

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE • 3MPL

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Etude de profils métaboliques dans les cellules de culture humaines par spectroscopie isotopique : application pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie analytique

Présentée

et soutenue publiquement par

Estelle MARTINEAU

Le 25 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Président	Mme Laurence LE MOYEC, <i>professeur</i> • Université d'Evry Val d'Essonne
Rapporteurs	Mme Isabelle BILLAULT, <i>maître de conférences</i> • Université de Paris-sud 11 M. François SEGUIN, <i>professeur</i> • Université de Poitiers
Directeur de thèse	M. Serge AKOKA, <i>professeur</i> • Université de Nantes
Co-encadrants de thèse	Mme Illa TEA, <i>maître de conférences</i> • Université de Nantes M. Patrick GIRAUDEAU, <i>maître de conférences</i> • Université de Nantes

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe EBSI (Elucidation de Biosynthèse et Spectrométries Isotopiques) du laboratoire CEISAM (Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation). Je remercie son directeur, M. Bruno BUJOLI, de m'y avoir accueillie.

Je remercie tout particulièrement M. Serge Akoka, directeur de cette thèse, pour sa disponibilité, son enthousiasme communicatif et pour les connaissances qu'il a pu m'apporter au cours de ces dernières années.

Je tiens également à remercier Mme Illa TEA d'avoir co-encadré cette thèse. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour le soutien que tu m'as apporté tout au long de cette thèse.

Je remercie également M. Patrick GIRAUDEAU, co-encadrant de cette thèse, pour sa sympathie, sa disponibilité, son humour et son écoute.

Je remercie vivement Mme Isabelle BILLAULT et M. François SEGUIN de m'avoir fait l'immense honneur d'accepter le travail de rapporteurs. Je remercie également Mme Laurence LE MOYEC d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier Mme Sophie Nion-Barillé et M. Vehary Sakanyan pour nous avoir fourni les lignées cellulaires de cancer du sein ainsi que des données sur celles-ci.

Un grand merci à Grégory LOAEC, sympathique stagiaire que j'ai eu la chance de co-encadrer au cours de cette thèse, pour avoir contribué activement (et toujours en chanson) à l'avancée des travaux sur les extractions et sur la SMRI.

Un grand merci également à Ingrid ANTHEAUME pour sa sympathie et pour avoir effectué une partie des manipulations et des analyses pour la SMRI. Bon courage avec les cellules !!!

Merci beaucoup à Virginie SILVESTRE et Benoît CHARRIER pour leur aide dans l'utilisation des spectromètres. Encore merci Virginie pour ta gentillesse, ta bonne humeur, pour le temps que tu as pu me consacrer et toute l'écoute dont tu as fait preuve à mon égard.

Merci à tous les membres de l'équipe EBSI et de l'équipe IMF du bâtiment 9 pour votre accueil et votre gentillesse. Un grand merci également à tous les thésards et stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer pour avoir égayé ces trois années par votre sympathie et votre bonne humeur communicative : Alexis, Eliot, Kasia, Kouamé, Ugo, Grégory, ...

Je remercie chaleureusement tous mes amis pour leur affection et le soutien sans faille qu'ils m'apportent depuis tant d'années : mon Hélène, Amandine et Jluç, Franfinou et Mathieu, Marie, Anne-Charlotte, Anaïs et Tudual, Anaïs, Romain,... Mention spéciale à Anaïs et Anne-Cha pour vous être proposées pour relire ce manuscrit, ainsi qu'à Amandine et Marie pour avoir lancé le concept « soirée pizza-répétition de soutenance » !!!

Enfin, je remercie du fond du cœur ma mère, ma sœur Marion, mon beau-père et toute ma famille qui m'a toujours soutenue et sans qui je ne serai pas là aujourd'hui.

Notations et Abréviations

A	Abondance isotopique
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AE-SMRI	Analyseur Elémentaire couplé à un Spectromètre de Masse de Rapports Isotopiques
APC	Acide PerChlorique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATC	Acide TriChloroacétique
BIRD	Bilinear Rotation Decoupling
COSY	COrrrelation SpectroscopY
COSY-DQF	COrrrelation SpectroscopY with Double Quantum Filter
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CV	Coefficient de Variation
δ	Déviation isotopique
d_1	Délai de récupération
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNP	Dynamic Nuclear Polarization
D-PBS ou PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Oestrogen Receptor
ERETIC TM	Electronic REference To access <i>In vivo</i> Concentrations
FID	Free Induction Decay
GB	Gaussian Broadening
GC-C-SMRI	Chromatographie gazeuse couplée à un four à combustion et couplée à un spectromètre de masse de rapports isotopiques

GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
Her2 (ou ErbB2)	Human epidermal growth factor receptor 2
HR-MAS	High Resolution Magic Angle Spinning
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
LB	Line Broadening
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
ns	Number of scans, ou nombre d'accumulations
PBS	Phosphate Buffer Solution
PLS	Partial Least Square
PR	Progesterone Receptor
R	Rapport isotopique
R ²	Coefficient de détermination
r_c	Rapport des concentrations
RF	RadioFréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	Rotation par minute
r_v	Rapport du volume des pics 2D
SDM ou SM	Spectrométrie De Masse
SMRI	Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques
SNIF-NMR	Site-specific Natural Isotope Fractionation measured by Nuclear Magnetic Resonance
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T	Température
T ₁	Temps de relaxation longitudinale
TD ₁	Nombre de points du FID dans la dimension 1 en RMN 2D

