



> Design d'une étude métabolomique
Binta Diémé, IR biologiste en analyse de données, PFEM

- I. Généralités: historique, définitions
- II. Les différents types d'études métabolomiques
- III. Les outils analytiques
- IV. Le prétraitement des données analytiques
- V. Les analyses statistiques
- VI. Interprétation des résultats

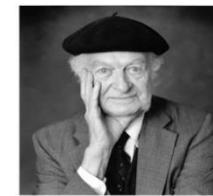
> Généralités: historique

Concept de « profil métabolique »
1940



Roger Williams

Utilisation de « profil métabolique » (GC/MS)
1971



Linus Pauling

Utilisation de « profil métabolique » (RMN)
1984

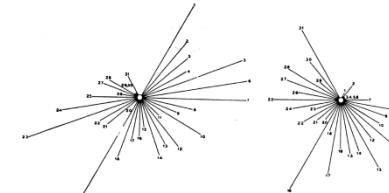


Jeremy K Nicholson

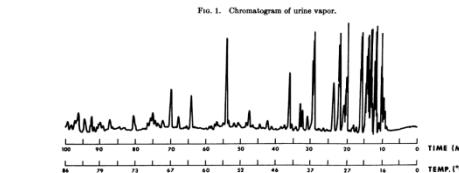
Utilisation du terme « métabolome »
1988



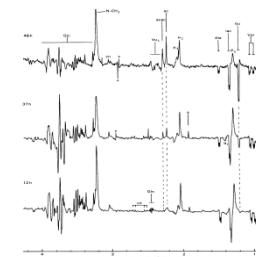
Stephen G. Oliver



Profil métabolique urinaire sur papier chromatographique

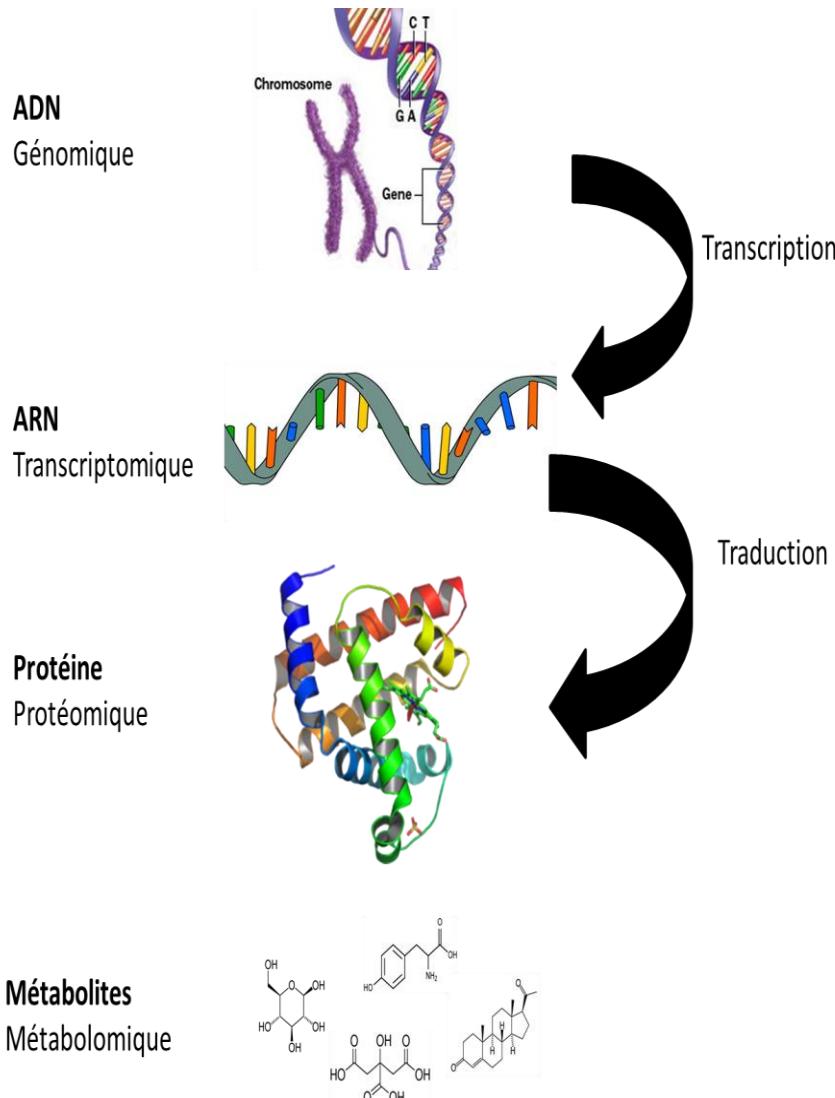


Profil métabolique urinaire par GC/MS



Profil métabolique du sérum par ^1H -RMN

> Généralités: définition



Métabolome

Ensemble des petites molécules (< 1500 Da) présentes dans un échantillon biologique.

Métabolomique

Définition (Fiehn *et al.* Nat. Biotechnol., 2000) :

- Identification et quantification exhaustive et non sélective de tous les métabolites d'un système biologique.

> Généralités: domaines d'application de la métabolomique

Santé



- Diagnostique (précoce, prédictif)
- Physiopathologie (cancer, maladies cardio-vasculaires, diabète/obésité)
- Maladies métaboliques, maladies du métabolisme

Pharmacologie



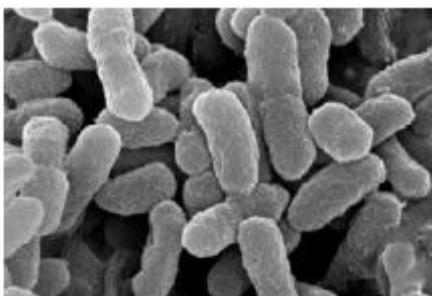
- Développement/validation de nouveaux médicaments, AMM
- Pharmacologie prédictive
- Suivi individualisé
- Pharmacocinétique
- Biomarqueurs de toxicité

Agro-alimentaire



- Nutrition (prébiotiques, probiotiques)
- Suivi nutritionnel personnalisé
- Sécurité alimentaire, fraudes
- Traçabilité, OGM

Microbiologie



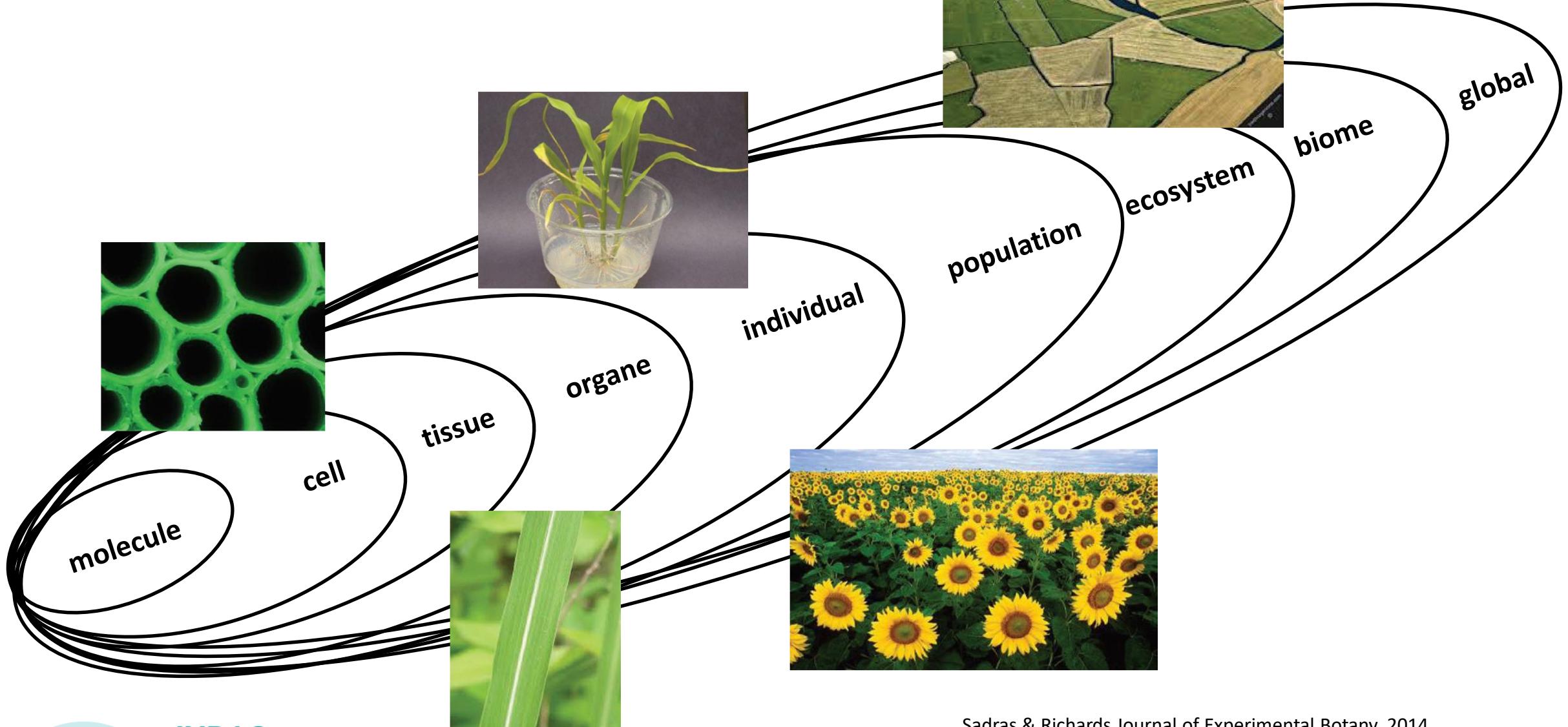
Physiologie végétale



Physiologie animale



Tiré thèse Aurélie Roux (Roux 2011)

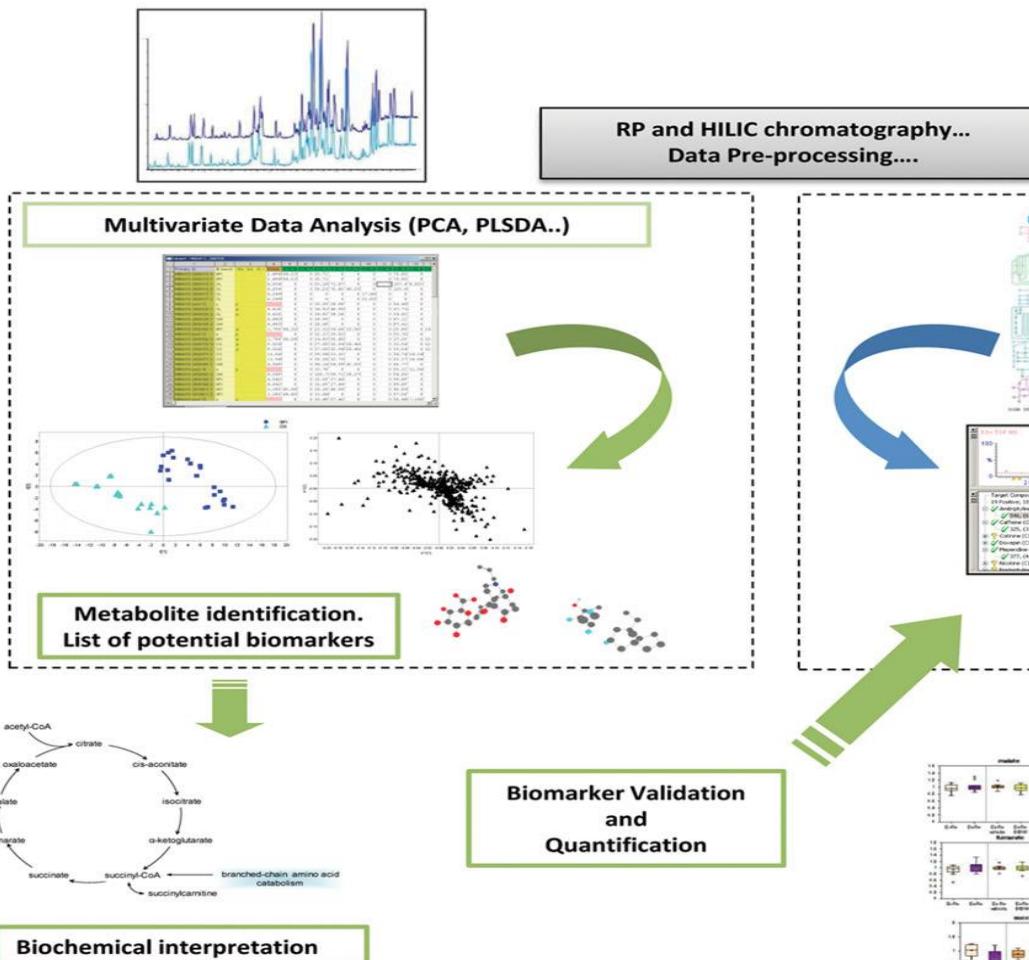


Sadras & Richards Journal of Experimental Botany, 2014

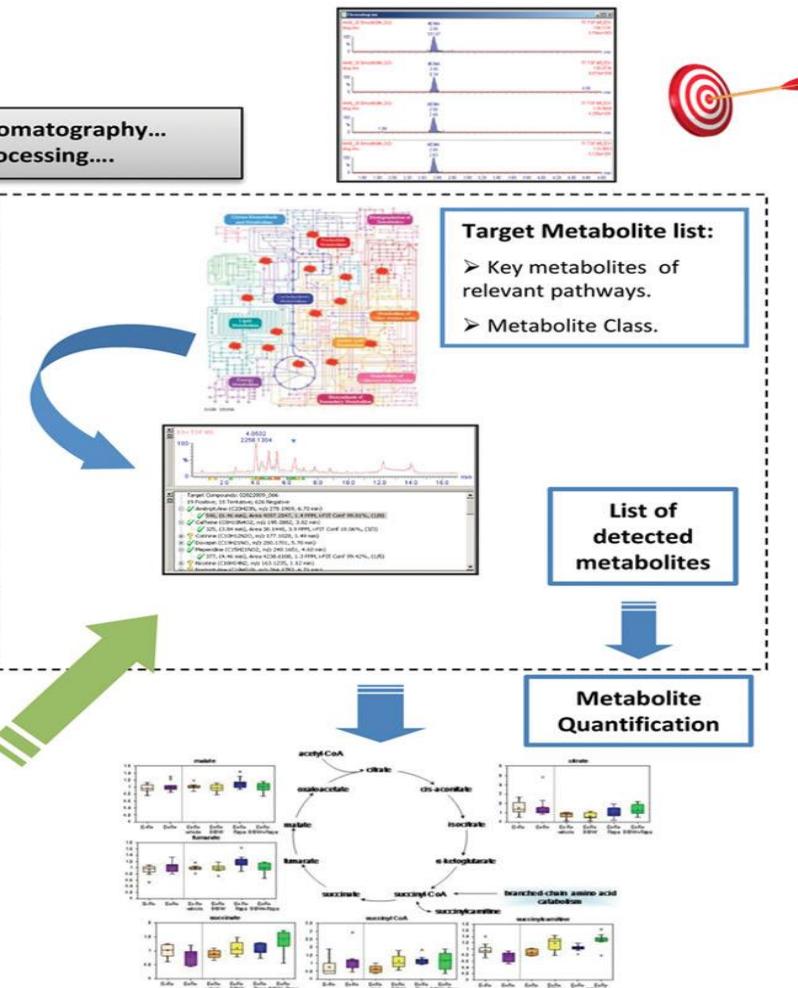
Les différents types d'études métabolomiques

Comprehensive Metabolomic Strategy

Untargeted Analysis



Targeted Analysis



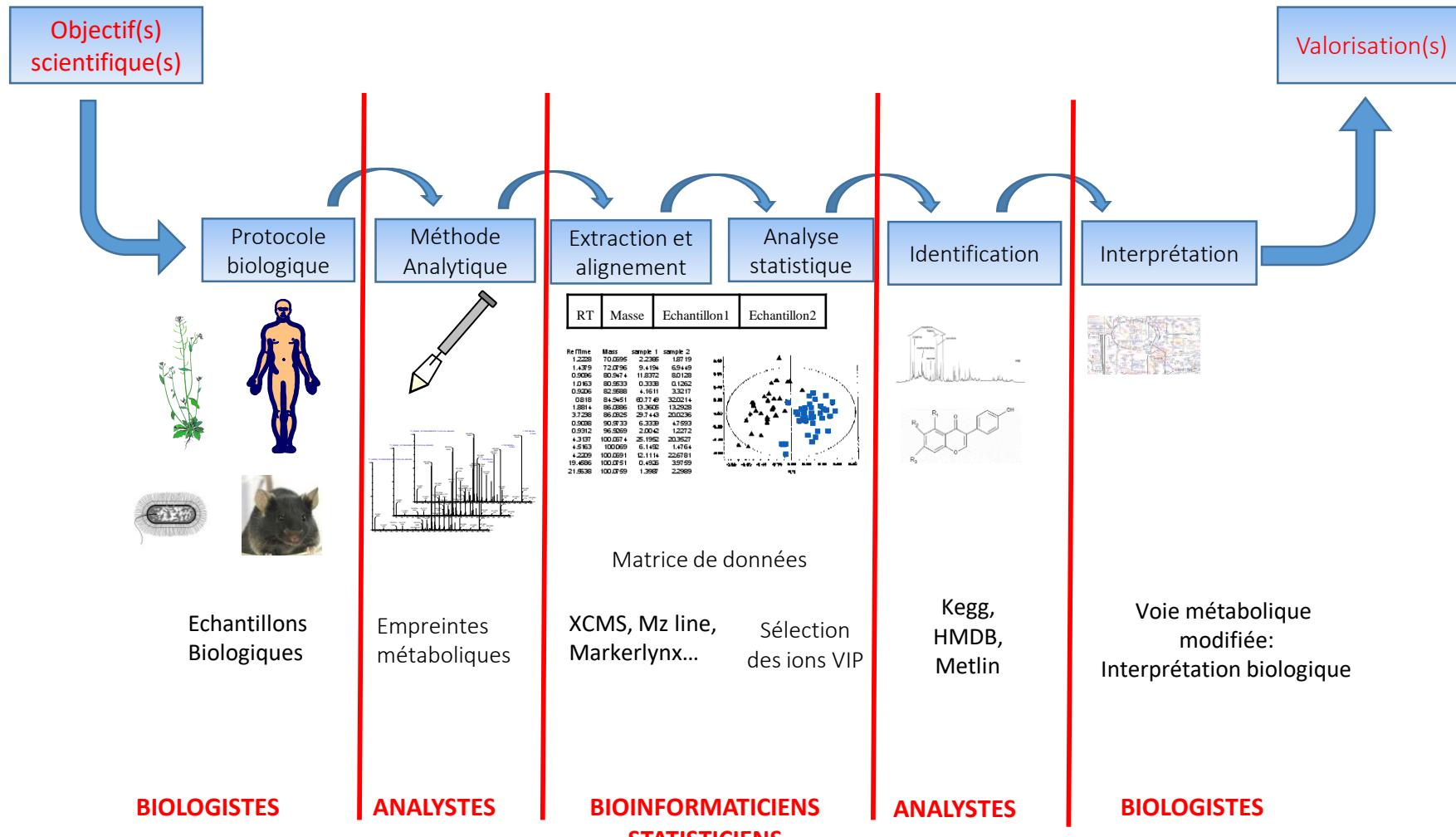
INRAe

Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production et analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

Zacharias et al., Electrophoresis (2013), 34, 2762–2775

Workflow d'une étude métabolomique



Etape 1: questions biologiques



Etape 2: design de l'étude

- Mis au point du modèle expérimental:
 - Modèle in vitro: culture cellulaire, microorganismes
 - Modèle animal
- Fluides biologiques: urine, plasma, sang, salive, LCR etc.
- biopsies
- Plantes

Etape 1: questions biologiques



Etape 2: design de l'étude

➤ Fluides et tissus biologiques humains: urine, plasma, LCR etc.

- Sexe
- Age
- Alimentation
- Prise médicamenteuse
- Exercice physique
- Heure du prélèvement

➤ Plantes

- Saison de prélèvement
- Lieu de prélèvement
- Conditions climatiques

Etape 3: recueil et stockage des échantillons

➤ Prélèvement d'échantillons biologiques:

- Doit être le plus court possible
- Dépend de la nature de l'échantillon
- Puis l'aliquotage des échantillons (si fluides biologiques) permet de limiter les cycles congélations/décongélations

➤ Stockage

- Congélateurs -80°C



INRAE

Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production at analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

Etape 1: question biologique



Etape 2 : design de l'étude



Etape 3 : préparation des échantillons

- Randomisation de la préparation et de l'analyse des échantillons
- Garder au maximum la chaîne de froid

Etape 3 : préparation des échantillons

La préparation des échantillons dépend:

- du type de matrice à analyser
 - Solide: cellules, tissus, microorganismes
 - liquide
- du type de composés à analyser
 - Polaire, apolaire...
- de la plateforme analytique
 - RMN
 - MS (dérivation chimique pour la GC/MS par exemple)
 - Les deux?



