

Métabolomique

Plan

- Introduction sur les métabolites
 - Définitions
 - **Des métabolites**
 - **Du Métabolome**
 - Les sources des métabolites
 - Les principaux métabolites
- La métabolomique
 - Définition
 - Objectifs de l'étude des métabolites
 - Pourquoi étudier les métabolites?
 - Fonctions des métabolites
- Technique d'analyse des métabolites :
 - Chromatographie liquide (LC-MS) : Non ciblée et ciblée
 - Spectrométrie de masse en phase gazeuse (GC-MS) : Ciblée

Introduction –Définition: Métabolites

- Un métabolite est une substance de petite taille (en général moins d'un kilodalton) formée au cours du métabolisme, qu'il s'agisse du produit final ou d'un intermédiaire.
- Les métabolites sont classées en deux catégories en fonction de leur origine : **endogènes** lorsqu'ils sont produits par l'organisme, **exogènes** lorsqu'ils proviennent de l'environnement extérieur.
- La principale limitation à l'identification des métabolites se situe dans l'usage des techniques de détection.

Introduction-Définition: Métabolome

- Ensemble des petites molécules (généralement moins de 1500 Daltons) qui se trouvent dans une cellule, un tissu ou un organisme.
- Beaucoup de ces petites molécules sont dites « métabolites », c'est-à-dire les produits de processus biologiques notamment du métabolisme.
- Il y a des milliers de métabolites dans un organe. Leur nombre exact n'est pas connu.

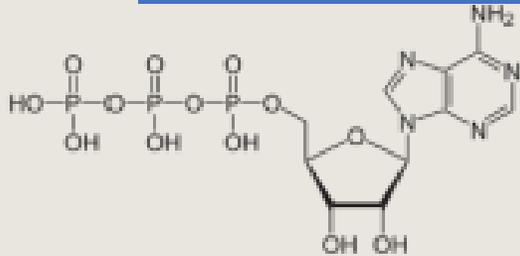
Les sources de métabolites

Les trois principales sources de métabolites en biologie animale sont l'urine, le sang et les tissus, auxquelles s'ajoutent la salive, la respiration, les fluides cérébraux, les larmes et la transpiration, actuellement en cours d'exploration

Métabolites principaux : Endogène

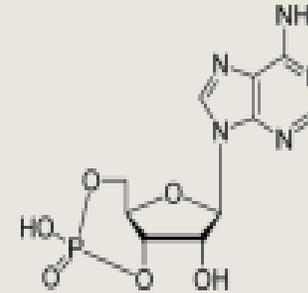
ATP

(source d'énergie)



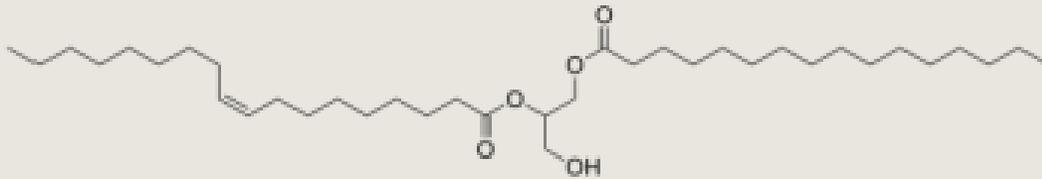
cAMP

important pour la transmission des signaux au sein des cellules



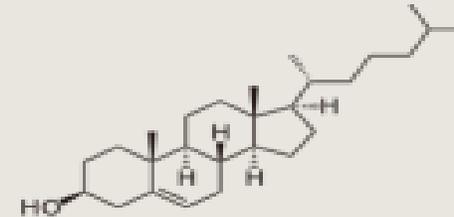
Diacylglycerol

Important pour la transmission des signaux au sein des cellules)



Cholesterol

affecte les propriétés des membranes et les voies de signalisation



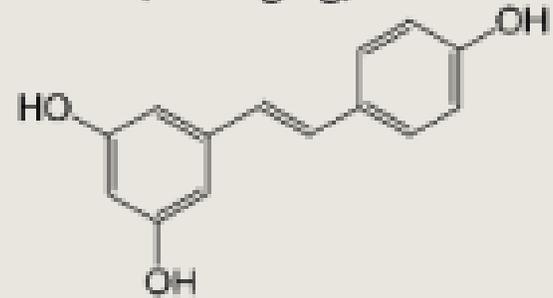
Petites molécules principale : Exogène

Ethanol

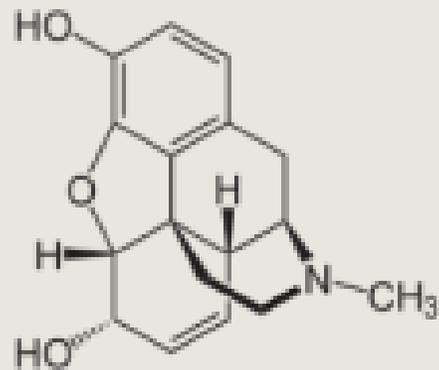


Resveratrol

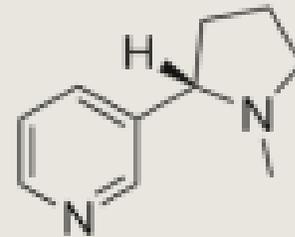
(Anti-aging)



