



**HAL**  
open science

## La quête d'une extraction tout-en-un, rapide et monophasique

Marine Valleix, Delphine Centeno, Stephanie Durand, Estelle Pujos-Guillot

### ► To cite this version:

Marine Valleix, Delphine Centeno, Stephanie Durand, Estelle Pujos-Guillot. La quête d'une extraction tout-en-un, rapide et monophasique. 16èmes Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique, Jun 2024, St Malo, France. hal-04611707

**HAL Id: hal-04611707**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04611707>**

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.

# Analyse d'échantillons sanguins : Pourquoi choisir entre métabolomique et lipidomique ?

## La quête d'une extraction tout-en-un, rapide et monophasique.

Marine Valleix<sup>1</sup>, Delphine Centeno<sup>1</sup>, Stephanie Durand<sup>1</sup>, Estelle Pujos-Guillot<sup>1</sup>

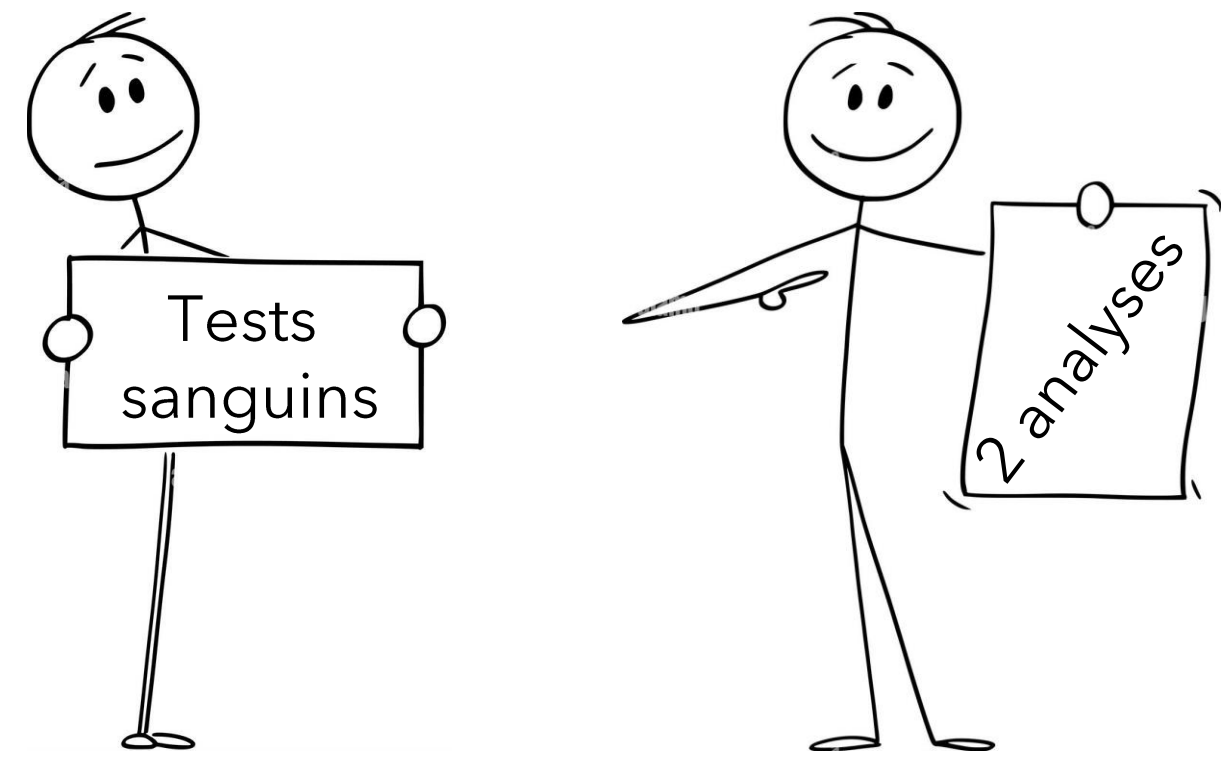
<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, MetaboHUB Clermont, Clermont-Ferrand, France

### CONTEXTE

**Demande :**  
Analyse globale d'échantillons sanguins

**Proposition :**  
2 protocoles distincts

**Problématique :**



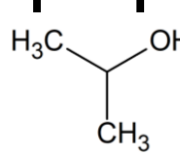
Focus métabolites polaires  
Protocole « **métabolomique** »

