

Métabolomique environnementale:

définition et applications

- **Application des approches métabolomiques pour caractériser le métabolisme d'organismes, vivant dans un environnement**
 - Naturel, perturbé ou non
 - Artificiel (laboratoire reproduisant les conditions d'un milieu)
- **Ceci permet de se faire une représentation de l'état de santé :**
 - d'un organisme ou d'une population
 - du milieu (normal ou perturbé)
- **Les perturbations étudiées sont principalement les:**
 - Stress biologiques (maladies...)
 - Stress chimiques (toxicité aiguës ou chroniques...)
 - Stress physiques (températures, rayonnement...)

L'échantillonnage (1):

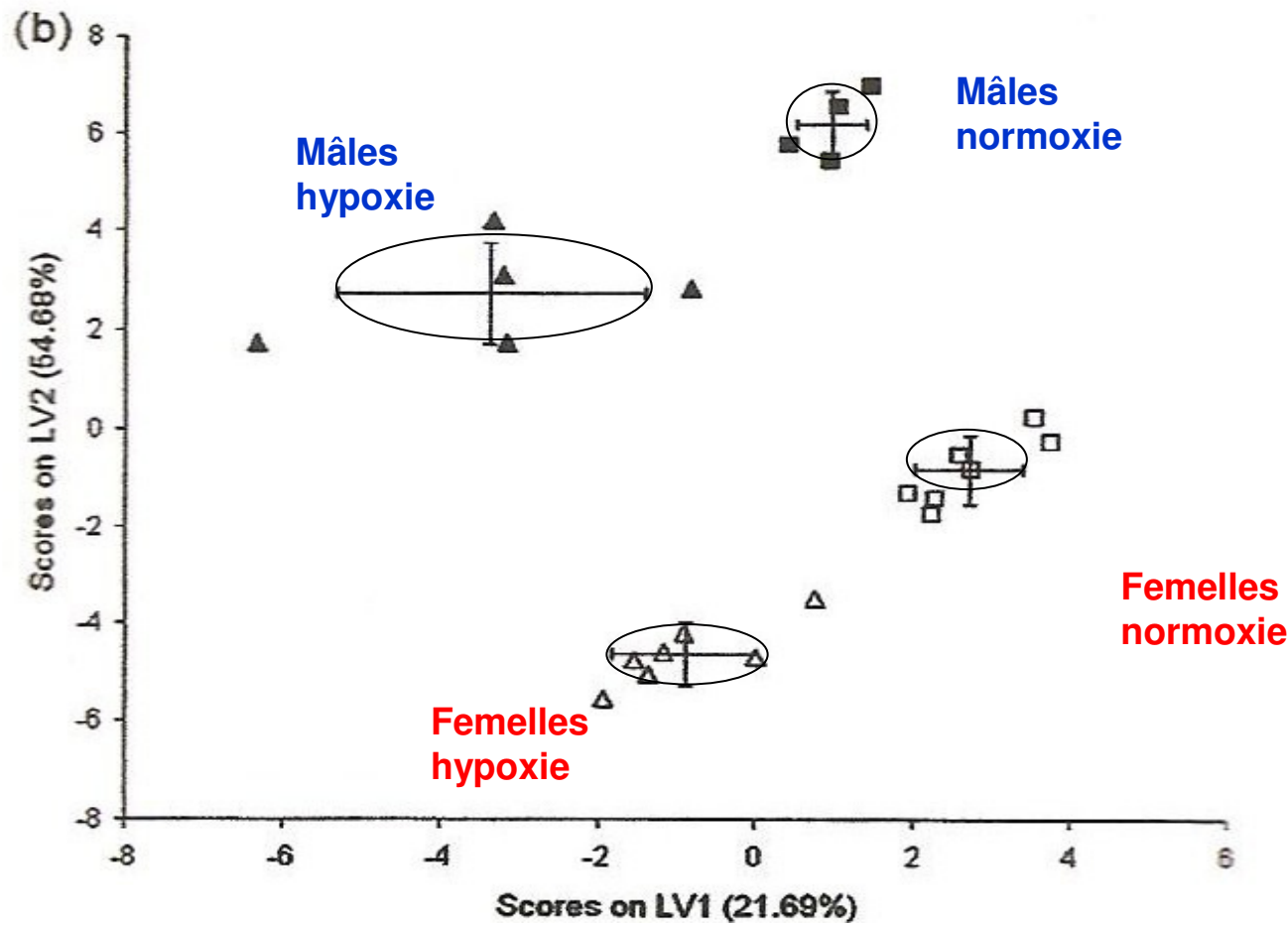
un point important à considérer

- **Variabilité d'un individu à l'autre dans une population sauvage**
 - Variabilité génétique (populations /lignées pures)
 - Variabilité locales (températures, nourriture ...)
 - Variabilité due à l'âge
 - Variabilité physiologiques (sexe, maladies...)
- **Ceci introduit un bruit de fond biologique qui peut masquer des différences métaboliques entre individus:**
 - en « bonne santé »
 - ou « stressés »
- **Ce sont des points très important pour lesquels souvent on manque de données fiables**

L'échantillonnage (2) *ex: moules et hypoxie*

- **La moule** (*Mytilus galloprovincialis*) animal filtreur (sentinelle) sédentaire: très utilisé pour suivre les atteintes à l'environnement des côtes et estuaires
- **Question:** est ce que la connaissance du phénotype (sexe, âge) est indispensable pour l'interprétation des données métabolomiques?
