

Développement d'une méthode générale d'analyse métabolomique de l'urine humaine par UHPLC-HRMS/MS pour la recherche de biomarqueurs : optimisation des paramètres de séparation et de traitement des données.

Quentin Vandoolaeghe, Valérie Bouchart, Matthieu Meryet-Figuiere, Pierre Lebailly, Raphaël Delépée

▶ **To cite this version:**

Quentin Vandoolaeghe, Valérie Bouchart, Matthieu Meryet-Figuiere, Pierre Lebailly, Raphaël Delépée. Développement d'une méthode générale d'analyse métabolomique de l'urine humaine par UHPLC-HRMS/MS pour la recherche de biomarqueurs : optimisation des paramètres de séparation et de traitement des données.. Congrès SEP 2021 14 ème congrès francophone sur les sciences séparatives et les couplages de l'AFSEP., Oct 2021, Paris, France. hal-03451102

HAL Id: hal-03451102

https://normandie-univ.hal.science/hal-03451102

Submitted on 26 Nov 2021

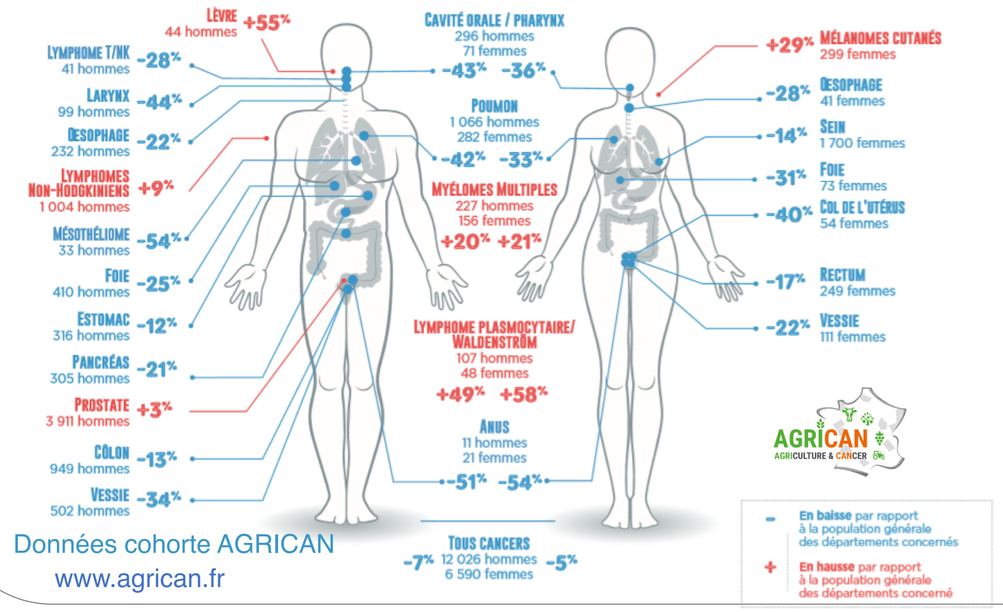
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Développement d'une méthode générale d'analyse métabolomique de l'urine humaine par UHPLC-HRMS/MS pour la recherche de biomarqueurs : optimisation des paramètres de séparation et de traitement des données

Quentin Vandoolaeghe[1,2], Valérie Bouchart[1,3], Matthieu Meryet-Figuiere[1], Raphaël Delépée*[1,2]
*raphael.delepee@unicaen.fr
[1]INSERM U1086 ANTICIPE Normandie Univ, UNICAEN, Unité de Recherche Interdisciplinaire pour la Prévention et le Traitement des Cancers, Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, Caen
[2]Plateforme PRISMM, UNICAEN, Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, Caen
[3]LABÉO, Pôle Recherche Développement & Innovation, Caen