Focus lipides apolaires  
Protocole « **lipidomique** » [1]

Solvant privilégié : **Méthanol**



Solvant privilégié : **Isopropanol**



2 préparations d'échantillons

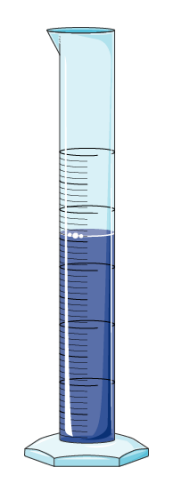
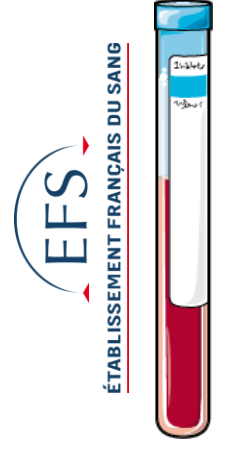
- = 2 fois plus de temps
- = 2 fois plus de solvant
- = 2 fois plus d'échantillon utilisé

Et si on mettait en place un seul protocole ?



### MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Conditions testées**  
Echantillon : Solvant  
1:4 (v:v)



**Echantillons**

- Plasma
- Sérum

**Solvants**

- Méthanol (M)
- Isopropanol (I)
- I : M (2:2)
- I : M (3:1)