> Points clés

- Renseigner au maximum les métadonnées:
 - caractéristiques de l'échantillon,
 - conditions de prélèvement ou de récolte
 - Conditions de stockage et d'analyse
- Extraire de manière répétable les métabolites
- Pas de protocole universel d'extraction des métabolites
- Outils analytiques complémentaires



INRAE

Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production at analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

Les outils d'analyse: la spectrométrie de masse

> La spectrométrie de masse : bref historique

1910: **Joseph John Thompson** (Prix Nobel en 1906) conçoit la technique de spectrométrie de masse et mesure les abondances naturelles des isotopes stables du néon

1942: commercialisation du premier appareil

1959: **Roland Gohlke** réalise le premier couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse

1975: développement de la source à pression atmosphérique

1981: **Barber** met au point la source à bombardement d'atomes rapides (FAB)

1985: **Hillenkamp** découvre le MALDI (matrix-assisted-laser-desorption-ionization)

1984: **Fenn** (Prix Nobel 2002) découvre la méthode d'ionisation électrospray

1988: **Tanaka** (Prix Nobel 2002) invente le couplage ToF Maldi

Année 1990: **Makarov** invente l'analyseur Orbitrap



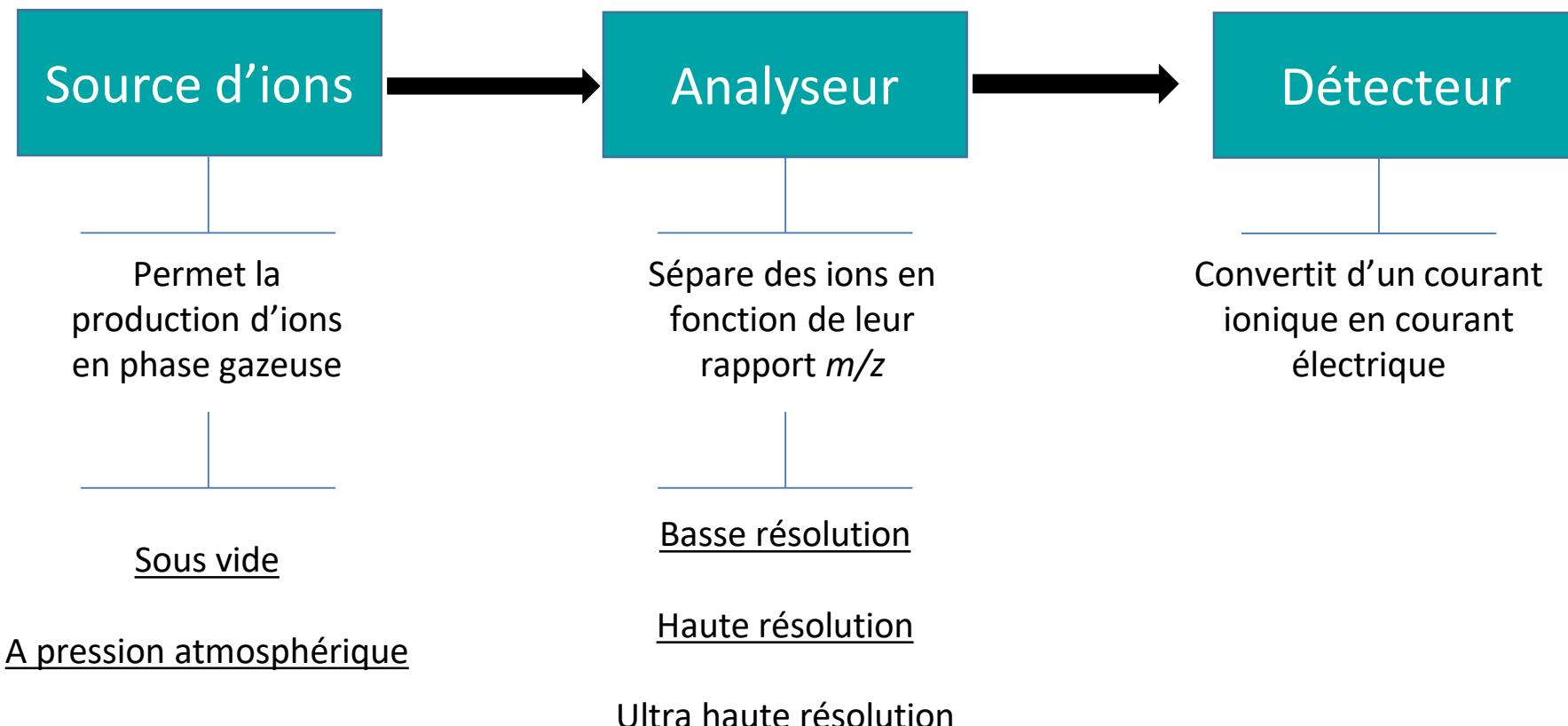
INRAE

Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production at analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

> La spectrométrie de masse

C'est une méthode de mesure des rapports masse sur charge de molécules ionisées



> La spectrométrie de masse : la source d'ions

Objectif: ioniser et vaporiser les molécules

Source d'ions

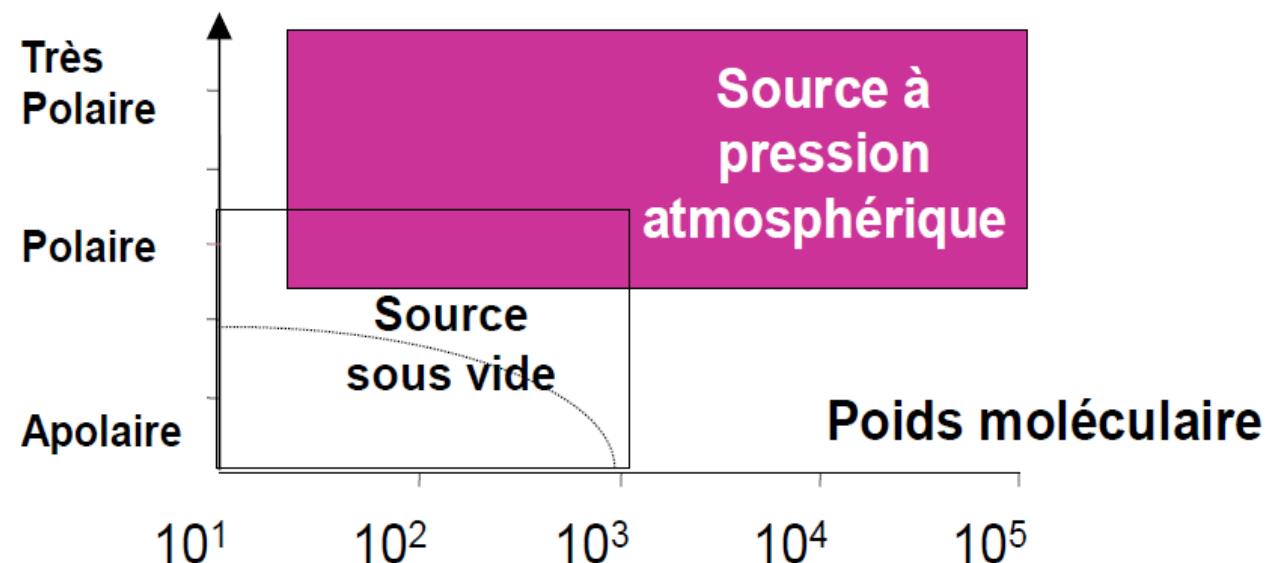
Permet la production d'ions en phase gazeuse

Sous vide

- Ionisation par impact électronique (EI): ionisation dure
- Ionisation chimique(CI): ionisation douce

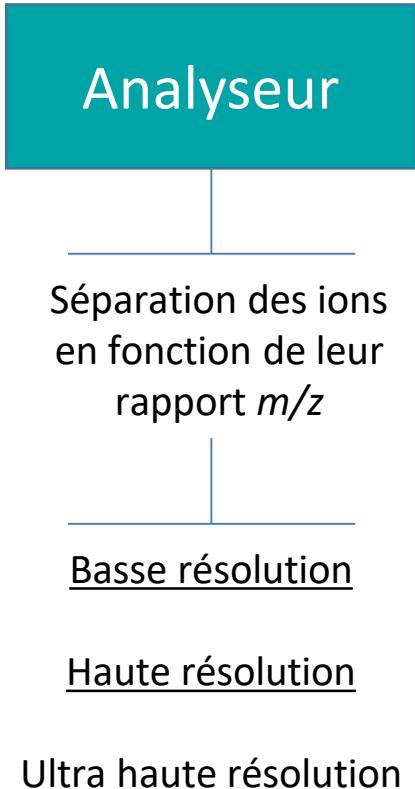
A pression atmosphérique

- L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI): composés apolaires
- Ionisation par électrospray (ESI): composés polaires



> La spectrométrie de masse : les analyseurs

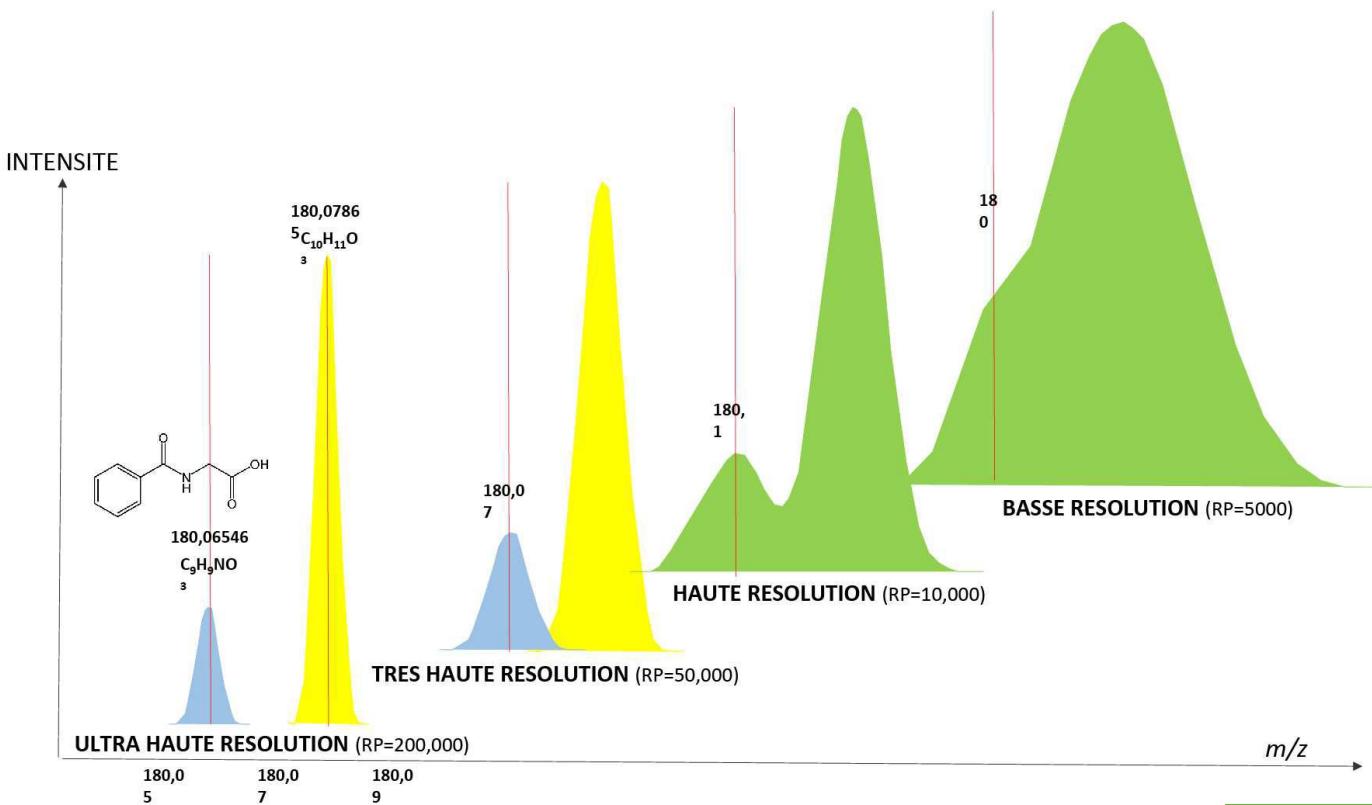
Objectif: séparer les ions selon leur rapport masse/charge



Principales caractéristiques d'un analyseur:

- La résolution R
- La gamme de masse (m/z) qu'il peut analyser
- La rapidité de balayage en m/z
- La sensibilité

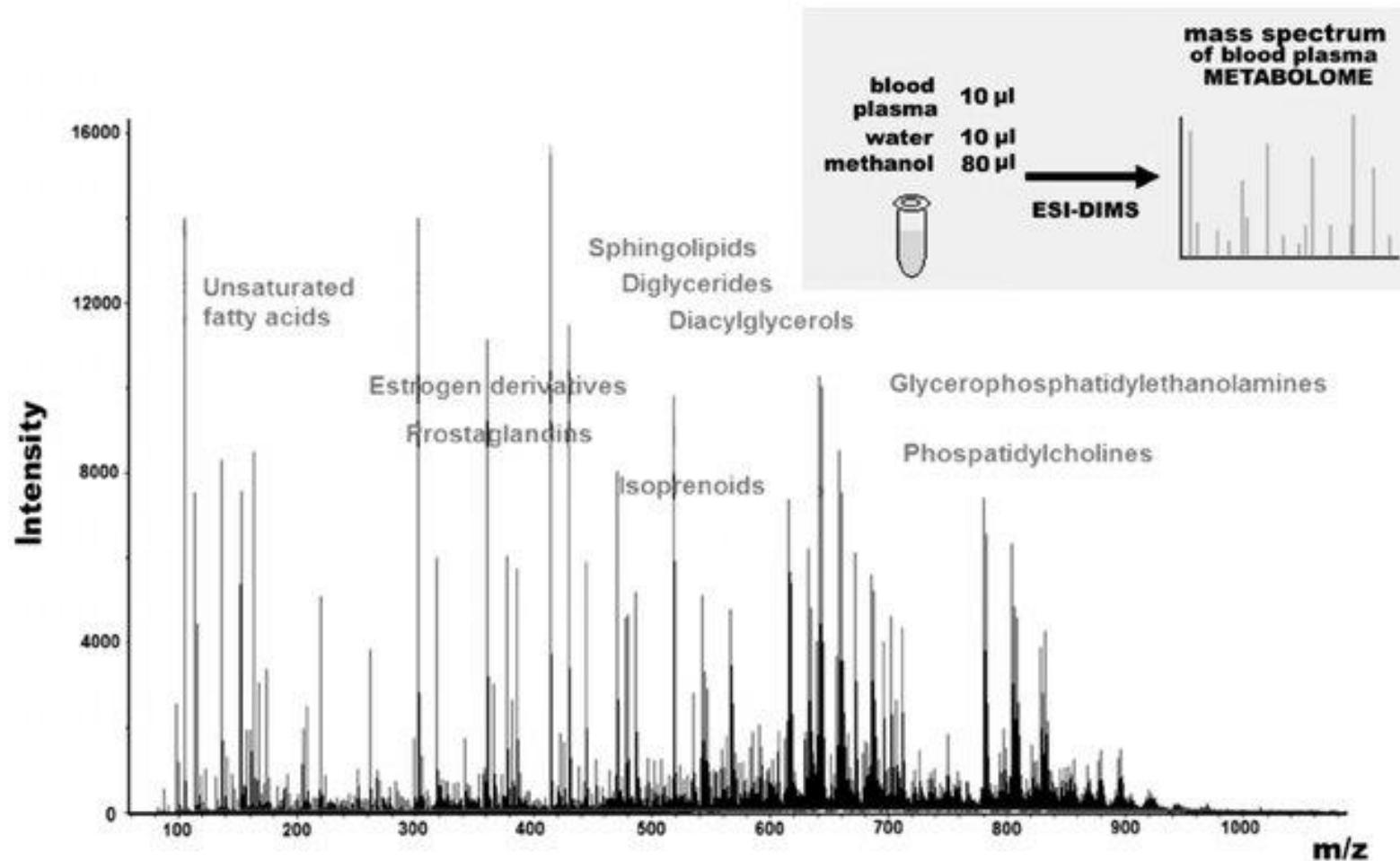
> Les analyseurs: résolution



Tiré du MOOC de métabolomique

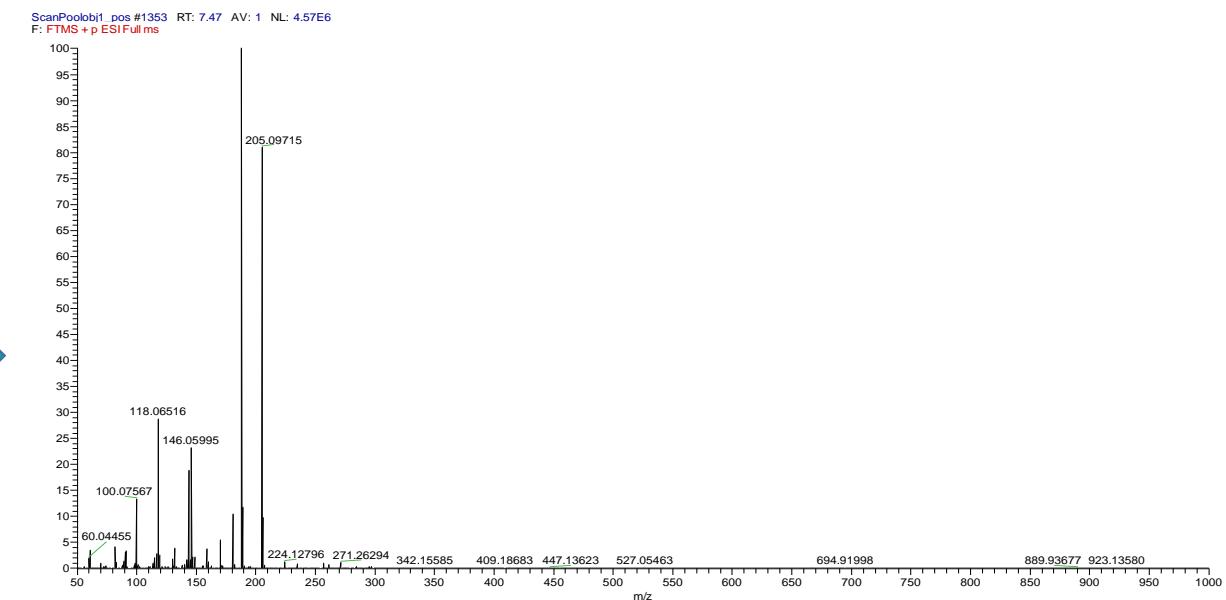
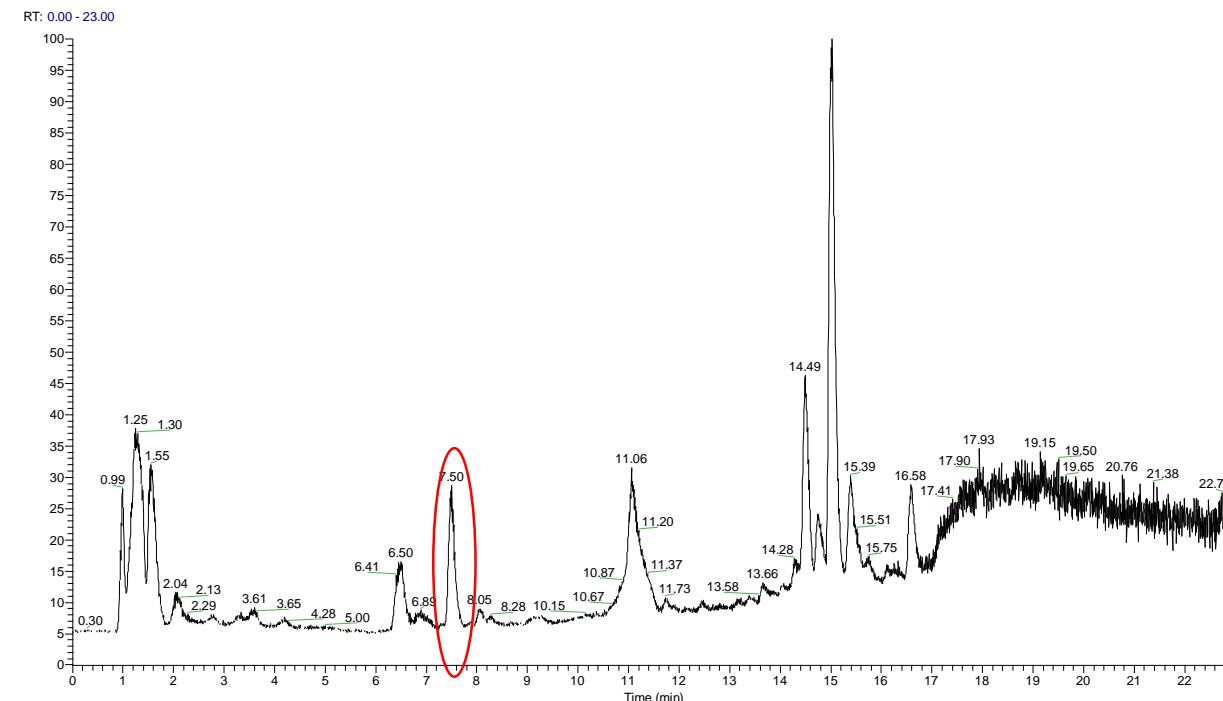
Analyseur	Résolution ($m/\Delta m$, FWHM)	Exactitude en masse (ppm)
Quadripôle	3 000	200
Piège à ions (2D/3D)	5 000	200
Temps de vol	8 000-80 000	1-10
Orbitrap®	Jusqu'à 280 000	<2
FT-ICR	Jusqu'à 10 000 000	<1

> Complexité d'un spectre de masse: sans séparation chromatographique

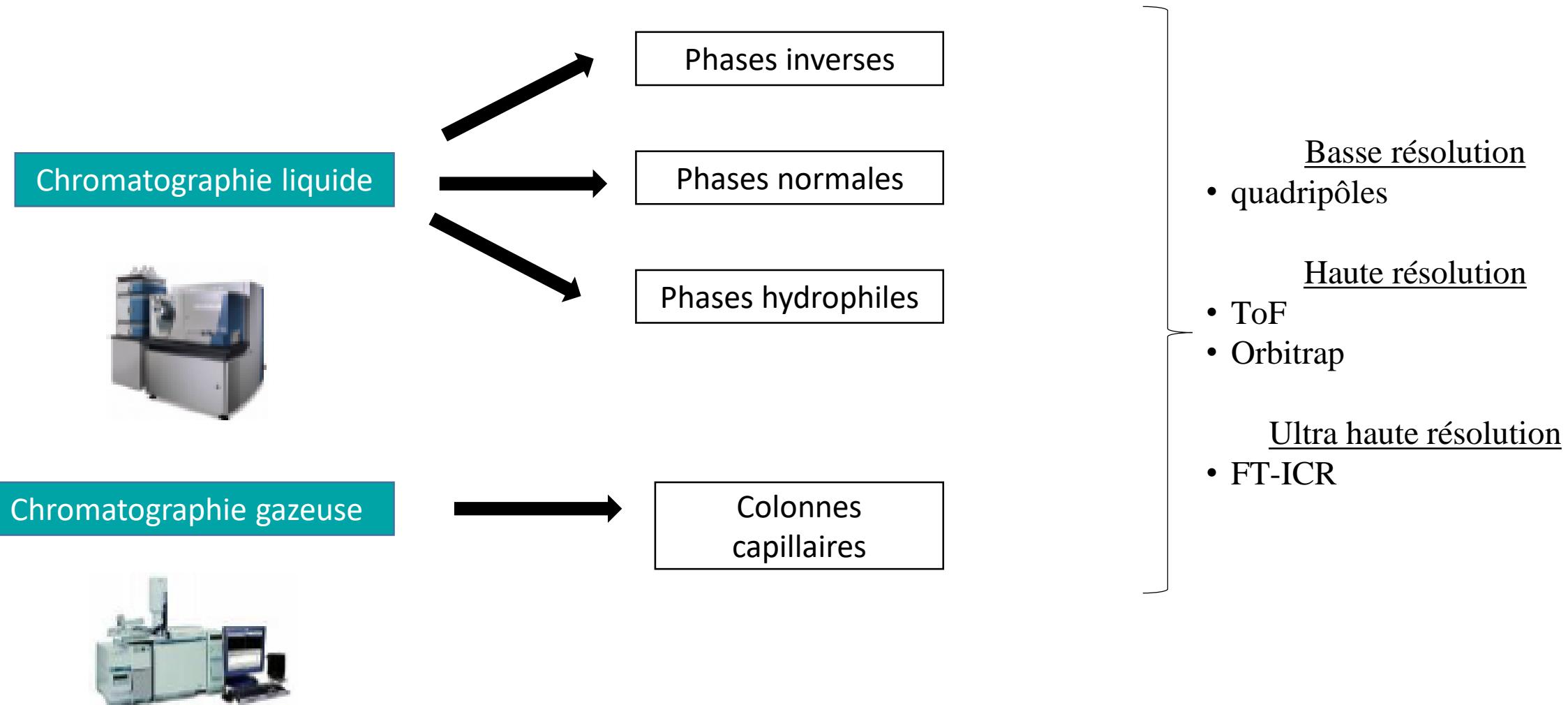


Lokhov et al., PLoS ONE (2014), 9 (9), e105343

> Complexité d'un spectre de masse: avec séparation chromatographique



➤ Les couplages chromatographiques



➤ Les couplages chromatographiques

Chromatographie liquide

➤ Avantages de la LC-MS

- Analyse de composés polaires, thermolabiles et ioniques
- Accès à l'ion moléculaire
- Préparation de l'échantillon réduite (dans certains cas)

➤ Inconvénients de la LC-MS

- Ionisation douce
- Spectres de fragmentation peu reproductibles

Chromatographie gazeuse

➤ Avantages de la GC-MS

- Analyse de composés apolaires et volatiles
- Spectres de fragmentation reproductibles

➤ Inconvénients de la GC-MS

- Préparation de l'échantillon plus longue
- Fragmentation intensive (EI), pas d'accès à l'ion moléculaire

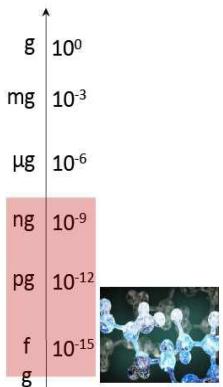
➤ Inconvénients communs

- Encrassement des sources
- Vieillissement des colonnes chromatographiques
- Phénomène de suppression d'ions