Morphine

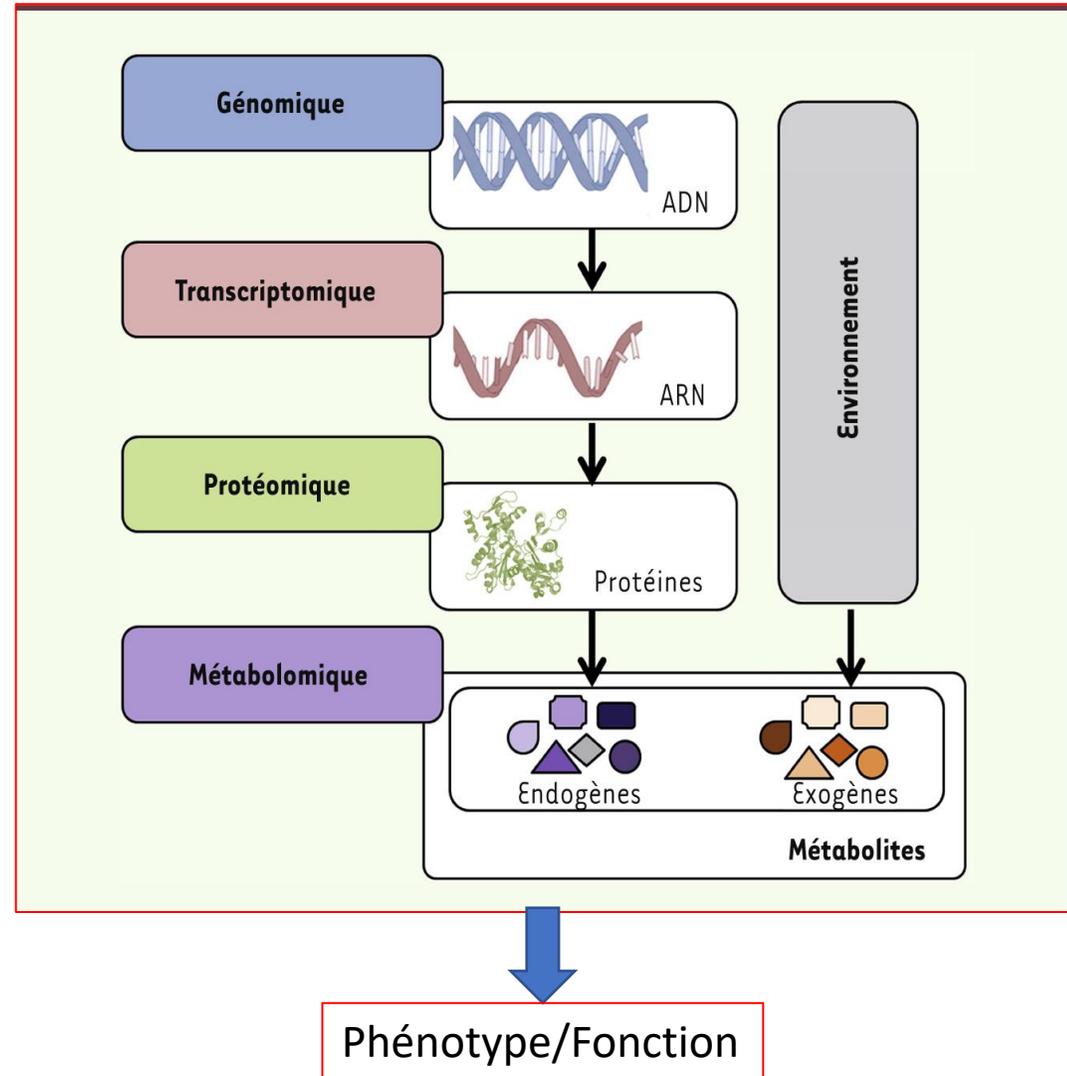


Nicotine



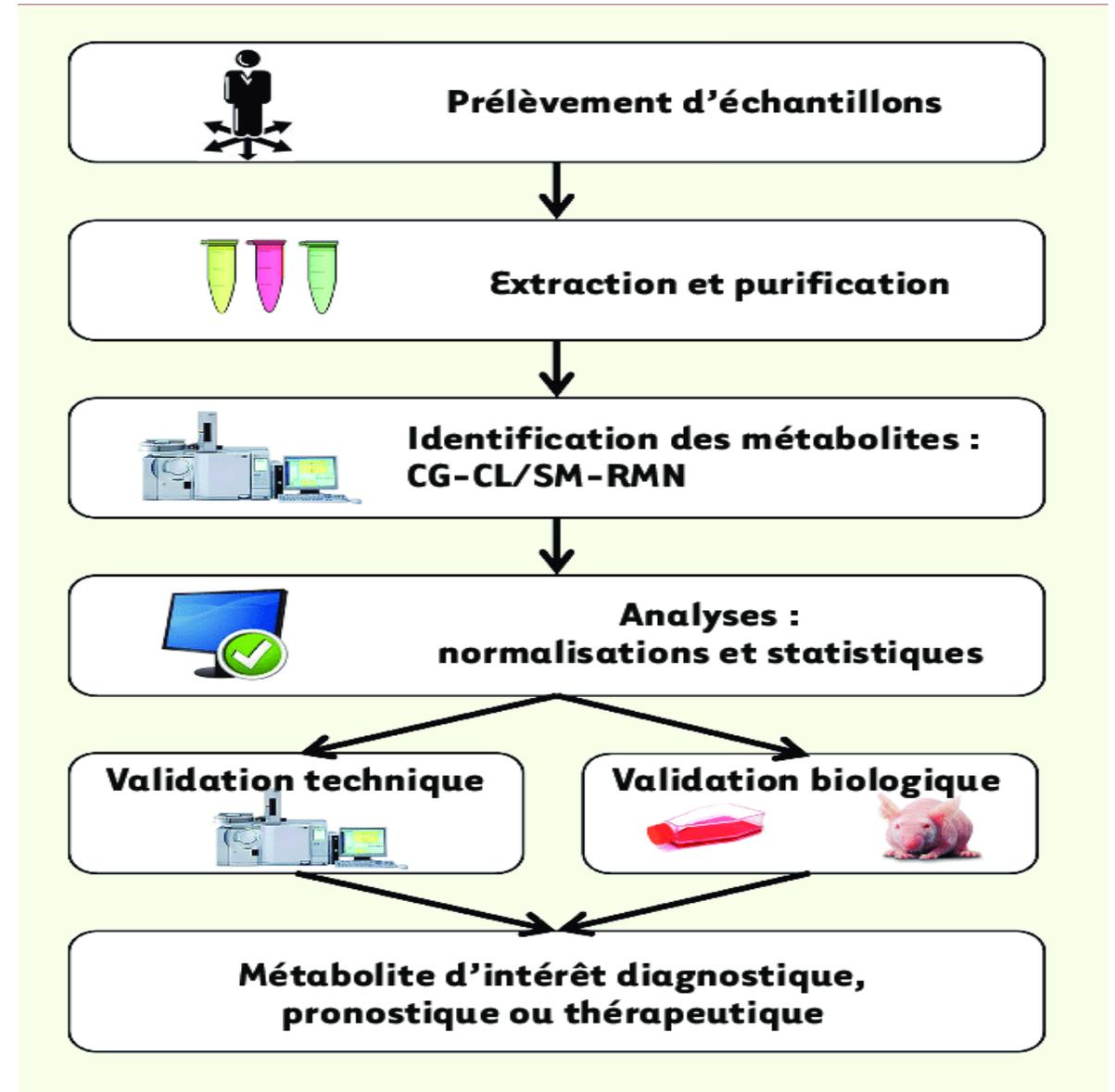
Métabolomique: Définition

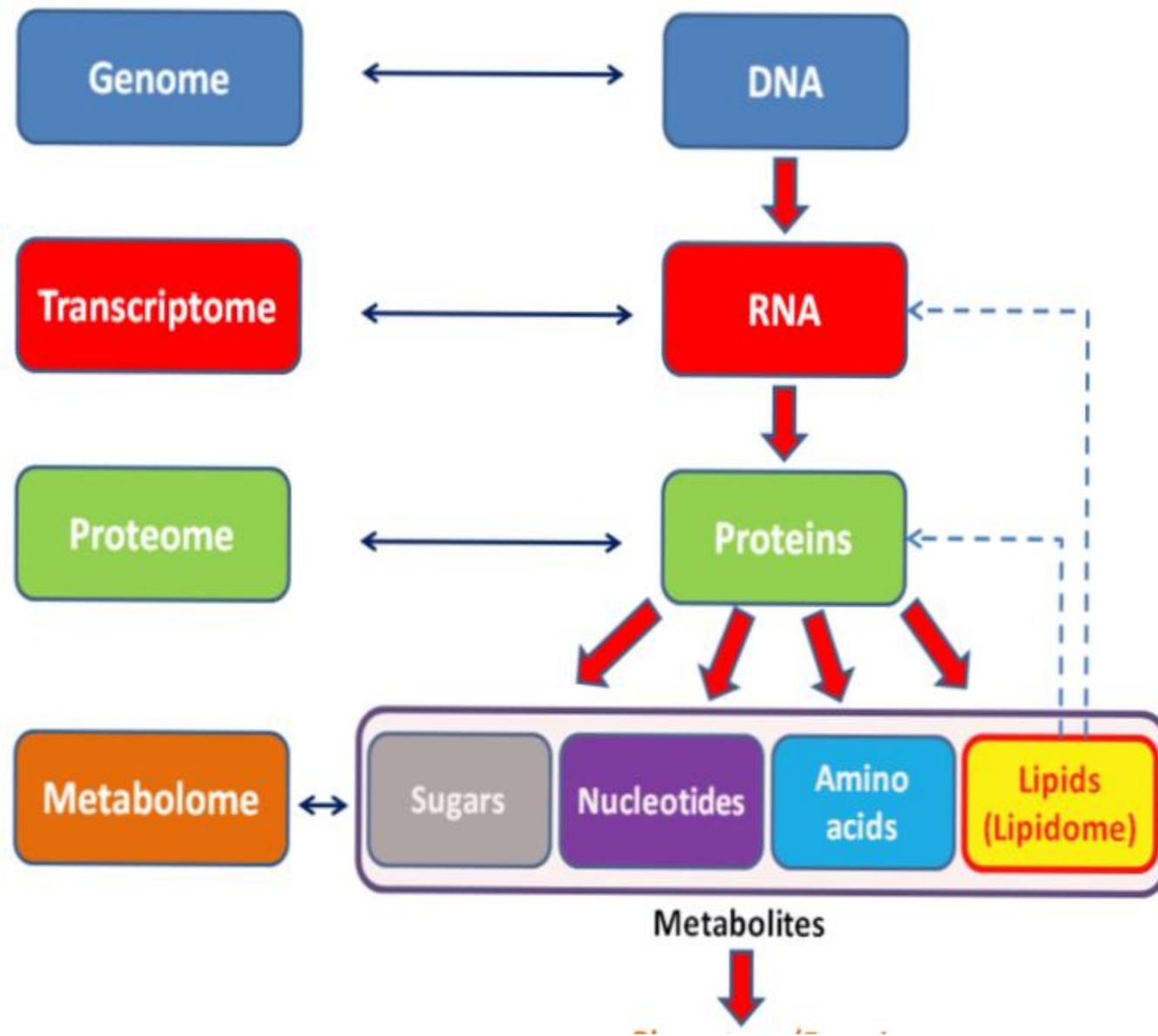
La métabolomique, étude des métabolites issus de l'organisme ou provenant de l'environnement, se situe en aval de la génomique (étude de l'ensemble des gènes), de la transcriptomique (étude de l'ensemble des ARN messagers) et de la protéomique (étude de l'ensemble des protéines).



Objectifs de l'étude des métabolites

Le but final de l'étude des métabolites est d'obtenir une concordance entre le profil analysé dans les biofluides et la biochimie du tissu pathologique considéré. Il est nécessaire de déterminer comment un profil métabolomique tissulaire se reflète dans la signature métabolomique des prélèvements sanguins ou urinaires



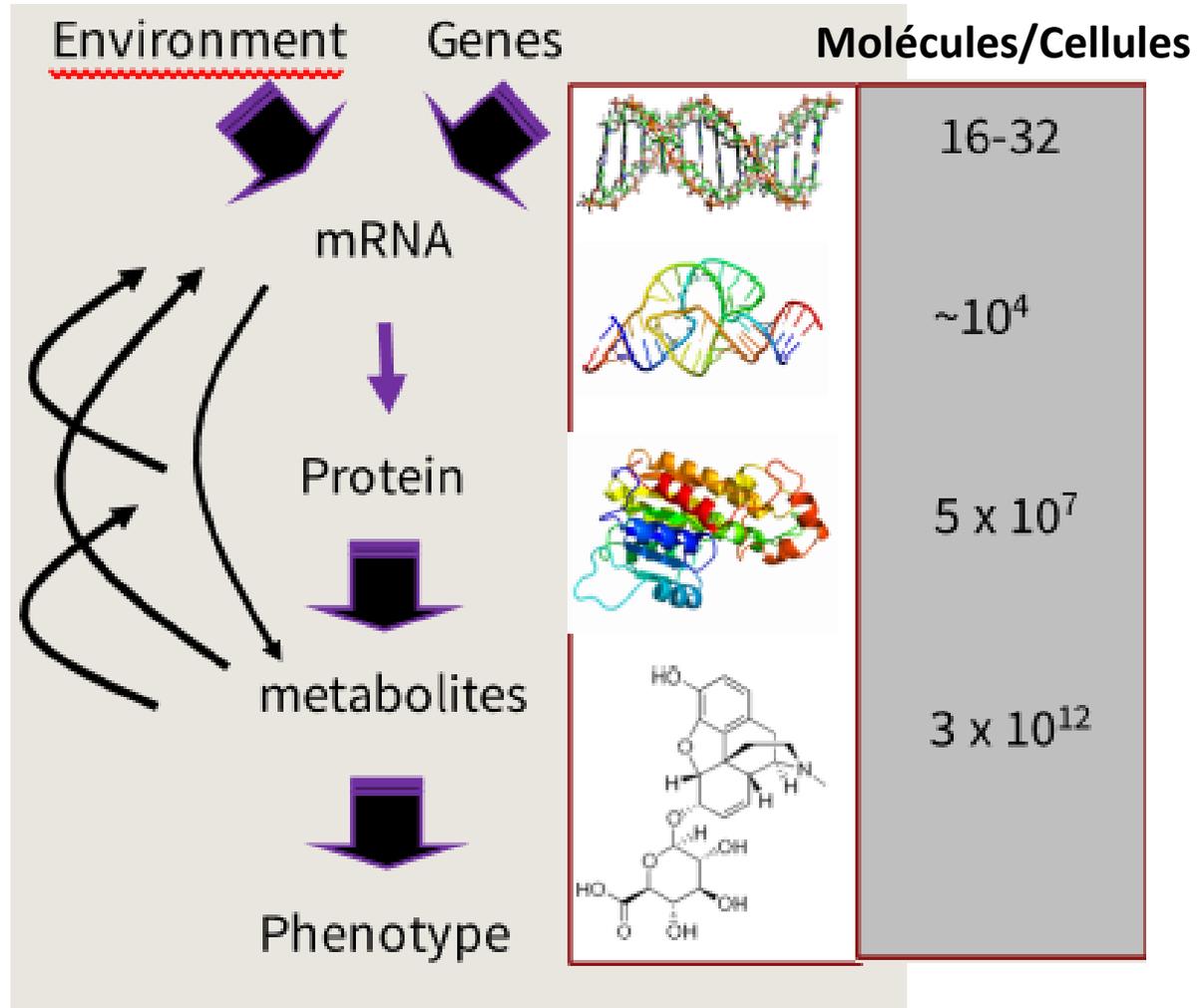


- **Pourquoi étudier les métabolomes ?**
- **Comment étudier les métabolomes.**

Pourquoi étudier les métabolomes ?