décongelés à température ambiante

stockés à -20°C

**Extraction tout-en-un monophasique**



1. Vortex manuel



2. Attente  
30 min -20°C



3. Centrifugation  
20 min 4°C 13 000 rpm  
Récupération du **surageant**

**Contrôles qualité**

- Pools
- Pools dilués
- Blancs

**Echantillons**  
n = 5 par condition

4. Séchage au Genevac



Stockage à sec à -80°C

**UHPLC-HRMS**

Méthode métabolomique de routine non ciblée



A : H<sub>2</sub>O 0,1% FA  
B : ACN 0,1% FA  
Débit : 0,4mL/min

HSS T3 150 x 2,1mm 1,8µm  
T°C Colonne : 30°C

Volume d'injection : 5 µL

QToF (Bruker, Impact II)  
ESI positif  
50 à 1 000 m/z



Retraitement des données [2]   
**Workflow4metabolomics**

**Extraction des données brutes**  
(paramètres XCMS : Gaussian Bandwidth 5 puis 2)

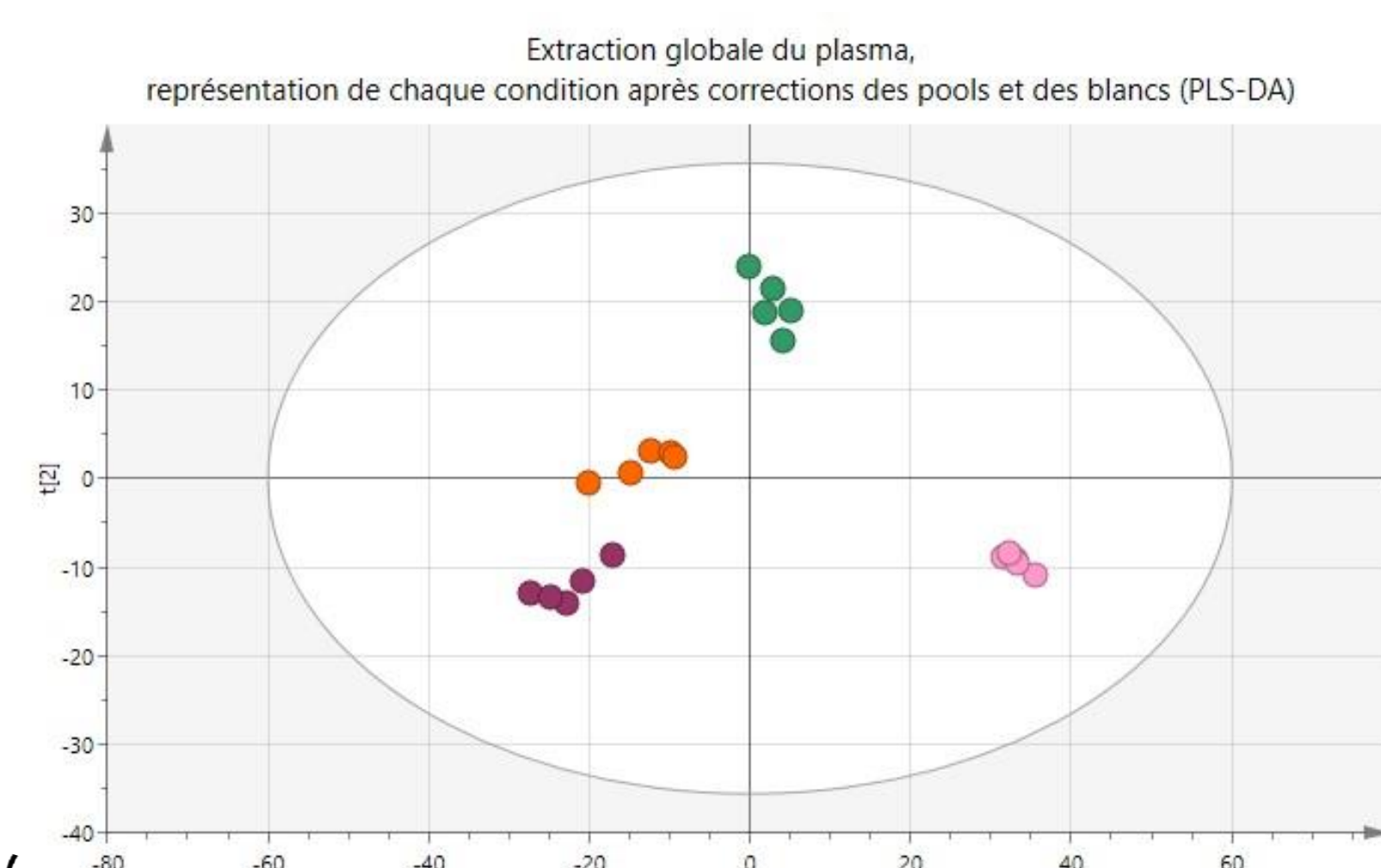
**Filtres qualitatifs :**

- Aux extrémités du run (temps de rétention)
- Présents dans les blancs, absents dans les pools
- CV pool > 30% et  $\frac{CV\ pool}{CV\ échantillon} < 1$
- Corrélation avec les pools

**Correction de l'effet batch**

**Annotation : Matching avec des banques de données internes (BIH), HMDB et LipidMaps**  
1 match = m/z ± 5 ppm, si disponible Tr ± 0,3 sec

