

Outils métabolomiques : stratégie, spécificités et pièges

M1 Biologie intégrative et Physiologie végétale
UE Biodiversité et Physiologie



INRAE



AgroParisTech



université
PARIS-SACLAY



The plant observatory

François Perreau,
francois.perreau@inrae.fr Ingénieur de recherche INRAE,
Institut Jean-Pierre Bourgin-Sciences du Végétal, Versailles
Plate-forme Observatoire du végétal-chimie, métabolisme
Et Equipe Physiologie de la germination

14/10/2024

Instruments:

- LC-MS/MS
- LC-Q-TOF
- GC-MSs (3)
- HPLC UV, HPL-IonC
- FTIR microspectrometer
- RMN (50%)

Staff:



Expertises:

- Primary and Specialized Metabolism / Metabolomics
- Signaling and Plant Hormones
- Biofuels, Green Chemistry, Lipids and Cell Walls

Services:

- **Method development**
- **Analysis offers**
 - Profiling and identification
 - Quantification
 - Structural characterization



Rappel : qu'est-ce que le métabolome ?

Rappel : qu'est-ce que le métabolome ?

- Définition : c'est l'ensemble des petites molécules organiques ou « métabolites » présents dans un échantillon biologique.
 - ⇒ n'inclut pas les biopolymères (ADN, ARN, protéines, polysaccharides)
 - ⇒ inclut les métabolites centraux, les métabolites spécialisés, les petits peptides, les nucléotides et même les lipides, les hormones...

Le métabolome représente la composition chimique de cet échantillon/tissu/organisme à un moment donné dans une situation donnée.

La métabolomique est l'analyse du métabolome.

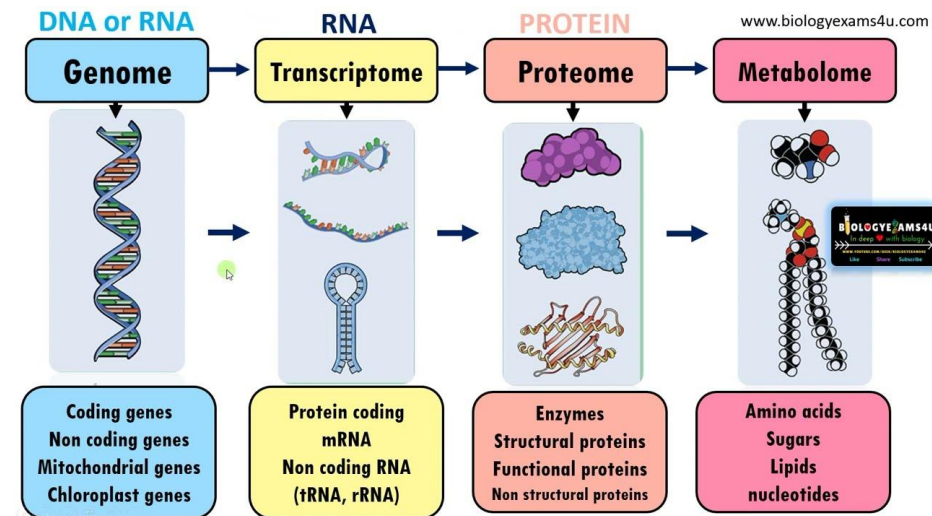
**MAIS POURQUOI
L'ANALYSER ?**

Rappel : qu'est-ce que le métabolome ?