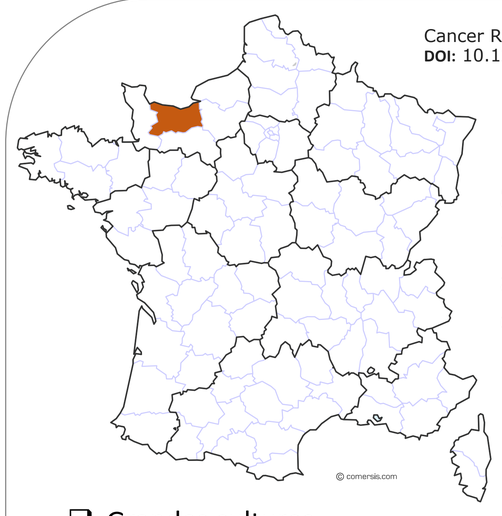
Contexte : Activités agricoles et Cancer



- ❑ Etudier la **plausibilité biologique** en termes de cancer, les effets précoces (pour des secteurs les plus complexes ou les moins représentés), rechercher des **marqueurs prédictifs** d'un risque de cancer.
- ❑ **Approche holistique** de la question des cancers en **milieu professionnel agricole**.

Les activités professionnelles agricoles ont un impact sur l'incidence des cancers → **Effet des pesticides?** **Autres déterminants?**

Biothèque Epibio97



Cancer Res 2004 (64) (6) 2264-2269;
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3604

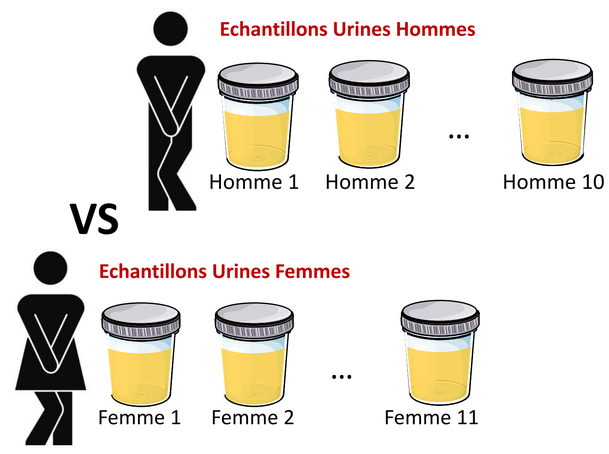
8% des 7 991 exploitations agricoles du Calvados

- ❑ Grandes cultures
- ❑ Période 1997-2000 : 410 fermes - 758 sujets
- ❑ Echantillons biologiques chez 90 % des individus
  - ✓ **Urine**
  - ✓ Sérum
  - ✓ Lymphocytes viables
  - ✓ Globules rouges,
  - ✓ ADN de leucocytes
- ❑ Questionnaire standardisé complet

Characteristics	Females n = 315 (41.5%)	Males n = 443 (58.5%)
Median age [min–max]	46 [19–96]	44 [17–76]
Smoking habit		
Never-smokers	81%	49%
Current smokers	9%	26%
Ex-smokers	10%	25%
Medication		
No	53%	76%
Yes	47%	24%
Alcohol consumption		
None	21%	5.5%
Once a week	47%	37%
One meal/day	13%	16.5%
At all meals	17%	31%
More	2%	10%
Job title		
Farm owner	46%	78%
Agricultural worker	7%	10%
Retired	5%	7%
Spouse	38%	1.4%
Mean duration of agricultural employment (years ± SD)	27 ± 14 (1–59)	27 ± 12 (1–62)
Pesticide users on open field crops	0.6% (n = 2)	63%
Type of pesticide use		
Pesticides on open field crops	0.6%	63%
Herbicides on meadows	2%	52%
Insecticides on animals	55%	78%
Herbicides on farmyards	44%	66%
Herbicides on slopes	11%	66%
Mean duration of pesticide use (years ± SD)	13 ± 10 (6–20)	20 ± 9 (1–48)
Median farm area (hectares [min–max])[a]	97.5 (n = 2)	72.5 [0–406]
Median farm area devoted to crops[a]	78.5 (n = 2)	46 [0–403]
Median time since last pesticide exposure in days (min–max)	6 (n = 1)	28 (0–359)