### PLASMA

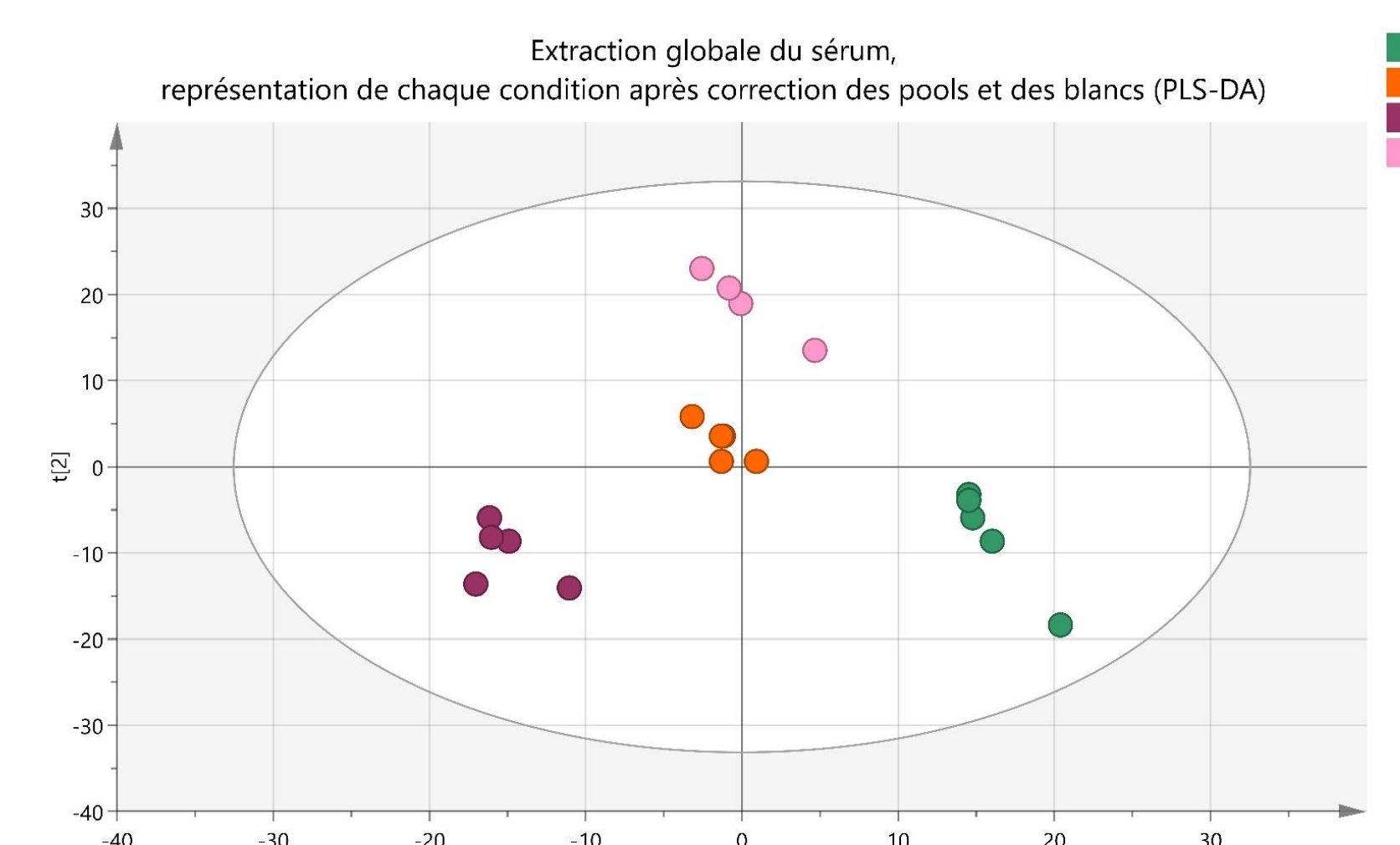


Comment sont répartis les réplicas d'analyse ?  
Est-ce qu'une condition semble plus **répétable** que l'autre ?

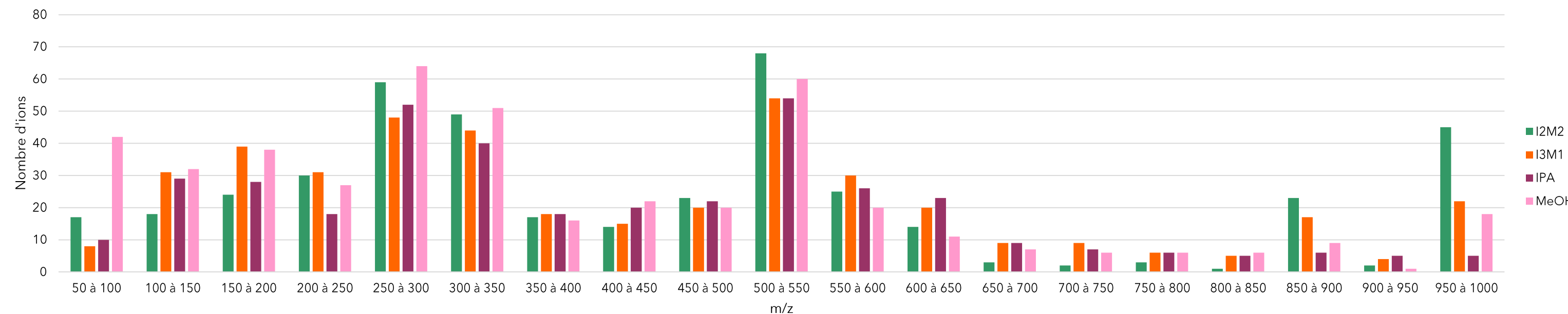


Un solvant est-il plus performant dans l'**extraction commune des gammes de masse** « métabolomique » et « lipidomique » classique ?

