urine)
- Gamme

UHPLC-MS



UHPLC 1260 Agilent



Sciex 5500 QTRAP*

Optimisation paramètres source + transitions
 Mise en place du gradient LC
 Détermination RT
 Constitution des mix
 Evaluation effet matrice

A : H₂O + 0,1% AF (+Formate ammonium ESI NEG)
 B : ACN + 0,1% AF
 Débit : 0,4mL/min
 Colonne : BEH RP18 100 x 2,1mm 1,7µm
 Four : 40°C
 Volume d'injection : 5 µL

MRM ESI POS/NEG
 Curtain Gas : 30 psig
 Ion spray voltage : -3500 V / +4500V
 Source temperature : 600°C
 GS1 & GS2 : 50 psig

Validation sur échantillons réels d'urine

Classification des échantillons par mesure de leur Osmolalité



Répartition des échantillons par classe :

- Classe 1 = 0 à 200 mOsmol/L
- Classe 2 = 201 à 400 mOsmol/L
- Classe 3 = 401 à 600 mOsmol/L
- Classe 4 = Sup à 601 mOsmol/L

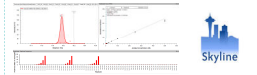
Préparation des échantillons

1. Vortex manuel
2. Dilution au 1/2 ou 1/4...avec de l'eau milliQ en fonction de leur classe

Retraitement des données



Pour organiser le transfert de la méthode vers partenaires et s'intercomparer l'utilisation d'un logiciel ouvert est utilisé :



CHOIX DES STANDARDS

Une méthode de quantification pour chaque biomarqueur peut être limitée par la disponibilité, le prix ou l'utilisation à grande échelle des standards commerciaux.

Sélection dans la littérature de candidats biomarqueurs

Disponible commercialement → non → Choix d'un autre standard



Dans les domaines de la santé - nutrition, des milliers de métabolites sont présents selon des gammes de concentration et des polarités très différentes ce qui constitue un challenge supplémentaire à relever !

oui → Tarif abordable ? → non → Choix d'un autre standard

OPTIMISATION Pour chaque standard sélectionné

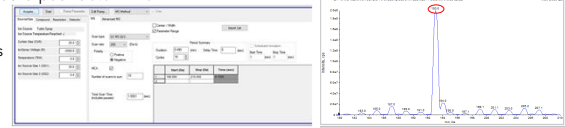
/!\ Cette phase de sélection est très longue, le développement de la méthode est d'autant plus difficile car la liste est implémentée au fur et à mesure

OPTIMISATION MS

Analyse de standard unique

Infusion de chaque standard pour déterminer :

- le mode d'ionisation
- les paramètres sources
- Ions Fils



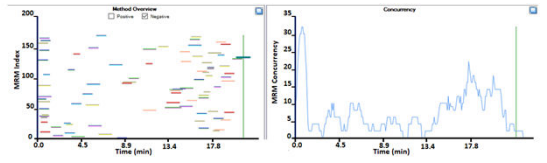
choix de 2 transitions MRM par analyte

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Retent Time (min)	ID	SP (volts)	CE (volts)	CP (volts)
194.062	116.050	155.0	ST0511_011	36.000	9.000	15.000
194.062	16.000	155.0	ST0511_012	36.000	23.000	16.000
194.062	46.000	155.0	ST0511_013	36.000	37.000	12.000

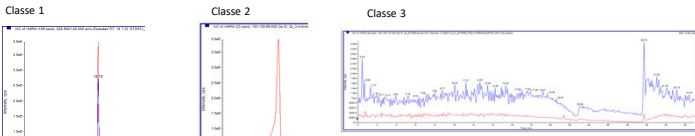
Analyse en mélange de standards

Optimisation nombre de points par pics chromatographiques pour une meilleure définition