- **Protocole expérimental: choc hypoxique** (A. Hines et al. 2007):
 - 14 moules prélevées après 2 hrs hors de l'eau (marée basse)
 - 14 moules prélevées en même temps et maintenues immergées 2 hrs
 - Prélèvement du manteau, du muscle adducteur et des branchies (N2 liq.)
 - Analyse histologique du manteau pour le sexage
 - RMN-H1

L'échantillonnage (3) *ex: moules et hypoxie*



analyses en composantes principales

L'échantillonnage (4):

Importance de la saison de prélèvement

ex: moules et hypoxie

metabolites	Port Quin		Southampton	
	mâle/femelle	p	mâle/femelle	p
Glycine	4,27	<0,0001	4,35	<0,005
Phosphoarginine	3,01	<0,0001	1,83	<0,005
Glutamate	1,98	<0,0001	1,55	<0,0001
Lysine	0,79	<0,05	1,42	<0,226
Tyrosine	0,65	<0,0001	1,32	<0,408
Acetoacetate	0,50	<0,0001	0,56	<0,111

Port Quin: ramassage un seul jour en juillet

Southampton: 4 ramassages entre avril et juillet

Conclusions:

tenir compte des traits génétiques (espèces) et phénotypiques (sexe) et du cycle de vie (développement), sont des conditions minimales à respecter

Toxicologie environnementale:

Une méthodologie plus performante (1)

***ex: Toxicologie du Pyrène (hydrocarbure polycyclique)
sur *Lombricus rubellus****

OAH. Jones, Chemosphere 2008

- **Conditions expérimentales**
 - Sol contaminé au laboratoire
 - Doses de toxique: 0, 10, 40, 160, 640 mg/kg de sol
 - Incubation des lombrics: 42 jours
- **Analyses effectuées sur les lombrics**
 - Mortalité
 - Activité de nourrissage
 - Croissance..
 - RMN-H1 et GC-MS

Toxicologie environnementale:

Une méthodologie plus performante (2)