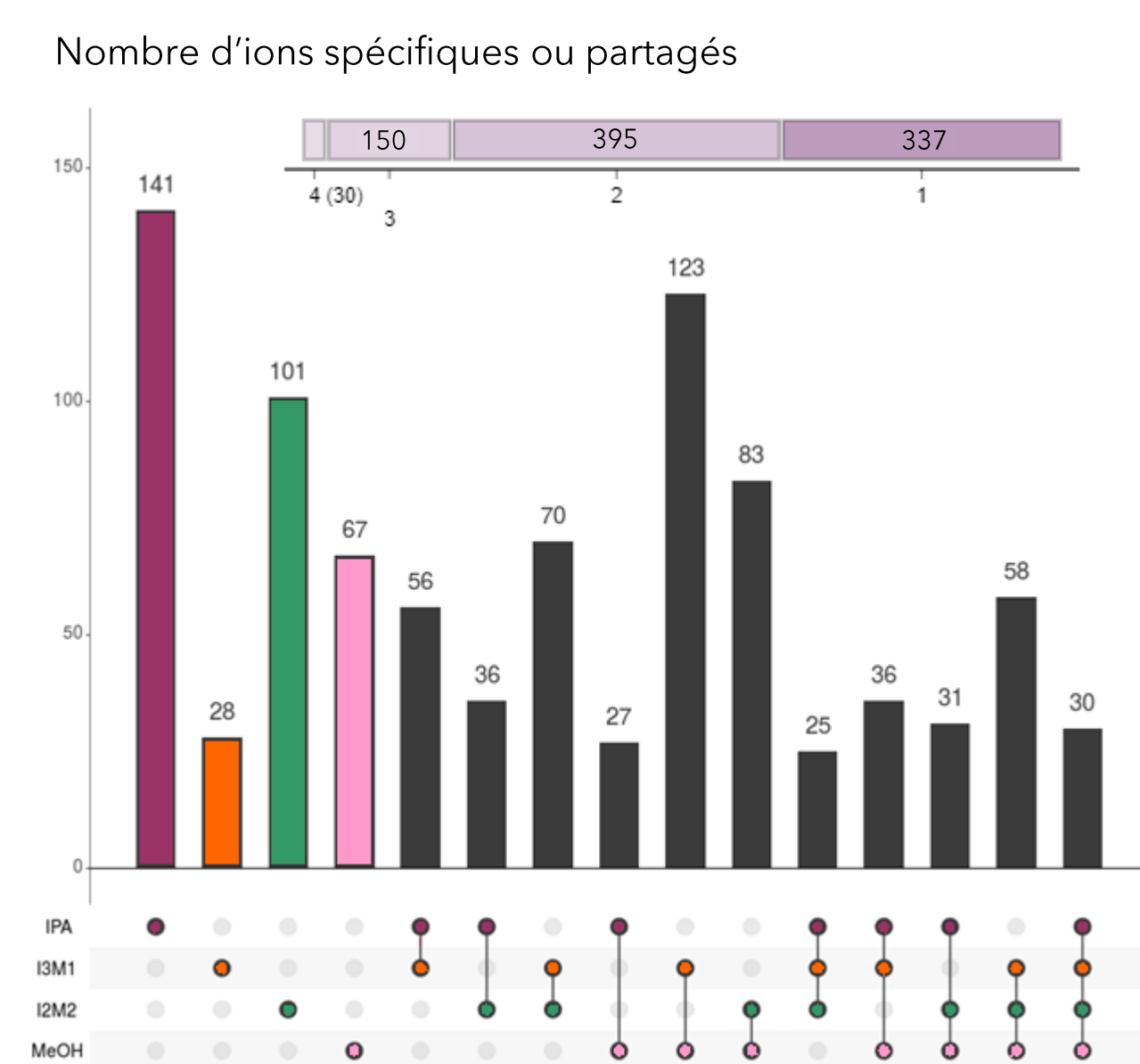
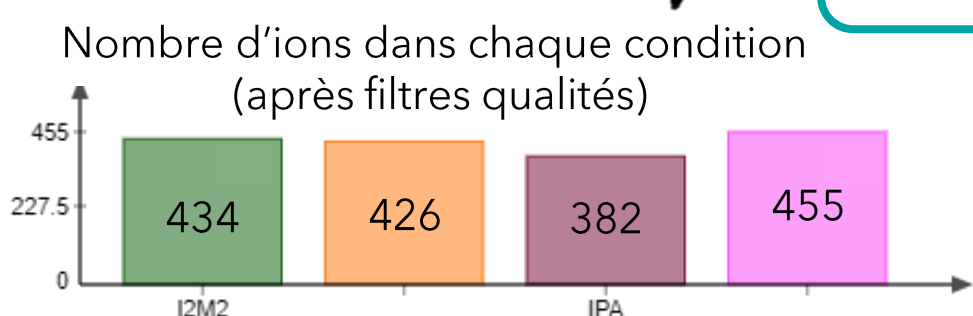
### SÉRUM



