

Etude épidémiologique consolidée par des approches à haut débit utilisant la spectrométrie de masse à ultra haute résolution – Recherche et validation structurale des biomarqueurs du risque cardiovasculaire

1. Contexte et Objectifs

Les produits du métabolisme sont influencés dans leur composition par des facteurs génétiques et environnementaux et constituent donc la représentation la plus proche, à un instant donné, du phénotype moléculaire.¹ En conséquence, ces dernières années, les approches globales telles que la métabolomique sont devenues prépondérantes dans le domaine de la santé, la nutrition, et plus généralement, de la physiopathologie. La métabolomique vise à révéler des changements métaboliques provoqués par un stress ou une maladie ou encore l'exposition à des polluants environnementaux. Cette approche pluridisciplinaire conjugue plusieurs techniques comprenant la chimie analytique, l'analyse statistique ou la chimiométrie et la biologie. Elle implique notamment l'utilisation de méthodes analytiques sensibles et robustes dont généralement le couplage de la chromatographie (liquide ou gazeuse) et de la spectrométrie de masse (GC/MS ou LC/MS).² Ces méthodes GC/MS ou LC/MS permettent la caractérisation la plus exhaustive et la plus sensible possible des échantillons biologiques très complexes, mais sont limitées par leur débit avec des durées d'analyse de quelques minutes à quelques dizaines de minutes auxquelles s'ajoutent des limitations techniques (effets mémoires, dégradation des conditions expérimentales au long d'un grand nombre d'analyses...). L'équipe CSOB (partenaire 1) a privilégié le développement d'approches à haut débit par introduction directe, permettant de réduire significativement le temps d'analyse, mais au détriment de l'exhaustivité de la détection des ions. Néanmoins quand elle est combinée à la spectrométrie de masse à très haute résolution (par exemple avec l'utilisation d'un instrument de type FT-ICR), elle permet la séparation des composés selon les mesures précises des valeurs m/z .^{3,4,5}

Ainsi dans le cadre du doctorat de B. Habchi (2014-2017), l'analyse par introduction directe dans un instrument FT-ICR a été effectuée à partir d'échantillons d'urines diluées de la cohorte NESCAV (« Nutrition, Environment and Cardiovascular Health ») constituée pour étudier le risque cardiovasculaire en lien avec le risque environnemental (exposition aux contaminants, modes de vie, habitudes alimentaires). Une étude préliminaire a déjà démontré en termes de répétabilité et de robustesse, la qualité des empreintes spectrales obtenues.⁶ Néanmoins, ces approches produisent de

¹ O. Fiehn. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, 2002. 48, 155.

² I.D. Wilson, R. Plumb, J. Granger et al. HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics. *J. Chromatogr. B.*, 2005, 817, 67.

³ S. Alves, E. Rathahao-Paris and J.-C. Tabet. Potential of Fourier Transform Mass Spectrometry for high throughput metabolomics analysis. Pages 219-302. In *Advances in Botanical Research*, Vol. 67: Metabolomics coming of age with its technological diversity. (2013). Ed. Rolin, Dominique.

⁴ B. Habchi, S. Alves, A. Paris, et al. How to really perform high throughput metabolomics analyses efficiently? *TrAC Trends in Anal. Chem.*, 2016, 85:128.

⁵ E. Rathahao-Paris, S. Alves, C. Junot and J.-C. Tabet. High resolution mass spectrometry for structural identification of metabolites in metabolomics. *Metabolomics*, 2016, 12(1):1

⁶ B. Habchi, S. Alves, D. Jouan-Rimbaud Bouveresse, et al. Potential of dynamically harmonized Fourier transform ion cyclotron resonance cell for high throughput metabolomics fingerprinting: control of data quality. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, 410, 483.

grands jeux de données complexes, nécessitant l'apport d'outils bio-informatiques pour traiter ces données, pour en extraire l'information la plus pertinente possible. Récemment, l'analyse statistique sans *a priori* par PCA a permis de révéler l'exposition à des médicaments tels que la metformine ou le sotalol, utilisés respectivement dans des cas de diabète de type 2 ou des cas d'arythmie cardiaque, exposition confirmée par l'examen des métadonnées épidémiologiques.

Ce projet prévoit d'exploiter les empreintes spectrales de la cohorte afin de mettre en évidence des perturbations possibles du métabolisme en lien avec le risque environnemental. Ces travaux constitueront une preuve de concept que la métabolomique établie par des approches à haut débit (de l'ordre de 400 à 500 échantillons phénotypés par 24 h) et à ultra haute résolution permet d'accéder à un phénotypage détaillé et, ainsi, de révéler l'hétérogénéité des populations étudiées, ce qui *in fine* permet d'atteindre une précision importante dans le diagnostic de maladies, cette précision ultime étant le fer de lance de la médecine personnalisée (théranostique).