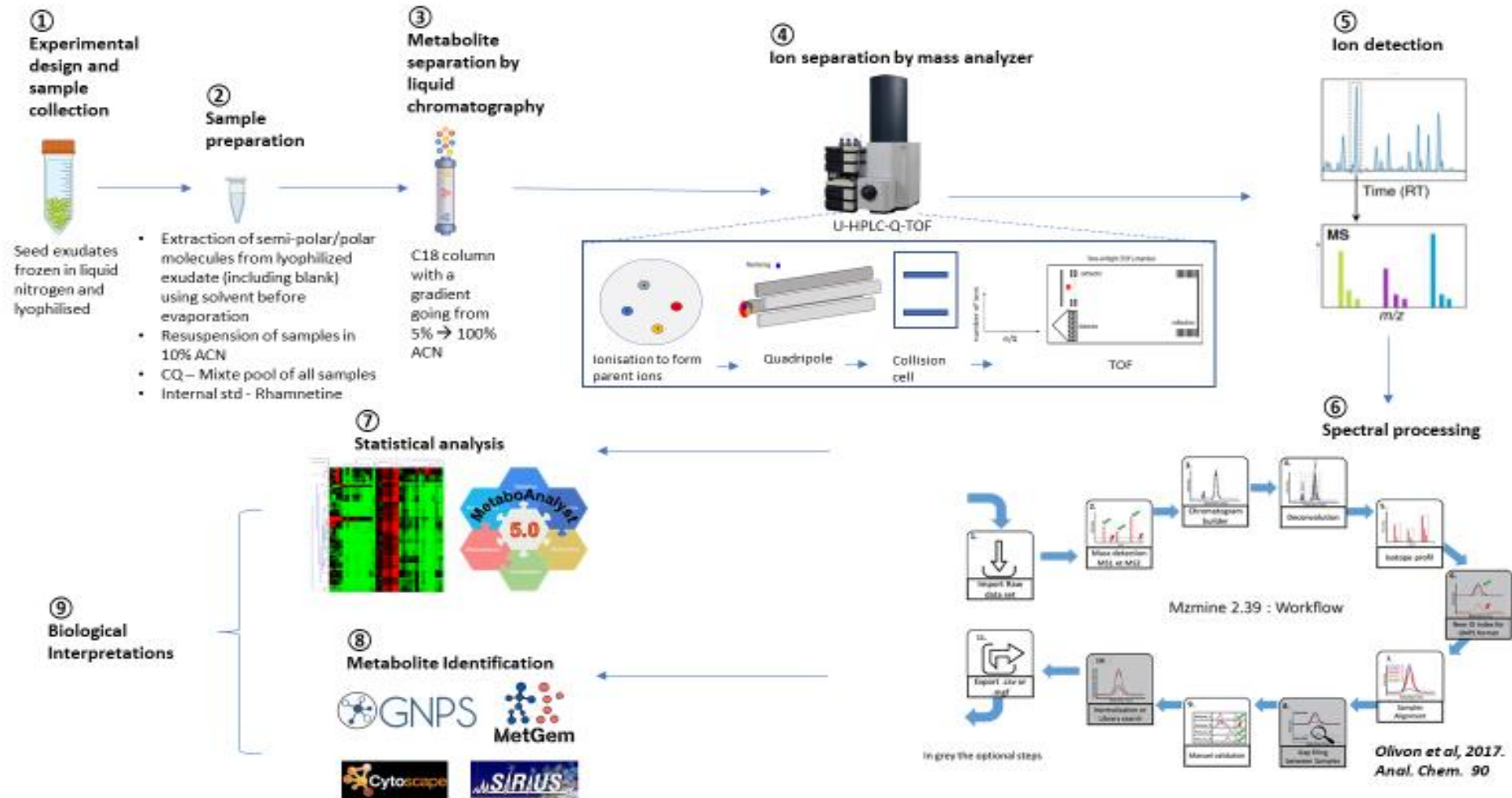
- Définition : c'est l'ensemble des petites molécules organiques ou « métabolites » présents dans un échantillon biologique.
 - ⇒ n'inclut pas les biopolymères (ADN, ARN, protéines, polysaccharides)
 - ⇒ inclut les métabolites centraux, les métabolites spécialisés, les petits peptides, les nucléotides et même les lipides, les hormones...

Le métabolome représente la composition chimique de cet échantillon/tissu/organisme à un moment donné dans une situation donnée.

La métabolomique est l'analyse du métabolome.



Exemple d'une analyse métabolomique LC-HRMS non ciblée



Les 9 étapes d'une analyse métabolomique FIABLE

1. Définir la question biologique
2. Déterminer les composés à rechercher
3. Définir le plan d'expérience selon contraintes biologiques et analytiques

CONCEPTION

PRATIQUE

TRAITEMENT DE DONNEES

A chaque étape pratique et de traitement, on peut rajouter de la variabilité, on peut faire échouer la manip, on peut perdre de vue la question biologique.

Les 9 étapes d'une analyse métabolomique FIABLE

1. Définir la question biologique
2. Déterminer les composés à rechercher
3. Définir le plan d'expérience selon contraintes biologiques et analytiques
4. Conditions de récolte et de stockage
5. Extraction
6. Analyse chimique

CONCEPTION

PRATIQUE

TRAITEMENT DE DONNEES

A chaque étape pratique et de traitement, on peut rajouter de la variabilité, on peut faire échouer la manip, on peut perdre de vue la question biologique.

Les 9 étapes d'une analyse métabolomique FIABLE

1. Définir la question biologique
2. Déterminer les composés à rechercher
3. Définir le plan d'expérience selon contraintes biologiques et analytiques
4. Conditions de récolte et de stockage
5. Extraction
6. Analyse chimique
7. Traitement quantitatif des données
 - Quantité absolue
 - Quantité relative
8. Annotation/identification
9. Analyse statistique

CONCEPTION

PRATIQUE

TRAITEMENT DE DONNEES

A chaque étape pratique et de traitement, on peut rajouter de la variabilité, on peut faire échouer la manip, on peut perdre de vue la question biologique.

Une métabolomique ou des métabolomiques ?

- Traduire la question biologique en analyse(s)

Attention, les fonctions des molécules ne recouvrent pas forcément les structures et propriétés d'analyse.