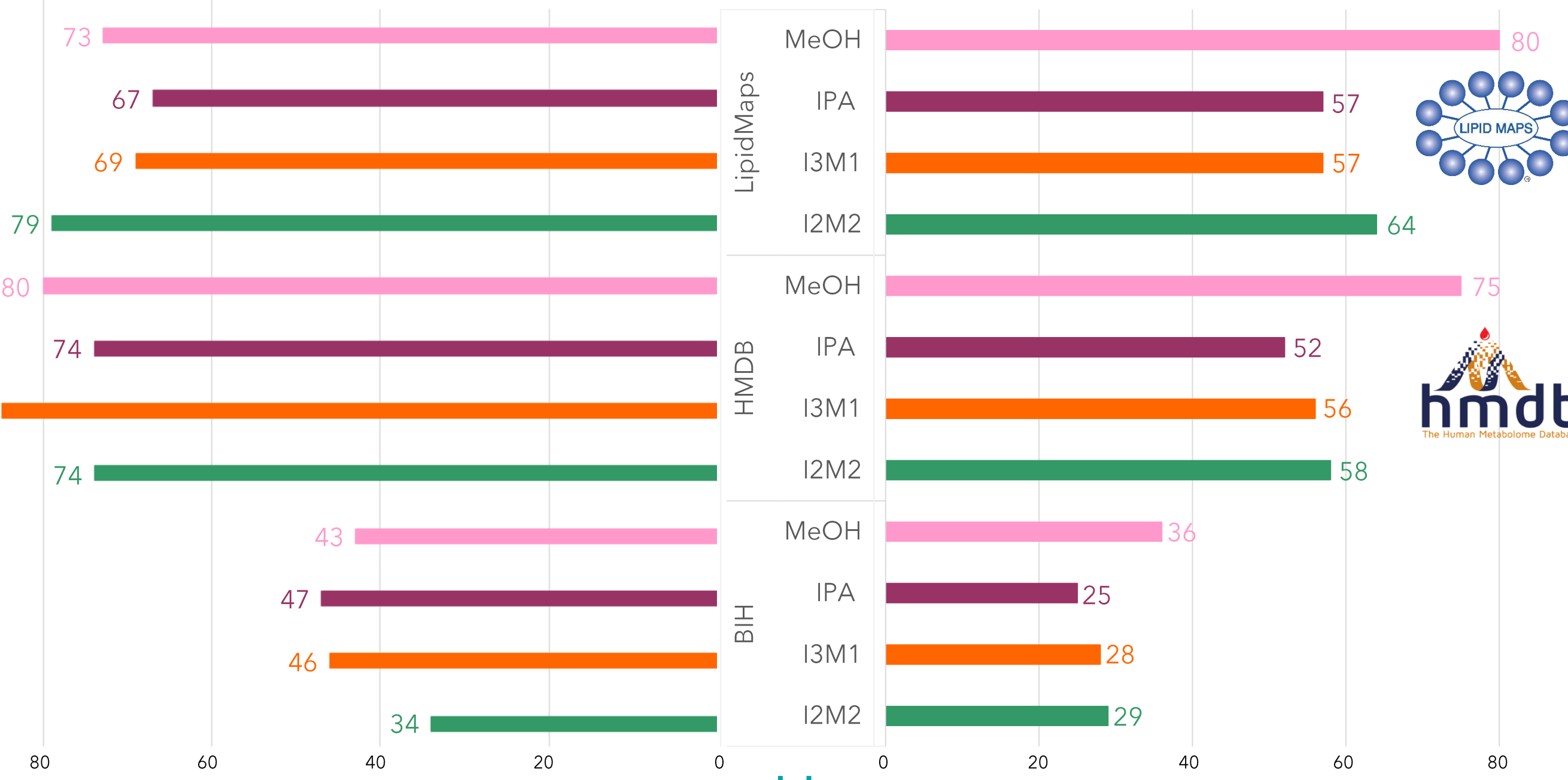
Extraction du plasma par les 4 conditions de solvants, nombre d'ions extraits selon différentes gammes de masses