TOCSY T^Otal Correlation Spectroscop^Y

ZQF-TOCSY Zero-Quantum Filtered T^Otal Correlation Spectroscop^Y

REMERCIEMENTS	2
NOTATIONS ET ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	11
PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE	13
1 LES OUTILS ANALYTIQUES "OMIQUES"	13
1.1 GENOMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE	13
1.2 PROTEOMIQUE.....	16
1.3 METABOLOMIQUE ET METABONOMIQUE	17
1.3.1 Définitions	17
1.3.2 Principe de l'étude	17
1.3.3 Etat des lieux des études métabolomiques par spectrométrie de masse	19
1.3.4 Etat des lieux de la RMN métabolomique et métabonomique	20
1.3.5 Intérêts relatifs de la spectrométrie de masse et de la RMN	24
2 L'ANALYSE ISOTOPIQUE	25
2.1 EFFETS ISOTOPIQUES ET FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE	25
2.2 ETAT DES LIEUX DES TECHNIQUES EXISTANTES.....	27
2.2.1 En milieu enrichi en isotopes stables	27
2.2.2 En abondance naturelle	27
2.3 LES APPLICATIONS DE L'ANALYSE ISOTOPIQUE	28
2.3.1 Avantages de l'utilisation des isotopes stables	28
2.3.2 Avantages de l'analyse isotopique	29
2.3.3 Applications	29
3 LA RMN 2D QUANTITATIVE	32
3.1 PRINCIPE DE LA RMN 2D.....	32
3.2 QUELQUES TECHNIQUES DE RMN 2D	33
3.2.1 Spectroscopie J-résolue	33
3.2.2 COSY et COSY-DQF (CORrrelated SpectroscopY-Double Quantum Filtered)	34
3.2.3 TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)	35

3.2.4	INADEQUATE	35
3.2.5	HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)	36
3.3	INTERET DE LA RMN 2D POUR L'ANALYSE QUANTITATIVE	36
3.4	INCONVENIENTS DE LA RMN 2D POUR L'ANALYSE QUANTITATIVE	37
3.5	RMN 2D QUANTITATIVE APPLIQUEE AUX MILIEUX COMPLEXES	38

PARTIE 2 : OPTIMISATION DE LA RMN 2D QUANTITATIVE POUR L'ETUDE DE MILIEUX COMPLEXES **41**

1	INTRODUCTION	41
2	ETUDE PRELIMINAIRE	41
2.1	PREPARATION DE L'ECHANTILLON	42
2.2	PARTIE EXPERIMENTALE	42
2.3	RESULTATS ET DISCUSSION	43
3	MISE AU POINT D'UNE METHODE RAPIDE DE RMN 2D QUANTITATIVE POUR L'ETUDE DES CELLULES DU CANCER DU SEIN	47
3.1	CHOIX DE LA SEQUENCE DE RMN 2D	47
3.1.1	Préparation de l'échantillon	47
3.1.2	Optimisation de la séquence INADEQUATE symétrisée proton	47
3.1.3	Réduction du temps d'expérience	51
3.2	EVALUATION ANALYTIQUE DE L'INADEQUATE SYMETRISEE PROTON	56
3.2.1	Préparation des échantillons et conditions d'acquisition	56
3.2.2	Résultats et discussion	56
3.3	APPLICABILITE A UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE	59
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	60

PARTIE 3 : CHOIX D'UNE PROCEDURE D'EXTRACTION POUR L'ANALYSE METABOLOMIQUE PAR RMN DE CELLULES DE CANCER DU SEIN **62**

1	INTRODUCTION	62
2	STRATEGIE DE SELECTION DE LA METHODE D'EXTRACTION ET APPLICATION AUX LIGNEES DE CANCER DU SEIN	64
2.1	ETUDE PRELIMINAIRE	64

2.2	MATERIELS ET METHODES.....	66
2.2.1	Culture cellulaire	66
2.2.2	Méthodes d'extraction	66
2.2.3	Paramètres d'acquisition et de traitement RMN	67
2.2.4	Analyses statistiques des données RMN	68
2.3	RESULTATS ET DISCUSSION	68
2.3.1	Analyse des spectres RMN	69
2.3.2	Efficacité des différents protocoles d'extraction	72
2.3.3	Evaluation du protocole d'extraction pour l'analyse métabolomique de lignées de cancer du sein	75
3	CONCLUSION ET PERSPECTIVES _____	77
PARTIE 4 : APPLICABILITE DE L'INADEQUATE-¹H SUR DES EXTRAITS CELLULAIRES		79
1	INTRODUCTION _____	79
2	MATERIELS ET METHODES _____	80
3	RESULTATS ET DISCUSSION _____	81
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES _____	85
PARTIE 5 : DISCRIMINATION DE CELLULES DE CANCER DU SEIN PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE RAPPORTS ISOTOPIQUES		87
1	INTRODUCTION _____	87
2	MATERIELS ET METHODES _____	88
2.1	CULTURE CELLULAIRE	88
2.1.1	Cellules	88
2.1.2	Milieux de culture	90
2.1.3	Récupération des cellules	91
2.1.4	Extractions des lipides, des métabolites solubles, des protéines et de l'ADN	91
2.2	ANALYSES PAR SMRI	92
3	RESULTATS ET DISCUSSION _____	94

3.1	CELLULES ENTIERES.....	94
3.2	D'OU POURRAIT PROVENIR LE FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE DES CELLULES ?.....	98
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES _____	100
	CONCLUSION GENERALE	102
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	104
	LISTE DES FIGURES	116
	LISTE DES TABLEAUX	119
	PRODUCTION SCIENTIFIQUE	120
	ANNEXES	121
1	CYCLES DE PHASE COMPLET ET PARTIELS DE L'INADEQUATE-¹H SYMETRISEE	121
2	TAUX DE RECOUVREMENT POUR LA LIGNEE SKBR3 _____	122
3	TAUX DE RECOUVREMENT POUR LA LIGNEE MCF-7 _____	123

Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme [1]. Grâce aux progrès thérapeutiques et à un dépistage précoce, le taux de mortalité dû à ce cancer a diminué ces dernières années. Le développement d'outils diagnostiques est devenu un enjeu majeur afin de pouvoir détecter cette pathologie le plus tôt possible. Les principaux outils de diagnostic sont la mammographie et la biopsie. Ensuite, une fois que le cancer est dépisté, la caractérisation de celui-ci est réalisée par histologie (analyse des tissus biologiques) afin de déterminer des biomarqueurs (quantité de récepteurs à œstrogène, à progestérone, ...) qui soient représentatifs du type de cancer du sein et de relier ces informations à un traitement précis. Depuis une trentaine d'années, de nouveaux outils de diagnostic sont mis au point, dans le cadre de l'étude des gènes [2] ou des protéines [3], afin de découvrir de nouveaux biomarqueurs caractéristiques du cancer. Plus récemment, l'étude des métabolites en milieux complexes ou métabolomique [4] a connu un essor important en chimie analytique : ainsi, de nombreuses études ont été réalisées, notamment par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à une ou deux dimensions [5-7] et par Spectrométrie de Masse des Rapports Isotopiques (SMRI) [8-10], pour identifier des biomarqueurs spécifiques des problèmes étudiés et établir des profils isotopiques.

Cependant, la SMRI n'a jamais été envisagée jusqu'à maintenant pour différencier des cellules de cancer du sein ou pour tenter d'établir une relation entre la composition isotopique en abondance naturelle de ces cellules et l'état de la pathologie. En ce qui concerne la RMN métabolomique, celle-ci se limite généralement à l'identification des métabolites, notamment dans le cadre d'études par RMN unidimensionnelle [11, 12] : en effet, les recouvrements des signaux dus au nombre important de métabolites rendent difficiles leur quantification. Une alternative serait alors l'utilisation de la RMN bidimensionnelle [13-15] mais celle-ci se caractérise par de longues durées expérimentales qui restreignent son usage à des fins quantitatives [16].

L'objectif de cette thèse est donc d'établir des profils isotopiques de cellules de cancer du sein par Spectrométrie de Masse des Rapports Isotopiques et de mettre au point une méthode d'analyse rapide et quantitative par Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle afin d'établir un lien entre les profils métaboliques et isotopiques de ces cellules.

Dans un premier temps, les notions théoriques nécessaires à la compréhension de notre démarche seront présentées. Ensuite, l'utilisation de ces deux techniques spectroscopiques sera étudiée afin de différencier les cellules de cancer du sein.

Les parties concernant la RMN aborderont différents points : tout d'abord, les potentialités des techniques de RMN 2D existantes seront évaluées afin de déterminer la séquence qui permettra la quantification rapide et précise des métabolites. Pour cela, une optimisation de la durée d'expérience sera effectuée : en effet, celle-ci est conditionnée essentiellement par deux paramètres qui sont le nombre d'accumulations, permettant d'avoir un rapport signal-sur-bruit

suffisant, et le nombre d'incrémentes dans la première dimension, nécessaire pour avoir des spectres correctement résolus. Avant de pouvoir appliquer la séquence sélectionnée et optimisée sur des métabolites intracellulaires, une optimisation de la méthode d'extraction de ces composés devra être effectuée afin de s'assurer qu'un maximum de métabolites sera récupéré en quantité suffisante. Une stratégie basée sur l'utilisation de la RMN 1D métabolomique permettra de comparer l'efficacité de plusieurs protocoles d'extraction. Enfin, l'application combinée de la méthode d'extraction sélectionnée et de la séquence RMN 2D optimisée sera réalisée sur quelques lignées cellulaires de cancer du sein.

En SMRI, nous déterminerons les profils isotopiques des atomes de carbone et d'azote contenus dans des cellules issues de différentes lignées cellulaires. Pour ce faire, nous proposerons un procédé analytique permettant de discriminer ces lignées entre elles tout en obtenant des analyses rapides, faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses.

Par la complémentarité des deux techniques analytiques utilisées pour discriminer des lignées de cellules cancéreuses, nous chercherons à comprendre l'origine du fractionnement isotopique des cellules cancéreuses.

Partie 1 : Bibliographie

1 Les outils analytiques "omiques"

Depuis environ une trentaine d'années, de nombreuses sciences « omiques » ont connu un plein essor. Ces nouveaux outils de diagnostic permettent de fournir un grand nombre de renseignements sur le vivant afin, par exemple, de mettre en évidence la complexité de la régulation et des mécanismes cellulaires ou d'apporter des informations sur le fonctionnement des voies métaboliques. Le but de toutes ces techniques est la caractérisation des dysfonctionnements existants, la prévention des maladies et la mise en œuvre de nouveaux traitements. Une partie de ces techniques est regrouper sur le schéma de la Figure 1.

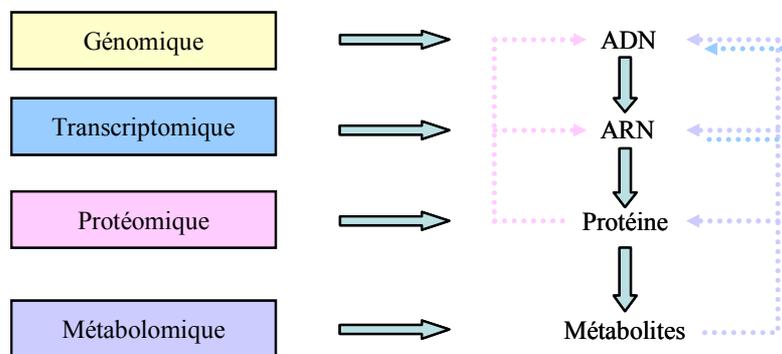


Figure 1 : Techniques de la famille des « omiques » [17].

Cette figure met en évidence l'interdépendance de ces différentes techniques puisqu'en effet, l'ADN code pour les protéines à l'aide de l'ARN messager, qui traduit les informations apportées par les gènes. Les quantités de métabolites et les protéines sont également interdépendantes : les protéines ont une influence sur les profils métaboliques grâce aux réactions enzymatiques dans lesquelles elles entrent en jeu alors que les concentrations en métabolites peuvent affecter l'expression des protéines [18]. Selon les dernières estimations, il y aurait entre 3000 et 20000 métabolites présents dans le corps humain, plus de 100000 protéines et au moins 30000 gènes [19]. Les différents concepts des techniques de la famille des « omiques » seront présentés dans les paragraphes 1.1, 1.2 et 1.3.