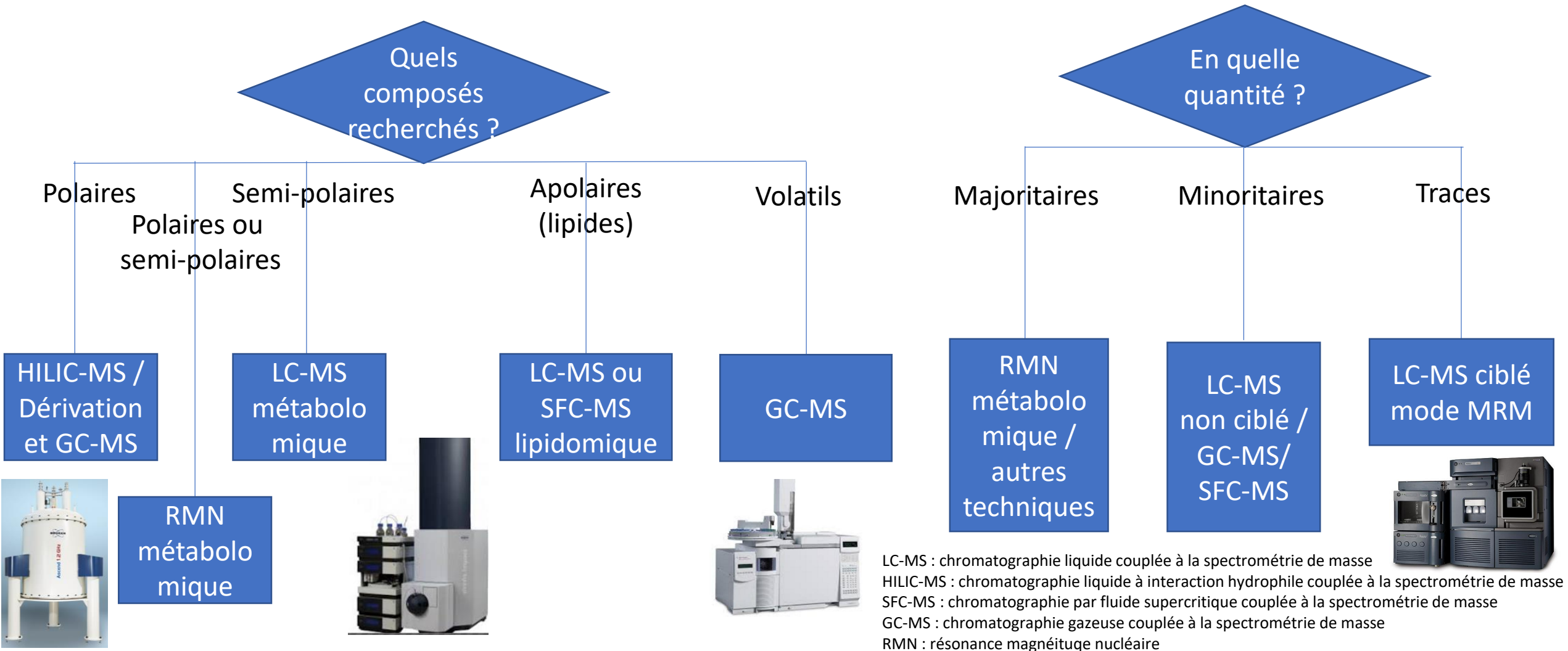
Exemple de question biologique : ce traitement de la tomate au stimulateur de défense des plantes induit-il l'accumulation des composés de défense ?

→ Les composés de défense des plantes sont de familles chimiques aux propriétés très différentes, donc répondre à cette question biologique nécessite des analyses assez larges.

- Analyse ciblée ou non ciblée :

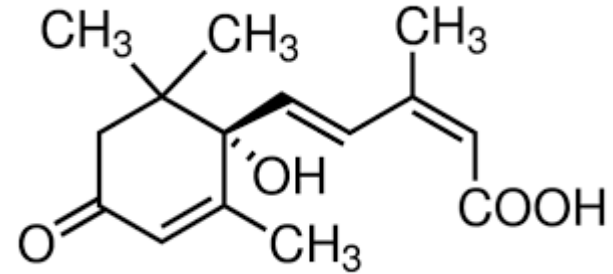
- si ciblée, toute la méthode doit être adaptée aux propriétés connues des composés à analyser.
- si non-ciblée, il faudra choisir une méthode de compromis et très conservatrice, ou alors plusieurs méthodes différentes pour une plus grande couverture.

Arbre des choix techniques pour la métabolomique



Suivons l'exemple d'une étude sur les hormones végétales

- Etude d'un gène et sa fonction dans la biosynthèse de l'acide abscissique (ABA)



-> Analyses d'ABA prévues dans les graines du mutant vs. le sauvage, chez *Arabidopsis thaliana*



1. La question biologique

- Une hypothèse précise, fondée sur un raisonnement et des résultats d'expériences précédentes et la littérature
- Une seule hypothèse à tester à la fois, c'est mieux !



Un poisson à la fois ?



Ou ratisser large ?