> Avantages de la spectrométrie de masse

Analyse possible d'ultra-traces



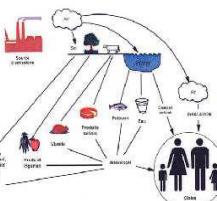
SENSIBILITÉ

Identification non ambiguë des analytes



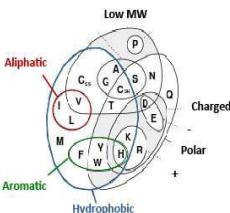
SÉLECTIVE

Applicable à des matrices biologiques très diverses



VERSATILITÉ

Pris en charge d'analytes aux propriétés physico-chimiques très variées



UNIVERSALITÉ

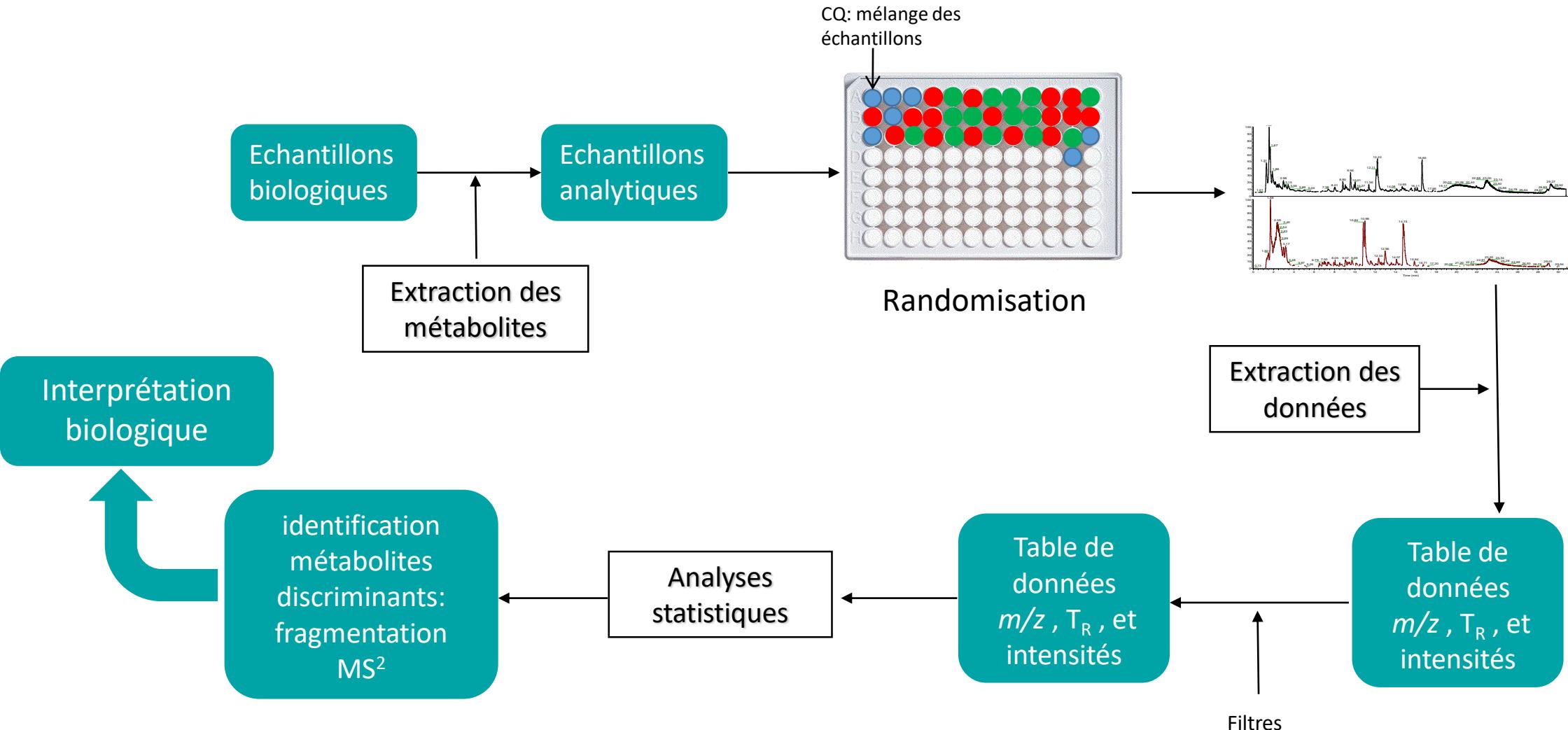
Délivre des informations quantitatives très fiables



**PRÉCISION
JUSTESSE**

Image tiré du MOOC de métabolomique

Workflow en spectrométrie de masse (SM)



➤ Randomisation des échantillons biologiques en SM



La randomisation: analyser de manière aléatoire les échantillons

- Objectif: éviter tout effet confondant lié à l'ordre de préparation ou d'injection des échantillons

> Extraction des données en SM

Etape 4 : analyse des échantillons

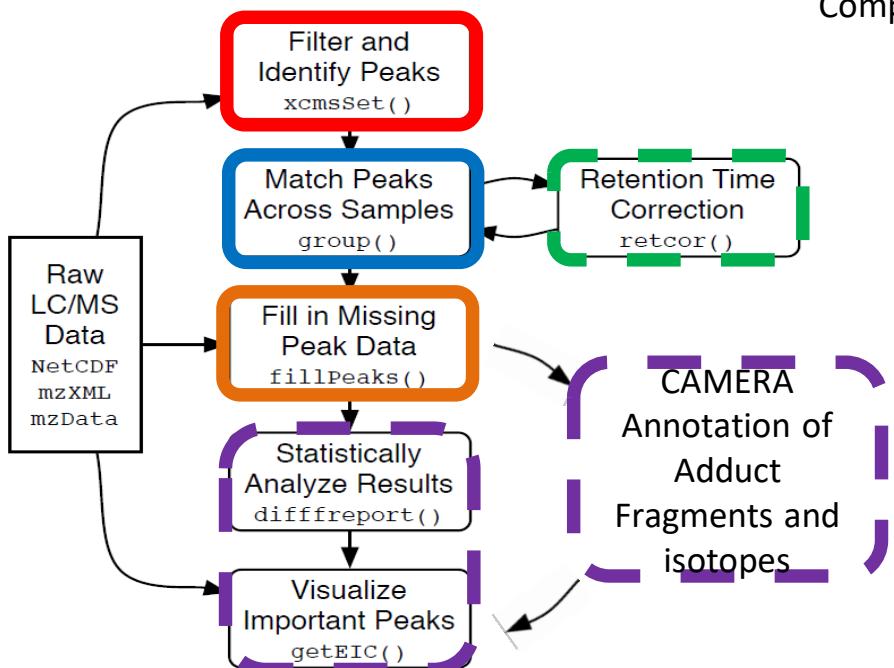
Logiciels gratuits:

MZmine
OpenMS
MetAlign
MSFACTS
MSClust

Etape 5 : Extraction des données



Galaxy



Logiciels commerciaux:

Progenesis®
MS-Processor®
Markerlynx®
MassHunter®
MassProfiler®
Compound Discoverer®

Echantillon	Variable	RT ₁ -MS ₁	RT ₂ -MS ₂	...	RT _x -MS _x
Patient 1		Int ₁₁	Int ₁₂		Int _{1x}
Patient Y		Int _{y1}	Int _{y2}		Int _{yx}

> Correction de la dérive du signal analytique en SM

Etape 5 : Extraction des données



Etape 6 : Correction dérive du signal

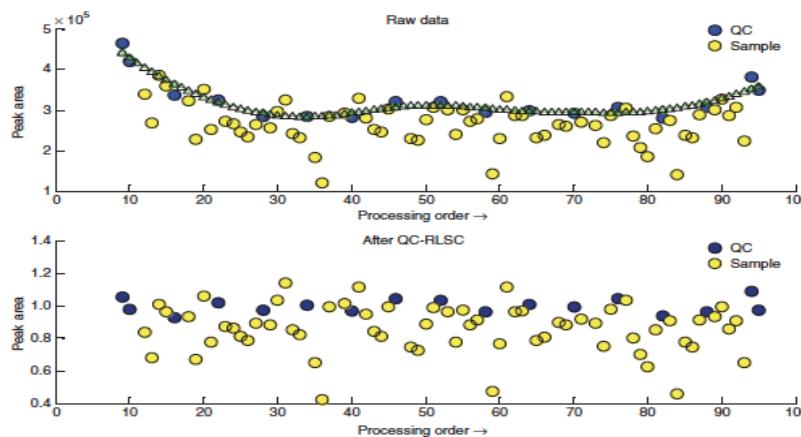


Figure 2 | The QC-RLSC protocol for a metabolic feature detected in UPLC-MS (ES+) with signal attenuation across a given analytical batch. A cross-validated LOESS curve (upper plot) is fitted to the QC samples, the correction curve interpolated (triangles), to which the total data set for that peak is corrected (lower plot).

Dunn et al., (2011). *nature protocols.* 6, 1061-1083

Filtres

- CV échantillons > CV CQ
- CV CQ <30 %
- Ratio signal Echantillon/Blanc >3

Table de données

TP conversion de fichiers

Les outils d'analyse: la résonance magnétique nucléaire

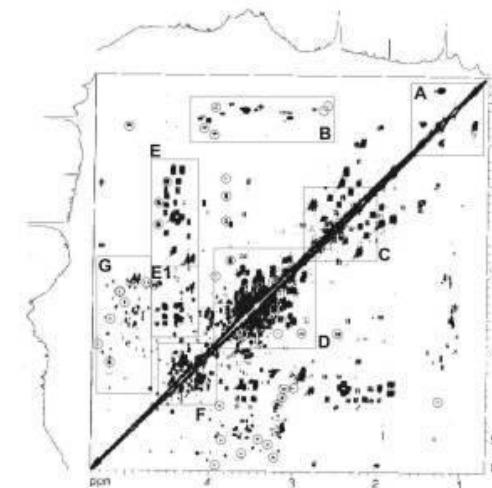
> La résonance magnétique nucléaire (RMN): bref historique

1938: I. Rabi (Prix Nobel de physique 1944) met en évidence la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

1946: F. Bloch et E. M. Purcell (Prix Nobel de physique 1952) développent la technique de mesure par RMN

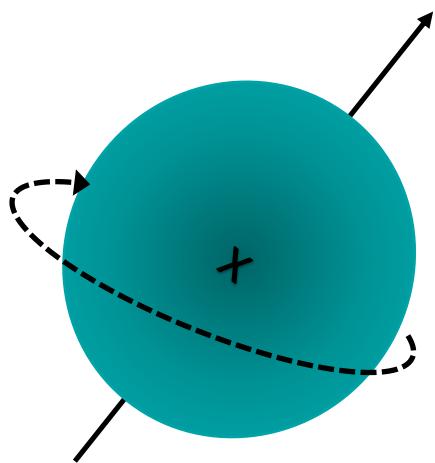
1961: Shoolery met en vente le premier spectromètre commercial (60MHz) chez VARIAN (USA)

1964-1976: R. R. Ernst (Prix Nobel Chimie 1991) invente la RMN à transformée de Fourier et multidimensionnelle



1977: P. Lauterbur et P. Mansfield (Prix Nobel Médecine 2003) réalisent la première image obtenue par IRM

> Concepts Physiques: spin



- Le spin est une des propriétés des particules, au même titre que la charge et la masse
- Le spin caractérise le magnétisme du noyau
- Le spin total dépend du nombre de particules dans le noyau (protons et neutrons)

 de l'isotope

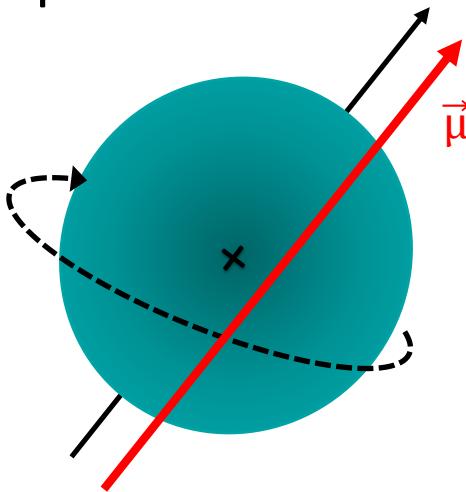
Concepts Physiques: spin

s	Masse atomique	Numéro atomique	
Demi-entier	impaire	Pair/impair	^1H , ^{13}C
Entier	paire	impair	^2D , ^{14}N
Nul	paire	pair	^{12}C , ^{16}O

Noyau	Spin
^1H	$1/2$
^2H	1
^{14}N	1
^{15}N	$-1/2$
^{13}C	$1/2$
^{17}O	$-5/2$

> Concepts Physiques: moment magnétique

Au moment cinétique de spin \vec{S} est associé un moment magnétique dipolaire $\vec{\mu}$

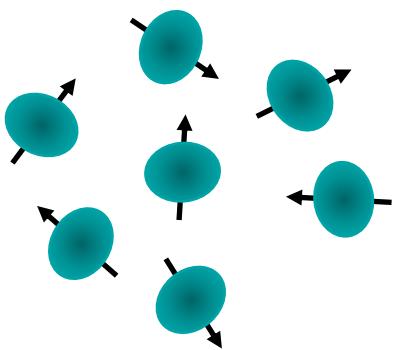


$$\vec{\mu} = \gamma \vec{S}$$

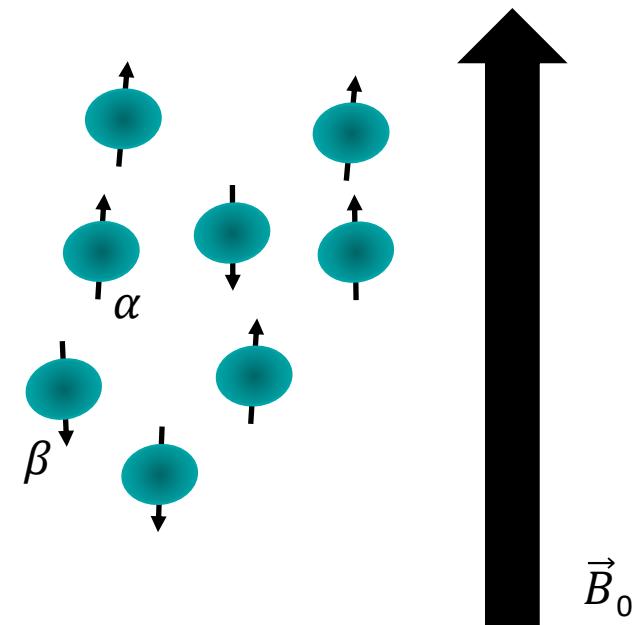
Le rapport gyromagnétique (γ) est une caractéristique de chaque noyau atomique