1.1 Génomique et Transcriptomique

La génomique est une technique d'analyse décrivant l'ensemble du profil génétique d'un organisme. Ces vingt dernières années, son essor a conduit à une meilleure compréhension et à une caractérisation de différentes pathologies, telles que les cancers, le diabète, etc. par l'établissement de cartes représentant l'ensemble des gènes codés par l'ADN et par

l'identification de nouveaux gènes et la caractérisation de leurs fonctions. Ainsi, ces avancées ont permis l'amélioration des pronostics d'une maladie grâce à une meilleure caractérisation de celle-ci et de son stade de développement, à une amélioration de la compréhension des voies de synthèse et à la mise en place de nouveaux diagnostics préventifs et de stratégies thérapeutiques pour soigner ladite maladie [2].

La transcriptomique, quant à elle, concerne l'étude de l'ARN messager, et plus particulièrement la quantification des messagers présents, des éventuels nouveaux messagers et des brins non-codants. Elle permet donc de déterminer si des changements se sont produits dans l'expression des gènes au niveau de l'ARN : dans ce cas, des traitements vont être mis en œuvre et la transcriptomique permettra de réaliser un suivi de ceux-ci. Ces deux technologies sont assez proches l'une de l'autre, puisque les ARN messager permettent de traduire l'information portée par l'ADN. Cependant, le transcriptome, contrairement au génome, varie en fonction du temps, de l'environnement, du type de cellule, etc. [20].

L'une des technologies utilisée en génomique est la puce à ADN dont le principe de fonctionnement est expliqué Figure 2. Celui-ci est basé sur la complémentarité entre les deux brins d'ADN : la base thymine (T) d'un brin s'apparie avec la base adénosine (A) du second brin et inversement. L'autre couple de bases est constitué de la cytosine (C) et de la guanine (G).

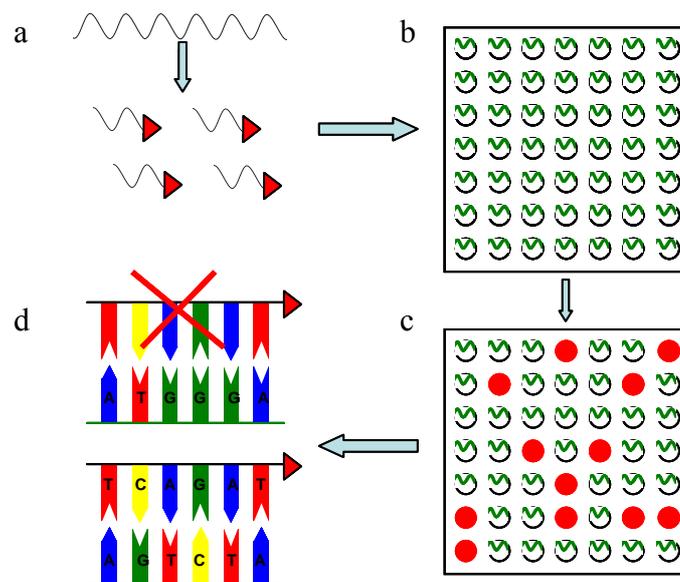


Figure 2 : Principe de fonctionnement d'une puce à ADN a) marquage des brins d'ADN par une molécule fluorescente b) dépôt sur la sonde constituée de brins d'ADN connus c) apparition de spots fluorescents quand les brins s'apparient d) reconstitution des séquences d'ADN par traitement informatique.

Tout d'abord, les brins d'ADN sont séparés puis fragmentés afin de constituer les cibles à analyser. Chaque fragment est ensuite marqué par une molécule fluorescente (symbolisée par la flèche rouge sur la Figure 2a) avant d'être déposé sur une puce (cf. Figure 2b). Celle-ci est constituée d'une surface solide, telle que du verre ou du silicium, sur laquelle sont immobilisés des morceaux d'ADN marqués provenant de banques d'ADN et dont

l'enchaînement des bases est connu. Ces fragments d'ADN sont également appelés sondes et sont clairement repérés par leur position sur la surface solide. Après dépôt des cibles sur la puce, celles-ci vont s'apparier uniquement avec les sondes ayant des enchaînements de bases complémentaires aux leurs. L'hybridation de la sonde avec la cible ainsi que l'intensité de cette hybridation peuvent être visualisées grâce à la fluorescence des cibles : un scanner retranscrit l'image de la puce en niveaux de gris. Ensuite, une coloration plus ou moins forte est attribuée à chaque signal en fonction de son intensité, celle-ci étant proportionnelle à la quantité de cibles appariées avec la sonde. Ainsi, sur la Figure 2c, l'hybridation de la cible avec la sonde conduit à l'apparition d'un spot lumineux rouge. La puce est lavée plusieurs fois afin que seuls les brins parfaitement appariés restent dessus. L'enchaînement de bases des sondes étant connus, un logiciel de traitement informatique permet de reconstituer les brins d'ADN qui se sont appariés [21].

La technologie principalement utilisée en transcriptomique est la puce à ARN dont le principe de fonctionnement est le même que celui de la puce à ADN décrit précédemment, avec cette fois-ci, des fragments d'ARN [22].

Ces puces permettent par exemple de comparer des tissus sains et malades et d'identifier d'où provient le dysfonctionnement, ou bien de réaliser un suivi dans le temps de l'activité cellulaire afin de mieux comprendre les mécanismes de la maladie.

Ces deux techniques présentent cependant certains inconvénients : en effet, elles sont difficiles et lourdes à mettre en œuvre, puisqu'il faut extraire suffisamment de matière (ADN ou ARN messager) pour pouvoir réaliser une analyse sur une puce. Les technologies utilisées coûtent également cher à la fabrication.