1. La question biologique

- Une hypothèse précise, fondée sur un raisonnement et des résultats d'expériences précédentes et la littérature
- Une seule hypothèse à tester à la fois, c'est mieux !
 - Y a-t-il moins d'ABA dans les graines du mutant KO ?
 - L'inactivation du gène réduit-elle la quantité d'ABA accumulée dans les graines chez les mutants ?
 - L'inactivation du gène modifie-t-elle la production ou le catabolisme de l'ABA dans les graines des mutants ?
 - L'inactivation du gène modifie-t-elle le métabolisme de la graine du mutant en rapport avec l'ABA ?



Un poisson à la fois ?



Ou ratisser large ?

2. Les composés recherchés

Ils dépendent de votre question biologique...

- Y a-t-il moins d'ABA dans les graines du mutant KO ?



- L'inactivation du gène réduit-elle la quantité d'ABA accumulée dans les graines chez les mutants ?



- L'inactivation du gène modifie-t-elle la production ou le catabolisme de l'ABA dans les graines des mutants ?







- L'inactivation du gène modifie-t-elle le métabolisme de la graine du mutant en rapport avec l'ABA ?







2. Les composés recherchés

Ils dépendent de votre question biologique...

- Y a-t-il moins d'ABA dans les graines du mutant KO ?  ABA ciblé
- L'inactivation du gène réduit-elle la quantité d'ABA accumulée dans les graines chez les mutants ?  ABA ciblé
- L'inactivation du gène modifie-t-elle la production ou le catabolisme de l'ABA dans les graines des mutants ?  ABA, précurseurs et catabolites ciblés
- L'inactivation du gène modifie-t-elle le métabolisme de la graine du mutant en rapport avec l'ABA ?  Tous les métabolites

2. Les composés recherchés

Ils dépendent de votre question biologique...

- Y a-t-il moins d'ABA dans les graines du mutant KO ?  ABA ciblé
- L'inactivation du gène réduit-elle la quantité d'ABA accumulée dans les graines chez les mutants ?  ABA ciblé
- L'inactivation du gène modifie-t-elle la production ou le catabolisme de l'ABA dans les graines des mutants ?  ABA, précurseurs et catabolites ciblés
- L'inactivation du gène modifie-t-elle le métabolisme de la graine du mutant en rapport avec l'ABA ?  Tous les métabolites

.... et des possibilités d'analyse

Sensibilité de la méthode, détectabilité des composés (mode de séparation et de détection, MS mode positif ou négatif.....), quantification relative ou absolue

3. Plan d'expérience

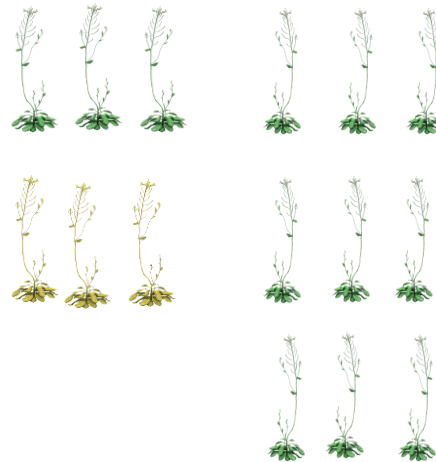
But : concevoir une expérience faisable, qui donne des phénotypes métaboliques clairs, marqués et fiables

- .
- .
- .
- .
- .
- .
- .
- .

3. Plan d'expérience

But : concevoir une expérience faisable, qui donne des phénotypes métaboliques clairs, marqués et fiables

- Des réplicats biologiques
- Des témoins
- Des réplicats génétiques
-
-
-
-
-



3. Plan d'expérience

But : concevoir une expérience faisable, qui donne des phénotypes métaboliques clairs, marqués et fiables

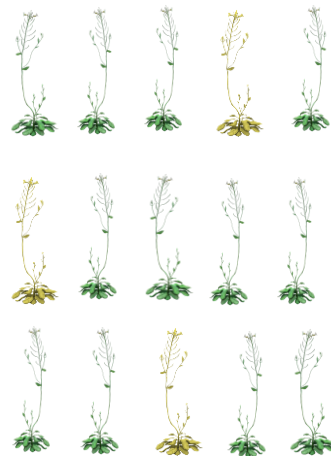
- Des réplicats biologiques
- Des témoins
- Des réplicats génétiques
- Une randomization
-
-
-
-



3. Plan d'expérience

But : concevoir une expérience faisable, qui donne des phénotypes métaboliques clairs, marqués et fiables

- Des réplicats biologiques
- Des témoins
- Des réplicats génétiques
- Une randomization
- Des conditions d'expérience pour minimiser la variabilité entre réplicats (conditions très contrôlées ?)
- Des conditions d'expérience pour maximiser le contraste entre les échantillons différents : expérience préliminaire à envisager ?
- Beaucoup d'échantillons ? (attention aux coûts)



4. Récolte et stockage

But : avoir les différences les plus marquées, qui soient représentatives de l'expérience/du moment de prélèvement

- Moment de l'échantillonnage
- Durée de l'échantillonnage / temps avant congélation
- Conservation par congélation, lyophilisation ou autre ?
- A l'abri de la lumière/de l'oxygène ?