➤ Concepts Physiques: moment magnétique vs champ magnétique

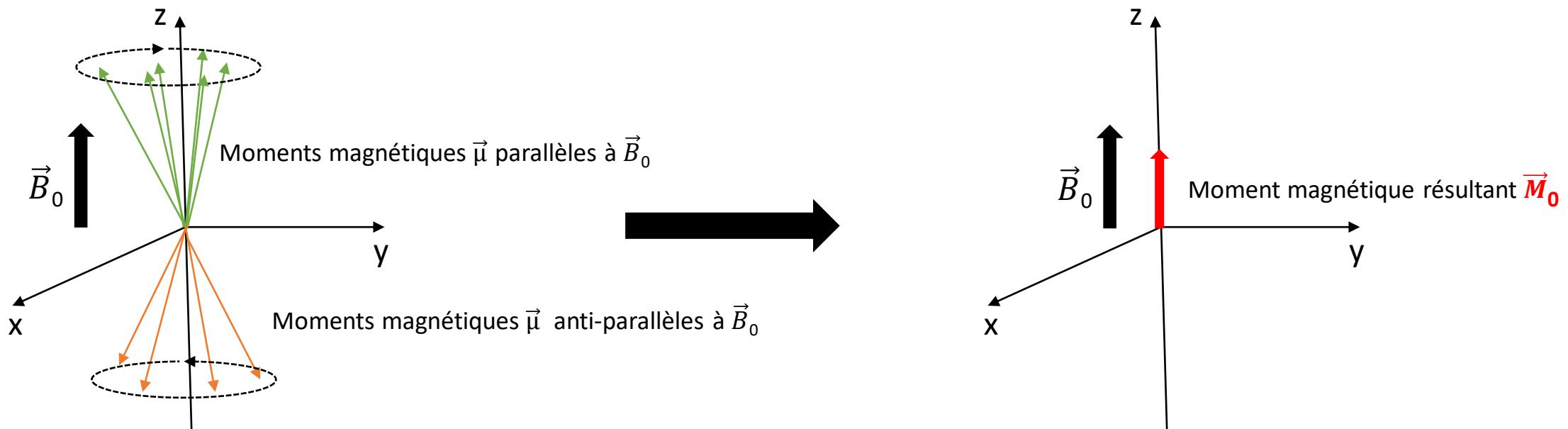
Absence champ magnétique



présence champ magnétique

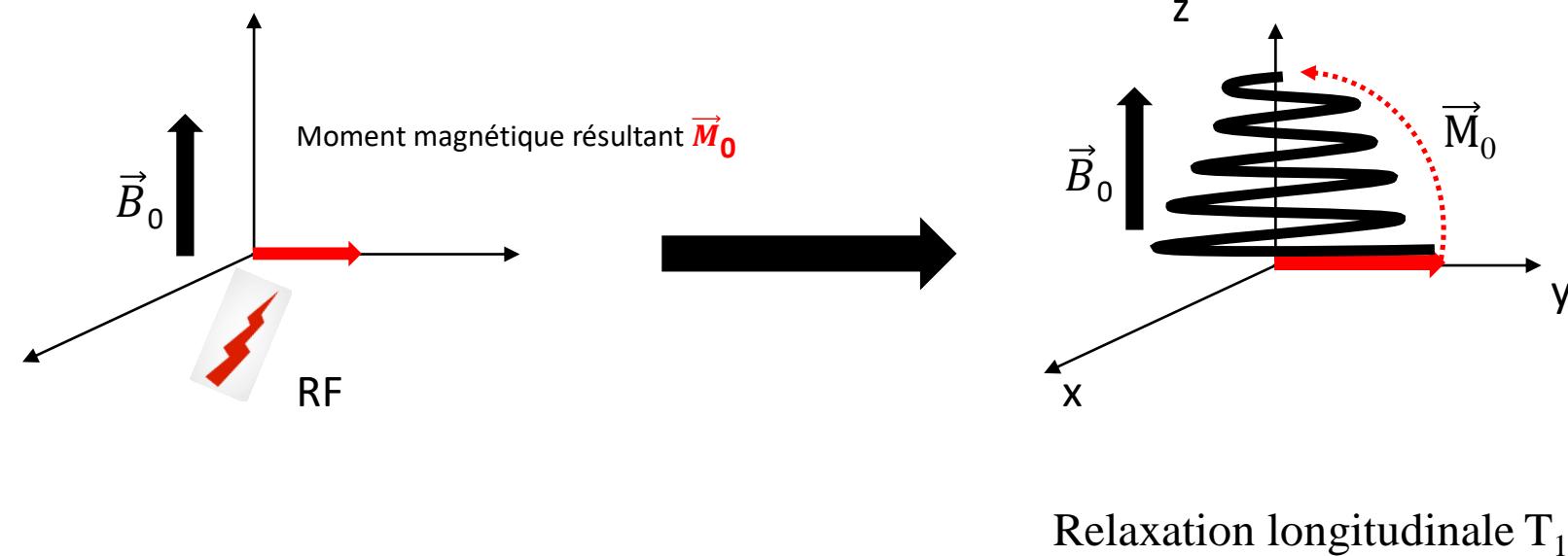


Concepts Physiques: magnétisation

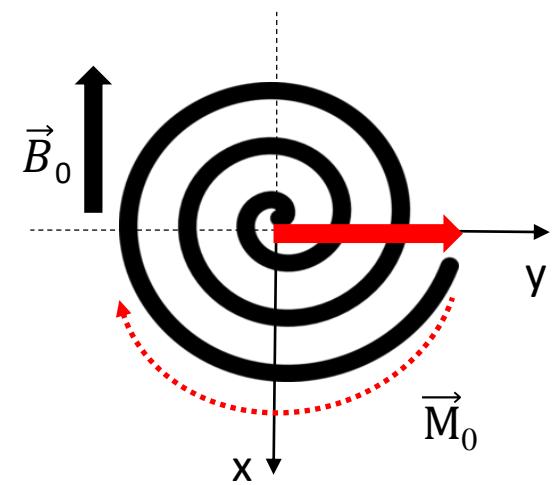


$$\vec{M} = \sum_N \vec{\mu} = \vec{M}_0$$

Principe d'une expérience de RMN standard

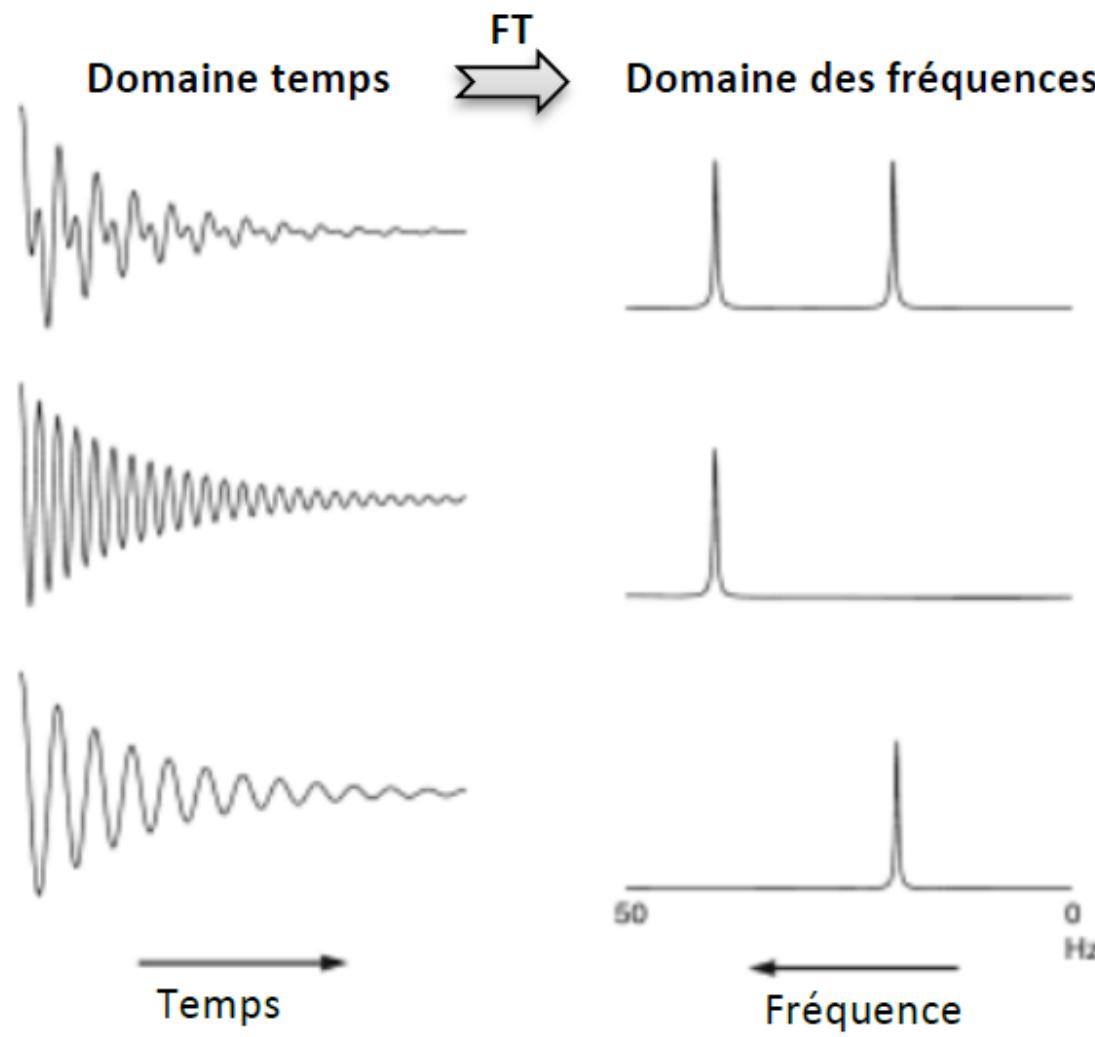


Relaxation longitudinale T_1

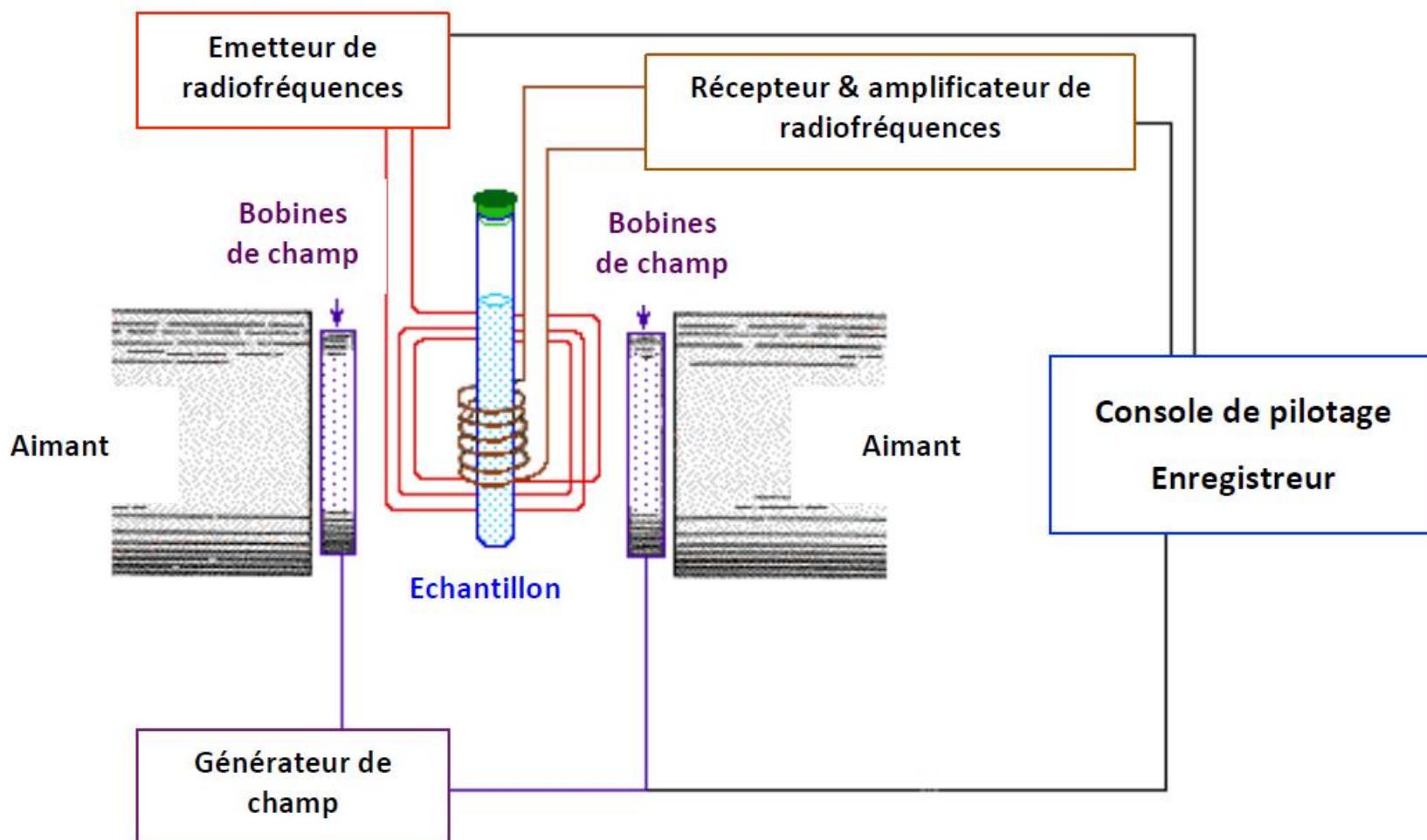


Relaxation transversale T_2

> Le signal RMN

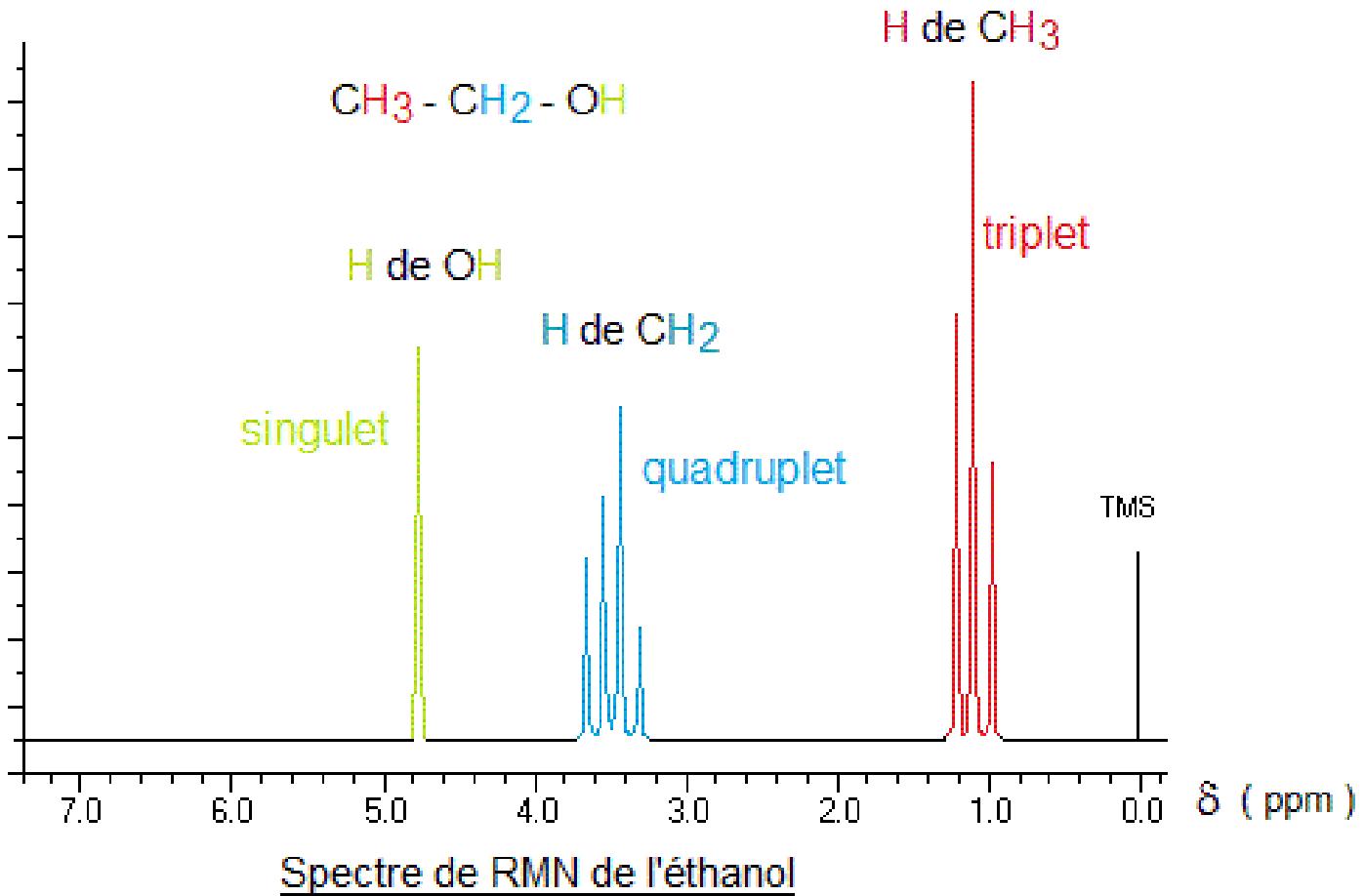


Représentation schématique de l'appareillage RMN



> Structure d'un spectre 1D ^1H

Ethanol: $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$



> Les informations contenues dans un spectre RMN

Nature du noyau

- Fréquence de résonance
- Déplacement chimique

Nombre de noyaux résonant à la même fréquence

- Concentration de la molécule

Nombre de noyaux des groupements voisins

- Multiplicité des signaux

> La RMN: les spectromètres

Les plus utilisés sont les spectromètres à haut champ

Caractéristiques d'un spectromètre:

- La sensibilité et la résolution augmentent avec le champ magnétique
- Grand nombre de noyaux observables
- Expériences en 2D

Ils permettent d'analyser:

- Des biofluides
- Des extraits solubilisés
- Tissues ou des biopsies



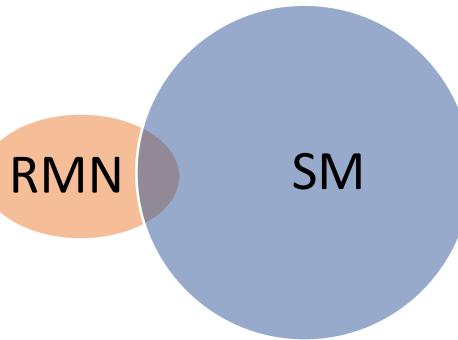
INRAE

Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production at analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

> Les techniques analytiques

RMN



SM

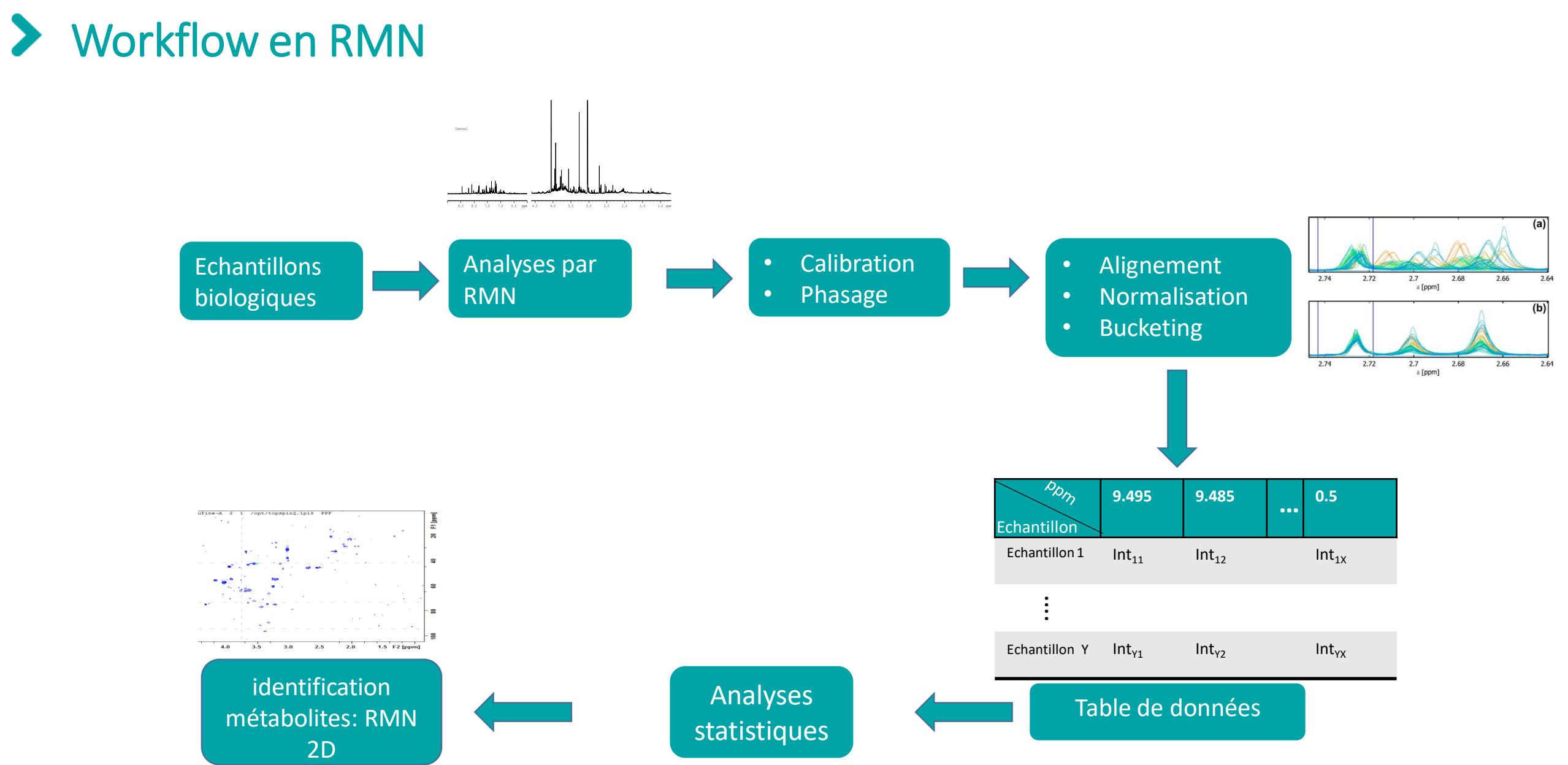


- Robuste
- Pas de préparation de l'échantillon
- Quantitative

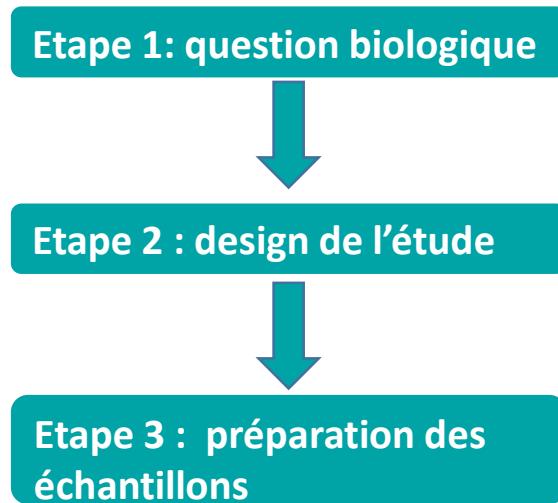
Sensibilité faible

- Moins robuste
- préparation de l'échantillon ++
- Semi-quantitative

Sensibilité élevée



➤ Préparation d'échantillons biologiques en RMN



- Ajout de solvant deutéré à l'échantillon solide (tissus, cellules) ou liquide (urines)
- Utilisation de solutions tampons
- Ajout d'un standard externe (TSP, DSS...)

Extraction des données en RMN

Solutions gratuites:
NMRProcFlow
W4M

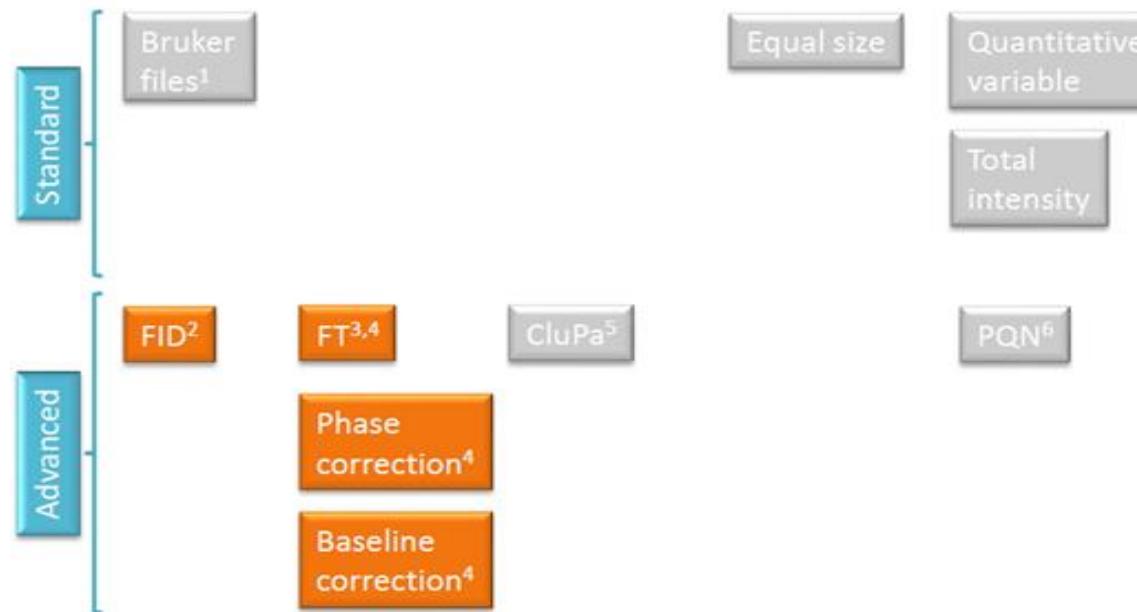
Etape 4 : analyse des échantillons

Solutions commerciales:
AMIX®
Icoshift® sous Matlab
MestRenova®

Etape 5 : Extraction des données



1. Read
2. TopSpin
3. Alignment
4. Bucketing
5. Normalize



> Etude de LCR de patients d'Alzheimer par ¹H-RMN

Analyse par ¹H-RMN de 77 liquides céphalo-rachidiens (LCR) de différents patients (collaboration du Dr Pariente Jérémie et Christian Vincent; et hôpitaux de Toulouse)

Contrôle (Ctr) (23 patients)	Démence (DE) non MA (27 patients)	MA (27 patients)
RAS	Démence sémantique	Maladie d'Alzheimer (MA)
Maladie psychiatrique	Démence fronto temporelle	MA + angiopathie amyloïde
Neuropathie périphérique	CADASIL	MA + démence OH
Alcoolisme	Dégénérescence cortico-basale	MA + HPN
Comitialité (épilepsie)	Vascular cognitive impairment	
Maladie psychiatrique	Paralysie supranucléaire progressive	
AVC thalamique antérieur	Maladie de Creutzfeldt-Jakob	
Psychose chronique	Dégénérescence lobaire fronto-temporale	
Hydrocéphalie à pression normale	Sclérose latérale amyotrophique (=maladie de Charcot)	
	Maladie neuro-dégénérative non étiquetée	
	Démence alcoolique + épilepsie	
	Démence vasculaire	

Cruz, T. et al.(2014). *Metabolites*. **4**, 115-128.



INRAE

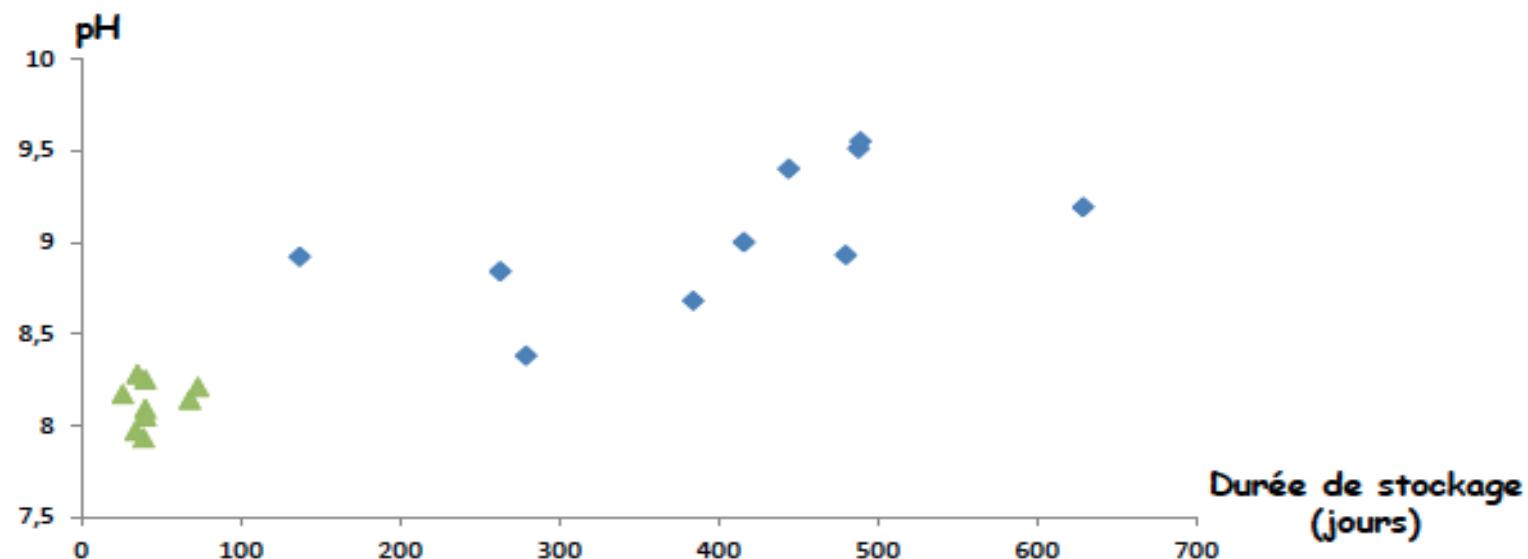
Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production at analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

> Etude de LCR de patients d'Alzheimer par ^1H -RMN

Le pH du LCR évolue naturellement dès son prélèvement

- Au moment du prélèvement il est entre 7.4 et 7.6
- Après 2h à 4°C il peut atteindre 9.6



Des variations de pH entraînent des déplacements chimiques de certaines molécules

> Etude de LCR de patients d'Alzheimer par ^1H -RMN

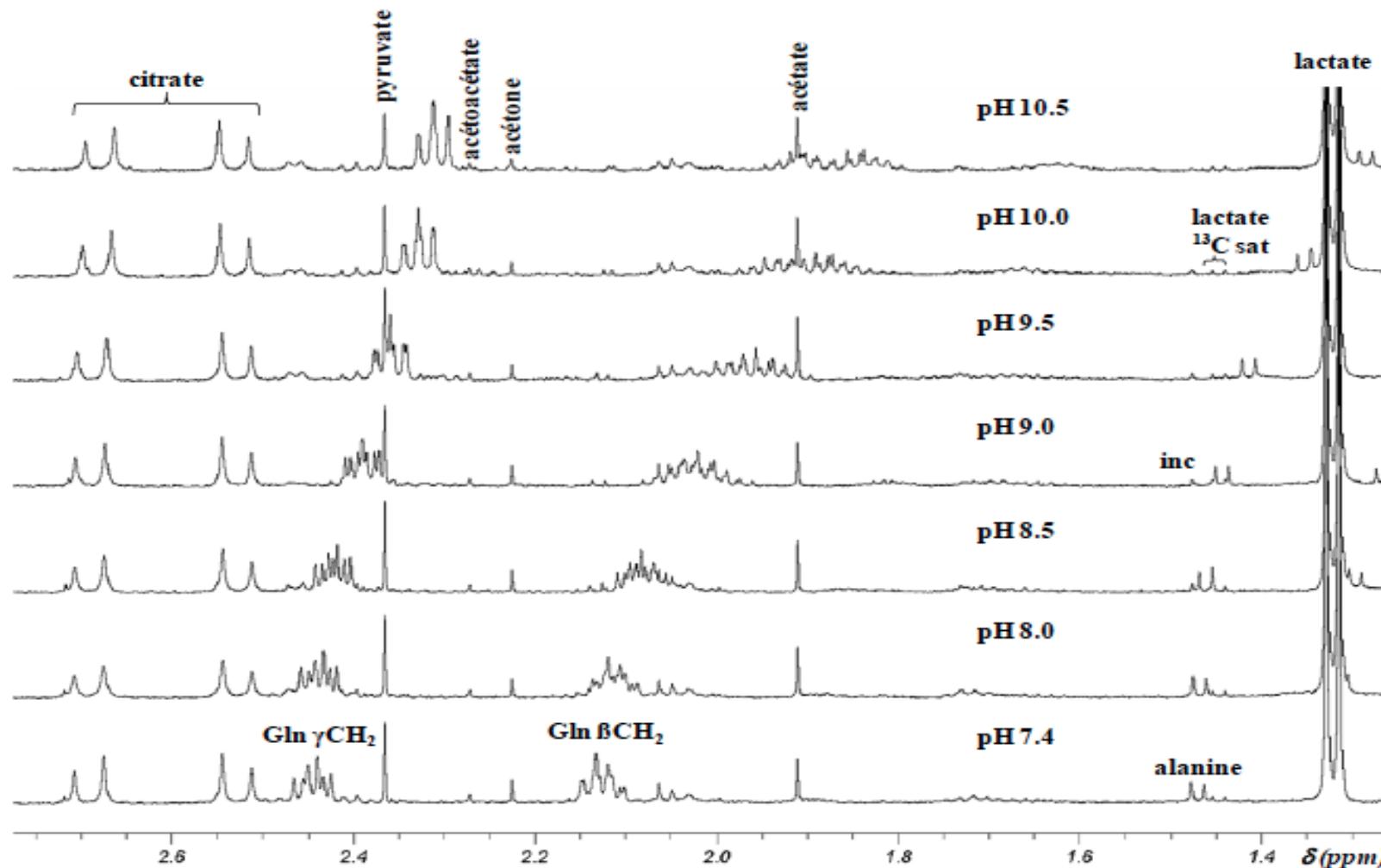


Figure 4. Representative ^1H NMR spectra (1.25–2.8 ppm region) of a CSF sample containing 33% D_2O whose pH was adjusted at different pH between 7.4 and 10.5. Gln: glutamine; sat: satellite; unk: unknown.