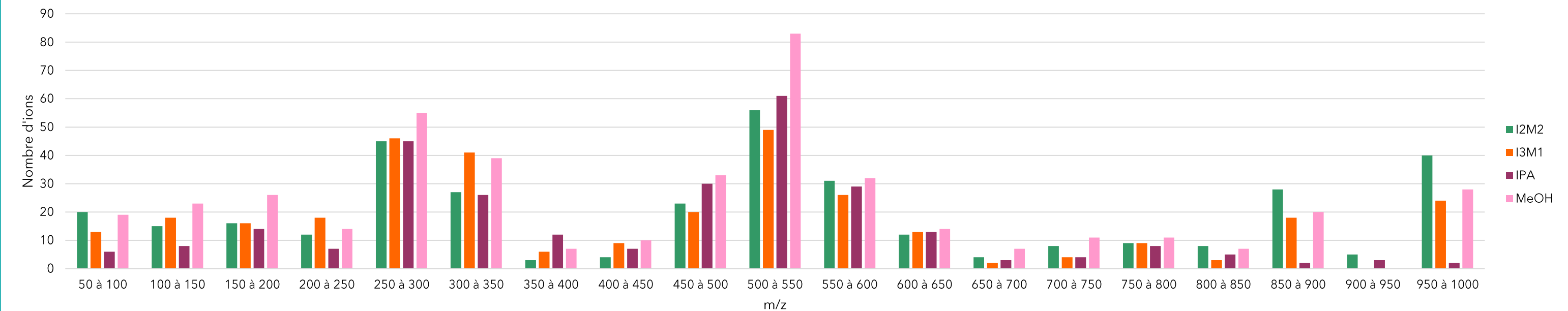
Quels **ions sont communs** aux conditions, et combien sont **annotables** ?