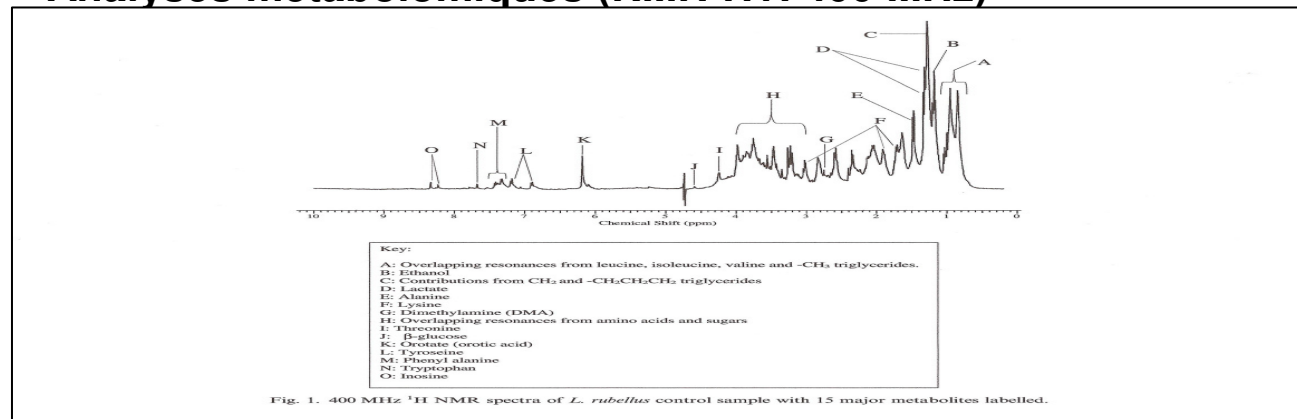
*ex: Toxicologie du Pyrène (hydrocarbure polycyclique)
sur *Lombricus rubellus**

- **Résultats:**

- Toxicologie classique

- Témoin: pas de mortalité et activité de nourrissage OK
 - 10 et 40 mg/Kg: mortalité < à 10 % et nourrissage OK
 - 160 et 640 mg/kg: mortalité significative et nourrissage en baisse

- Analyses métabolomiques (RMN-H1: 400 MHz)



Toxicologie environnementale:

Une méthodologie plus performante (3)

***ex: Toxicologie du Pyrène (hydrocarbure polycyclique)
sur *Lombricus rubellus****

- **Résultats de métabolomique**

- **Différences significative dès 40 mg/kg au lieu de 160mg/kg**
- **La perturbation du métabolisme du lombric est caractérisée par:**
 - **Forte baisse du lactate et des acides gras insaturés**
 - **Forte augmentation de certains acides aminés
Alanine, leucine, valine, isoleucine**
- **Cette accumulation d'acides aminés suggère une fonte des muscles; les acides aminés étant utilisés pour la néoglucogenèse, ainsi que le lactate.**