> Etude de LCR de patients d'Alzheimer par ^1H -RMN

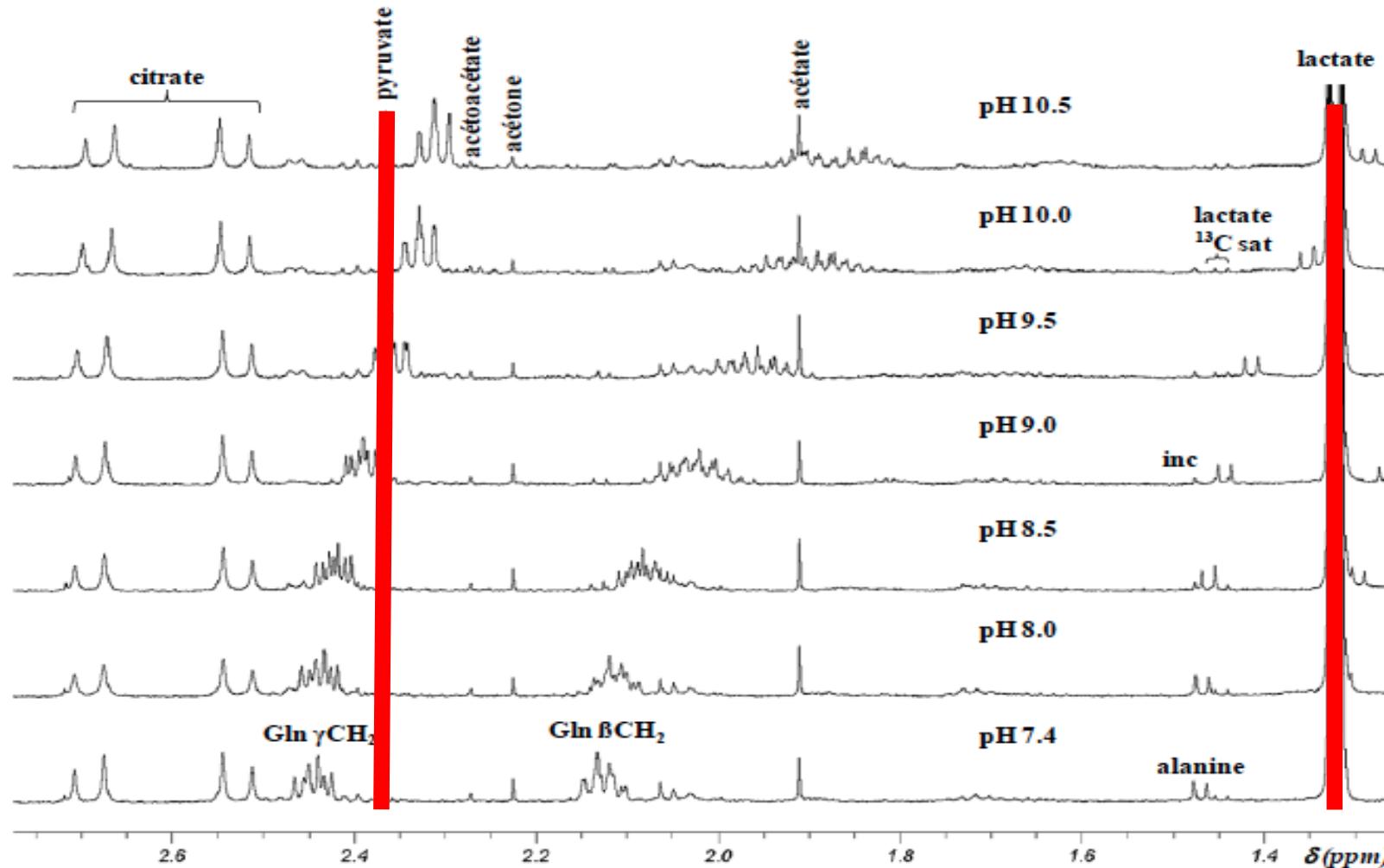


Figure 4. Representative ^1H NMR spectra (1.25–2.8 ppm region) of a CSF sample containing 33% D_2O whose pH was adjusted at different pH between 7.4 and 10.5. Gln: glutamine; sat: satellite; unk: unknown.

> Etude de LCR de patients d'Alzheimer par ^1H -RMN

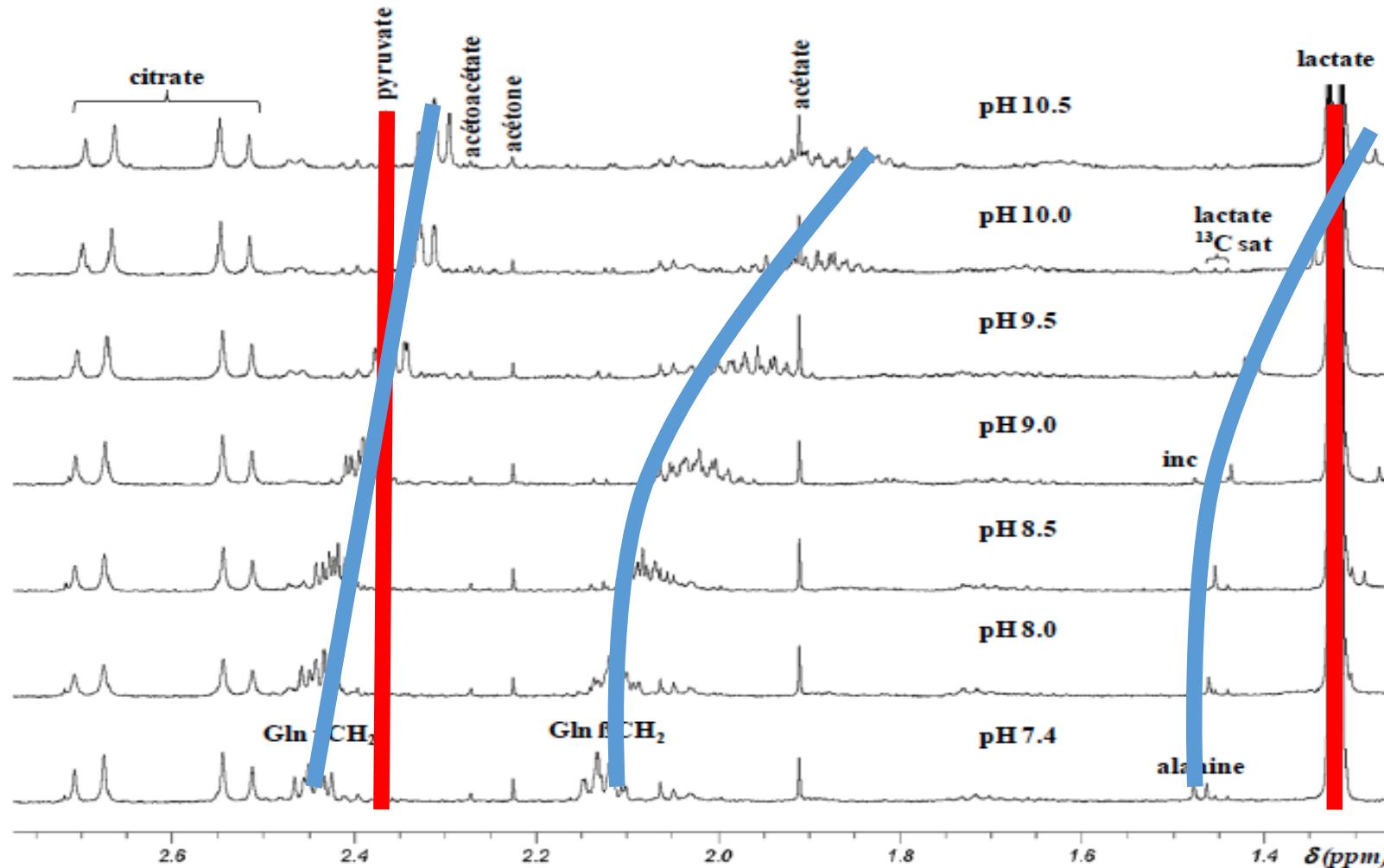
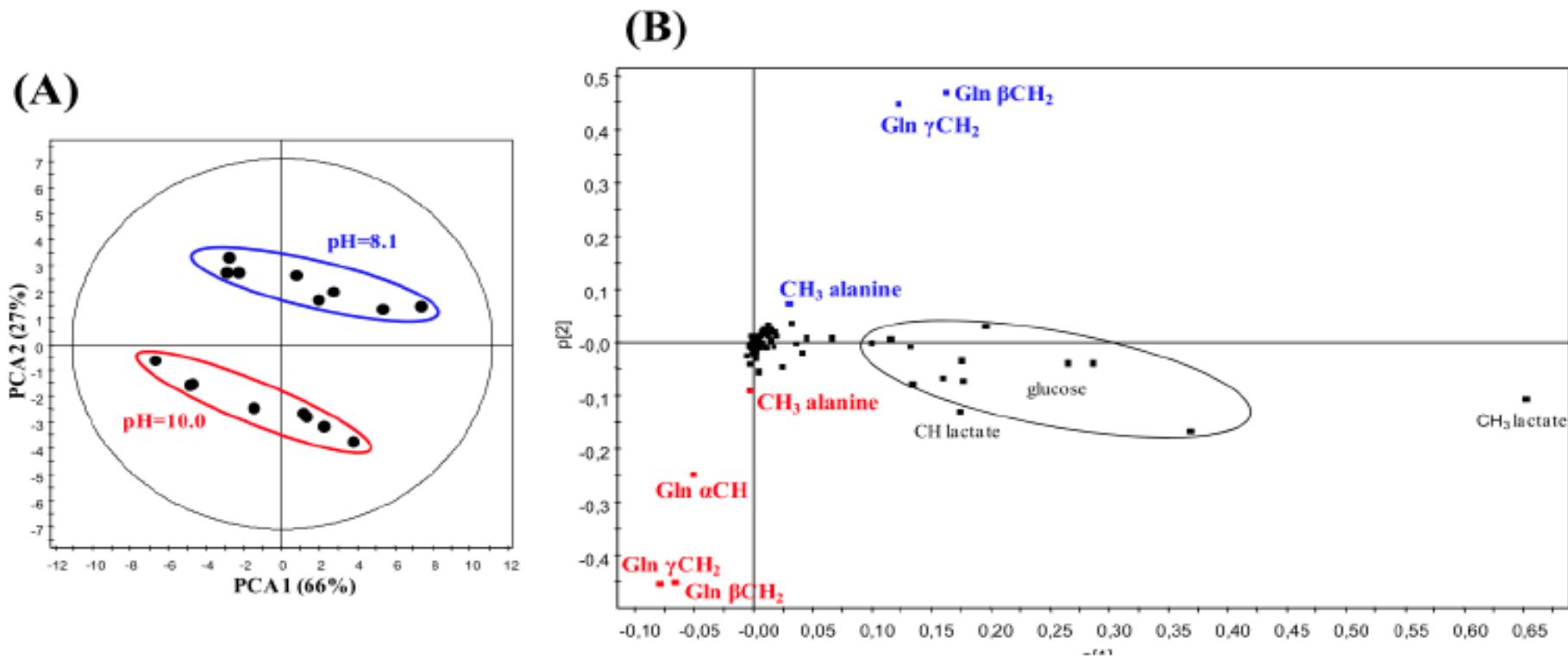


Figure 4. Representative ^1H NMR spectra (1.25–2.8 ppm region) of a CSF sample containing 33% D_2O whose pH was adjusted at different pH between 7.4 and 10.5. Gln: glutamine; sat: satellite; unk: unknown.

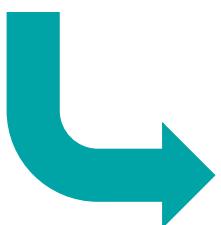
> Etude de LCR de patients d'Alzheimer par ^1H -RMN



Cruz, T. et al.(2014). *Metabolites*. **4**, 115-128.

➤ Etude de LCR de patients d'Alzheimer par ^1H -RMN

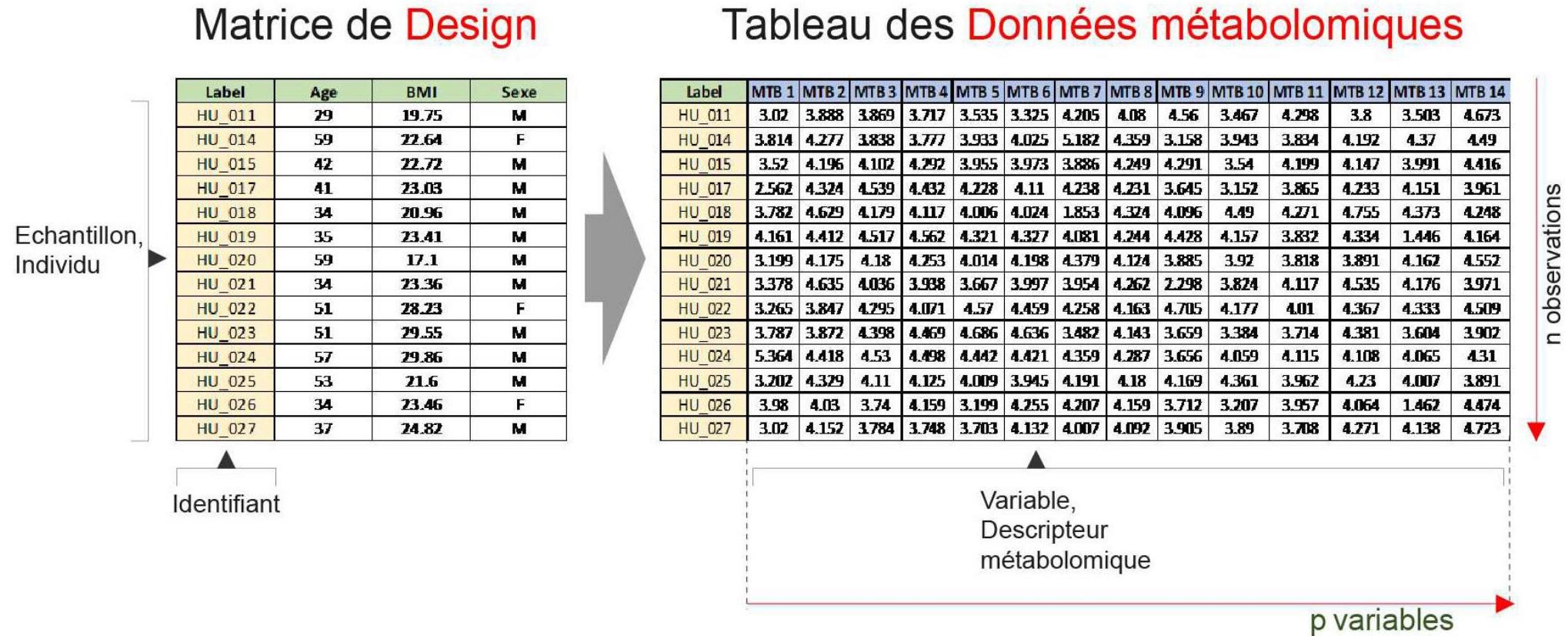
- Le contrôle du pH est primordial dans le LCR
- Mauvaises interprétations des résultats biologiques



Importance d'éviter tout biais analytique

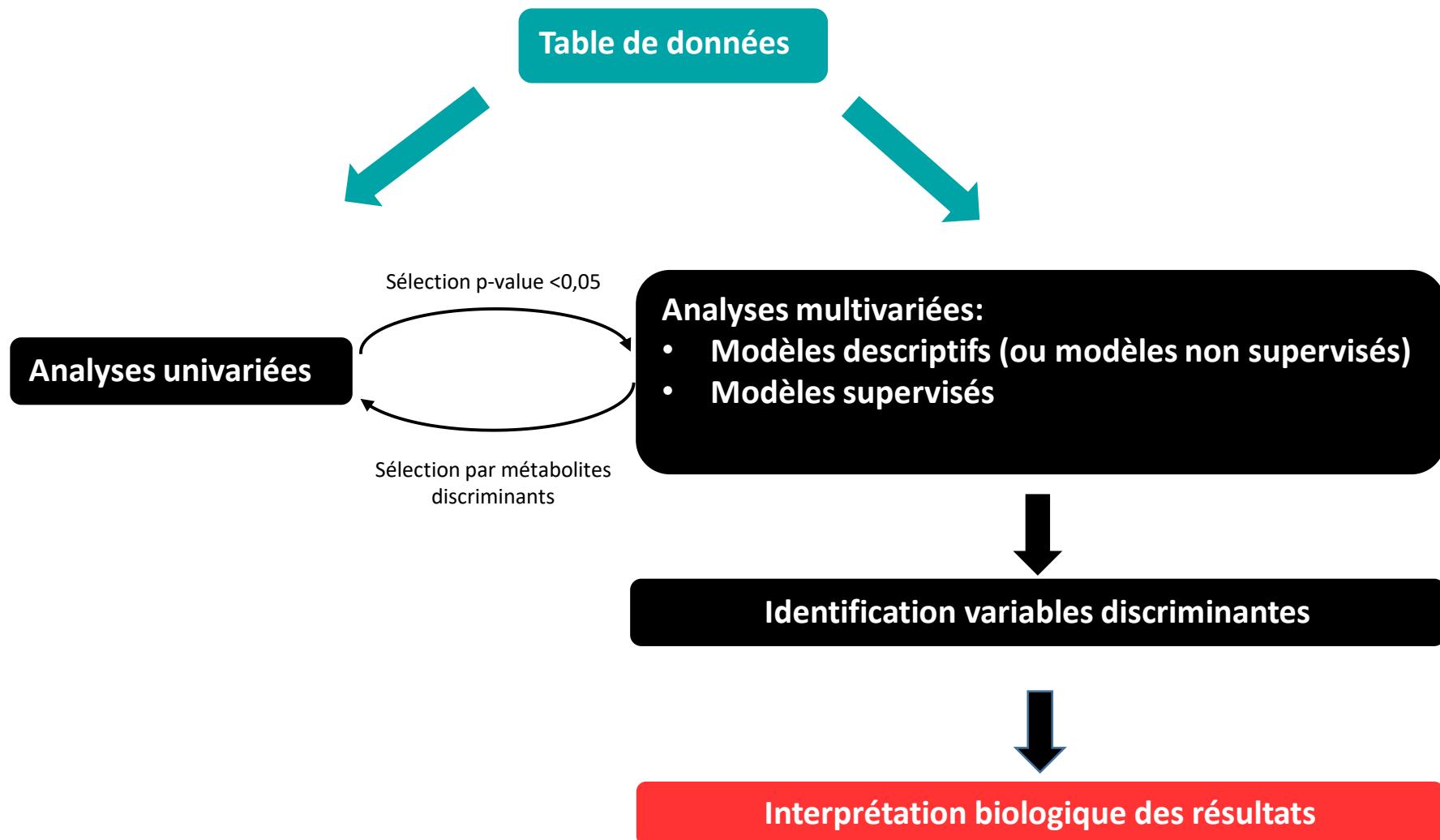
Les analyses statistiques

Tableaux d'informations



Données Sacurine

> Analyses statistiques



> Analyses statistiques

➤ **Statistiques descriptives:** décrire, résumer, synthétiser l'information contenue dans les données

- Univariées
- Multivariées (modèles non supervisés)

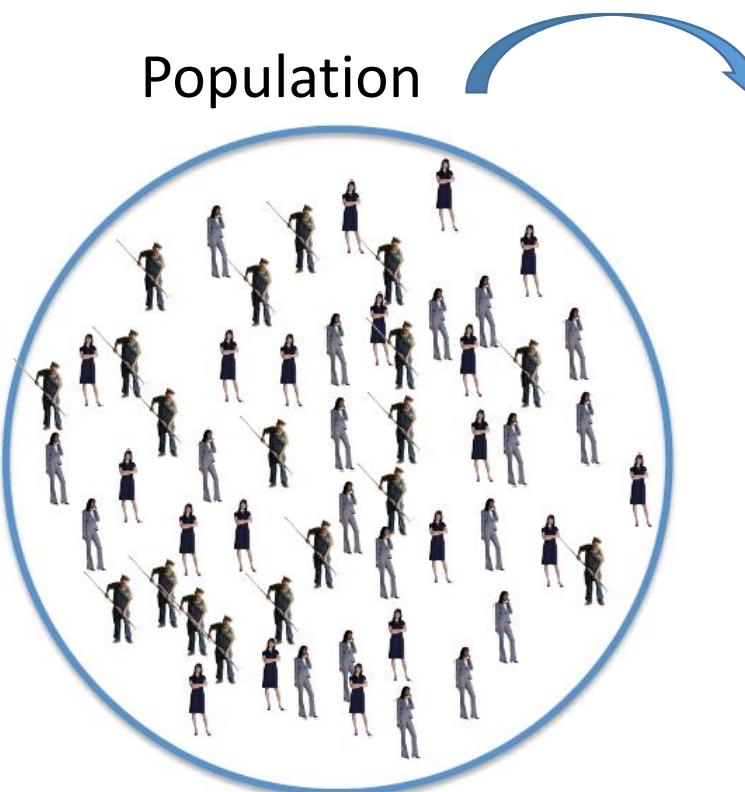
➤ **Statistiques inférentielles ou décisionnelles:** extrapoler à la population entière les propriétés mises en évidence sur l'échantillon

- Univariées
- Multivariées (modèles supervisés)



Statistiques univariées

> Statistiques univariées : statistiques descriptives



Statistiques:

- Moyenne
- Médiane
- Ecart-type
- Coefficient de variation
- Etc.

> Statistiques univariées : statistiques descriptives

Type de variable			
Classe d'outil	Variable Catégorielle		Variable Quantitative
	Indice numérique	Graphique	
	Ex: Traitement, Sexe...	Tableau de contingence Tableau de fréquence	Moyenne, Médiane Variance, Ecart-type, Erreur-standard, Coefficient de corrélation
		Graphe en barres	Graphe en points, Graphe X-Y Graphe à barres d'erreurs, Box-plot, Histogramme, Graphe quantile-normal.

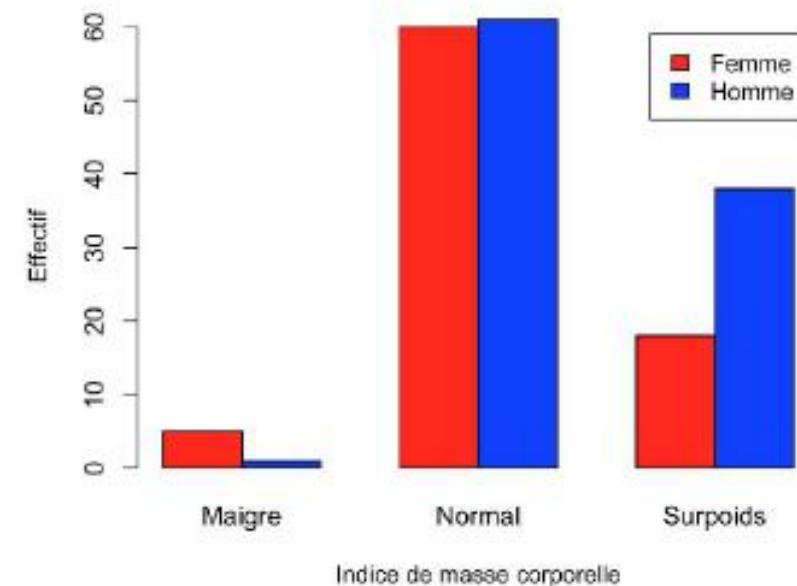
> Statistiques univariées : statistiques descriptives

Tableau de fréquence (en %)

	Maigre	Normal	Surpoids	Total
Femme	2.7%	32.8%	9.8%	45.4%
Homme	0.5%	33.3%	20.8%	54.6%
Total	3.3%	66.1%	30.6%	100%

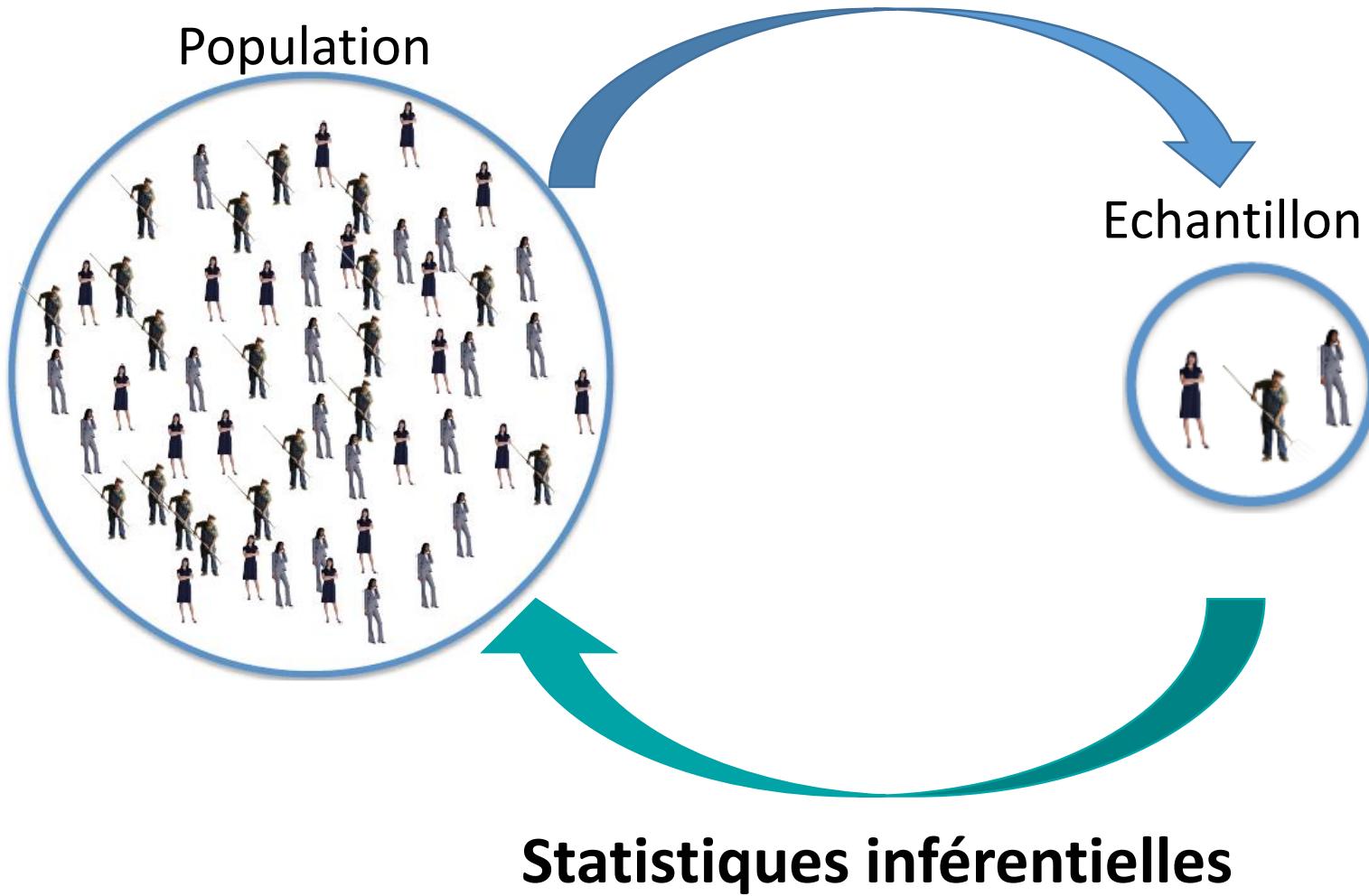
Graphe en barres

Indice de masse corporelle par sexe



Données Sacurine

> Statistiques univariées



> Statistiques inférentielles ou décisionnelles

➤ Objectifs: extrapoler à la population entière les propriétés mises en évidence sur l'échantillon