Parce que

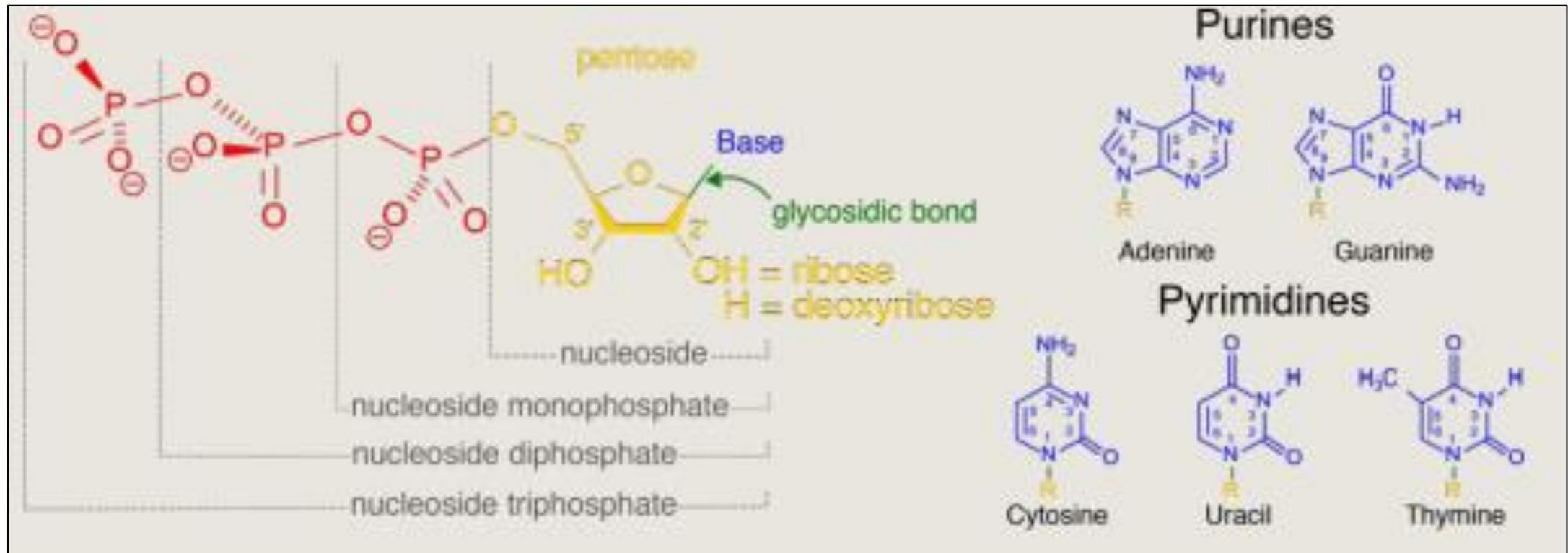
- Les métabolomes sont étroitement liés aux phénotypes



Parce que

Les métabolites viennent de : Nous (les choses que nous fabriquons)

- Nucléosides et nucléotides (éléments constitutifs de l'ADN, de l'ARN)
- La plupart des lipides membranaires



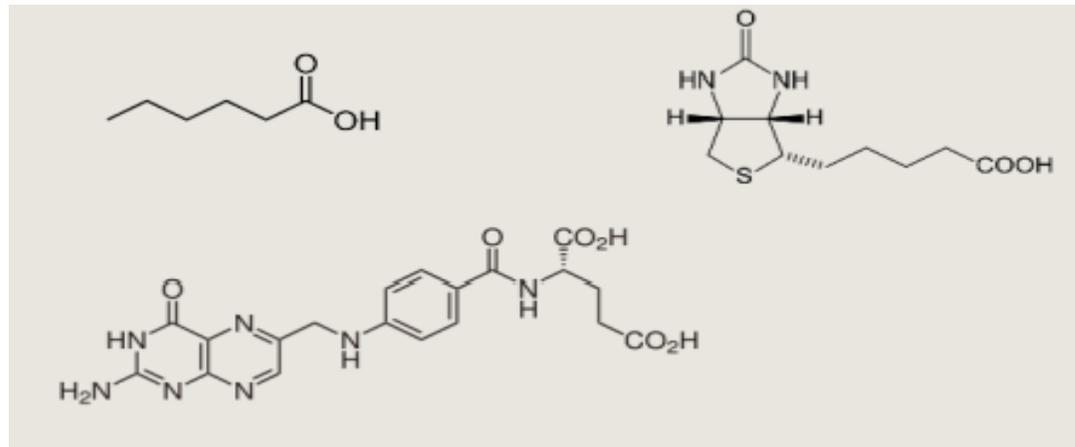
Parce que

Les métabolites proviennent de : Notre microbiome

- Acides gras à chaîne courte (SCFA)

Biotine

Folate



Parce que

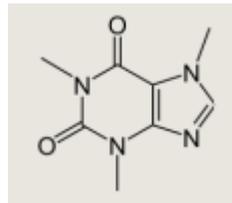
Les métabolites viennent de : Les aliments que nous mangeons

- ½ de nos acides aminés (par exemple Phénylalanine, Tryptophane, Lysine)

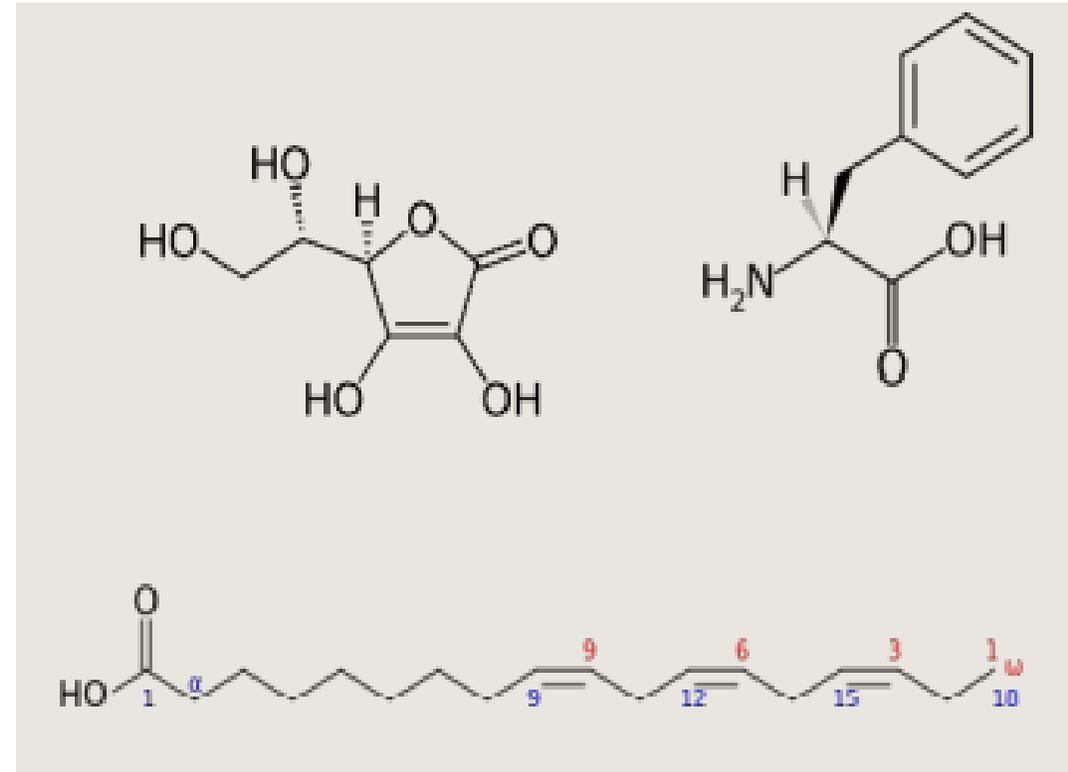
La plupart des vitamines (A, D, E, K, B)

Les acides gras oméga 3

Caféine



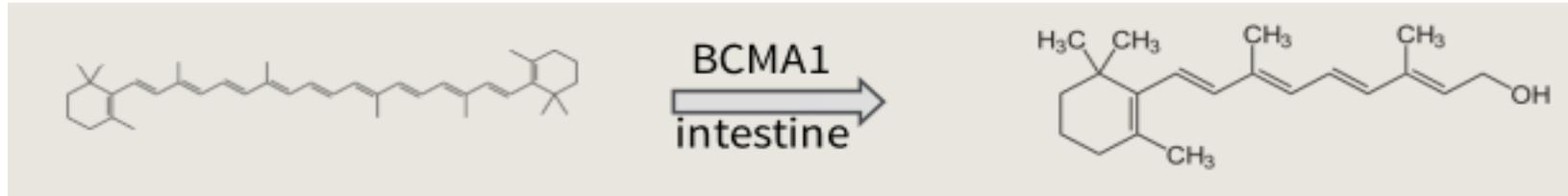
Métaux (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} ,)



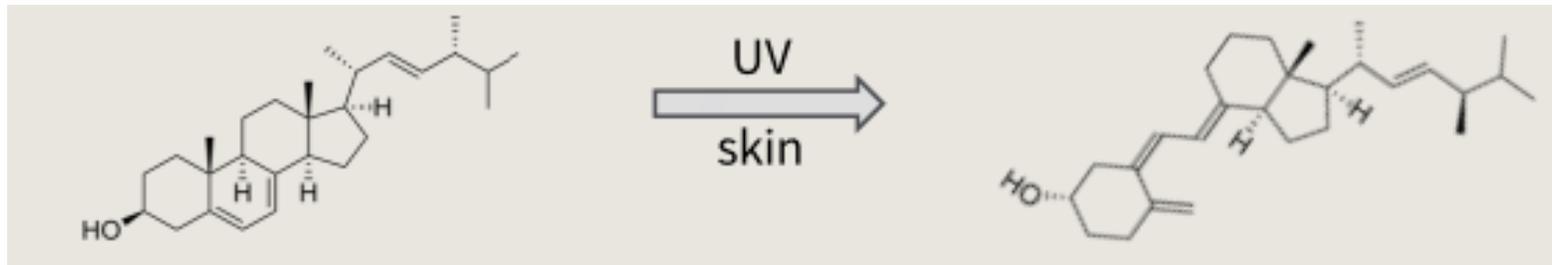
Parce que

Nous tirons également des précurseurs de métabolites de notre alimentation

- **Le bêta-carotène se transforme en vitamine A rétinol**



- **Ergostérol sous l'effet de La lumière du soleil se transforme en vitamine D2 (ergocalciférol)**



Seule source de vitamine D pour les végétariens

Diverses fonctions des métabolites :