2. Planning prévisionnel du projet doctoral :

	Objectifs	Retombées attendues
1 ^{ère} année	• Formation aux analyses statistiques multivariées (3 mois) • Approches statistiques exploratoires PCA, OPLS, analyses en composantes indépendantes... appliquées aux données complexes obtenues par FT-ICR (6-12 mois)	• Mise en évidence de variables métabolomiques d'intérêt
2 ^{ème} année	• Développement des méthodes analytiques sophistiquées pour l'identification des biomarqueurs métaboliques (6-12 mois) • Etude corrélative des métadonnées pour la validation des biomarqueurs métaboliques (3 mois)	• Caractérisation structurale des biomarqueurs métaboliques candidats.
3 ^{ème} année	• Reconstruction des réseaux métaboliques perturbés en lien avec la caractérisation de l'exposome détecté dans la cohorte (3-6 mois) • Rédaction de la thèse (3-4 mois)	• Mise en évidence de liens fonctionnels entre la signature métabolique de certains traits physiopathologiques et l'état d'exposition à des facteurs externes (exposome)

Au cours du travail de thèse, les aspects suivants seront développés :

- La validation de méthodes d'analyse rapide et à haut débit (fondée sur la reproductibilité, sensibilité, ...) pour produire des empreintes analytiques de qualité.
- L'optimisation des outils de traitement des empreintes spectrales
- L'exploitation des données complexes pour la détection de « signatures de présence de xénobiotiques » en utilisant des outils bio-informatiques sophistiqués
- La caractérisation structurale des marqueurs grâce à l'utilisation de la base de données créée. L'instrument FT-ICR sera utilisé pour caractériser des composés inconnus grâce à la détection de structures fines indiquant la présence d'isotopes naturels, corollaire d'une détermination précise de la composition élémentaire. La mobilité ionique sera aussi utilisée en complément pour l'identification rapide de marqueurs métaboliques (appareil TIMSTof disponible dans l'équipe CSOB).

Ce projet doctoral permettra à l'étudiant d'acquérir de solides compétences dans le domaine de l'analyse par spectrométrie de masse (différentes techniques seront utilisées comme FT-ICR, TIMSTof, LC/MS et/ou des expériences MS/MS....) conjointe à l'analyse statistique multivariée et la bio-informatique.

3. Intérêt de la collaboration entre les partenaires

Ce projet collaboratif propose le développement d'une approche originale mettant en œuvre la complémentarité des compétences interdisciplinaires des domaines de la chimie analytique, de la bio-informatique et de la biologie.

Partenaire 1. Equipe Chimie Structurale Organique et Biologique (CSOB) de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM UMR 8232), Sorbonne Université : La recherche appliquée et le développement de méthodologies innovantes en spectrométrie de masse constituent un axe de recherche majeur du directeur de thèse S. Alves. Depuis 10 ans, les travaux de recherche ont été menés en métabolomique (point-clef HCERES 2017 de l'unité). Ainsi en 2020, S. Alves a obtenu le financement d'un projet scientifique collaboratif (ANR), nommé CHIRAMICS dédié à l'analyse de métabolites chiraux par couplage de la mobilité ionique et de la MS/MS. L'équipe CSOB, reconnue pour son expertise dans le domaine de l'instrumentation par spectrométrie de masse, possède un parc instrumental varié et de pointe, dont deux instruments de très haute résolution (FT-CR et Orbitrap) ainsi qu'un instrument équipé de la séparation par mobilité ionique (TimsTOF). L'équipe est partenaire des infrastructures nationales telles que MetaboHUB, dédiée aux développements en métabolomique et fluxomique ainsi que la fédération de recherche FT-ICR (FR 3624) dont la mission est d'offrir à la communauté scientifique une expertise en technologie FT-ICR. Une collaboration est également prévue avec Dr. Estelle Rathahao, ingénieure de recherches du Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire (LIAA) de l'UMR CEA-INRAE Médicaments et Technologies pour la Santé (UMR MTS, CEA de Saclay), accueillie à temps partiel dans l'équipe CSOB.

Partenaire 2. Equipe Biochimie des Interactions Métaboliques (BIM), UMR 7205 Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes (MCAM), CNRS/Muséum national d'Histoire naturelle (MNHN) – Département Adaptation du Vivant (AVIV) : Le développement de méthodes analytiques et chimiométriques constituent l'axe principal des recherches en métabolomique portées au sein de l'équipe BIM de l'UMR 7245 – MCAM du Muséum national d'Histoire naturelle par le Pr Alain Paris. Elles visent à mieux caractériser dans le domaine de l'écotoxicologie la part de l'exposome d'origine chimique ou microbienne dans la perturbation du fonctionnement métabolique d'espèces-cibles (poissons, mousses forestières). En parallèle, la caractérisation métabolomique dans un contexte épidémiologique de l'origine de l'hétérogénéité métabolique de sous-populations de sportifs réputés « normales » pour la cortisolémie ou la testostéronémie a montré la puissance du couplage des investigations métabolomiques et chimiométriques. Ces méthodes génériques sont actuellement utilisées dans un projet ANR (MOPSEA, 2022-2025) pour caractériser la métamorphose de larves de cnidaires (modèles méduse et corail) en fonction de paramètres fonctionnels ou environnementaux.