5. Conditions d'extraction

But : extraire de façon répétable, optimisée et homogène les composés désirés

- Choix d'un broyage efficace
- Choix du solvant d'extraction (attention, biais d'extraction par la polarité du solvant)
- Choix des contenants (plastique : attention !)
- Confection d'un témoin « blanc » d'extraction
- Purifications nécessaires ?
- Evaporation à sec puis resuspension ?
- Quel facteur de concentration ?

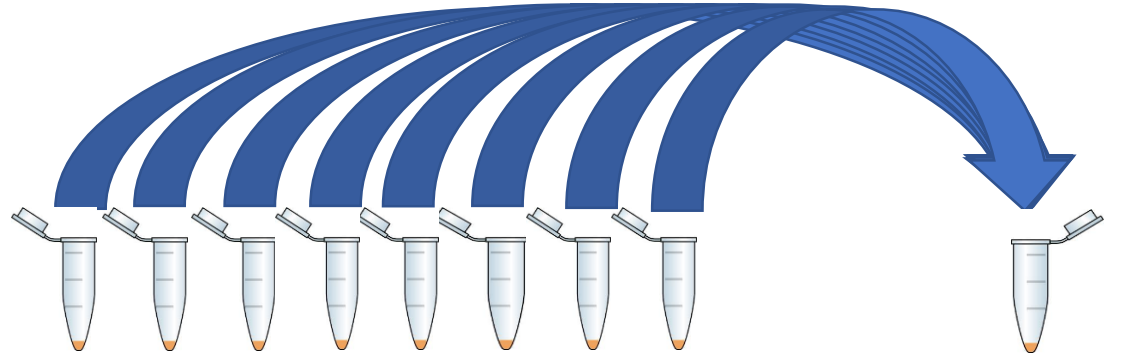
6. Conditions d'analyse

But : des analyses fiables, stables et quantitatives

- Evaluation des biais liés au type d'échantillons (effet matrice)
- Ajout d'étalons adaptés pour l'analyse (externe ou interne)
- Conditions adaptées pour détecter composés (séparation et détection)
- Pour les quantifier de façon relative ou absolue (gamme dynamique, gamme linéaire, saturation)
- Fiabilité et prévention de la dérive de l'appareil : QC, témoins
- Calibration de l'appareil