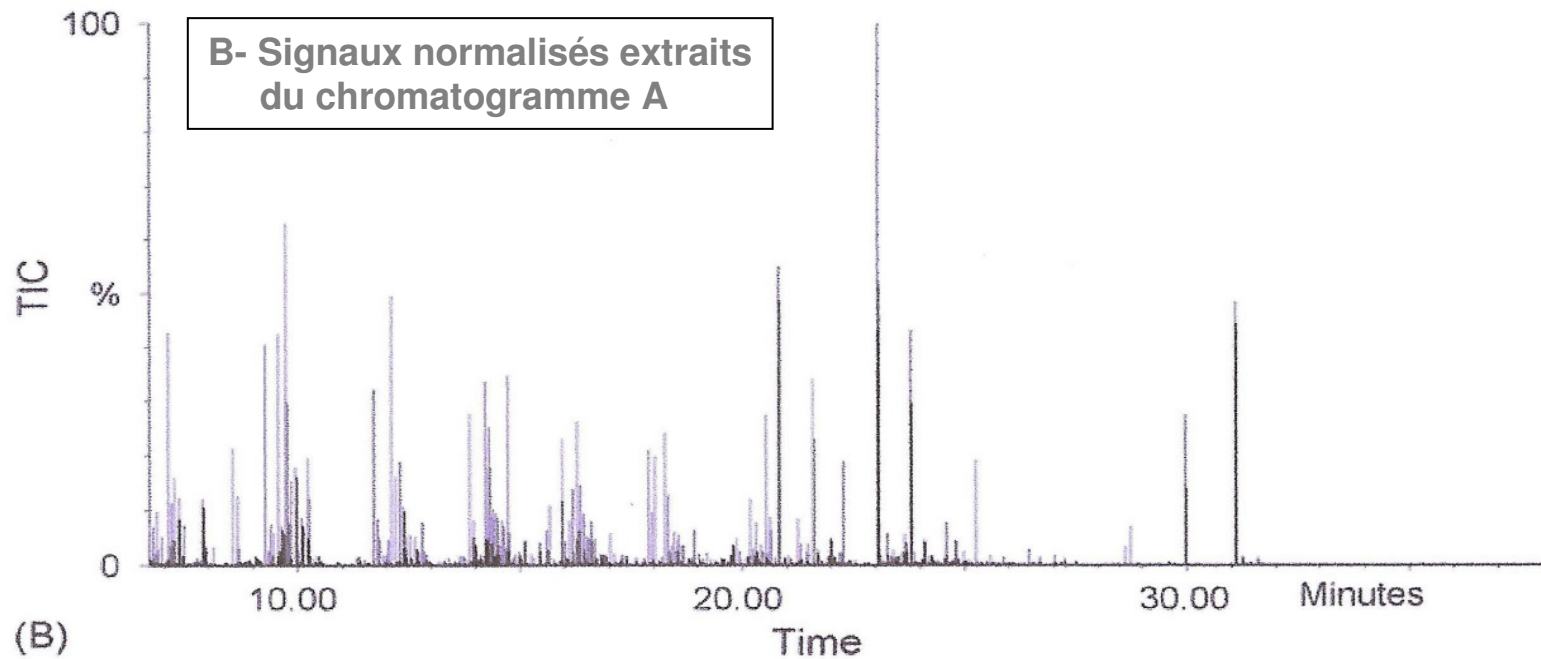
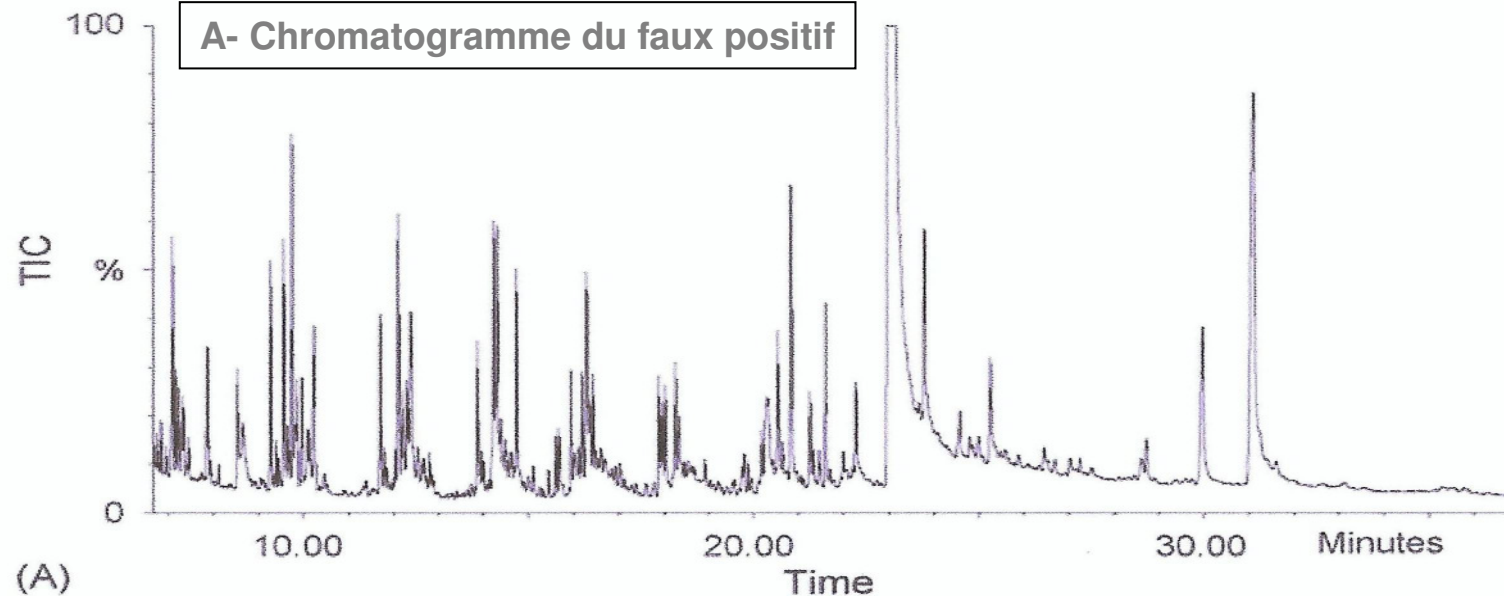
Recherche non ciblée de contaminants (1)

