

Plate-forme Métabolomique

ibmp

Institut de biologie
moléculaire des plantes

12 rue du général Zimmer
67084 Strasbourg cedex

T. 03 67 15 54 00
F. 03 67 15 53 00
<http://www.ibmp.fr>



Contact :

Dimitri Heintz, Ingénieur de Recherche

T. 03 67 15 52 62

Email. dimitri.heintz@ibmp-cnrs.unistra.fr

Conditions Générales / Fonctionnement de la plate-forme & Points clefs de l'analyse métabolomique

1 L'analyse métabolomique

La métabolomique est un champ de recherche récent, qui vise l'analyse quantitative, simultanée, exhaustive et non biaisée du contenu en métabolites d'un système biologique. Dans la pratique, il s'agit de caractériser et quantifier les petites molécules (<3000 Da) dans des échantillons biologiques, par différentes techniques de chimie analytique.

Au-delà des performances analytiques pures, primordiales dans cette approche, la métabolomique recouvre l'ensemble des concepts méthodologiques et des pratiques mises en œuvre pour l'analyse d'extraits biologiques complexes et l'interprétation des résultats obtenus. En particulier, de nombreux métabolites étant sensibles aux dégradations chimiques ou enzymatiques (oxydations, hydrolyses, ...) les protocoles d'échantillonnage, d'extraction et de préparation avant analyse sont généralement optimisés au cas par cas. De même, le traitement des données brutes est une dimension à part entière de la métabolomique.

La métabolomique est employée dans des domaines de recherche très variés : médecine, agroalimentaire, pharmacie, biologie fondamentale, écologie... On peut cependant distinguer deux grands types d'approches selon la façon dont la question scientifique est posée. D'une part les analyses ciblées sur une ou quelques molécules choisies (à titre d'exemple on peut citer le suivi des produits d'une réaction enzymatique *in vitro*, ou la quantification d'une hormone dans des tissus), et d'autre part les analyses non ciblées à vocation exploratoire (par exemple pour comparer sans *a priori* le phénotype métabolique de différents génotypes). Cette distinction oriente fortement les choix méthodologiques.

Enfin, contrairement aux disciplines connexes de la transcriptomique et de la protéomique, la métabolomique ne fait pas intervenir de méthodes d'analyse unique et normalisée. Le choix d'une méthode dépend des caractéristiques physicochimiques des molécules recherchées. De plus la discipline est émergente et les bases de données inachevées.

Tout nouveau projet donne donc lieu à des développements méthodologiques, pour l'extraction, l'analyse et l'identification des métabolites.

2 Equipements et compétences de la plateforme

Le parc analytique accessible comprend des appareils de chromatographie en phase liquide et gazeuse, dont certains sont couplés à des spectromètres de masse : **UPLC-3QMS, GC-3QMS, UPLC-QToF, UPLC-FTICR.**

La plupart des métabolites peuvent virtuellement être analysés sur la plate-forme : les molécules apolaires, facilement volatilisables (acides gras, stéroïdes, terpénoïdes...), les molécules moyennement polaires (phénoliques, alcaloïdes, hormones...) et les molécules polaires (acides aminés, acides organiques...).

3 Nous étudions ensemble votre projet

3.1 Après la prise de contact, la première étape consiste à définir les contours de votre demande au cours d'une réunion initiale avec la plateforme.

3.2 Vous nous présentez vos thématiques de recherche et le contexte scientifique de l'analyse.

3.3 Vous exposez vos attentes

Analyse exploratoire ou ciblée.

Analyse qualitative (présence/absence, identification, caractérisation structurale), semi-quantitative (abondance relative) ou quantitative (abondance absolue).

Nature et nombre des molécules recherchées.

Nature et nombre d'échantillons envisagés.

3.4 Nous procédons à une première expertise

Identification des points critiques de la préparation des échantillons

Recommandations et précision des pré-requis nécessaires pour la réalisation des analyses (design expérimental, manipulation du matériel biologique, préparation de l'échantillon final le cas échéant...)

Proposition de moyens analytiques

Estimation du temps nécessaire à la mise au point

Définition du coût du projet (achat de matériels, consommables et standards chimiques fournis à la plateforme, association de la plateforme dans les demandes de fonds...)

En cas de publication, nous demandons à faire figurer les noms d'au moins un des trois ingénieurs dans la liste des auteurs.

L'ensemble des points définis au cours de cette étape sont reportés dans une fiche échantillon, validée par la plateforme et par le collaborateur.