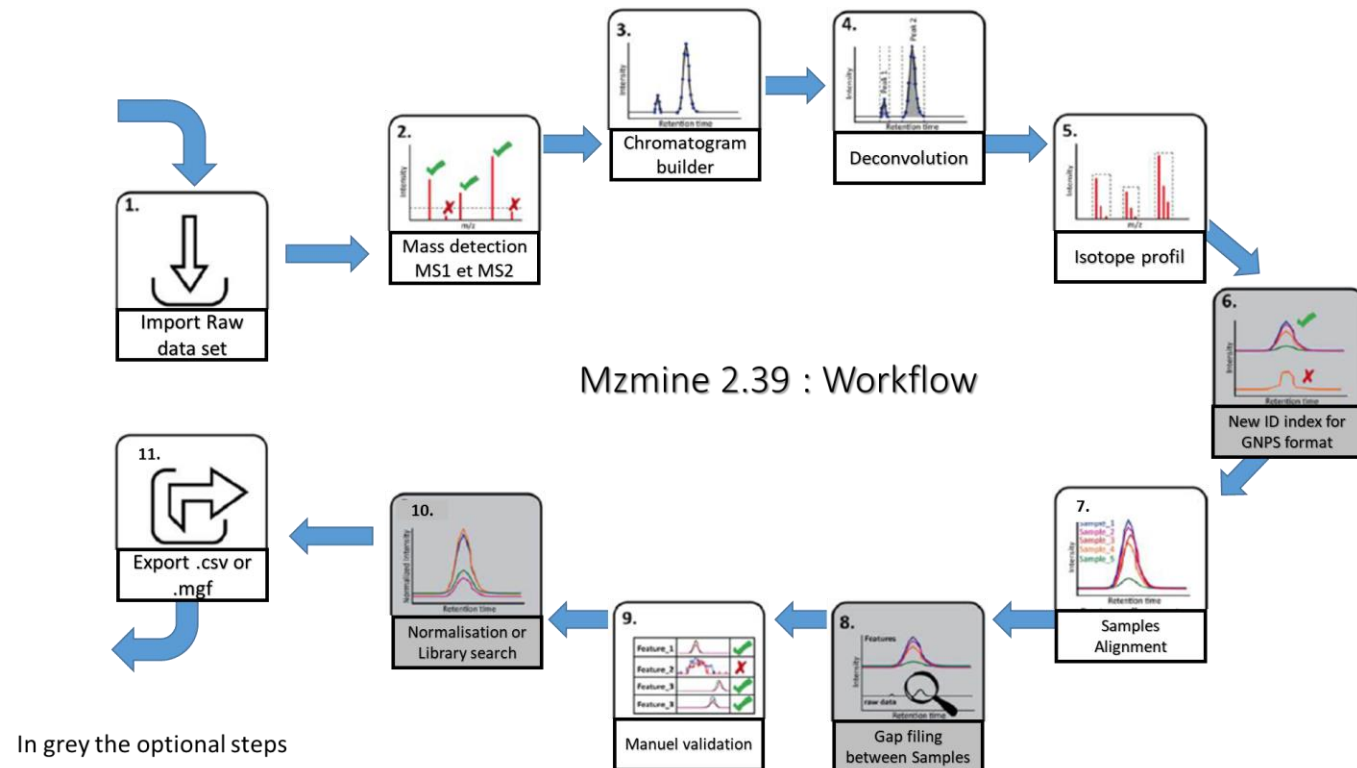
QC ou Contrôle Qualité

- QC : échantillon moyen constitué d'un aliquot de tous les échantillons. Représentatif de toute la série d'échantillons
- Utile pour tester la dérive de l'appareil, par son analyse tout au long de la série
- Utile pour trier les signaux suivant leur variabilité



7. Traitement de données

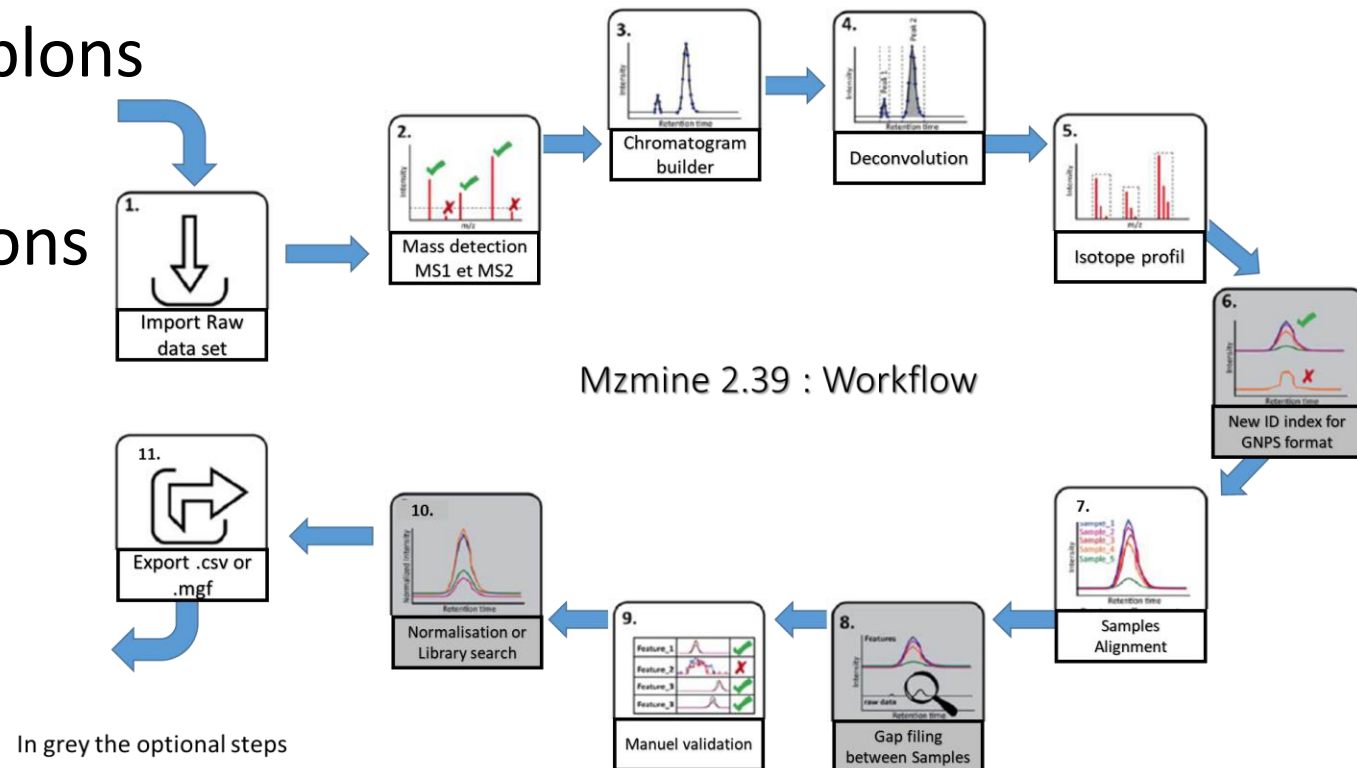
But : extraire des données toute l'information pertinente et uniquement elle, et la transformer pour pouvoir la manier