Besoin d'une méthodologie générale d'analyse métabolomique de l'urine

Mise en place d'une étude test :

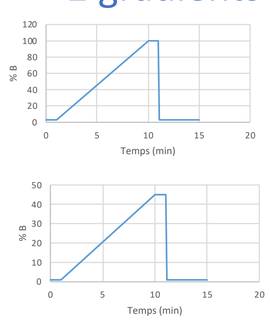


Méthodologie

Paramètres chromatographiques et de détection en HRMS

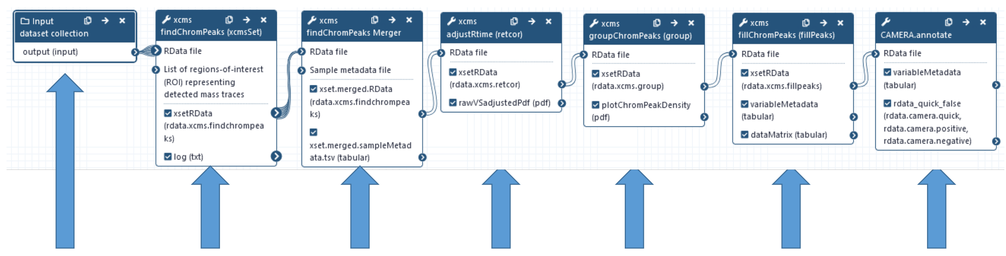
	ESI Positif	ESI Négatif
Séparation des molécules peu polaires C18 Waters Acquity® BEH C18 (1x100mm; 1,7 µm)	✓	✓
Séparation des molécules polaires HILIC Waters Acquity® BEH amide (1x100mm; 1,7 µm)	✓	✓

- 4 conditions
- 2 gradients



Détection masse : QTOF Agilent 6540, 1 scan/sec, 50-1000 m/z

Traitement des résultats : Galaxy W4M & mixOmics

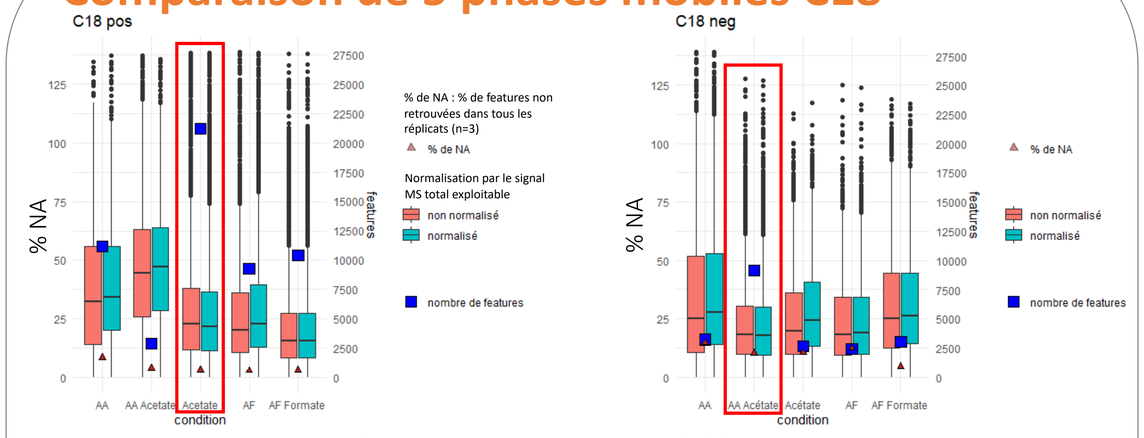


Insertion du jeu de donnée au format MzML → Détection des features → Rassemblement des données en un seul fichiers → Correction des temps de rétention → Comparaison des pics détectés dans plusieurs échantillons → Intégration des zones ou une feature devrait être présente mais non détectée → Annotation