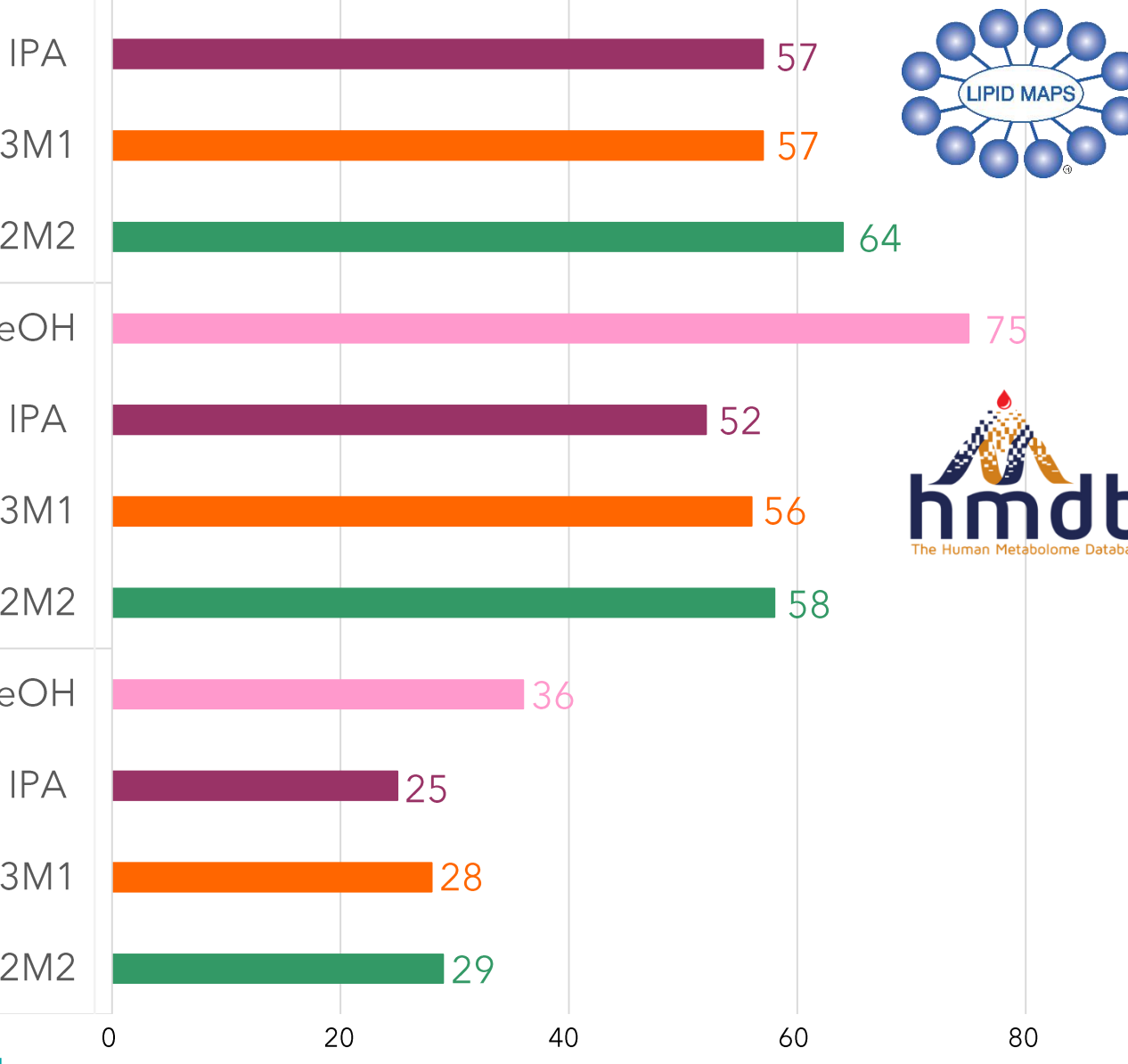
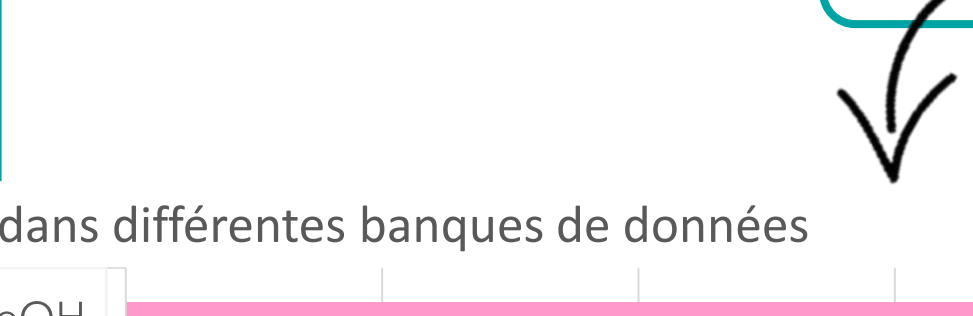
Nombre de match de chaque condition dans différentes banques de données



Extraction du sérum par les 4 conditions de solvants, nombre d'ions extraits selon différentes gammes de masses



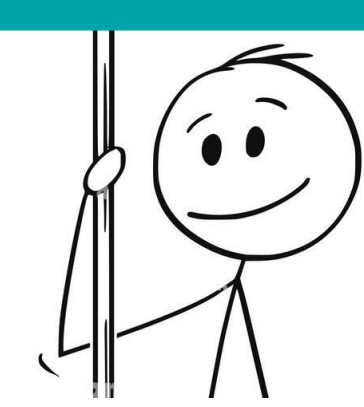
Quels **ions sont communs** aux conditions, et combien sont **annotables** ?



Le méthanol ressort comme le meilleur compromis entre répétabilité et extraction des petites et moyennes masses dans le plasma et le sérum, cela confirme que pour la métabolomique il a été choisi comme solvant de routine.

Le mélange **Isopropanol : Méthanol à 2:2** (v:v) extrait un nombre d'ion équivalent aux autres, mais sur toute la gamme de masse. Les métabolites cherchés en routine sont extraits, et de nouveaux ions originaux de plus faible et plus haute masse sont annotés.

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Le choix d'une méthode de préparation d'échantillon satisfaisant les besoins en métabolomique et lipidomique ne peut pas être uniquement évaluée par un protocole MS métabolomique.

**Une analyse avec un protocole MS optimisé pour la lipidomique viendra compléter ce choix.**

Références : [1] Medina et al. 2020 Anal.Chem., 95 (6) : 3168-3179; [2] Giacomoni et al. 2015 Bioinformatics, 31 (9) : 1493-1495

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

Contact : marine.valleix@inrae.fr