7. Traitement de données

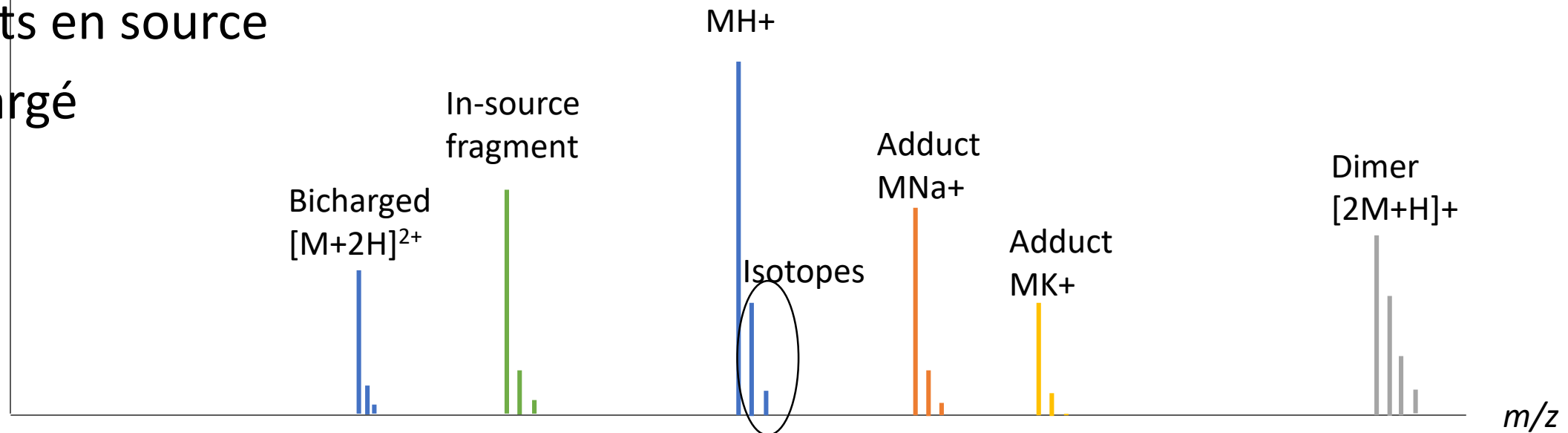
But : extraire des données toute l'information pertinente et uniquement elle, et la transformer pour pouvoir la manier

- Extraction des signaux pour les hypothétiques composés
- Paramétrage du traitement automatique (bruit, contaminants, ...)
- Elimination des artefacts et doublons
- Alignement des signaux entre eux sur l'ensemble des échantillons



Artefacts en spectrométrie de masse (ici electrospray mode +)

- Pic principal monoisotopique MH^+
- Isotopes
- Adduits
- Dimères
- Fragments en source
- Ion bichargé



8. Annotation /Identification en métabolomique non ciblée

But : proposer des identifications pour les composés et connaître leur niveau de certitude

Les 4 niveaux d'annotation en métabolomique

Sumner et al,
Metabolomics, 2007

Niveau 4 : un signal inconnu avec une mesure de masse

Niveau 3,5 : détermination de la formule brute par la masse précise

Niveau 3 : famille chimique caractérisée par le spectre MS/MS

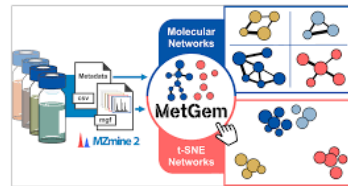
Niveau 2 : proposition d'identité putative, selon similarité du spectre MS/MS avec des bibliothèques

Niveau 1 : identification par comparaison à un étalon analysé au même moment

8. Annotation / Identification en métabolomique non ciblée

But : proposer des identifications pour les composés et connaître leur niveau de certitude

- Différents outils pour l'annotation

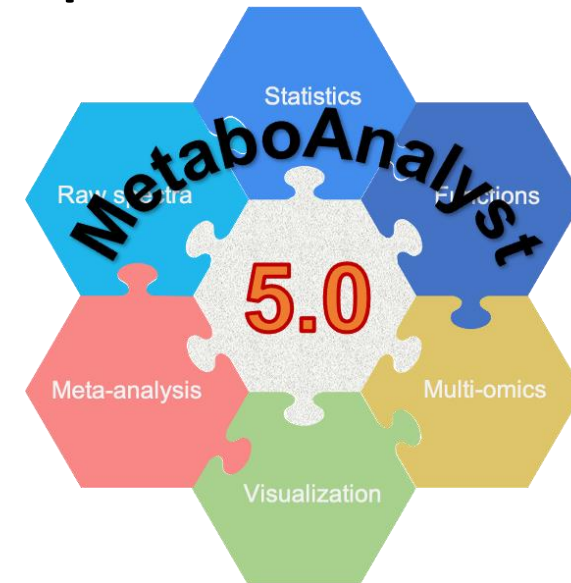


-> Se concentrer sur l'annotation des composés différentiellement accumulés

9. Normalisation et traitement statistique

But : pouvoir comparer les différents échantillons, de la façon la plus pertinente

- Normalisation par rapport à
 - à la quantité d'échantillon en poids sec ? En poids frais ?
 - au signal total de l'échantillon ? Au signal des seuls composés d'intérêt ?
 - à l'étalon interne ?
- Analyses multivariées supervisées / non supervisées
 - Analyses par composantes principales
 - Cartes de chaleur et clustering hiérarchique
 - ANOVA ? 1D, 2D ? Interactions de facteurs ?
 - PLS-DA ou l'analyse supervisée par excellence ? attention c'est une recherche a priori
- False Discovery Rate : garder un nombre limité de faux positifs
- Exclure des valeurs aberrantes ?