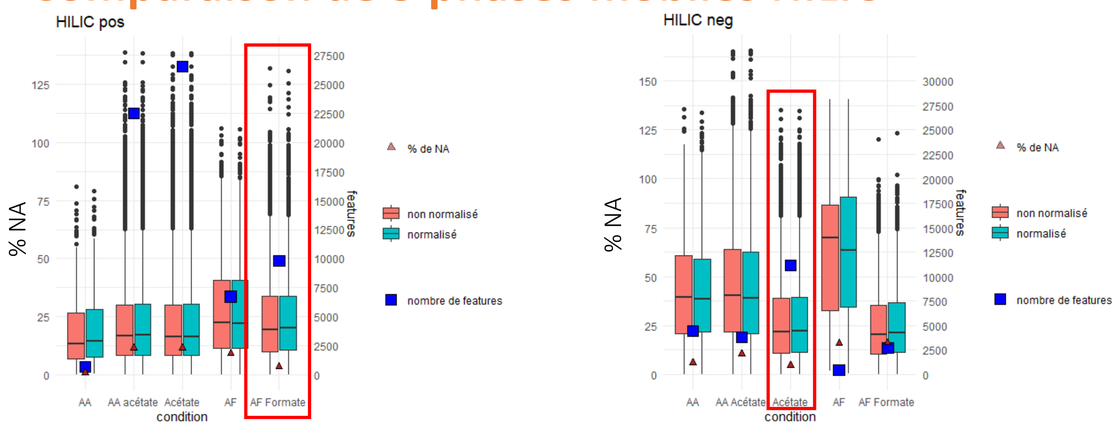
https://workflow4metabolomics.org/

Résultats

Comparaison de 5 phases mobiles C18



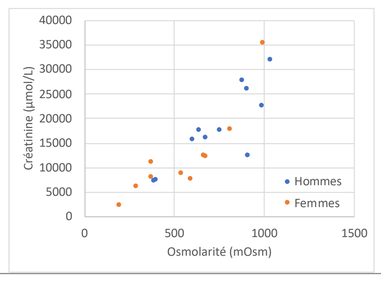
Comparaison de 5 phases mobiles HILIC



Méthodes de normalisation des urines

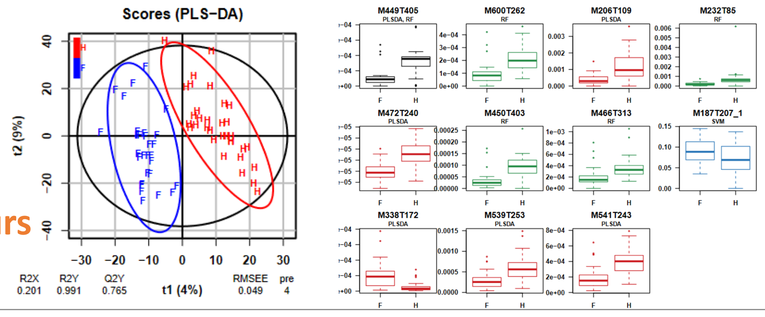
- ❑ Osmolarité
- ❑ Créatinine
- ❑ Signal MS total

Gagnebin et al., *Analytica chmica Acta, 2017*
Warack et al., *Journal of chromatography B, 2009*



Conclusion

- ❑ Analyse multivariée (PLS-DA) *HILIC POS* → **11 marqueurs**
- ❑ Analyse univariée (Wilcoxon) *HILIC POS* → **117 marqueurs**



UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE — Anticipe UMR 1086 — Inserm — LABÉO Pôle d'analyses et de recherche de Normandie — PRISMM Recherche et Innovation en Spectrométrie de Masse et Métabolomique — Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse unicancer NORMANDIE - CAEN