De plus, les informations génétiques et transcriptomiques seules sont insuffisantes pour décrire précisément le génome du fait de l'existence d'un réseau complexe d'interactions au sein des cellules. Si on se place à un niveau moléculaire, le fonctionnement cellulaire est très étroitement associé aux activités des protéines. Celles-ci jouent le rôle d'intermédiaire dans la traduction de l'information génétique pour le fonctionnement phénotypique et offrent donc une plateforme idéale pour la caractérisation des activités cellulaires. De plus, la relation entre les gènes et les produits issus des gènes (*i.e.* les protéines) n'est pas linéaire : un gène peut coder pour plusieurs protéines [17]. Enfin, l'expression du profil protéique peut apporter plus d'information sur le fonctionnement d'un organisme que celle du profil transcriptomique car le taux d'ARNm n'est pas toujours corrélé au taux de protéines [23]. Gygi *et al* ont montré que la corrélation entre les taux d'ARNm et de protéines n'est pas suffisante pour prédire le taux d'expression des protéines à partir des mesures quantitatives obtenues sur l'ARNm.

L'accès à la totalité du génome et du transcriptome est donc une condition nécessaire mais insuffisante pour la médecine génomique. En effet, les conséquences des défaillances génétiques doivent être également comprises pour avoir une meilleure vision d'ensemble de l'état de santé d'un patient : il faut donc avoir des informations sur les « produits » des gènes, *i.e.* le protéome et le métabolome. La combinaison de toutes ces techniques permet ainsi de mieux estimer les risques d'une pathologie et d'appliquer le meilleur traitement [2, 4].

1.2 Protéomique

La protéomique concerne l'étude de l'ensemble des protéines, et plus particulièrement la caractérisation et la quantification des protéines exprimées dans les cellules, ainsi que les interactions qu'elles peuvent établir entre elles [3]. Au départ, cette technique était moins bien considérée que la génomique, elle servait uniquement à établir les causes de maladies. Cependant, il a fallu se rendre à l'évidence que la génomique à elle seule ne suffisait pas à comprendre et à traiter les mécanismes moléculaires conduisant à des pathologies (telles que le cancer du sein) [24]. Contrairement au génome, le protéome évolue puisque les taux d'expression des protéines et leur état vont varier dans le temps en réponse à des facteurs et/ou à des perturbations environnementaux.

Une des techniques utilisées pour étudier l'ensemble du protéome est la puce à protéines [25]. Son principe de fonctionnement est proche de celui des puces à ADN et à ARN détaillé au paragraphe 1.1, les sondes étant cette fois-ci constituées de protéines immobilisées sur un support solide. L'étude protéomique se fait en trois étapes. Tout d'abord, il faut extraire les protéines et les séparer les unes des autres afin de préparer les molécules cibles. Pour cela, les protéines sont récupérées à l'aide de solutions de précipitation, après que les échantillons à analyser ont été broyés (tissus, ...) ou lysés (cellules). Les protéines sont ensuite resolubilisées avant d'être séparées par chromatographie en phase liquide ou par électrophorèse 2D (séparation des protéines sur un gel en fonction de leur point isoélectrique). Ensuite, l'analyse se fait par dépôt sur la puce des cibles qui vont interagir avec les sondes. Ces interactions peuvent être mises en évidence à l'aide d'un marqueur fixé sur la cible (mais qui risque de perturber l'arrangement de la protéine cible) ou d'un anticorps secondaire. La détection des interactions se fait soit par un signal radioactif (méthode simple et rapide mais qui impose certaines mesures de sécurité), soit par un signal chimioluminescent (grande sensibilité mais faible stabilité dans le temps), soit par un signal fluorescent (stable et analysable grâce aux scanners développés pour les puces à ADN) [21].

Les puces à protéines permettent de mettre en évidence les changements de structure ou les modifications de population des protéines pouvant mener à une pathologie. Bien que cette technologie coûte plus cher que celle des puces à ADN, elle a l'avantage de pouvoir prédire la structure et la dynamique des protéines, ainsi que les interactions existantes entre elles [26]. Cette technique est globalement moins coûteuse que celle utilisée en génomique. Cependant, cet outil nécessite un gros travail de préparation, notamment pour l'extraction des protéines.

Un premier bilan s'impose : bien que la génomique, la transcriptomique et la protéomique soient des techniques innovantes ayant connu un fort développement ces dernières années, les informations fournies grâce à ces études restent cependant incomplètes pour bien comprendre le mécanisme cellulaire et l'apparition des maladies. De plus, les technologies associées à ces techniques sont coûteuses en termes d'argent et de temps de travail pour préparer et obtenir les échantillons à analyser. Un des inconvénients majeurs de ces techniques est la difficulté à corréliser les changements observés, que ce soit dans l'expression des gènes ou dans le taux de protéines, à des maladies et/ou aux symptômes ciblés, et donc à la prescription de traitements

adéquats. Afin de contrer ce problème, une nouvelle technique de la famille des « omiques », appelée métabolomique, s'est récemment développée. Elle permet d'accéder à la compréhension des régulations moléculaires dans les systèmes biologiques et de fournir des informations concernant des systèmes biologiques qui sont complémentaires de celles apportées par la génomique, la transcriptomique et la protéomique [12].

1.3 Métabolomique et métabonomique

1.3.1 Définitions

La métabolomique est une des plus récentes techniques de la famille des « omiques » citées précédemment et s'inscrit directement dans la continuité de celles-ci (cf. Figure 1).