Lommen et al, 2007

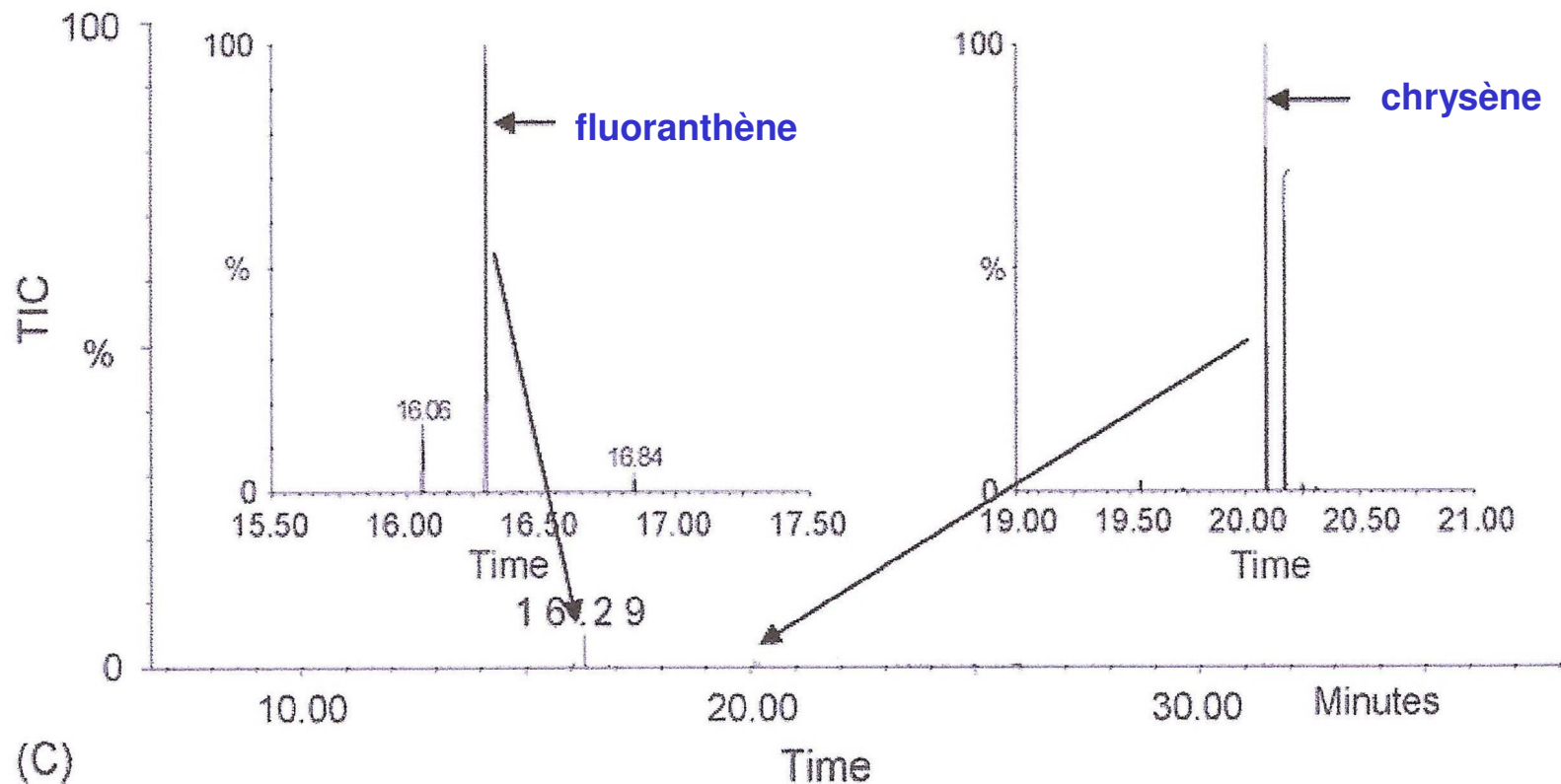
- **Contexte:** faux positif dans un extrait de plantes herbes de prairies) révélant une molécule du groupe des **dioxines** (test: DR CALUX)
 - 2 extraits témoins et 5 extraits non positifs)
- **Objectifs:** 1- extraire du bruit de fond du chromatogramme (GC-MS-TOF) le signal correspondant à une molécule inconnue a priori et n'étant pas une dioxine
 - 2- identifier la ou les molécule(s)
- **Technique:** utilisation du logiciel « metAlign » (utilisation libre) de traitement automatique de signaux
 - L'astuce est de soustraire du profil GC-MS tous les signaux provenant de la matrice (ici un extrait de plantes témoin et des échantillons non positifs)