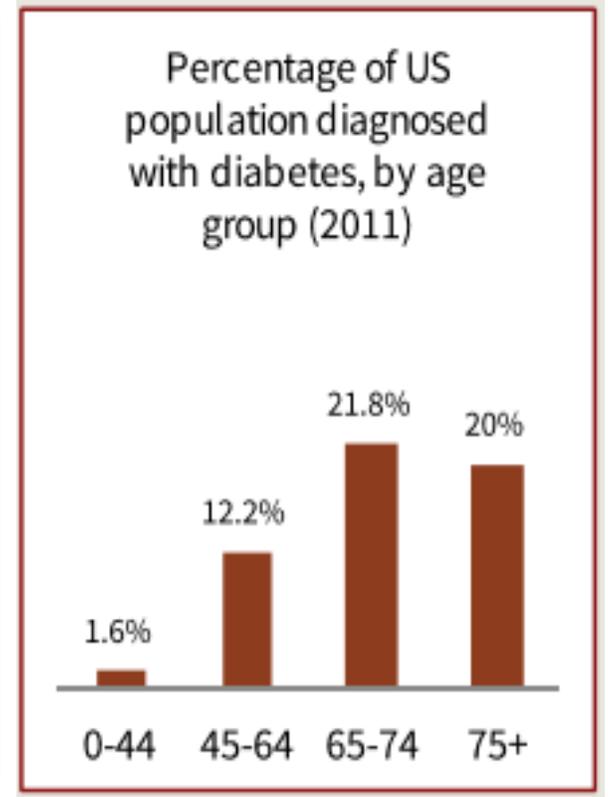
- Assurer les réactions biochimiques d'une cellule
 - Énergie, par exemple ATP
- Former des éléments constitutifs de macromolécules (par exemple, les protéines, les acides nucléiques, les glycanes sont formés à partir d'acides aminés, de nucléotides)
- Servir de cofacteurs d'enzymes (par exemple NAD, Hème)
- Régulation de l'activité enzymatique
 - Acétyl-CoA \longrightarrow Acétylation
 - ATP \longrightarrow Phosphorylation

Par conséquent, ils sont impliqués dans divers processus cellulaires

- Signalisation cellulaire (par exemple, ligand pour les récepteurs)
 - ✓ cAMP : récepteur bêta-adénergique
 - ✓ Prostaglandine : récepteurs des prostaglandines
- Structure de la cellule: Cholestérol
- La prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire
 - ✓ Effet Warburg (glycolyse et respiration non couplées)
 - ✓ Sérine, essentielle au cancer de la prostate (non essentielle aux cellules normales)

Grand nombre de maladies métaboliques

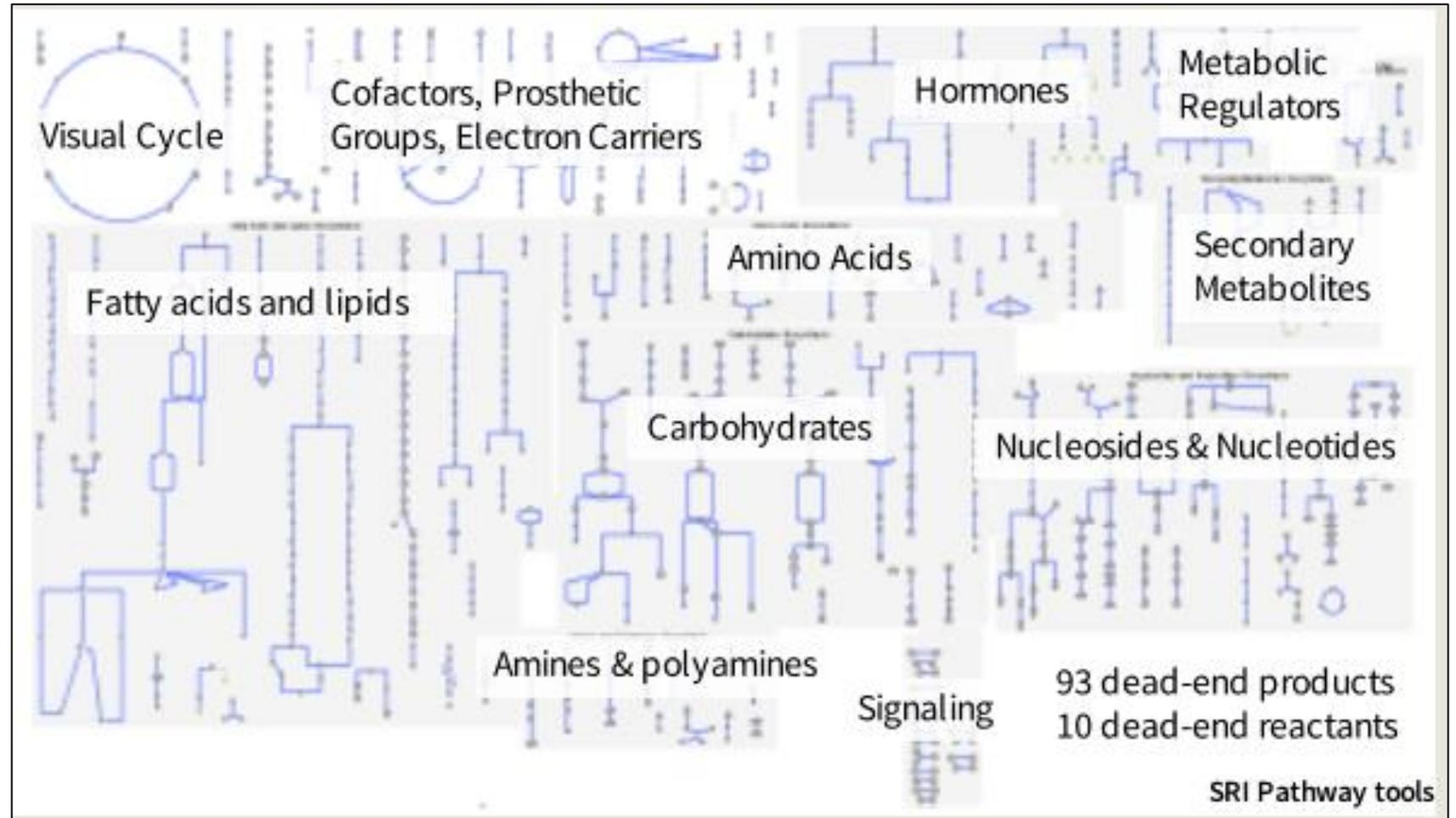
- Maladies génétiques telles que la phénylcétonurie
- Diabète
- Obésité
- Lipidémies
- Anomalies congénitales folate/acide folique
- Cancer (effet Warburg)



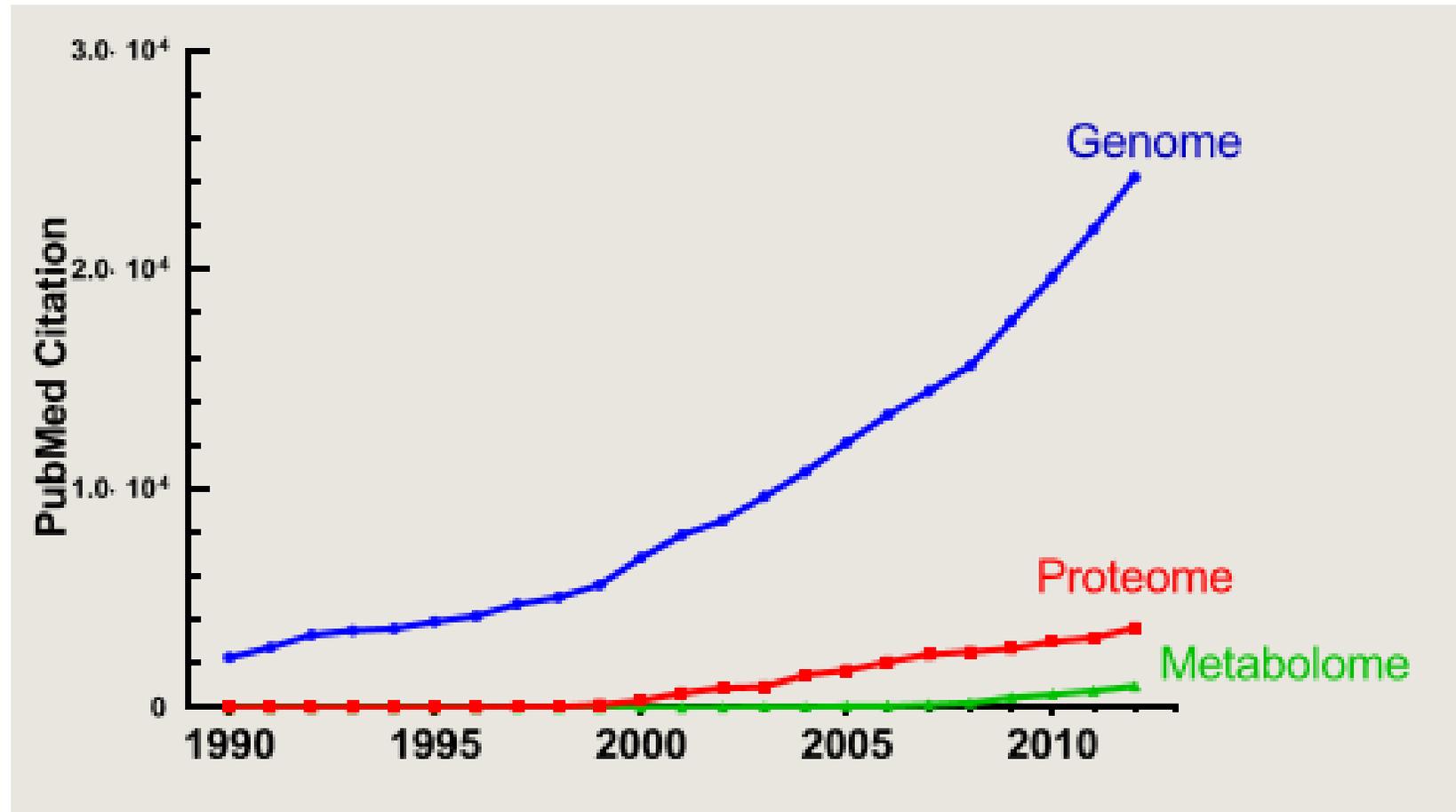
Le métabolome humain est large et diversifié

- >1000 composés
- Nous ne savons pas précisément sa taille.