Un projet démarre dès la validation de la 1^{ère} fiche échantillon et se termine sur **demande du collaborateur ou sans retour de votre part à partir de 60 jours après envoi des résultats** (ce qui est défini dans la procédure projet). Vous êtes informé après la mise au point de la méthode d'analyse et après chaque rendu de résultats et des **revues de projet** sont réalisées aussi souvent que souhaité pour faire le point sur les résultats obtenus, les éventuelles modifications scientifiques et/ou organisationnelles nécessaires et les suites à donner au projet.

4 Nous mettons en œuvre les analyses

4.1 Mise au point éventuelle (nécessite une certaine quantité de matériel biologique, des étalons internes et externes).

Lorsqu'une mise au point est nécessaire, la plateforme ne peut s'engager sur la durée des essais, ni ne peut garantir leur aboutissement en un protocole satisfaisant pour la réalisation des analyses demandées par le collaborateur. En revanche, la plateforme s'engage à tenir le collaborateur informé de l'avancement de la mise au point et de ses conclusions finales, qui conditionneront la poursuite du projet.

En fonction des besoins, la plateforme fournit les protocoles nécessaires pour la préparation des échantillons.

4.2 Nous planifions ensemble les analyses.

La réception des échantillons par la plateforme est planifiée avec le collaborateur en fonction des disponibilités de l'ingénieur responsable du projet, des équipements et produits nécessaires à la réalisation des analyses.

Dans le cas où les analyses planifiées ne peuvent pas être réalisées dans les délais prévus (pannes, etc.), le collaborateur en est informé et les analyses sont réalisées dans les meilleurs délais.

4.3 Informations sur la préparation des échantillons

L'étape de préparation des échantillons est un point crucial ; il n'existe pas de méthode standardisée, il est donc important de définir ensemble cette partie.

La plateforme peut fournir au collaborateur un protocole type mis au point préalablement. La plateforme peut aussi dans certains cas effectuer le développement de nouveaux protocoles de préparation d'échantillon, qu'elle s'engage à livrer au collaborateur par la suite. Si le collaborateur est déjà en possession d'un protocole de préparation d'échantillon, il doit le présenter à la plateforme, afin de vérifier sa compatibilité avec l'analyse par spectrométrie de masse. En particulier, la préparation de l'échantillon doit tenir compte du fait que certains solvants (Hexane, DMSO...) ne sont pas compatibles avec la chromatographie en phase liquide. Les solvants utilisés doivent être de haute pureté (LC-MS grade, HPLC grade, degré de pureté > 99 %), les solutions aqueuses ne doivent pas comporter de détergents, sels, d'acides ou bases fortes et l'échantillon ne doit pas contenir d'éléments radioactifs.

Le volume minimum pour faire une analyse est de 100µl. Avant de livrer les échantillons à la plateforme ils doivent toujours être centrifugés (à 13000g pendant 2 min à 4°C) afin de se débarrasser des débris solides susceptibles de boucher les capillaires. Si ce n'est pas suffisant, une étape de filtration est nécessaire, dans ce cas il faut consulter la plateforme pour vérifier la compatibilité des filtres avec les solvants.

4.4 Vous livrez les échantillons accompagnés d'une fiche de renseignement.

Les échantillons sont livrés à la plateforme par le collaborateur, accompagnés d'une fiche de description des échantillons.

Les échantillons ne sont pas conservés par la plateforme et doivent être apportés le jour des analyses et délivrés à l'ingénieur responsable du projet.

Les échantillons sont considérés comme détruits par l'analyse.

La propriété du collaborateur (échantillons et données) est sous la responsabilité de la plateforme, qui en assure la traçabilité et la protection, tout au long de la durée du projet.

Les conditions particulières concernant la confidentialité, la traçabilité ou le rendu des standards sont à préciser lors du montage du projet.

4.5 Nous procédons aux analyses.

La plateforme s'engage à mettre en œuvre tous les moyens à sa disposition pour fournir des conseils et des résultats d'analyse pertinents. En particulier, la plateforme s'engage à appliquer des protocoles satisfaisant aux critères minimum de publication, tels que définis notamment par le Metabolomics Standard Initiative (Sumner *et al.*, 2007 et Goodacre *et al.*, 2007).