ANOVA : analyse de la variance

PLS-DA : analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels

Conclusion : vous êtes chercheur ? Alors, avant votre expérience,...

- Associez-vous à un analyste en amont de votre expérience
- Discutez avec lui de vos besoins et définissez les prérequis de l'analyse
- Déterminez bien votre question biologique avant
- Validez votre plan d'expérience avec l'analyste avant



Conclusion : vous êtes chercheur ?
Alors, après votre expérience,...

- Comprenez le principe et les enjeux de l'analyse
- Maîtrisez toutes les étapes, les risques et les incertitudes pour ne pas sauter à des conclusions hâtives et fausses
- Discutez de vos résultats avec l'analyste, faites de lui un partenaire à part entière

JEU DE ROLE

Devenez chimistes analystes, membres d'une plate-forme de chimie



Etude de cas 1



- Un collègue contacte notre plate-forme avec la demande suivante :
« Je travaille sur l'influence des co-cultures chez le colza et sa résistance aux pathogènes. J'ai lancé une expérience pour voir la différence entre du colza cultivé de façon classique, et du colza cultivé en co-culture avec du pois ou de la féverole, sur une cinétique de 7 jours, avec une inoculation d'un pathogène ou pas. J'ai prélevé des racines et des feuilles, 2 à 4 échantillons par condition. Vous pouvez me faire des analyses métabolomiques et d'hormones végétales ? »
- Voyez-vous déjà des problèmes à cette demande ?
- Je suis ce collègue, quelles questions me posez-vous, pour vérifier la validité de ma demande ?
- Comment auriez-vous fait autrement ?
- Que me proposez-vous pour corriger le tir dans cette situation ?

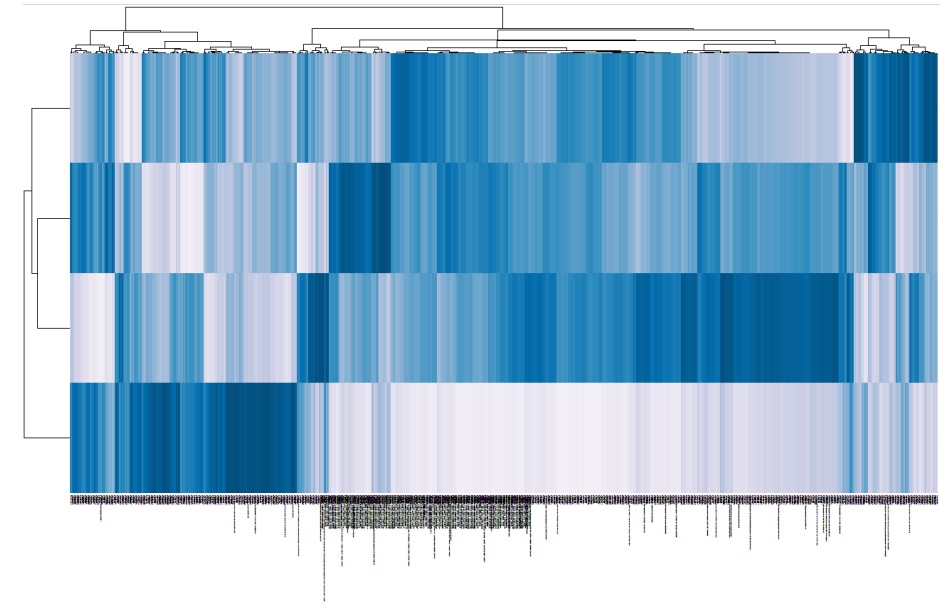
Etude de cas 2



Barrero et al 2005

« J'ai commandé des analyses préliminaires de métabolomique non ciblée LC-HRMS sur mon mutant *Arabidopsis aba1*, oui celui qui est en haut à droite.

J'ai vu des composés intéressants dans la heatmap que voici, c'est sûrement des biomarqueurs, je sens bien que c'est la riboflavine et ses dérivés. Est-ce que vous pouvez m'aider à les identifier ? Et refaire une expérience pour confirmer ? »



- Quelles questions me posez-vous, pour vérifier la validité des résultats ? Pour vérifier la validité de l'identité ?
- Quels risques que ce ne soit pas un biomarqueur ?
- Comment s'assurer que c'est un biomarqueur spécifique du mutant *aba1* ?

Etude de cas 3

« J'ai envoyé mes échantillons de plantes de mutant et sauvage avec 4 réplicats, en transcriptomique et en protéomique : j'ai vu des gènes et des protéines liées à la défense, sous-accumulées dans mon mutant. Donc je voudrais que vous me dosiez l'acide salicylique sur les mêmes échantillons. »

- Que me dites-vous ? Quelles questions me posez-vous ?
- Que me proposez-vous en complément ?