Cet outil de « profiling » permet de caractériser l'ensemble des métabolites (petites molécules produites par l'organisme) par la mesure de leurs concentrations dans des matrices complexes telles que les tissus cellulaires, l'urine, le plasma et les fèces, etc. La caractérisation de ces métabolites permet de découvrir des biomarqueurs de la pathologie étudiée. Dans de nombreuses études, une « simple cartographie » de l'ensemble des métabolites est insuffisante pour appréhender tous les tenants et aboutissants d'une pathologie donnée. Dans ce cas, une mesure de la variation des concentrations des métabolites impliqués dans des métabolismes modifiés sous l'effet d'une modification génétique ou d'un stimulus physiologique doit être effectuée. Comme l'ont expliqué Zhang *et al.*, ce concept, appelé métabonomique, se différencie de la métabolomique et consiste à identifier et quantifier les biomarqueurs responsables d'un syndrome donné [27]. Nicholson *et al.* l'ont également défini comme une méthode permettant d'étudier les profils métaboliques afin de fournir, par exemple, des informations sur l'état d'avancement de maladies ou sur la toxicité de médicaments [28].

1.3.2 Principe de l'étude

Les études métabolomiques et métabonomiques s'effectuent généralement en plusieurs étapes : échantillonnage, acquisition des données et analyse statistique [29]. Les deux premières étapes sont étroitement liées l'une à l'autre. En effet, dans certaines matrices biologiques comme les tissus ou les cellules, une extraction de leurs métabolites est nécessaire. Les métabolites que l'on veut étudier vont donc conditionner le choix de la méthode d'extraction, en fonction de l'affinité entre les solvants d'extraction et les composés à étudier. Celle-ci sera également dépendante de l'outil analytique utilisé pour l'obtention des données. La Figure 3 regroupe l'ensemble des étapes d'une étude métabolomique par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou par spectrométrie de masse.

La métabolomique par RMN et celle par spectrométrie de masse présentent une ligne conductrice identique. La première étape consiste à bien conceptualiser le cadre de l'étude : quel est l'énoncé du problème et quel est son intérêt ? Quel protocole expérimental doit être mis en place pour choisir et récupérer les échantillons à étudier qui permettront d'expliquer et

de justifier une étude donnée ? Une fois tout ceci réalisé, l'étape qui suit a pour but de récupérer et d'analyser les échantillons afin que les données obtenues puissent être traitées (calibration et identification des pics, normalisation, ...). Ces deux étapes sont dépendantes de la technique utilisée (RMN ou spectrométrie de masse) : en effet, une méthode d'extraction devra être mise en œuvre afin de collecter les métabolites d'intérêt et le choix de celle-ci doit se faire en fonction de la technique utilisée et de ce que l'on souhaite observer. Lors de l'utilisation de la spectrométrie de masse souvent couplé à la chromatographie en phase gazeuse ou liquide, une étape de dérivation est souvent nécessaire, pour permettre la séparation et la détection des métabolites. La technique RMN étant non destructive, la préparation d'échantillon est plus simple. Les critères évaluant l'efficacité de ces protocoles d'extraction sont le rendement, la reproductibilité, la facilité et la rapidité d'exécution [30-33]. Ensuite, les données sont analysées à l'aide d'outils statistiques multivariés, tels que l'analyse en composantes principales (ACP) [34-36] ou la régression des moindres carrés (PLS) [37, 38], afin de pouvoir discriminer des groupes et d'identifier des biomarqueurs caractéristiques de cette discrimination, si elle existe. Enfin vient l'étape de l'interprétation biologique : les biomarqueurs sélectionnés doivent être reliés au fonctionnement des voies métaboliques afin de mettre en évidence les défaillances existantes et ainsi résoudre le problème posé.

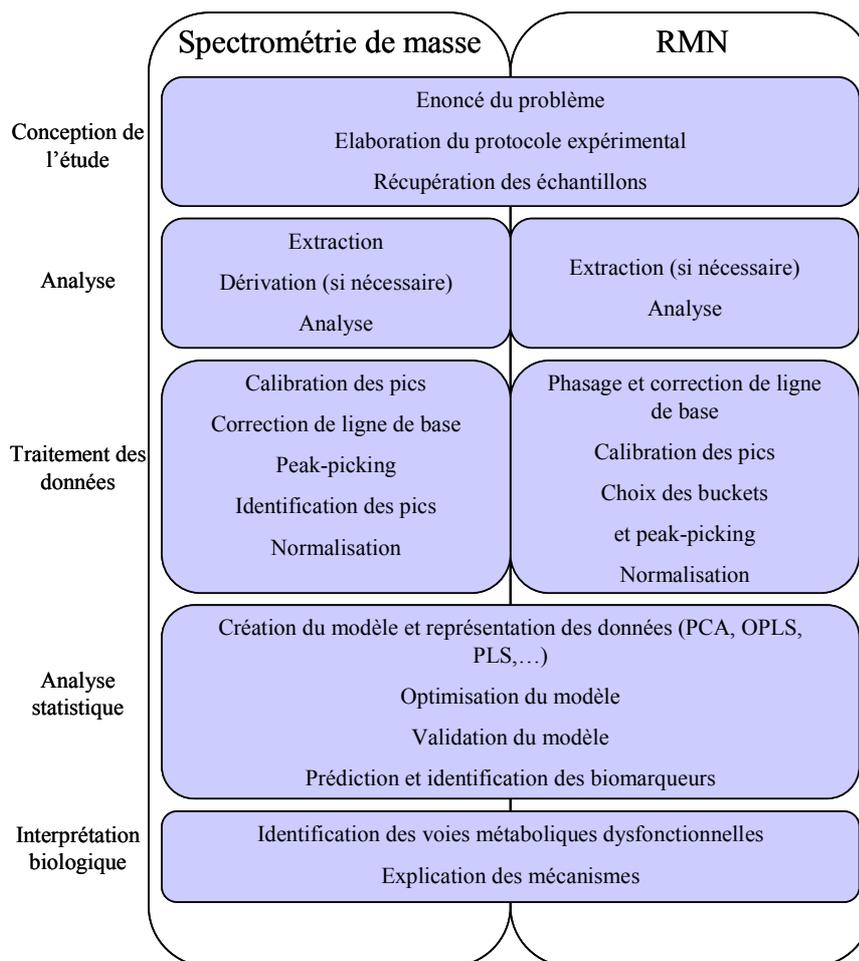


Figure 3 : Schéma descriptif représentant les différentes étapes d'une étude métabolomique par RMN ou spectrométrie de masse [11].