4.6 Nous vous livrons les résultats

- Délai : 30 jours ouvrés maximum après réception des échantillons pour la basse résolution/60 jours ouvrés maximum pour la haute résolution
- Format : rapport informatique quantitatif et/ou qualitatif (fichiers Excel, PowerPoint, PDF) en fonction du type de demande du collaborateur
- Informations minimum fournies : identifiant des échantillons analysés, conditions générales d'analyse (chromatographie, mode MS, unités de mesure) et d'interprétation des résultats, commentaires utiles, ...
- Lors de la valorisation finale des résultats du projet, la plateforme s'engage à rédiger toutes les parties nécessaires à la compréhension de la partie analytique. La plateforme s'engage à rédiger au minimum la partie Matériels et Méthodes la concernant, et à fournir toute illustration ou donnée utile.

La plateforme ne peut-être tenue pour responsable des résultats des analyses, mais seulement des moyens mis en œuvre pour les obtenir, les conserver et les délivrer.

La plateforme ne s'engage pas à conserver les résultats d'analyse après livraison au collaborateur.

5 Optimisez vos chances : les 5 points-clef

5.1 Le matériel biologique (organes, cultures cellulaires, fluides biologiques etc...).

L'état général du matériel biologique expérimental est extrêmement important, toute altération (maladie, carence nutritive, blessure, etc.) en modifie le métabolome.

Echantillonnage : prévoir **au moins 3 répliques biologiques** (par exemple 3 plantes ou 3 lots de plantes différents) **pour une étude ciblée et 8 répliques pour une étude non ciblée**

Collecte : Normaliser la procédure de prélèvement, en particulier : le stade de développement, la durée des opérations, le compartiment biologique prélevé et la fixation immédiate du métabolome par immersion de l'échantillon dans l'azote liquide.

Vite fait bien fait : prévoir le temps le plus court possible entre le moment de la collecte et l'étape de congélation des tissus. Rappel l'acide jasmonique est une hormone qui est induite après un stress au bout de quelques secondes pour atteindre un maximum 2min après induction liée a une blessure. Il faut donc faire vite.

5.2 L'intégrité des échantillons

Conservation : -80°C ; sous argon ; avec ou sans lyophilisation. Conserver le moins longtemps possible avant analyse.

Contamination : les plastiques, le développement microbien, les produits de nettoyage, etc.

5.3 L'extraction des métabolites

Etape excessivement critique, le protocole est à définir ensemble.

Réfléchir très tôt à l'étalement interne.

5.4 La conservation des extraits

Identification : opter pour de simples numéros ou lettres sur les flacons, un document annexe détaillant le contenu.

Conservation : -80°C ; sous argon ; ramenés à sec ou non. Conserver le moins longtemps possible avant analyse.

Contamination : les plastiques, surtout si en contact avec des solvants, le développement microbien, les produits de nettoyage, etc.

5.5 La quantification

Lorsqu'une quantification est demandée par le collaborateur, il est crucial d'utiliser des étalons internes et externes chaque fois que cela est possible.

L'étalon interne : composé introduit dans l'échantillon, qui peut être : un homologue structural des molécules analysées, un composé de la même classe chimique, ou un composé marqué aux isotopes stables (c'est le cas idéal).

- Il doit être pur, absent de l'échantillon, et inerte vis-à-vis de celui-ci.

- Il est généralement apporté dans le solvant d'extraction. Il permet de corriger toutes les variations quantitatives aléatoires introduites après son incorporation à l'échantillon : erreurs de pipetage, évaporation, dégradation, rendement de dérivation...

- Il est absolument indispensable pour comparer des échantillons entre eux : analyses semi-quantitatives

L'étalon externe : composé à doser préparé en solution pure de différentes concentrations et permettant de réaliser une courbe d'étalement pour une quantification absolue.

Remarque : la courbe étalon peut être produite à partir d'étalon externe ou par la méthode des ajouts dosés (et sa variante, la dilution isotopique).

Lectures recommandées

Fiehn O., Sumner L.W., Rhee S.Y. Ward J., Dickerson J., Lange B.M., Lane G., Roessner U., Last R., Nikolau B. (2007) Minimum reporting standards for plant biology context information in metabolomic studies. *Metabolomics*, **3**: 195–201.

JZ

Sumner L.W., Amberg A., Barrett D., Beale M.H., Beger R., Daykin C.A., Fan T. W-M., Fiehn O., Goodacre R., Griffin J.L., Hankemeier T., Hardy N., Harnly J., Higashi R., Kopka J., Lane A.N., Lindon J.C., Marriott P., Nicholls A.W., Reily M.D., Thaden J.J., Viant M.R. (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3: 211–221.