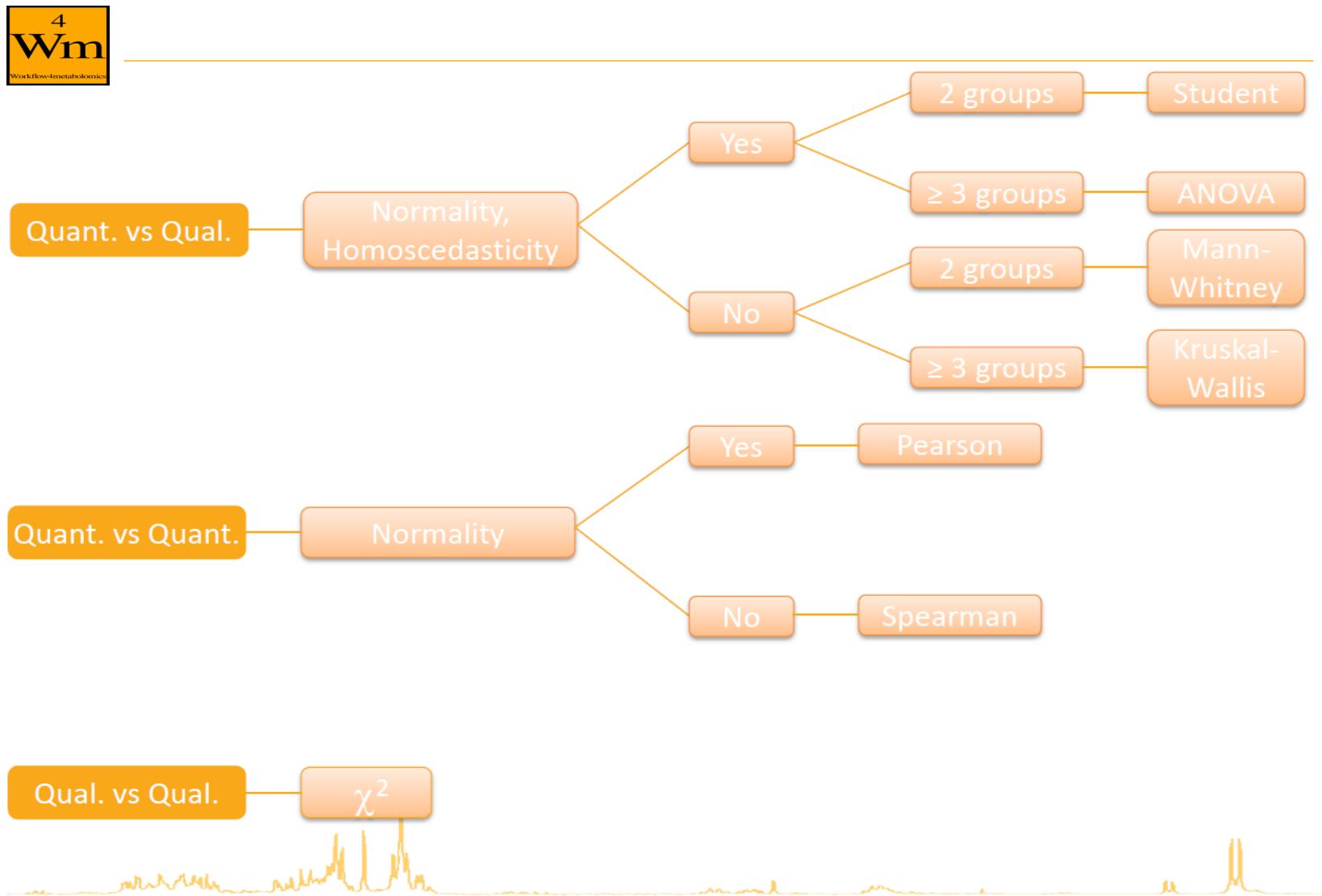
- Tests d'hypothèses

- La loi de distribution



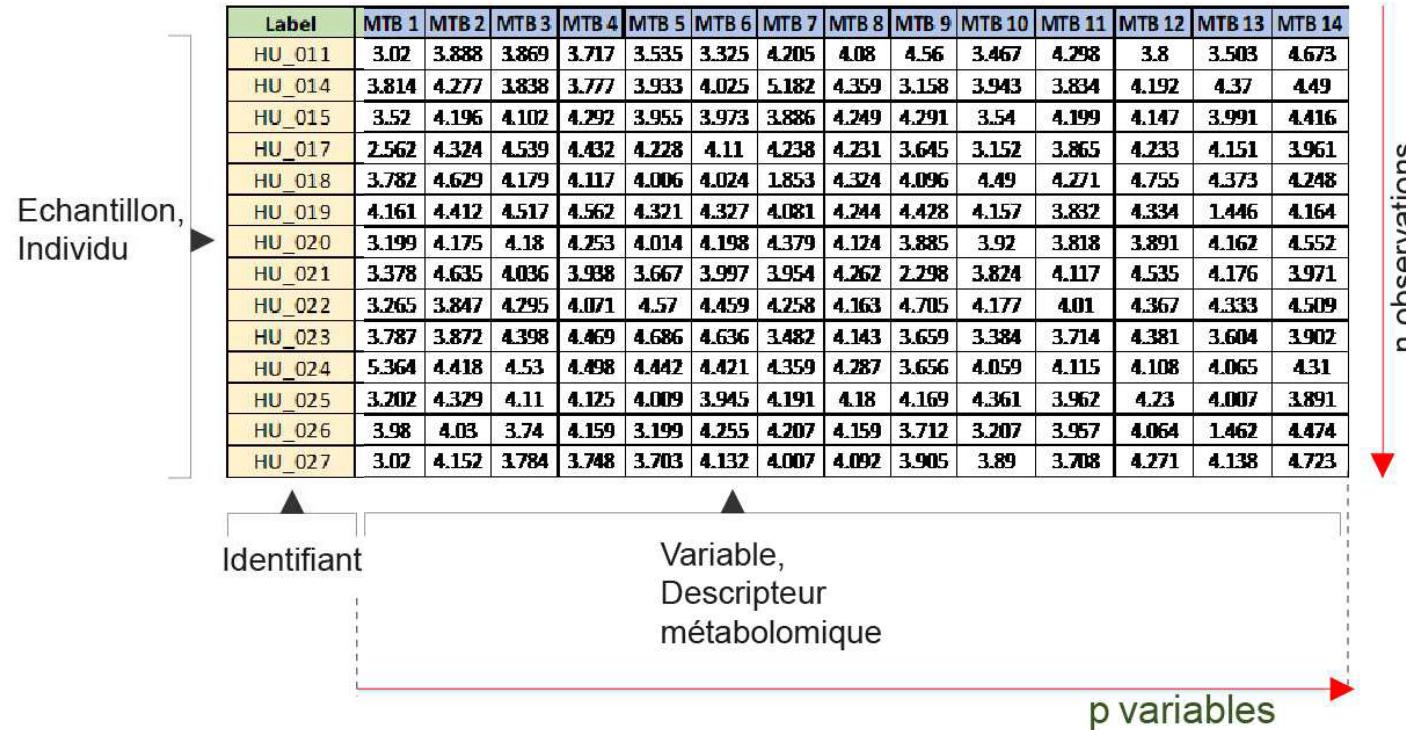
- Méthodes d'échantillonnage: cruciales pour éviter tout biais

> Statistiques inférentielles ou décisionnelles



Statistiques multivariées

Tableau de données métabolomiques



Données Sacurine

➤ Statistiques multivariées descriptives ou non supervisées

Objectifs:

- résumer et visualiser l'information pertinente contenue dans un grand tableau de données
- Mettre en évidences des liens potentiels entre les variables
- Identifier de regroupements d'individus similaires
- Mettre en évidence des individus atypiques



INRAE

Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production et analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

> Statistiques multivariées descriptives ou non supervisées

Méthodes descriptives	Variables quantitatives	Variables qualitatives/mixtes
Les méthodes factorielles: Visualiser les corrélations multiples entre les variables et/ou les individus	Analyses en composantes principales (ACP)	Analyses factorielles des correspondances (AFC, AFCM)
Les méthodes de classification: réduire le nombre d'individus en groupes homogènes	Classification hiérarchique ascendante	AFC ou AFCM et classification

> Statistiques multivariées descriptives

L'analyse en composante principale (ACP):

➤ réduire la multidimensionnalité en perdant le moins d'information possible

- les composantes principales sont des combinaisons linéaires des variables d'origines centrées
- Projection du nuage de points sur une surface plane

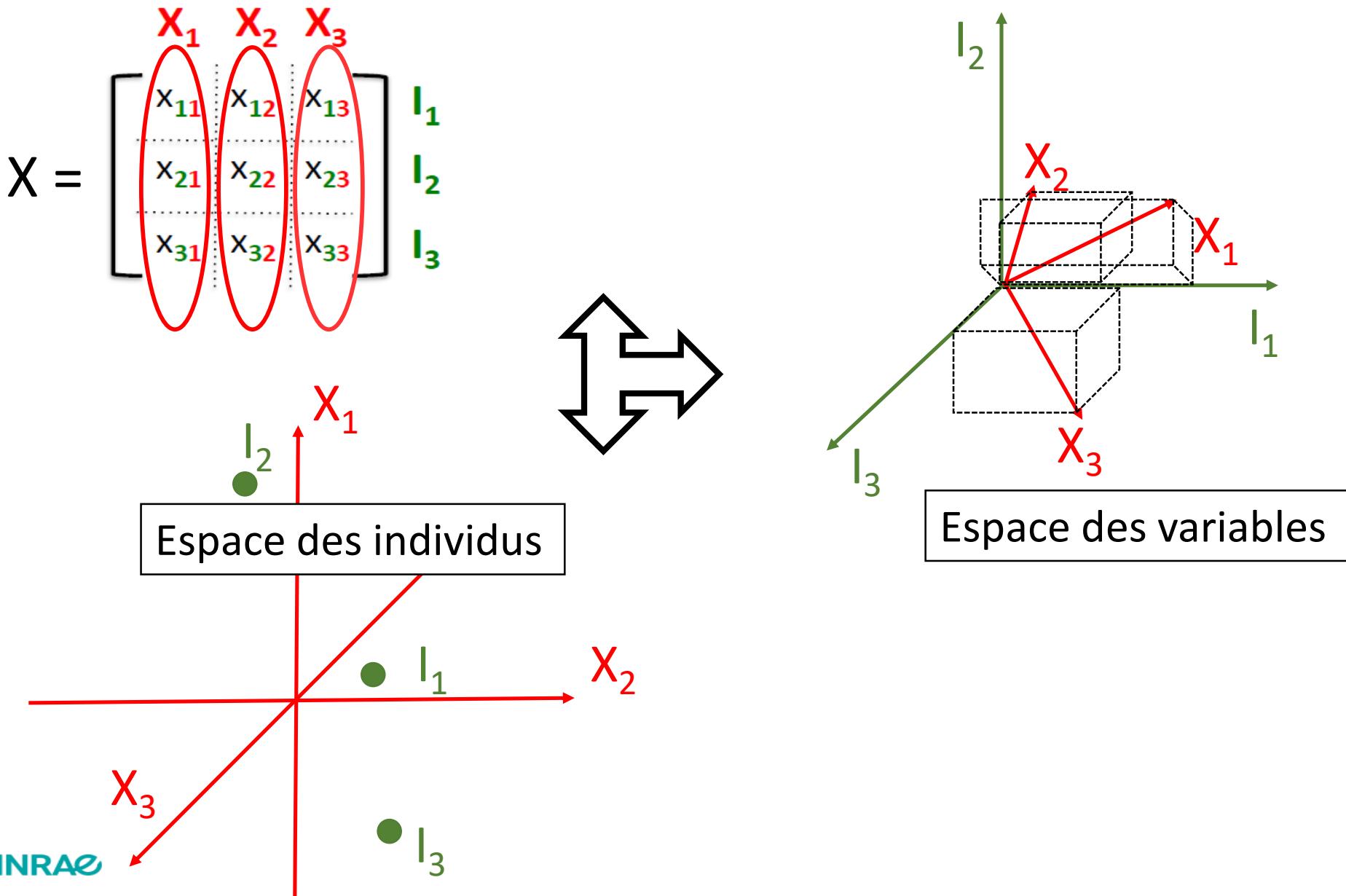


INRAE

Design d'une étude métabolomique

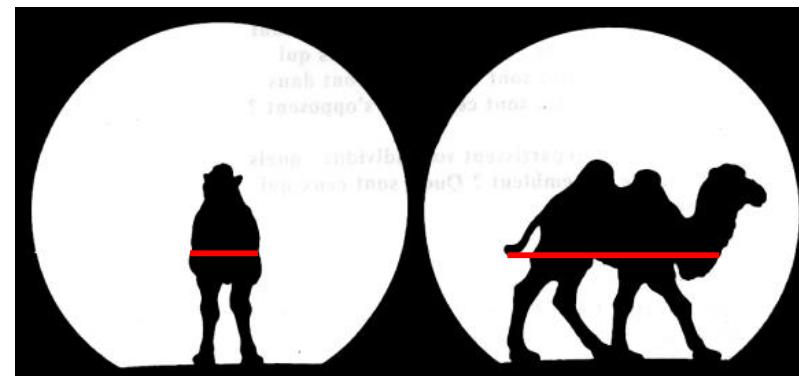
04-06-2020 / Production et analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

> Statistiques multivariées descriptives : ACP



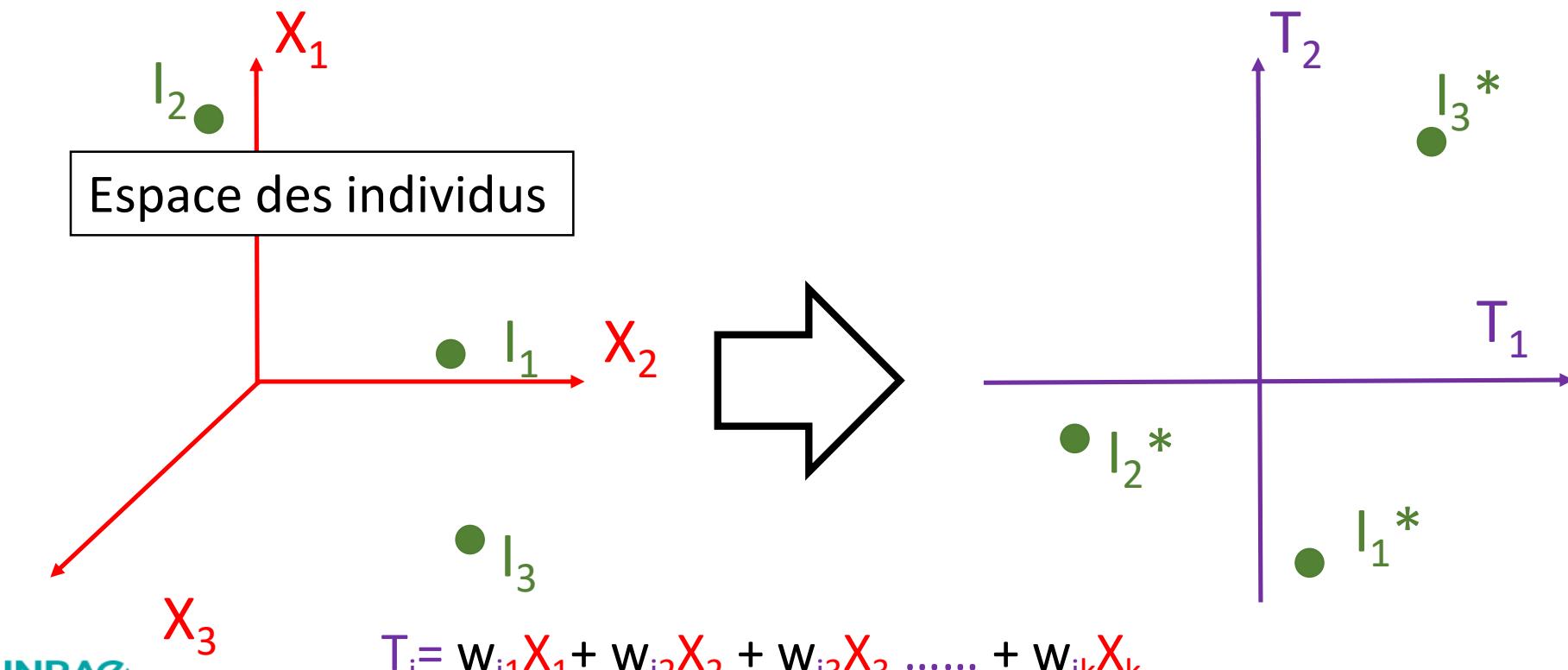
> Statistiques multivariées descriptives: ACP

➤ **D'un point de vue géométrique** : construction d'une série d'axes orthogonaux permettant de projeter le maximum de variabilité des données sur un plan à 2 dimensions.
(techniquement : maximise la variance projetée sur les axes)

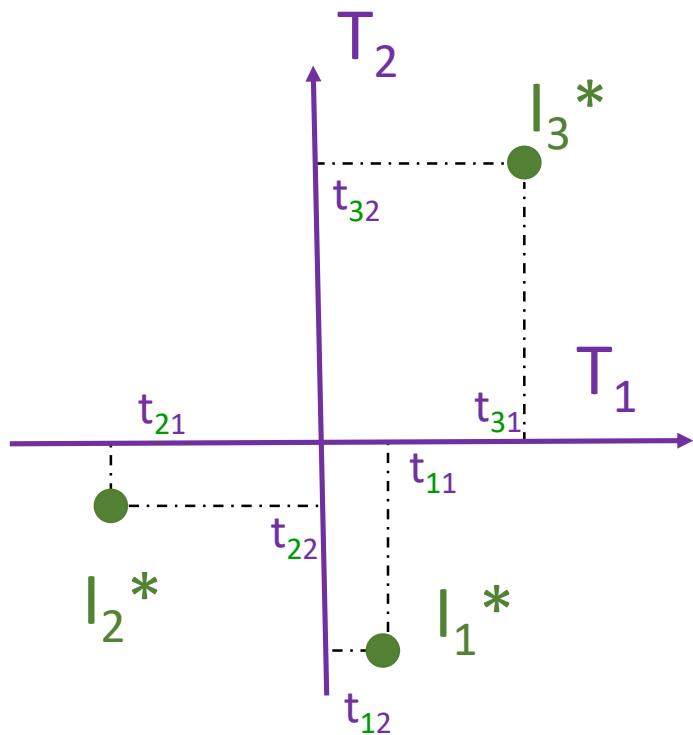


> Analyse en Composantes Principales

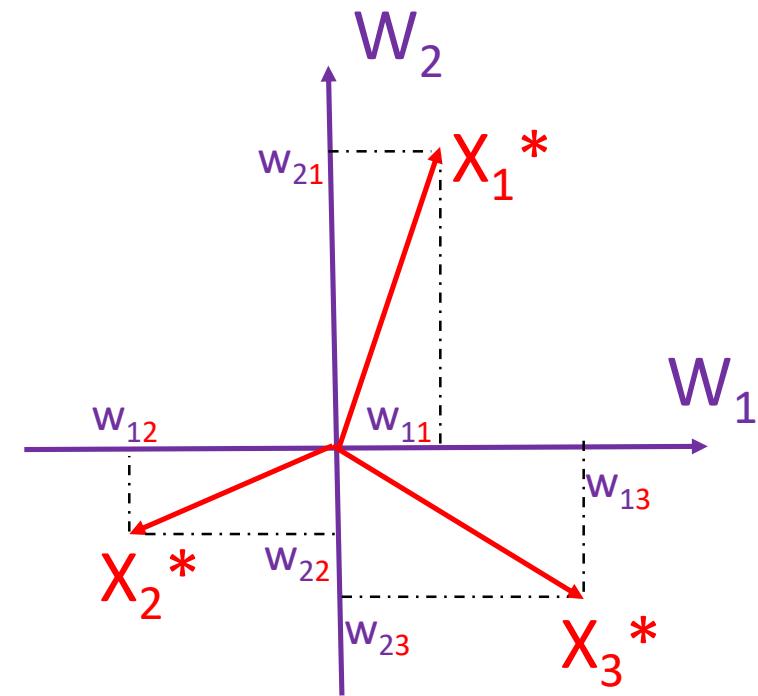
- Composante principale = somme pondérée des variables d'origine centrée
- Un poids est associé à chaque variable, ce poids peut être positif ou négatif



> Analyse en Composantes Principales

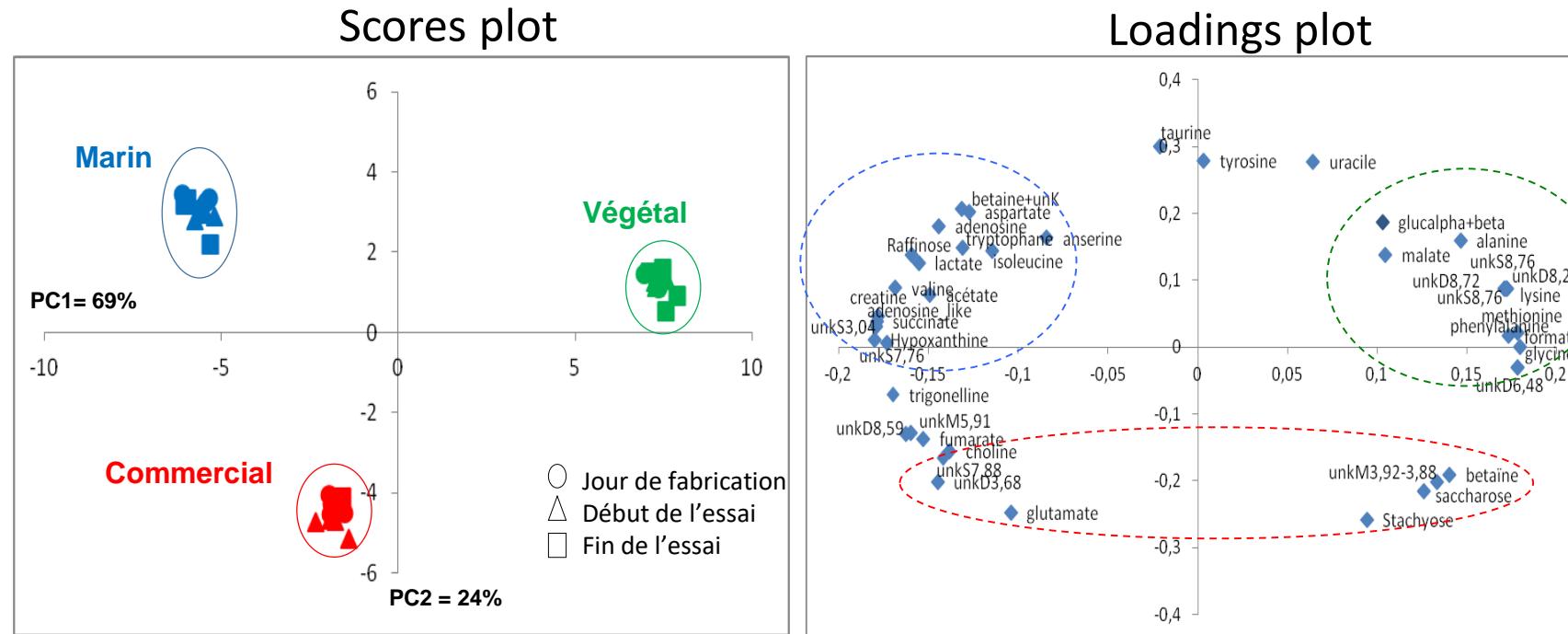


Scores plot



Loadings plot

> ACP sur les concentrations des métabolites d'extraits polaires d'aliments



45 variables (Concentrations des métabolites), 36 échantillons, Normalisation centrée réduite