1.3.3 Etat des lieux des études métabolomiques par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est en général couplée à la chromatographie liquide (LC-MS) ou gazeuse (GC-MS) afin de séparer les composants.

Dans la littérature, de nombreuses études ont été réalisées par spectrométrie de masse. Par exemple, en GC-MS, Tian *et al.* ont travaillé sur des bactéries afin de tester l'efficacité de différents solvants (acétonitrile, méthanol, acétone, éthanol) pour le « quenching » ou arrêt de l'activité cellulaire [39]. Avant analyse, une méthode de dérivation a été employée sur les métabolites afin de les rendre plus volatils pour l'analyse en GC. Le groupe de Boros a quant à lui étudié la façon dont le glucose, après avoir été marqué au ^{13}C , est incorporé par les cellules cancéreuses afin de mettre en évidence les voies métaboliques associées à la pathologie [40]. Fan *et al.* ont procédé de la même façon (utilisation d'un traceur en ^{13}C) pour mettre en évidence, après extraction de métabolites de cellules du cancer du poumon avec l'acide trichloroacétique, des perturbations du fonctionnement des voies métaboliques au sein du réseau métabolique [41]. Dans le même but, Metallo *et al.* ont étudié des cellules provenant de carcinomes pulmonaires. Ces cellules sont récupérées avec un mélange méthanol/eau (1 :1). Les métabolites sont extraits des cellules avec quatre volumes de chloroforme afin d'éliminer les protéines [42]. Avant analyse par GC-MS, une étape de dérivation a été nécessaire. Enfin, Winder *et al.* ont comparé l'efficacité de cinq méthodes d'extraction (méthanol, méthanol/chloroforme, acide perchlorique, éthanol bouillant et hydroxyde de potassium) sur la bactérie *Escherichia coli* [32]. Ils ont ainsi montré que les extractions avec le méthanol et l'éthanol étaient les plus performantes car les solvants de type alcool dénaturent et précipitent les protéines et les polysaccharides, n'ajoutent pas de sel (ce qui peut être problématique dans les études par spectrométrie de masse) et ont peu d'effet sur les pH. En revanche, ces méthodes sont loin d'être efficaces pour les métabolites ayant de fortes affinités avec les lipides.

Des travaux ont également été menés en (LC-MS). Kiefer et son équipe ont étudié des microorganismes afin de séparer des métabolites intracellulaires dans le but de réaliser une analyse quantitative de ceux-ci [43]. Cependant, ils ont rencontré quelques difficultés lors de la quantification du fait de la superposition de certains pics. Dans le but de mettre en évidence une éventuelle influence du pH sur le nombre de métabolites extraits, une étude a été menée sur les métabolites extraits à partir des globules rouges (érythrocytes) [44]. Sana *et al.* ont alors montré qu'en fonction du pH, les métabolites ne sont pas récupérés dans les mêmes quantités. Enfin, une comparaison de plusieurs protocoles d'extraction (dont acétonitrile/méthanol/eau et méthanol/eau) a été réalisée par Yuan *et al.* sur *Escherichia coli* ainsi que sur des tissus mammaires et a mis en évidence que l'extraction méthanol/eau (80%/20%) permettait d'obtenir les meilleurs résultats en termes de quantités extraites mais aucune conclusion n'a été tirée sur la répétabilité ou la reproductibilité de ces protocoles [45]. Très récemment, Lorenz *et al.* ont mis au point une procédure d'extraction rapide, facile à mettre en œuvre et reproductible utilisant les solvants méthanol et chloroforme froids afin d'identifier et de quantifier les métabolites présents dans les cellules de mammifères [46].

1.3.4 Etat des lieux de la RMN métabolomique et métabonomique

Comme cela a été présenté au paragraphe 1.3.2, les étapes concernant l'analyse et le traitement des données sont cruciales afin de pouvoir discriminer des échantillons biologiques. Ces étapes diffèrent en fonction de la technique utilisée. La Figure 4 récapitule le principe général d'une analyse par RMN métabolomique.

Tout d'abord, une attention particulière est donnée à la préparation d'échantillon selon le problème énoncé. Une analyse globale des métabolites est réalisée directement sur la matrice étudiée tandis qu'une analyse ciblée de métabolites nécessite la mise en place d'un protocole d'extraction adéquat pour la matrice considérée. L'influence du pH est aussi à prendre en compte lors de l'analyse par RMN car le pH peut induire une modification des déplacements chimiques, rendant l'identification des métabolites plus difficile.

L'analyse se fait ensuite en RMN à une dimension en utilisant les séquences d'acquisition suivantes :

- présaturation par une onde continue de faible amplitude (ZGPR) [47], cette dernière étant envoyée pendant le temps de récupération à la fréquence de résonance des protons de l'eau ;
- NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) [48] dont le motif d'impulsions est le suivant : $90^\circ\text{-}\delta\text{-}90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ avec δ qui est un court délai et τ (temps de mélange) qui est compris entre 100 et 150 ms ;
- CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) [49] ayant pour séquence d'impulsions $90^\circ\text{-}(\tau\text{-}180^\circ\text{-}\tau)_n$ avec τ qui doit être inférieur à $1/J$ et $n\tau \approx 60$ ms. Cette méthode permet d'éliminer les signaux larges des macromolécules.

Les séquences NOESY et CPMG contiennent également un motif de présaturation permettant d'atténuer le signal de l'eau.