- △ Amino Acids
- Carbohydrates
- ◇ Proteins
- Purines
- Pyrimidines
- ▽ Cofactors
- ⊥ tRNAs
- Other
- + (Filled) Phosphorylated
- Dead-end products
- Dead-end reactants

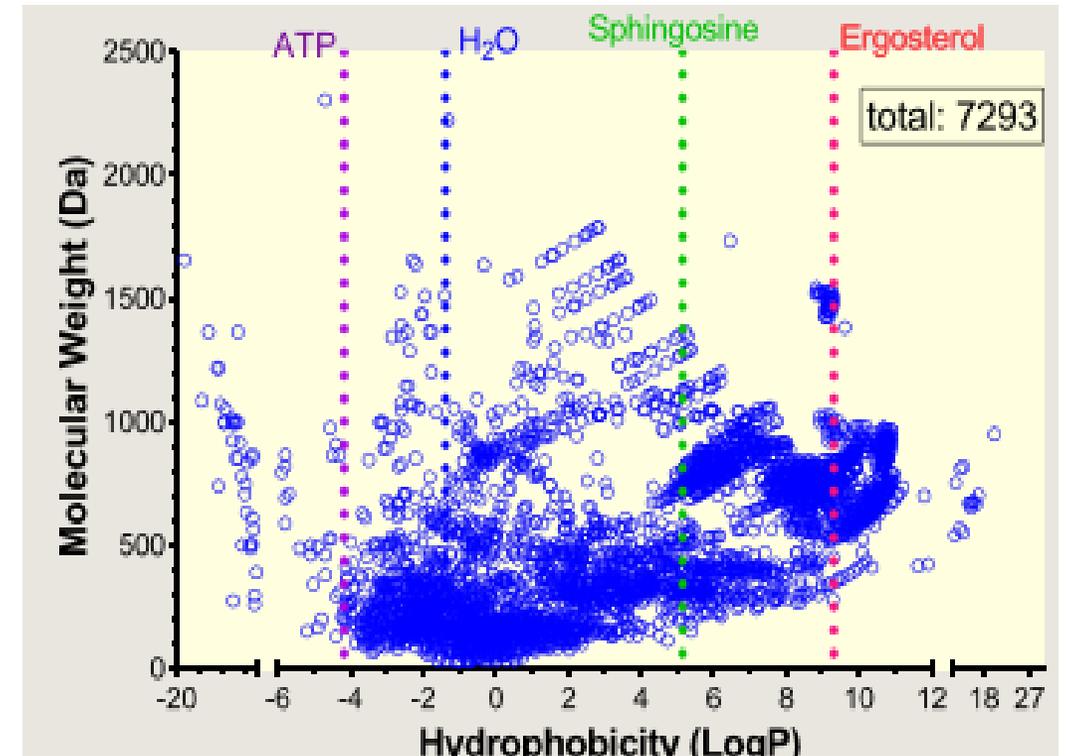


Le métabolome est moins bien étudié que les autres omes (génomome, transcriptome, protéome)



Le métabolome est chimiquement diversifié, ce qui le rend plus difficile à étudier (contrairement au génome ou au protéome, par exemple)

- Hydrophobe
 - Ex: les acides gras, les lipides, le cholestérol
- Hydrophile positif
 - Ex: les acides aminés, les amines
- Hydrophiles négatifs
 - Ex: les sucres, les acides organiques



	logP	MW	
Median	6.05	697.1	Métabolome Humain
Mean	5.08	616.5	

Comment étudier les métabolomes

- Le profilage : Spectrométrie de masse
 - Chromatographie liquide (LC-MS) : Non ciblée et ciblée
 - Spectrométrie de masse en phase gazeuse (GC-MS) : Ciblée



Prélèvement d'échantillons



Extraction et purification



**Identification des métabolites :
CG-CL/SM-RMN**



**Analyses :
normalisations et statistiques**

Validation technique



Validation biologique

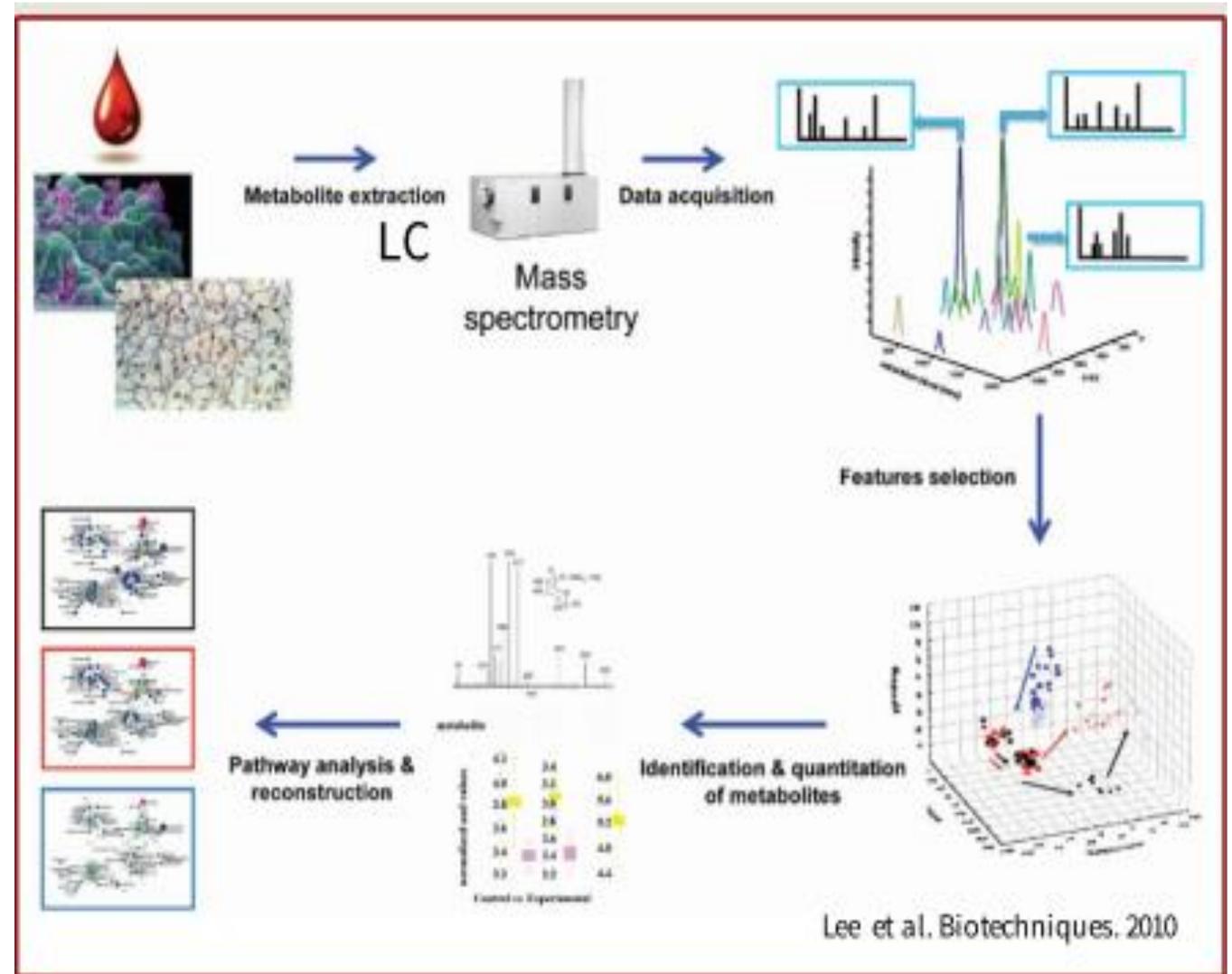
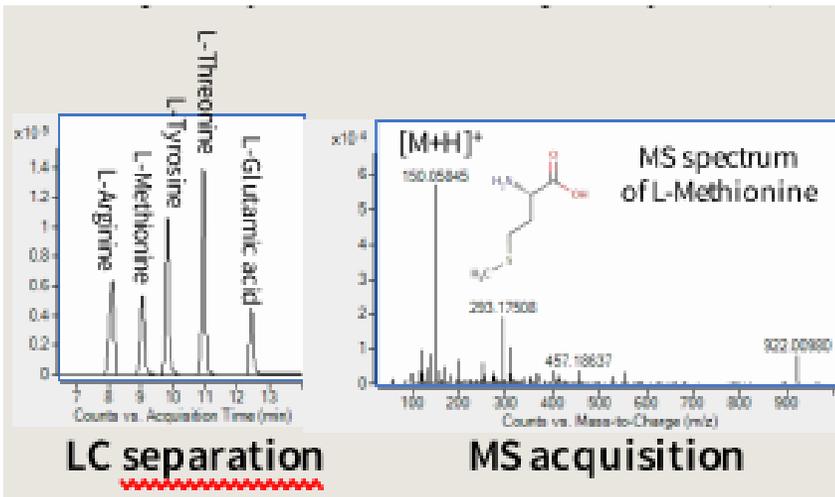