Stage Master 2 Blandine Madji Hounoum

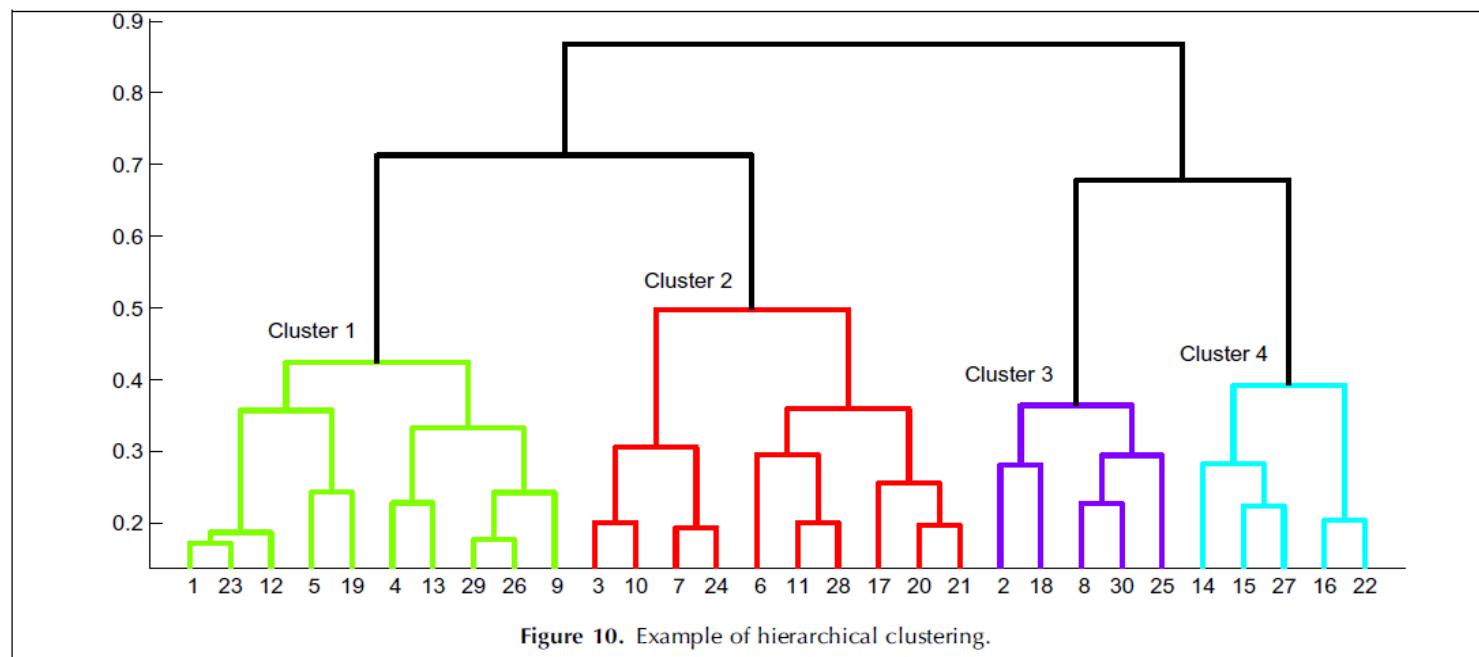
- Discrimination des trois aliments (97 % de la variabilité totale)
- Mise en évidence des métabolites majeurs discriminants les aliments
- Effet spécifique de chaque aliment sur le métabolisme des truites?

> Statistiques multivariées descriptives: classification ascendante hiérarchique

➤ Classification hiérarchique ascendante

- Mesure de distance ou dissimilarité entre les individus

➤ Objectifs: regrouper les individus en groupes homogènes



> Statistiques multivariées supervisées

> Objectif: expliquer la variable Y à partir des variables explicatives X

$$X = \begin{bmatrix} X_1 & X_2 & X_3 \\ \left[\begin{array}{ccc} x_{11} & x_{12} & x_{13} \\ x_{21} & x_{22} & x_{23} \\ x_{31} & x_{32} & x_{33} \end{array} \right] & \begin{array}{c} l_1 \\ l_2 \\ l_3 \end{array} \end{bmatrix}$$

Variables explicatives

$$Y = \begin{bmatrix} Y_{11} \\ Y_{21} \\ Y_{31} \end{bmatrix}$$
$$f(X) = Y$$

> Statistiques multivariées supervisées

Partial Least Squares (PLS):

➤ réduire la multidimensionnalité en perdant le moins d'information possible
(comme pour l'ACP)

- Variables latentes: maximisent la covariance entre X et Y
- Projection des nuages de points sur une surface plane

> Différents types d'études métabolomiques

➤ Études méthodologiques:

- Optimisation du protocole de préparation des échantillons
- Optimisation de(s) méthodes statistique(s)

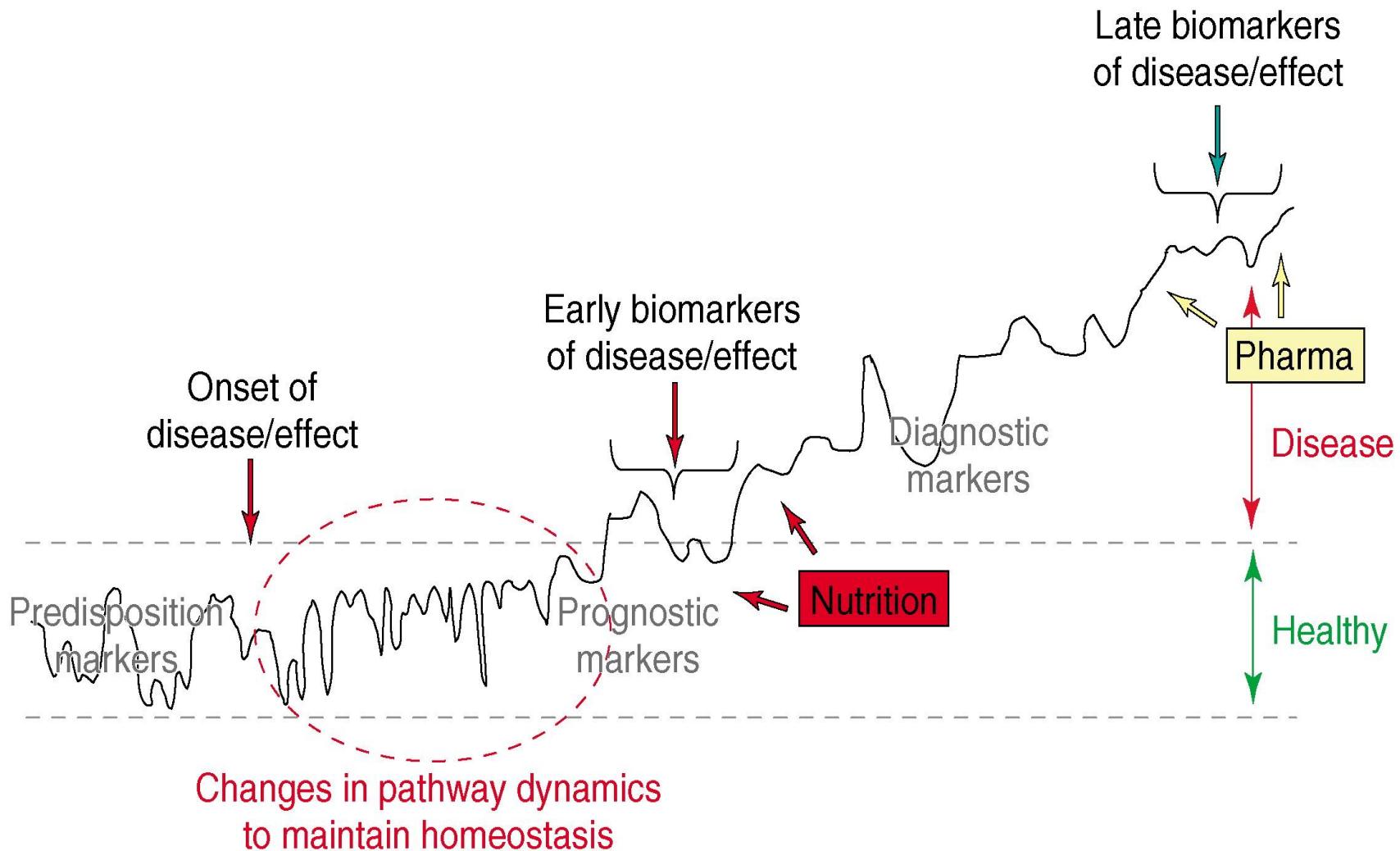
➤ Études non ciblées

- Détection du maximum de composés afin de :
 - Rechercher un ou plusieurs biomarqueurs (modèles prédictifs)
 - Rechercher des voies métaboliques perturbées (modèles explicatifs)

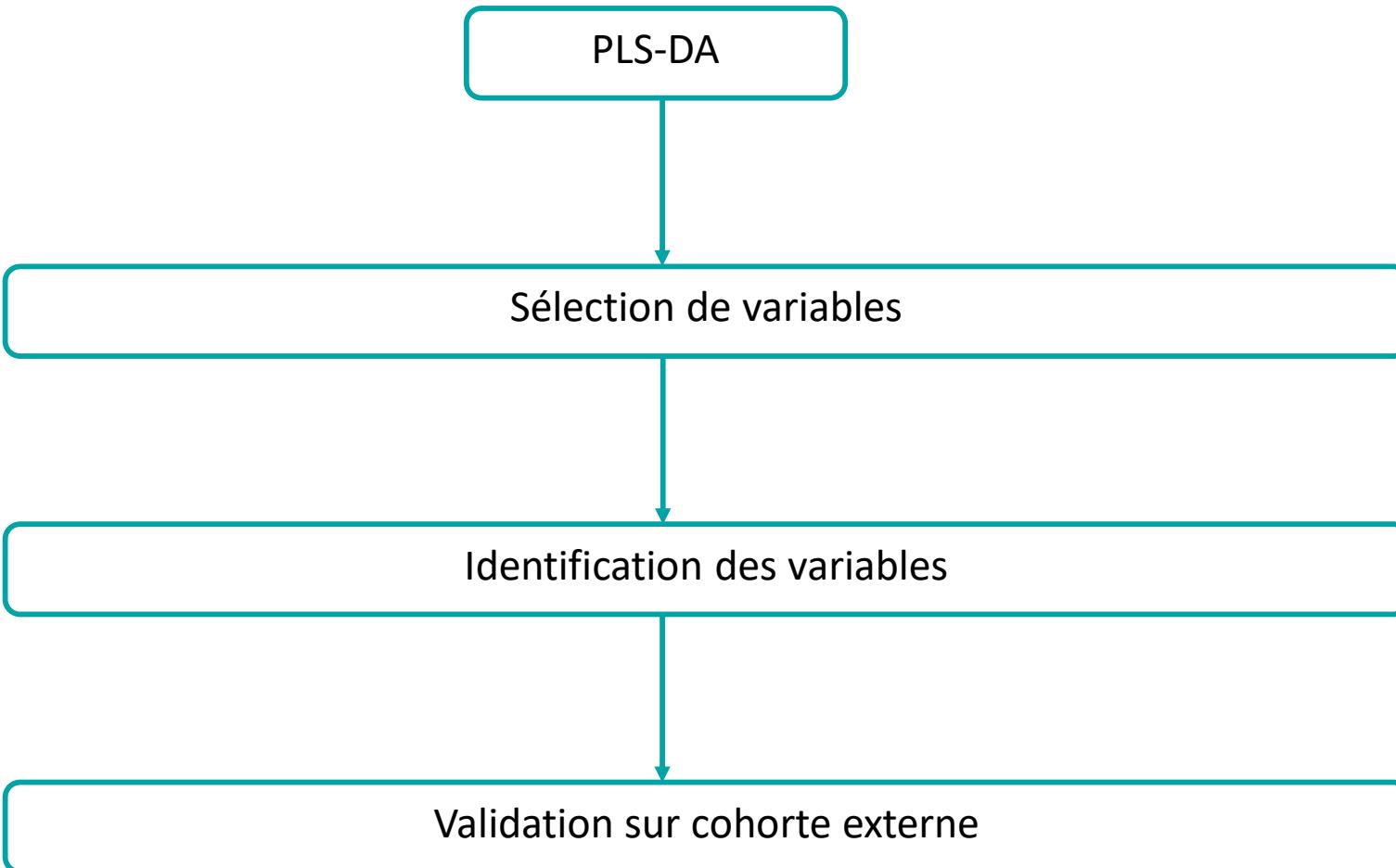
➤ Études ciblées:

- Recherche spécifique de composés appartenant à une ou plusieurs voies métaboliques
- Quantification de composés biomarqueurs

> Différents types de biomarqueurs



> Modèles prédictifs: recherche de biomarqueurs



➤ Exemple : recherche de biomarqueurs précoce de la boiterie chez les vaches

Boiterie chez les vaches:

- Forte prévalence chez les vaches laitières
- Souffrance animale
- Pas de symptômes avant l'apparition de la maladie

Objectifs: mettre en évidence des biomarqueurs précoce avant l'apparition de la boiterie chez les vaches

Protocole d'expérience:

- Prélèvement d'échantillons de sang de la vache à différents temps pendant la gestation et après la mise bas.

Zhang et al., *Animals* (2015), 5, 717-747.



Design d'une étude métabolomique

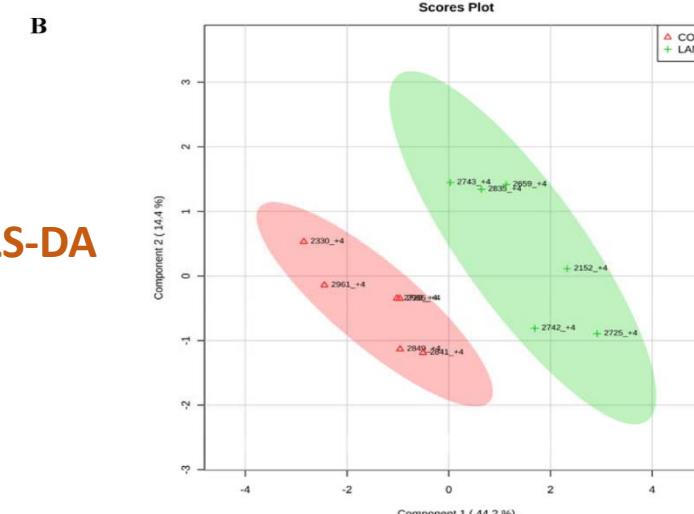
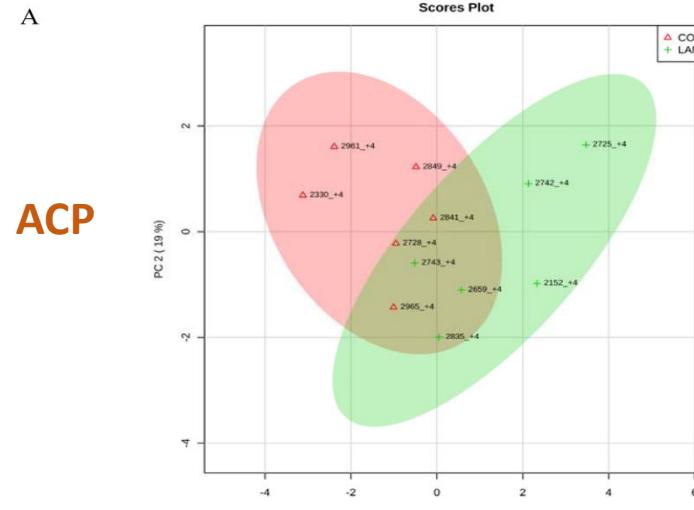
04-06-2020 / Production et analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

Exemple : recherche de biomarqueurs précoce de la boiterie chez les vaches

Construction d'une série d'axes (composantes ACP principales) permettant de maximiser la variance entre les individus

→ Visualisation du lien entre les variables quantitatives X et les variables qualitatives (groupes).

→ Classification des variables (score VIP) par ordre décroissant



Zhang et al., *Animals*, (2015), 5, 717-747.

> Différents types d'études métabolomiques

➤ Études méthodologiques:

- Optimisation du protocole de préparation des échantillons
- Optimisation de(s) méthodes statistique(s)

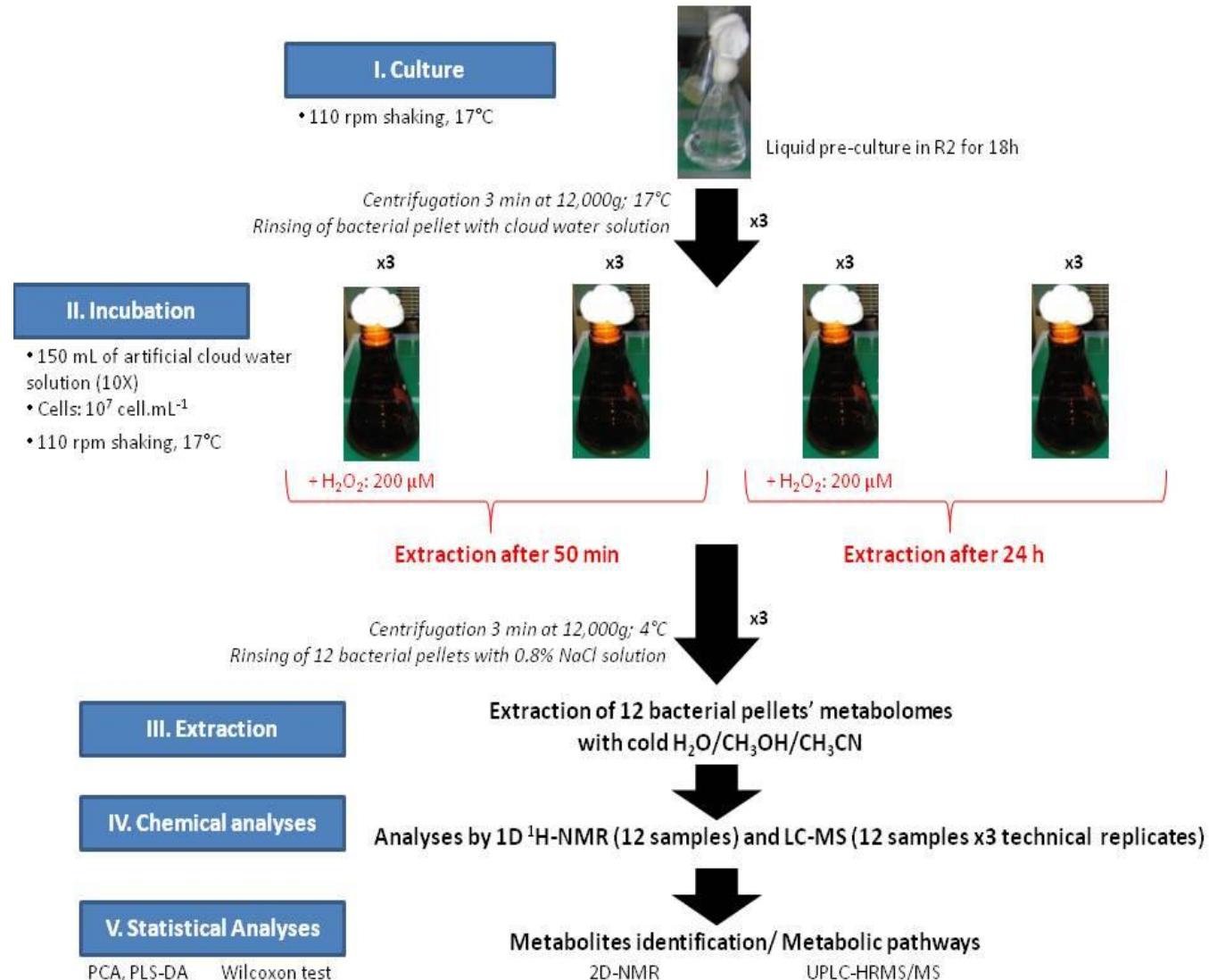
➤ Études non ciblées

- Détection du maximum de composés afin de :
 - Rechercher un ou plusieurs biomarqueurs (modèles prédictifs)
 - Rechercher des voies métaboliques perturbées (modèles explicatifs)

➤ Études ciblées:

- Recherche spécifique de composés appartenant à une ou plusieurs voies métaboliques
- Quantification de composés biomarqueurs

> Adaptations métaboliques de *Pseudomonas graminis* au stress H₂O₂ dans l'eau de nuage



INRAe

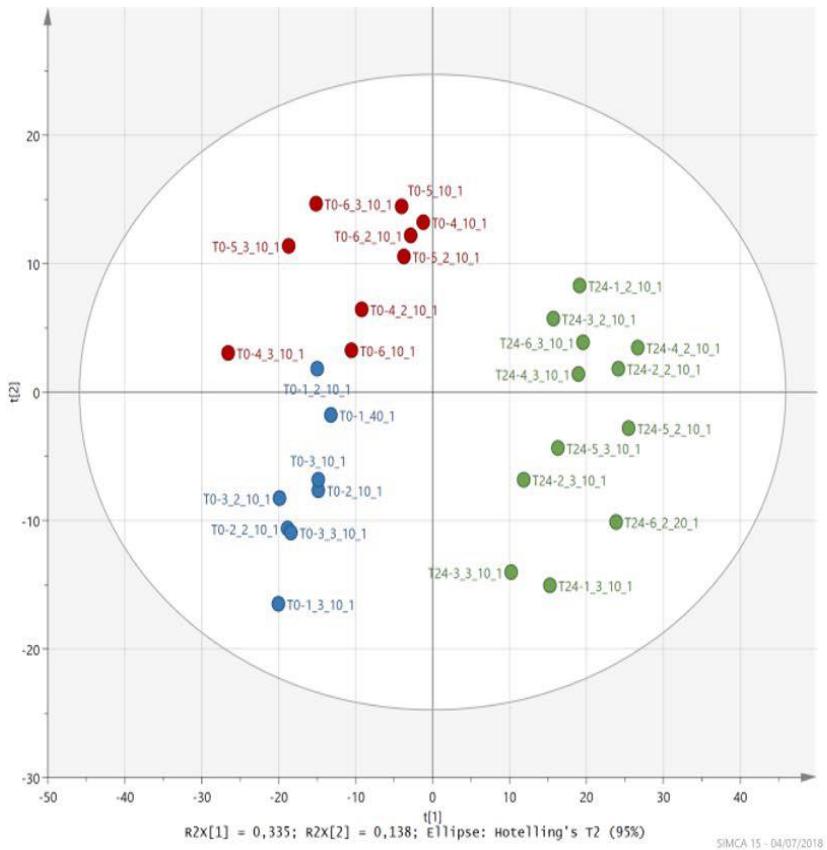
Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production et analyse de données métabolomiques / Binta Diémé

Wirgot *et al.*, *Scientific Reports* (2019), 9, 12799

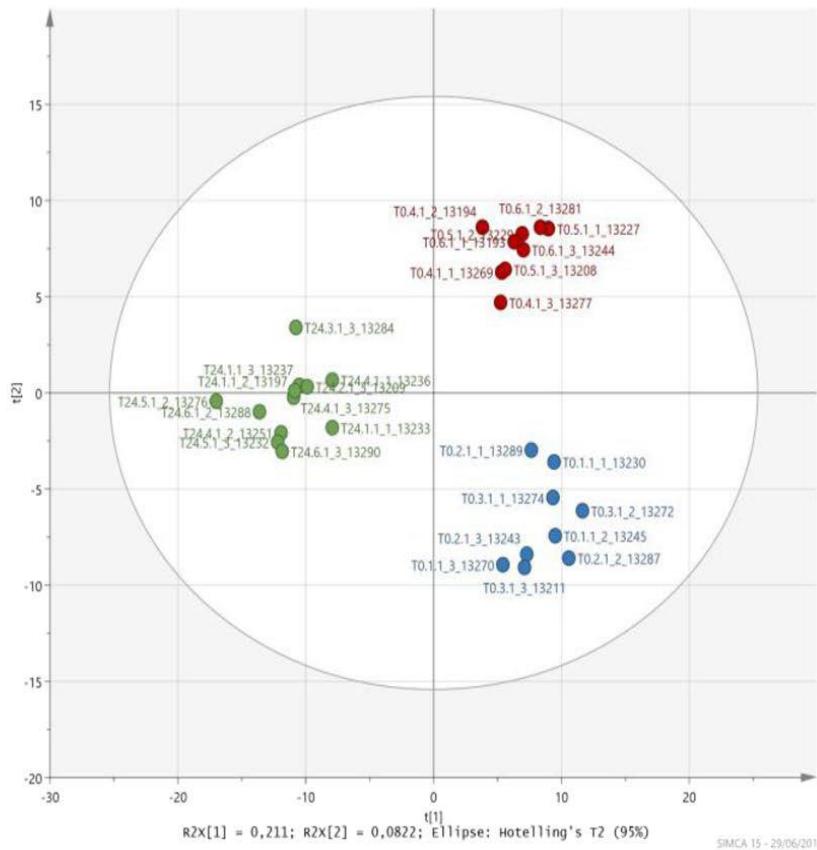
> Adaptations métaboliques de *Pseudomonas graminis* au stress H₂O₂ dans l'eau de nuage