Recherche non ciblée de contaminants (2)

Lommen et al, 2007



**C- Signaux sélectionnés du chromatogramme B
après soustraction des signaux de la matrice**



- **Fluoranthène** et **chrysène** sont des hydrocarbures polycycliques
le chrysène est connu pour être actif dans le bio-essai alors que le fluoranthène est inactif
- L'identification du composé se fait grâce aux bases de données
- Un contre test révèle effectivement la présence de ces 2 molécules dans l'extrait

Illustration de la gestion de la complexité:

un cas simple: Arabidopsis thaliana

JJB Keurentjes et al., Nature Genetics 2006

- **Analyse par LC-QTOF-MS**
 - 14 accessions du monde entier
 - **Un croisement étudié** (*Cape verde island x Landsberg erecta*)
 - 160 lignées fixées (>10génération)
- **Résultats sur les 14 accessions**
 - 2475 métabolites identifiés dans les 14 accessions, mais:
 - 1337 pour la plus riche (*Cape verde island*)
 - 826 pour la plus pauvre (*Columbia*)
 - 331 métabolites communs aux 14 accessions
 - 706 métabolites uniques à une accession
 - 235 pour la plus riche (*Cape verde island*)
 - 14 pour la plus pauvre (*Bay-0*)
- **Résultats sur le croisement (*Cvi x Ler*)**
 - 2129 métabolites détectés dont 853 absents des parents

La métabolomique environnementale

Forces, Faiblesses, Opportunités, Menaces (SWOT)

MG Miller, 2007

• Forces

- Les petites molécules sont effectivement la marque ultime des régulations génétiques
- Technologies matures
- Profil métabolique intelligible: recherche poussée par la découverte
- Possibilité de définir le normal du pathologique
- Comparaison entre laboratoire et données de terrain
- Développement de biomarqueurs d'effets

• Faiblesses

- Manque de bases de données d'identification des molécules
- Manque de software d'identification automatique et de quantification
- Des toxiques mineurs mais important peuvent ne pas être vus
- Difficile de séparer les causes de la toxicité des conséquences des dommages

La métabolomique environnementale:

Forces, Faiblesses, Opportunités, Menaces (SWOT)

MG Miller, 2007

• Opportunités

- Biomarqueurs prédictifs de pathologies
- Utilisation de profils métabolomique d'organismes sentinelles pour prévoir des effets éventuels sur l'être humain
- Utilisation d'OGM biens définis pour l'étude de la régulation du métabolisme
- Intégrer cette technologie avec analyse du génome et du protéome

• Menaces

- Cette technologie tiendra-t-elle ces promesses?
- Que faire avec cette avalanche de données?
- Faut-il utiliser une Ferrari lorsque une 2 CV est suffisante?
- Est-ce qu'un changement métabolique renseigne nécessairement sur la toxicologie?
- Qu'est-ce qu'un métabolome normal, pour un être humain, un rat ou un poisson?
- Est-ce que les agences de réglementation utiliseront ces données?