**Métabolite d'intérêt diagnostique,
pronostique ou thérapeutique**

Profilage des métabolites par spectrométrie de masse LC

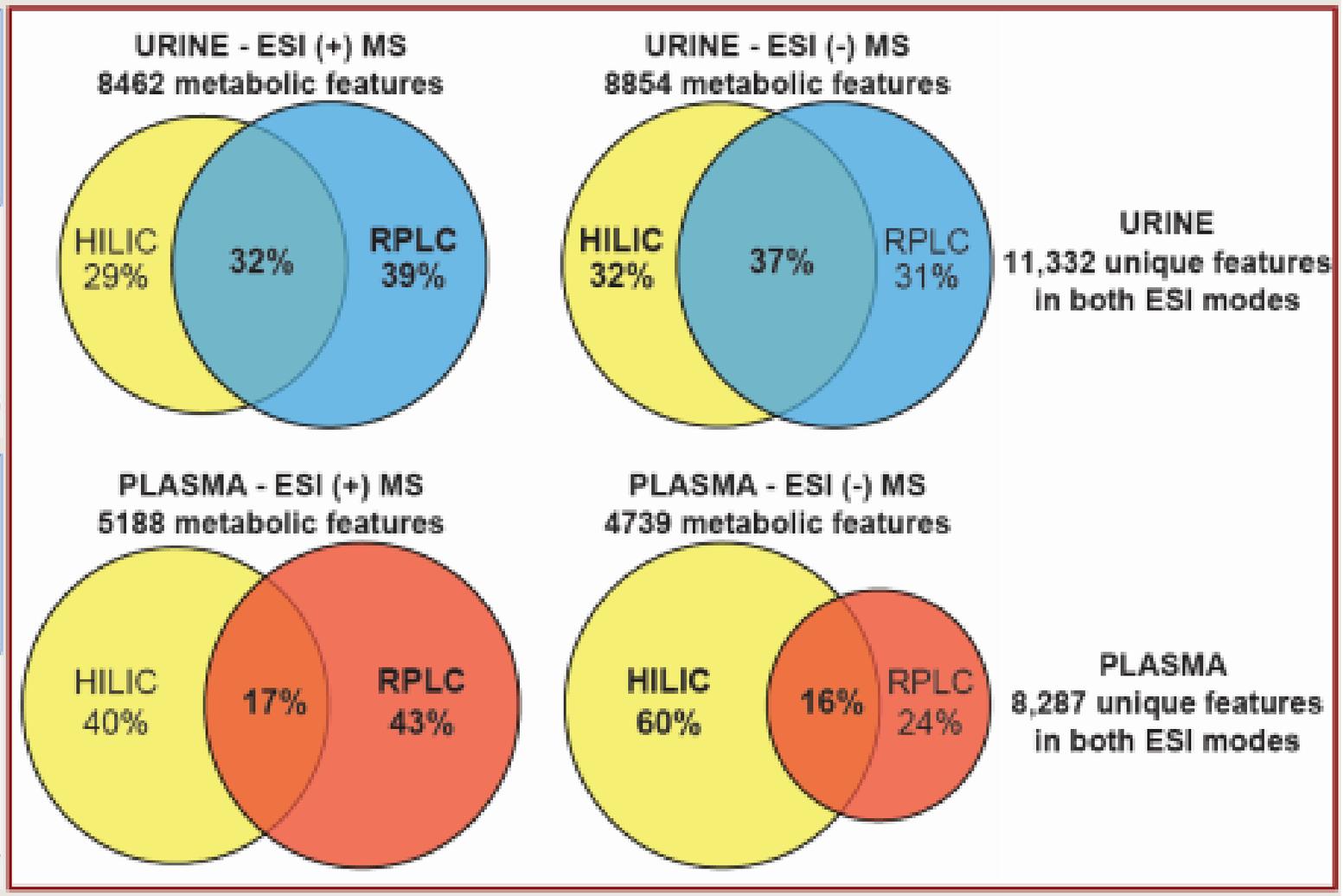
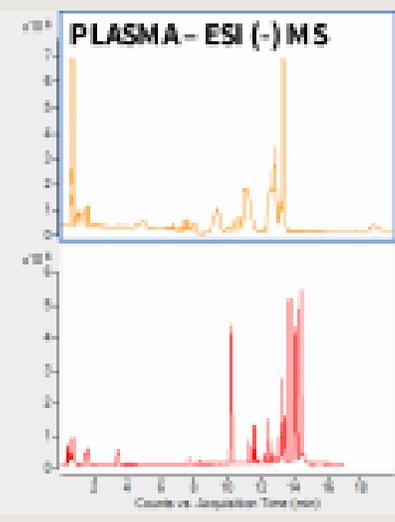
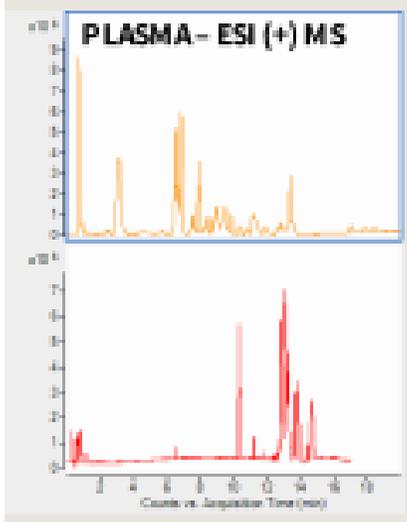
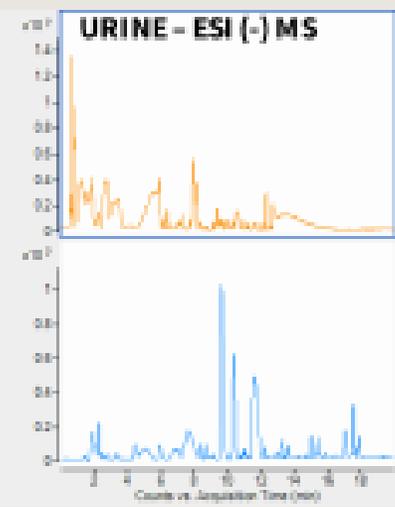
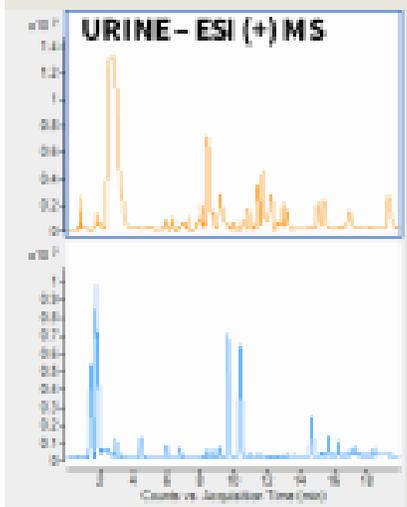
- LC-MS non ciblée
Similaire à la protéomique

Extraire les métabolites
:50-80% méthanol
(extraits hydrophobes et
hydrophiles)



Grâce à une CL sophistiquée, plusieurs milliers de pics sont détectés dans le sang et l'urine

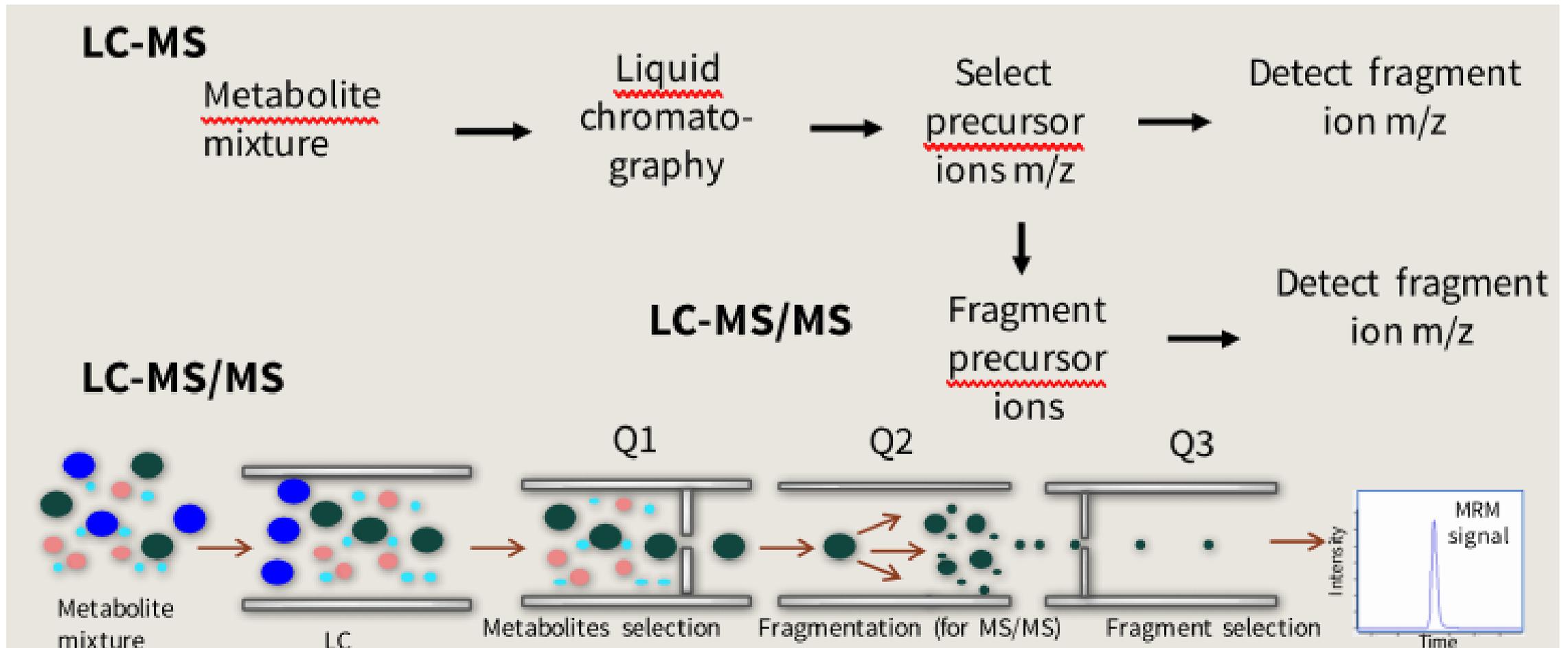
- Pics détectés dans l'urine et le sang en utilisant :
- Phase inverse CL (pour les molécules hydrophobes)
- HILIC LC (pour les molécules hydrophiles): La chromatographie à interaction hydrophile



Profilage des protéines par spectrométrie de masse LC : Métabolomique ciblée

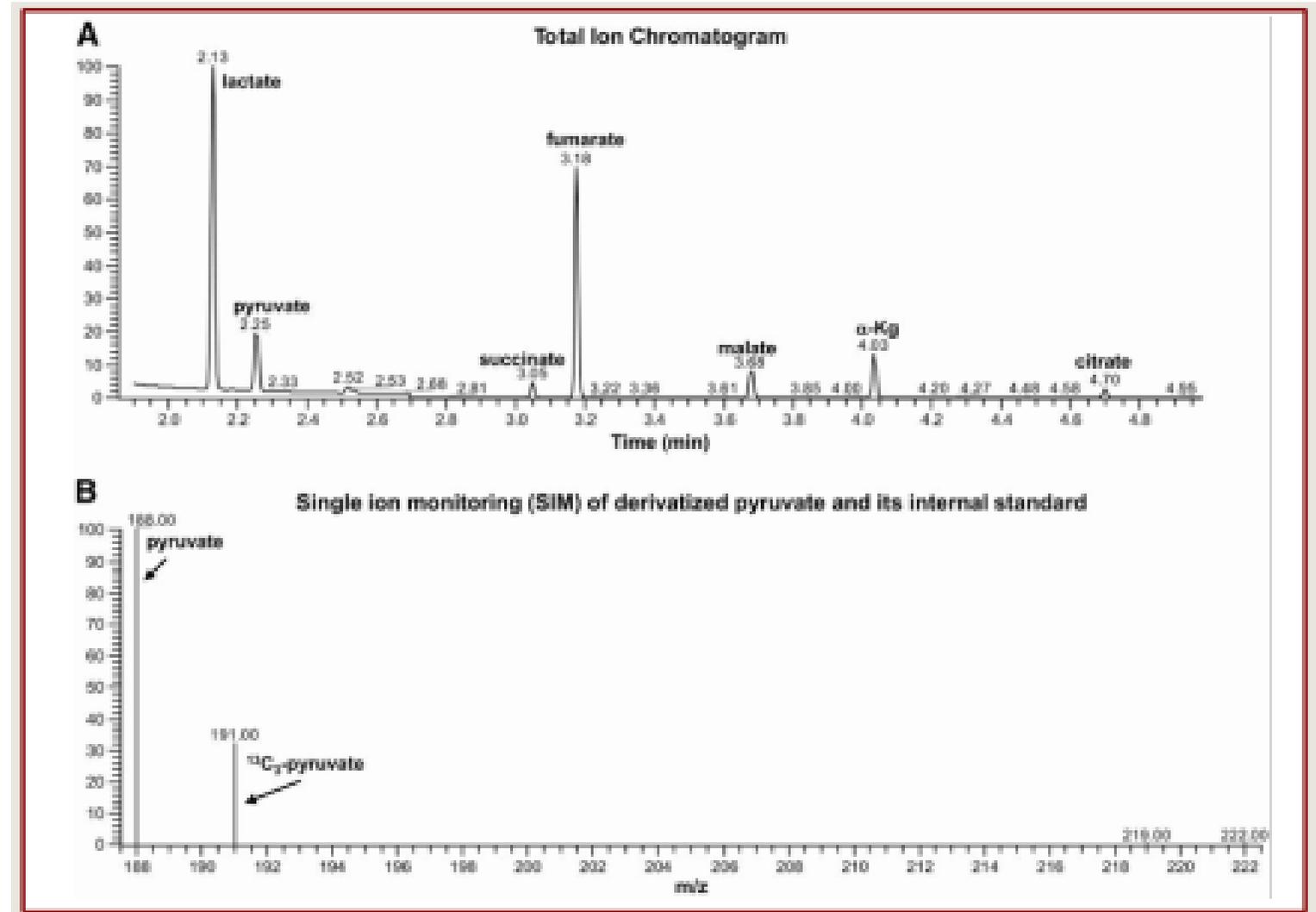
- Semblable à la protéomique
- Cibler sélectivement les analytes d'intérêt
- Orienter l'instrument sur des cibles sélectionnées, ce qui améliore considérablement le rapport signal/bruit ratio
- Peut être couplé à une dilution isotopique stable
- Permet une quantification précise

Profilage des protéines par spectrométrie de masse LC : Métabolomique ciblée



Profilage des protéines par spectrométrie de masse LC : Métabolomique ciblée

Homogénat de foie de rat



Messages à emporter – Vocabulaire- Concepts

- Métabolome - Ensemble de petites molécules (généralement inférieures à 1 500 daltons) présentes dans une cellule, un tissu ou un organisme.
- Les métabolites sont abondants dans la cellule. Ils remplissent diverses fonctions biochimiques et sont impliqués dans diverses propriétés biologiques.
- Ils sont chimiquement divers et peuvent être profilés par spectrométrie de masse.