ESI NEG



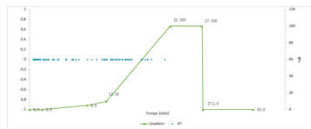
OPTIMISATION LC MS



Passage en LCMSMS

- Obtention RT
- Définition des classes (1, 2 ou 3)

classe 1: pic exploitable
 classe 2: pic dédoublé, épaulement ou tailing
 classe 3: pas de pic ou pic détecté sur 1 seule transition
Seules les classes 1 et 2 sont conservées



Optimisation gradient pour éviter les coélutions
 Evaluer interférence entre analytes
 Représentation de la couverture analytique

VALIDATION DE LA METHODE

Etalonnage externe ← non → Effet Matrice → oui → Utilisation d'un standard interne

Constitution d'une gamme avec 10 points de calibration injectée en triplicat sur 3 jours

Calibrant number	Concentration (µM)	Final Volume (µL)	Volume de std (µL)	Std	Standard
CAL10	10	1000	100	1000	101 POOL
CAL9	5	1000	100	500	101 POOL
CAL8	2,5	1000	100	250	101 POOL
CAL7	1	1000	100	100	101 POOL
CAL6	0,5	1000	100	50	101 POOL
CAL5	0,1	1000	100	10	101 POOL
CAL4	0,05	1000	100	5	101 POOL
CAL3	0,025	1000	100	2,5	101 POOL
CAL2	0,01	1000	100	1	101 POOL
CAL1	0,005	1000	100	0,5	101 POOL

ID Marker	MODE	S/N Bos	LOD Bos	lim Accuracy	#2
16	NEG	34,4	109,2	CAL3	0,9942
38	NEG	88,3	264,9	CAL4	0,9813
60	NEG	60	180	CAL3	0,9981
121	NEG	109,4	328,3	CAL8	0,9921
125	NEG	35,3	105,9	CAL5	0,9991
208	NEG	5,1	15,3	CAL2	0,9984
217	NEG	214,3	642,1	CAL3	0,9899
240	NEG	168,4	505,3	CAL4	0,9996
252	NEG	38,4	115,3	CAL3	0,9943
255	NEG	82,9	248,7	CAL3	0,9995
259	NEG	18,8	56,4	CAL3	0,9948
333	NEG	26	78	CAL2	0,9984
389	NEG	37,4	112,3	CAL9	0,9933
424	NEG	38,3	105,9	CAL3	0,9897
434	NEG	185,7	557,1	CAL7	0,9833
441	NEG	465	1395	CAL5	0,9897
456	NEG	27,8	83,5	CAL4	0,9944
473	NEG	109,9	329,7	CAL4	0,9873
474	NEG	21,4	64,2	CAL6	0,9847

Détermination des critères de validation:

- LOD, LOQ,
- Répétabilité
- Reproductibilité
- Linéarité

CONCLUSION

Ces travaux ont nécessité l'optimisation de 193 standards, 103 composés sont retenus selon les critères qualité cités ci-dessus. L'étape suivante est de transférer la méthode de quantification large échelle au sein des laboratoires partenaires pour organiser un essai interlaboratoire. L'objectif suivant sera de s'intercomparer et d'évaluer la qualité de cette nouvelle méthode ciblée. Une réflexion commune entre les partenaires sera menée afin de concevoir l'essai interlaboratoire qui couvrira les parties analytiques et traitement des données. A ce jour il est difficile de suivre les référentiels reconnus FDA et EMA pour des développements de quantification large échelle, le groupe MAP/UK (UK consortium on Metabolic Phenotyping) propose des niveaux de validation selon le nombre de métabolites à quantifier (Sarmad et al., 2023) qui seront des perspectives intéressantes.

Références : <https://mapuk.org>, Sarmad et al., 2023 Nature Protocols 18:1017-1027

Remerciements : Ces travaux ont été effectués dans le cadre de l'Infrastructure Française MetaboHUB et l'ANR (MetaboHUB-ANR-INBS-0010)

Contact : Charlotte.joly@inrae.fr