(a)



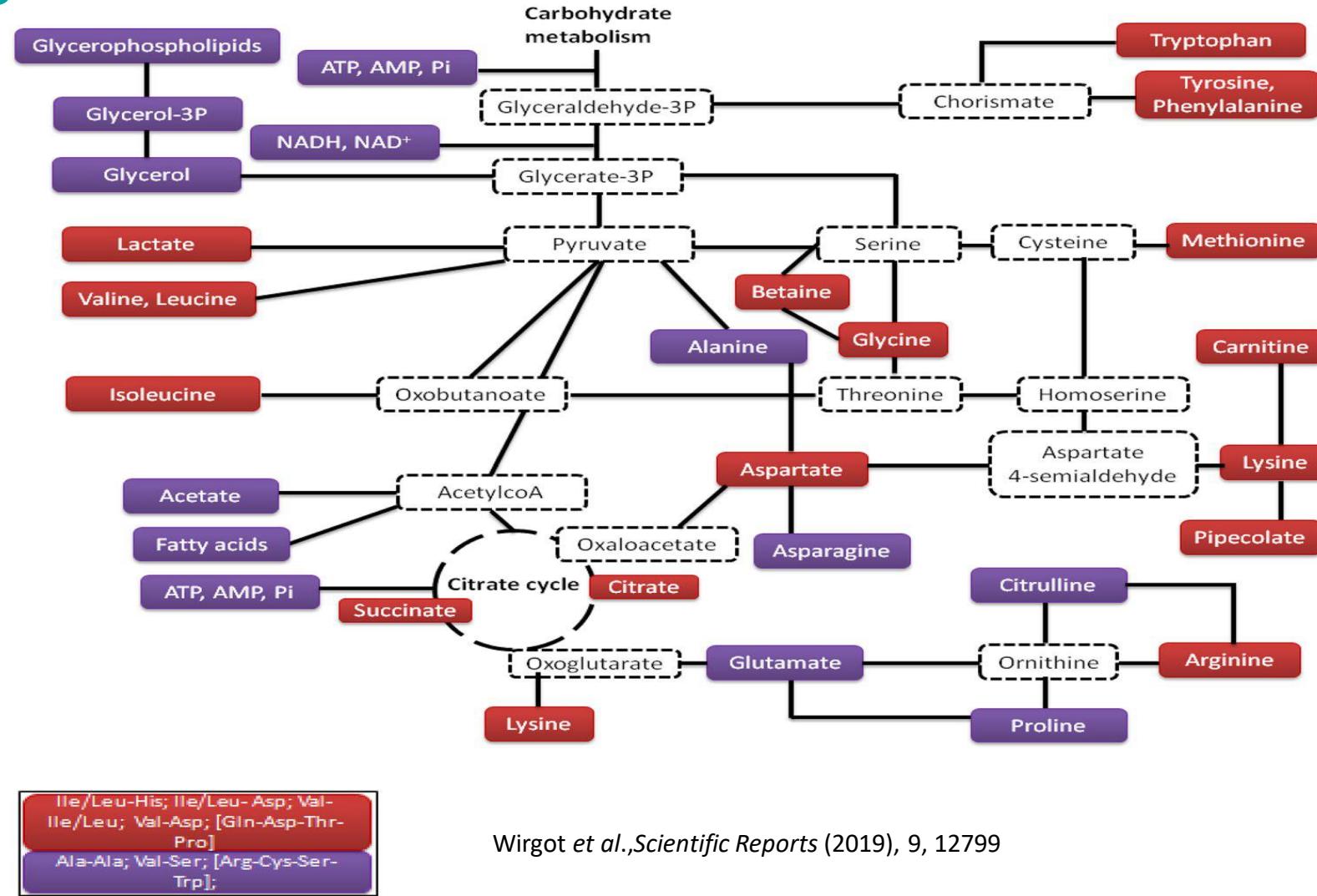
a) RMN

(b)



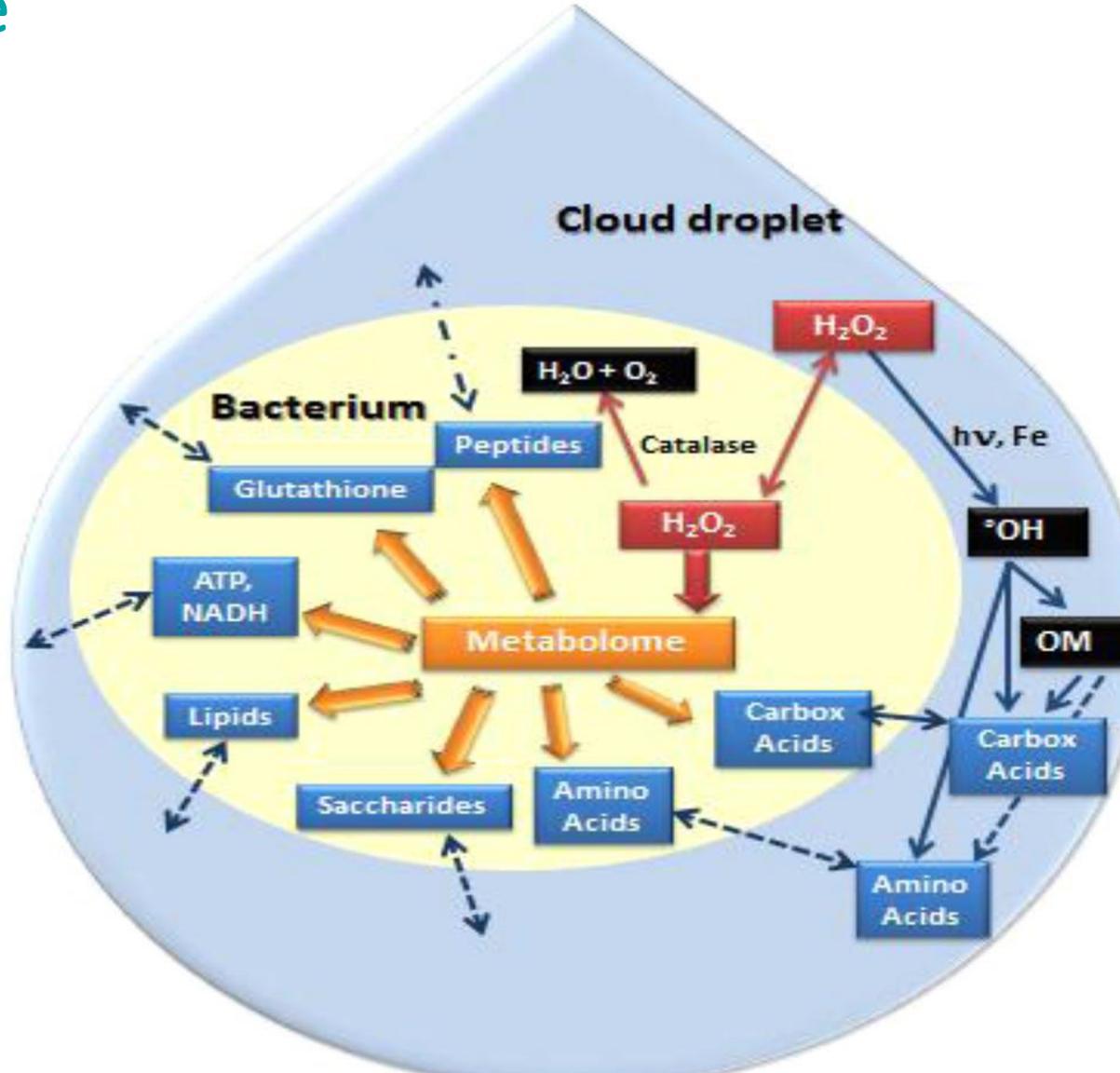
b) LC-MS mode +

Adaptations métaboliques de *Pseudomonas graminis* au stress H₂O₂ dans l'eau de nuage



Wirgot et al., *Scientific Reports* (2019), 9, 12799

➤ Adaptations métaboliques de *Pseudomonas graminis* au stress H₂O₂ dans l'eau de nuage



> Modèles explicatifs: réseaux métaboliques

➤ Plusieurs logiciels de mis en réseaux des métabolites

- MetExplore: plusieurs organismes dans BDD
- MetaboAnalyst: comparaison de différence de profil d'expression mais peu d'organismes disponibles pour mapper
- ChemRICH: non limité par le nombre de métabolites à mapper

> Différents types d'études métabolomiques

➤ Études méthodologiques:

- Optimisation du protocole de préparation des échantillons
- Optimisation de(s) méthodes statistique(s)

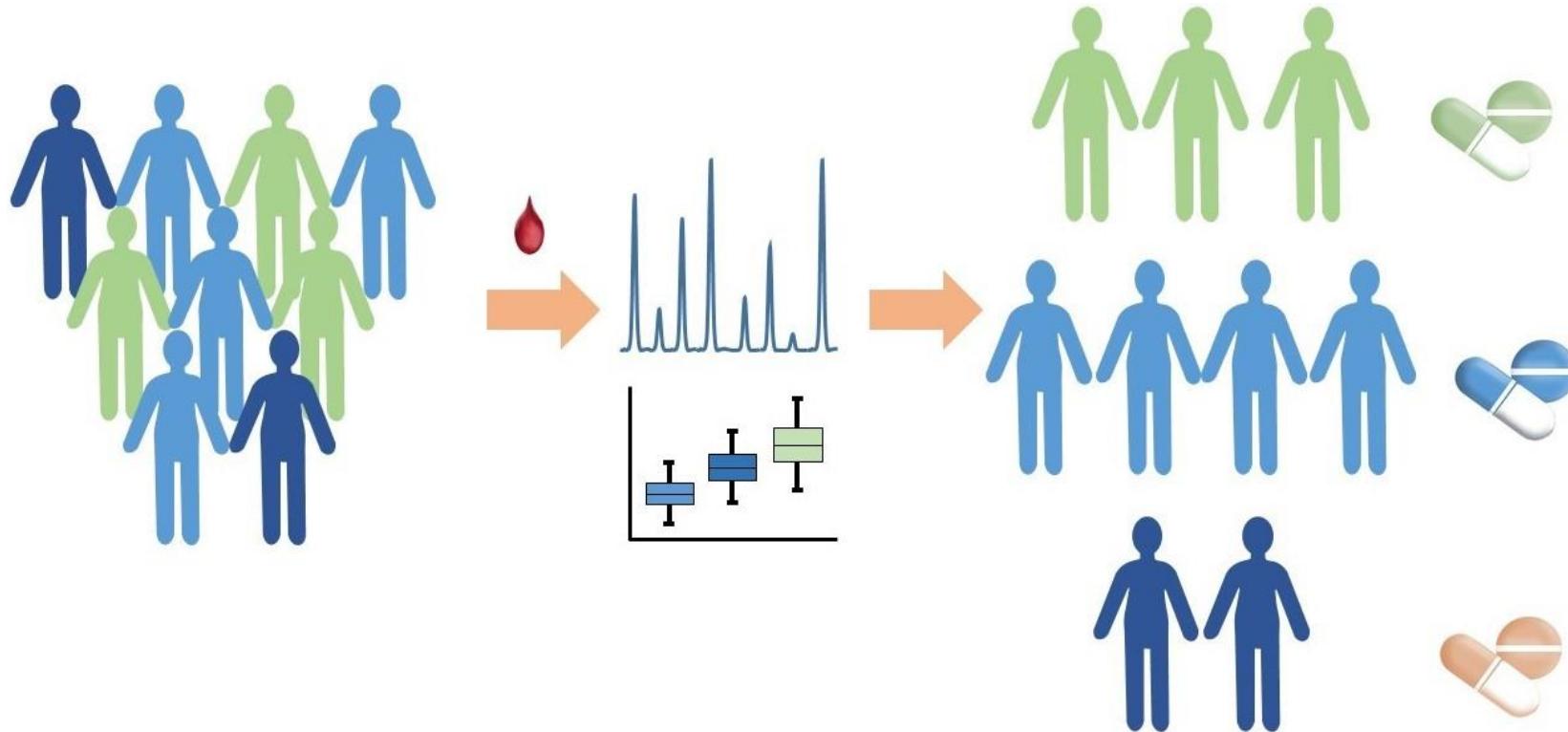
➤ Études non ciblées

- Détection du maximum de composés afin de :
 - Rechercher un ou plusieurs biomarqueurs (modèles prédictifs)
 - Rechercher des voies métaboliques perturbées (modèles explicatifs)

➤ Études ciblées:

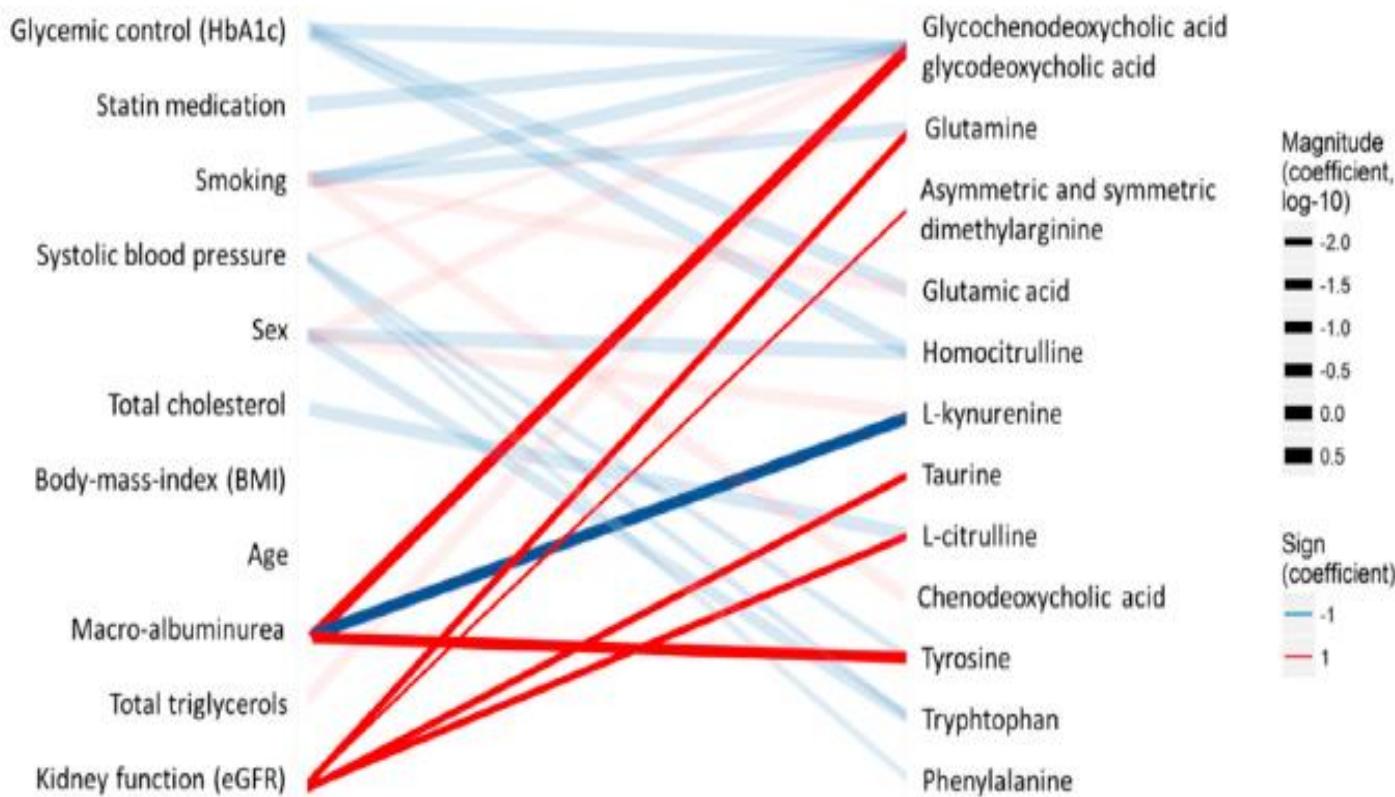
- Recherche spécifique de composés appartenant à une ou plusieurs voies métaboliques
- Quantification de composés biomarqueurs

> Etude clinique ciblée de métabolites pour la stratification de patients diabétiques



Ahonen et al., *Metabolites*, (2019), 9, 184.

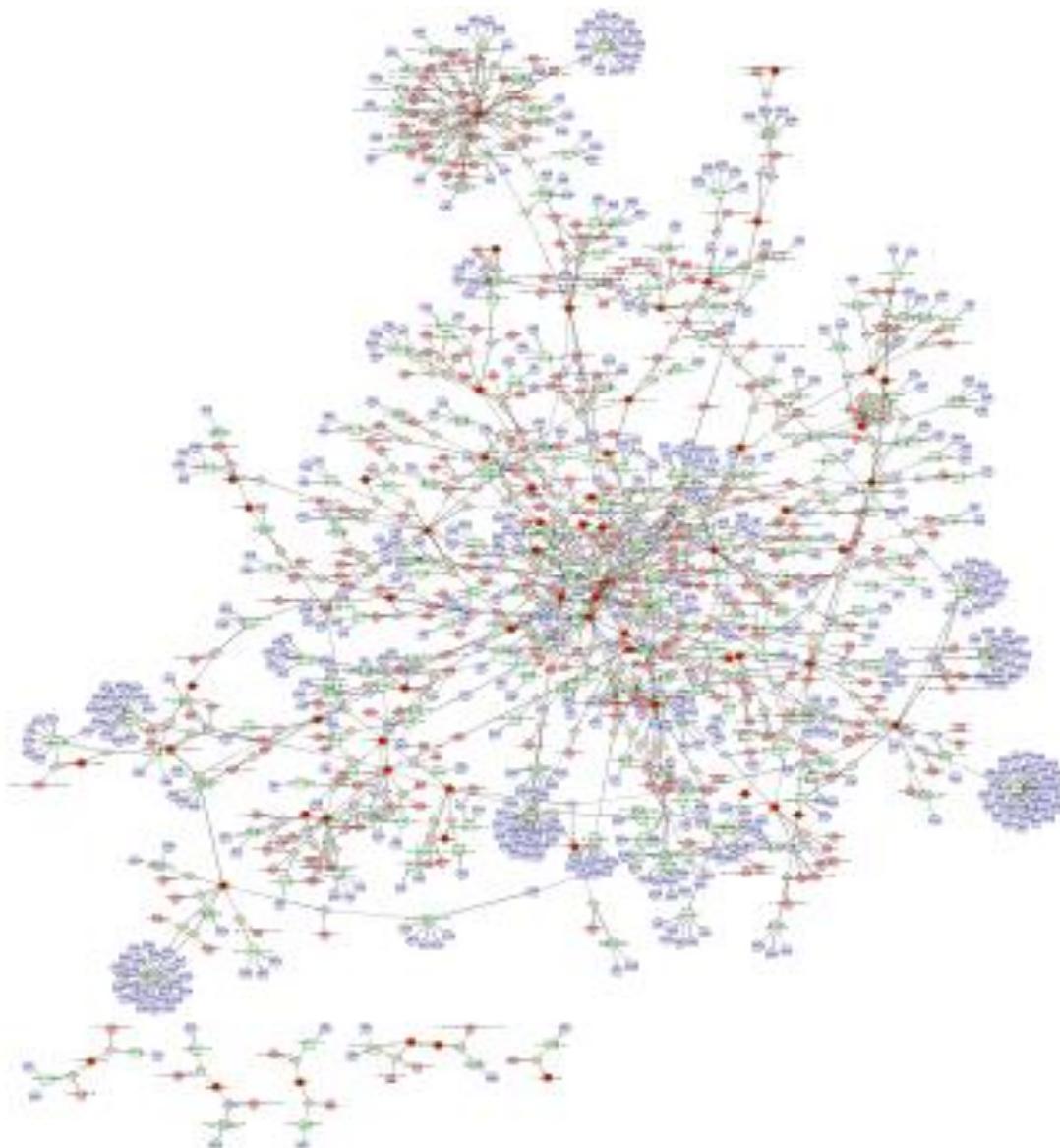
> Etude clinique ciblée de métabolites pour la stratification de patients diabétiques



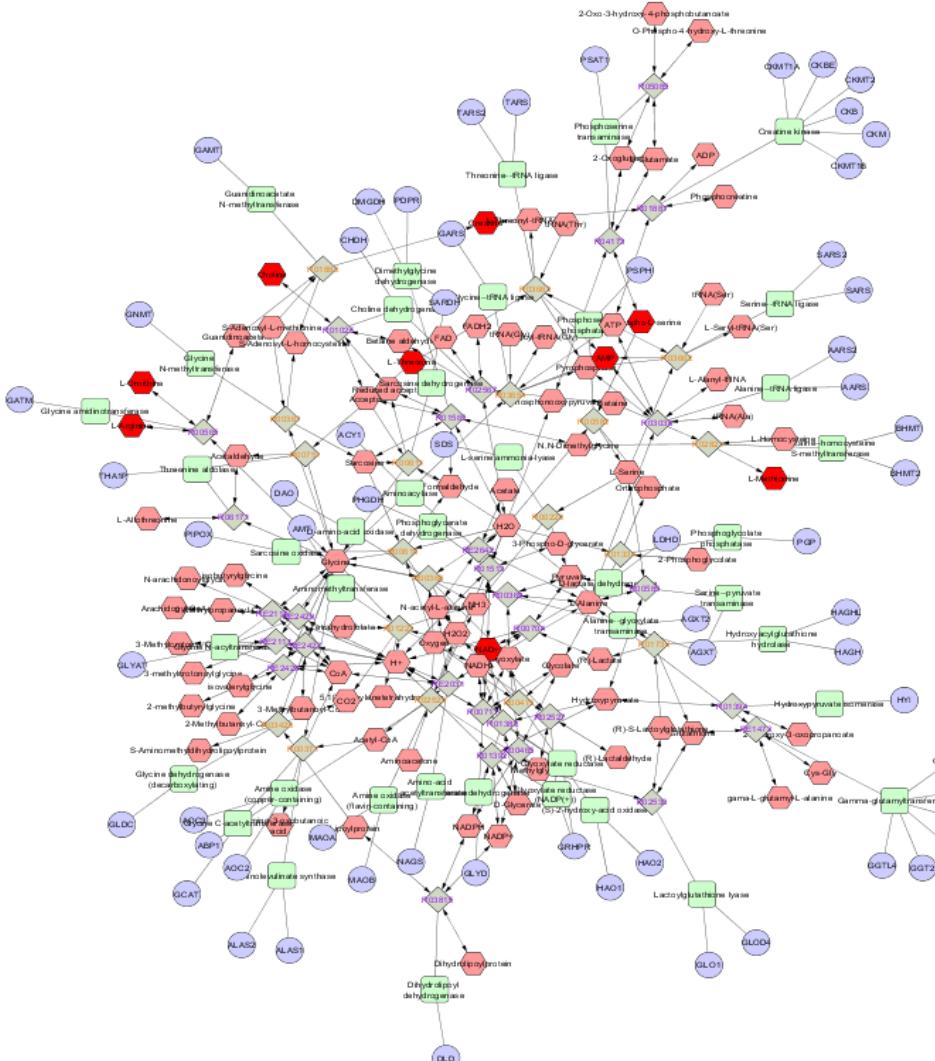
Ahonen et al., *Metabolites*, (2019), 9, 184.

Omiques intégratives

> Réseaux métabolites-enzymes-gènes



➤ Métabolisme de la glycine, sérine, thréonine, alanine



Conclusions générales

Métabolomique:

- Technologie multidisciplinaires
- Applicable à des nombreux domaines de recherche

Cependant

- Précautions à prendre à toutes les étapes du workflow pour éviter les biais



INRAE

Design d'une étude métabolomique

04-06-2020 / Production et analyse de données métabolomiques / Binta Diémé