Applications de la Métabolomique

Ce que nous apprendrons dans ce chapitre

- La métabolomique peut être utilisée pour trouver des biomarqueurs
- La métabolomique peut être utilisée pour étudier les interactions métabolite-protéine

Objectifs de la recherche en métabolomique

- 1) Découvrir les biomarqueurs
- 2) Comprendre les réseaux et les voies de régulation

Il existe de nombreuses maladies métaboliques

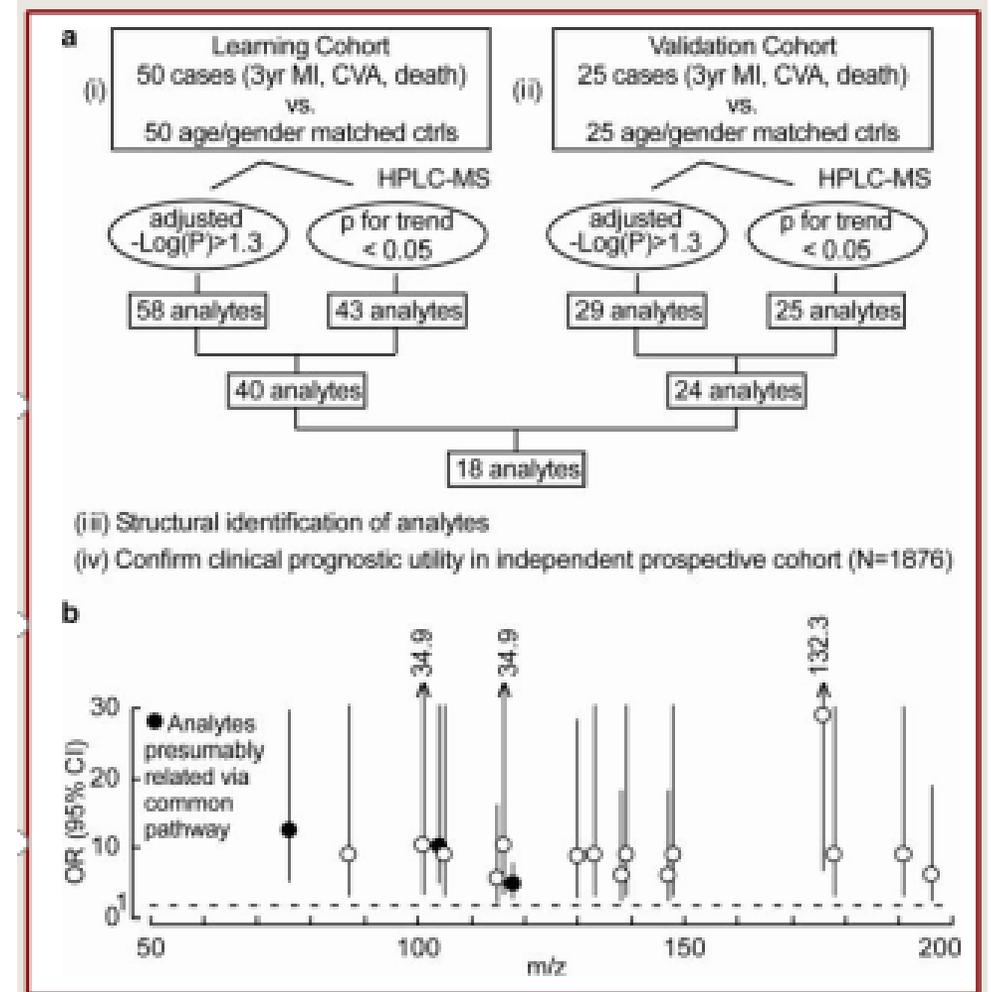
- Maladies génétiques telles que la phénylcétonurie Diabète
- Obésité
- Lipidémies
- Anomalies congénitales folate/acide folique
- Cancer (effet Warburg)

Des biomarqueurs de maladies cardiovasculaires bien étudiés

- Cholestérol : athérosclérose, maladies coronariennes
- Troponine I et T : infarctus aigu du myocarde

Utiliser la métabolomique pour découvrir des biomarqueurs : Maladies cardiovasculaires (MCV)

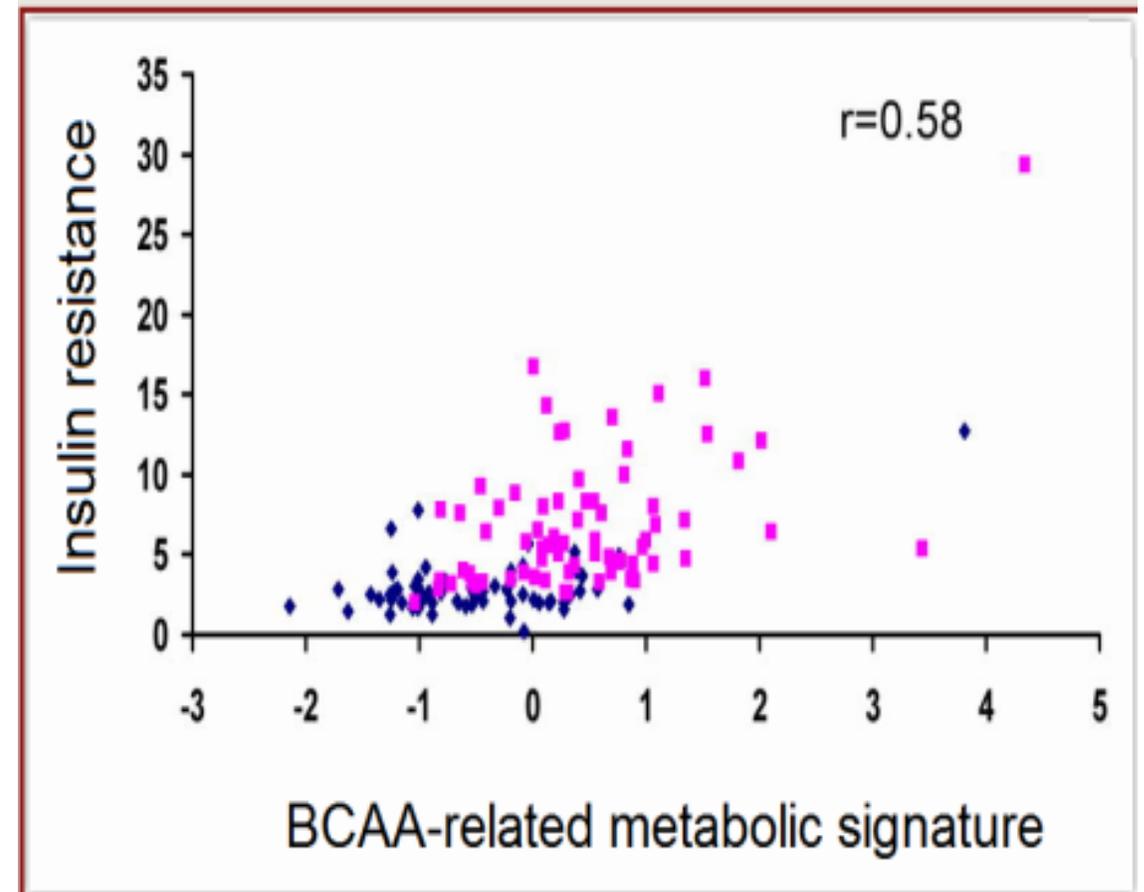
- HPLC-MS non ciblée du plasma
- Patients à risque ayant subi une crise cardiaque, un accident vasculaire cérébral ou un décès dans les 3 ans suivant l'évaluation, par rapport à des témoins appariés par âge/sexes sans événements cardiovasculaires majeurs
- Examiné >2000 analytes
- 18 significativement différents dans une étude et dans une étude de validation
- 3 biomarqueurs qui prédisaient le risque de maladies cardiovasculaires : choline, TMAO (Triméthylamine N-oxyde), bêtaïne



- Les sujets présentant des niveaux élevés de choline, de TMAO, de bétaine sont plus exposés à un risque de crise cardiaque, d'accident vasculaire cérébral ou de décès.
- Il est intéressant de noter que le TMAO est fabriqué à partir de la choline alimentaire par les microbes intestinaux !

Des biomarqueurs : Sensibilité à l'insuline

- Etude de 74 sujets obèses (IMC médian de 37 kg/m²) et 67 sujets maigres (IMC médian de 23 kg/m²) à l'aide d'une SM ciblée
- Identification d'une signature métabolique liée aux acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) chez des sujets obèses composée de
 - Acides aminés à chaîne ramifiée : leucine, isoleucine, et valine
 - glutamate/glutamine
 - Acylcarnitines C3 et C5
 - Les acides aminés aromatiques phénylalanine et tyrosine

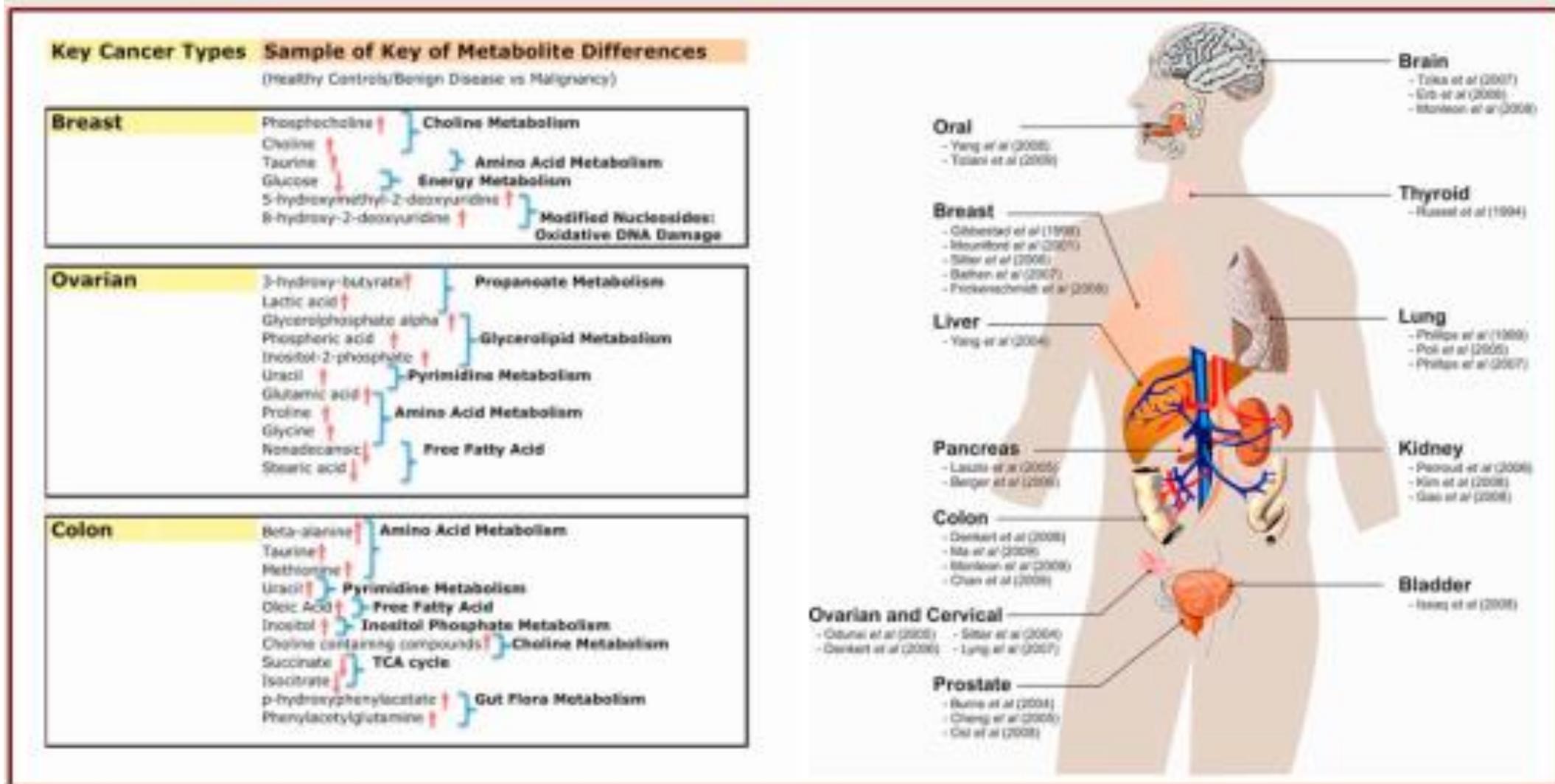


Diamants bleus : sujets maigres ; carrés violets : sujets obèses.

Des biomarqueurs : Cancer

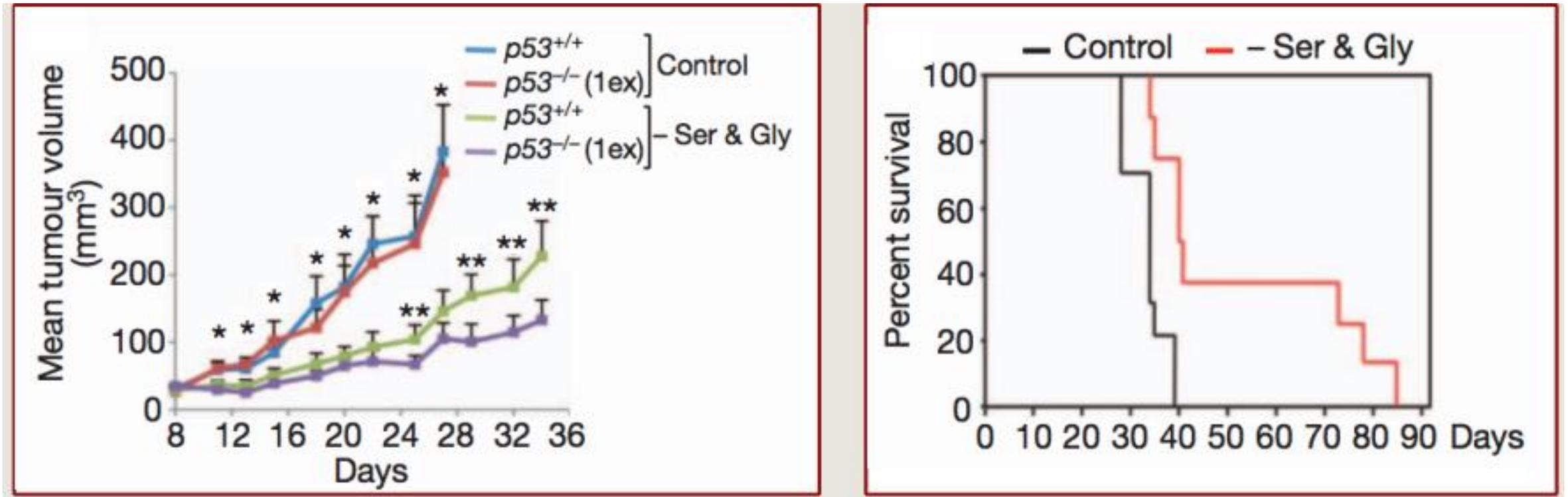
- De nombreux liens entre le cancer et le métabolisme
- Le cancer est une maladie métabolique
- L'effet Warburg : Les cellules cancéreuses produisent de l'énergie par un taux élevé de glycolyse et de fermentation de l'acide lactique dans le cytosol ; les cellules normales présentent un faible taux de glycolyse et d'oxydation du pyruvate dans les mitochondries
- Les mutations des gènes métaboliques sont courantes chez les patients cancéreux ; par exemple, l'IDH1 (isocitrate déshydrogénase) subit fréquemment des mutations dans les gliomes (ensemble des tumeurs cérébrales) et d'autres cancers

Des différences de métabolites sont observées dans de nombreux cancers



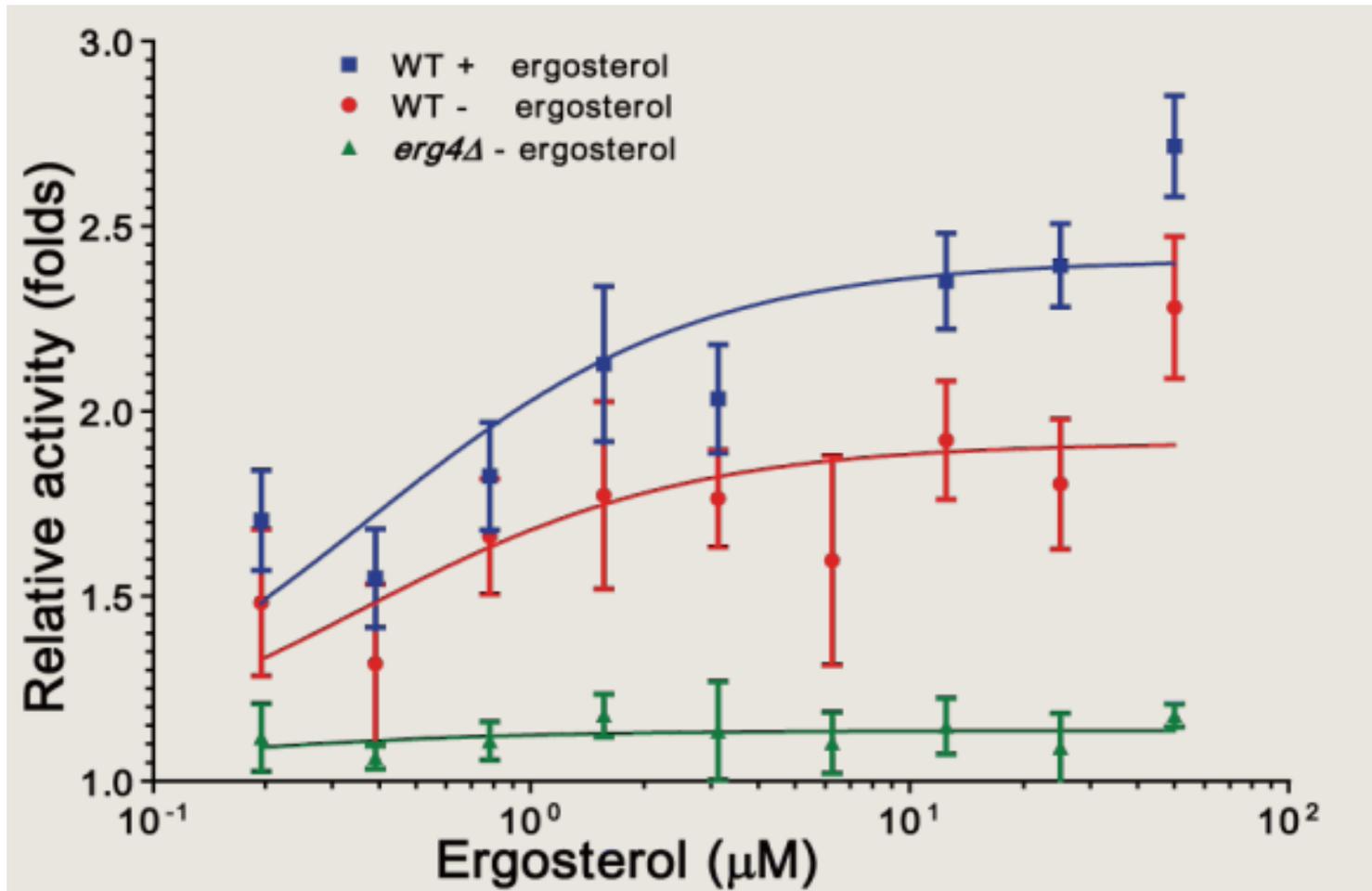
Métabolomique et cancer

La déplétion de la sérine réduit la croissance des tumeurs de la prostate et favorise la survie des souris



L'ergostérol est nécessaire pour l'activité de la kinase Ypk1

Serine/threonine-protein kinase Ypk1 (Rôle important dans la régulation de l'homéostasie)



Interaction Metabolites-Proteines

- Les interactions entre les kinases sont modifiées par l'ergostérol
- Ces interactions sont importantes pour
 - 1)Activité enzymatique
 - 2)Teneur en protéines
 - 3)Interactions protéine-protéine

Conclusion:

La métabolomique émerge comme un outil non invasif, pertinent et prometteur dans le cadre de l'identification d'une signature caractéristique d'une situation biologique, potentiellement importante pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Elle sera particulièrement utile pour enrichir la panoplie des autres « -omiques ». Des limites techniques freinent actuellement l'expansion des applications de la métabolomique. Il faudra notamment :

- (1) abaisser les seuils de concentration pour la détection des métabolites, ce qui permettra un affinement de l'ébauche métabolomique humaine ;
- (2) standardiser les méthodes de prélèvement des échantillons dans le cadre d'une matrice donnée, ce qui améliorera la fiabilité, la reproductibilité et la pertinence des analyses métabolomiques.