A l'aide des bases de données et/ou d'ajouts dosés, chaque massif ou groupement de raies est attribué à un ou plusieurs métabolites (Figure 4a). Cette attribution permet ensuite de définir des zones d'intégration des massifs d'intérêt, c'est-à-dire que les spectres sont découpés en zones appelées « buckets » : sur la Figure 4b, les « buckets » ont des tailles différentes selon l'identification des métabolites précédemment réalisée. (Dans le cas d'une étude de type « metabolomic fingerprinting » [50] dans laquelle on cherche à établir un cliché rapide des métabolites de plusieurs échantillons, les « buckets » ont toutes la même taille afin de comparer rapidement les échantillons entre eux). Enfin, une analyse statistique des résultats est effectuée à l'aide de méthodes statistiques telles que l'ACP ou la PLS : si des groupes apparaissent, les « buckets » responsables des différences observées sont identifiées dans le but de déterminer les biomarqueurs caractéristiques du problème étudié (Figure 4c) [17].

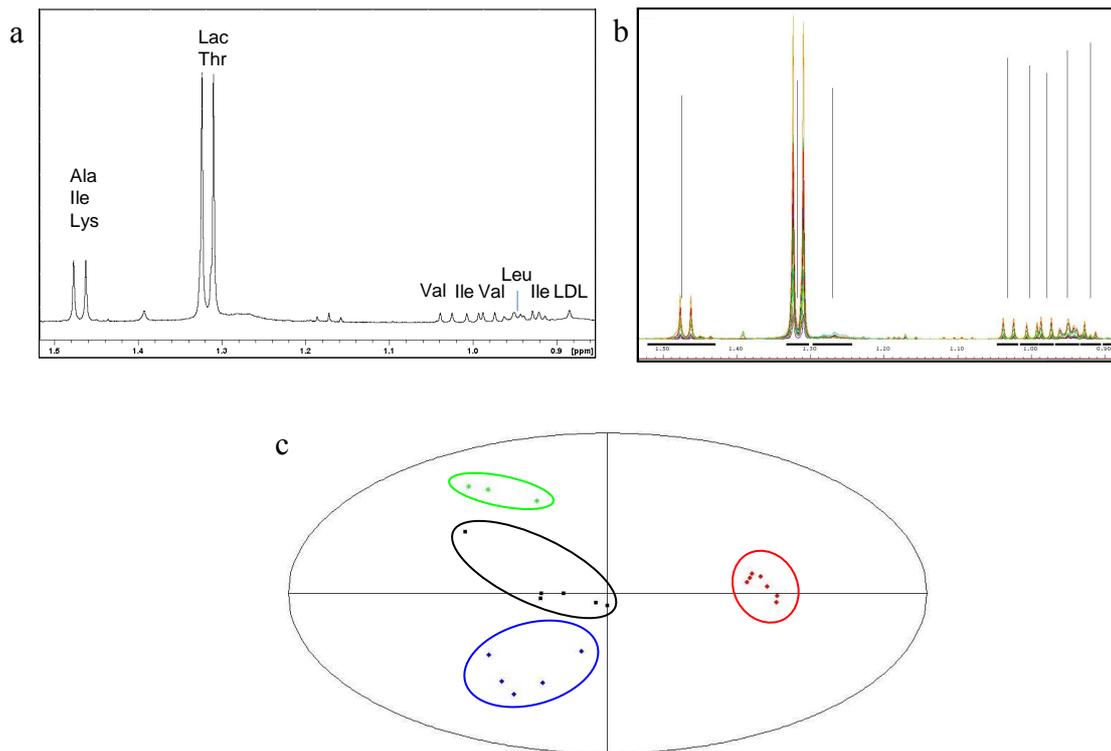


Figure 4 : Principales étapes d'une analyse métabolomique par RMN (a) acquisition de spectre par RMN 1D et identification des métabolites (b) sélection des buckets pour l'analyse statistique (c) analyse multifactorielle d'un ensemble d'échantillons pour l'identification de biomarqueurs permettant la séparation des groupes.

La RMN métabolomique possède une grande quantité d'applications, notamment dans le domaine de la médecine (transplantation [51], cancers [5, 52] etc.). En effet, l'analyse de profils métaboliques apporte de nombreuses informations sur les changements métaboliques se produisant lors d'un stimulus extérieur comme par exemple la consommation d'un médicament ou les prémices d'une maladie [53]. Par exemple, dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne, l'analyse de tissus par RMN 1D et l'identification de « buckets » sur les spectres ont permis de fournir des informations sur les profils métaboliques de la maladie, et de montrer que les tissus ne sont pas affectés de la même façon par celle-ci [54].

De nombreuses applications concernent également l'étude des plantes, des tissus, levures et des cellules humaines ou bactériennes. Certaines équipes ont choisi de réaliser des études métabolomiques sur des échantillons solides ou semi-solides, ce qui permet d'éviter une extraction préalable. La technique HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) [55] est alors une méthode de choix permettant de moyenner à zéro les interactions anisotropes responsables de l'élargissement des raies. Par exemple, Griffin *et al.* ont travaillé sur les cellules gliales et les neurones pour mettre en évidence une différence de profils métaboliques sur ces cellules issues du système nerveux [56]. Leur choix s'est porté sur la technique HR-MAS car ils souhaitaient observer simultanément les lipides solubles et les métabolites aqueux susceptibles d'être responsables des différences de profils. L'équipe de Duarte, quant à elle, s'est servie de la technique HR-MAS pour étudier l'influence de la conservation et de la manipulation sur l'intégrité de plusieurs types de cellules [57].

Généralement, la RMN liquide est beaucoup plus utilisée en métabolomique et différents protocoles d'extraction sont mis en œuvre en fonction des métabolites que les équipes de recherche souhaitent mettre en évidence. Ainsi, l'extraction avec de l'acide perchlorique a été utilisée par l'équipe d'Aboagye [5] sur des cellules cancéreuses du sein et par celle de Moreno [52] sur des tumeurs colorectales afin de récupérer les métabolites intracellulaires et de les étudier par RMN du proton. Aboagye *et al.* ont ainsi pu extraire préférentiellement la choline, la phosphocholine et la glycérophosphocholine et montrer que le passage du stade sain au stade cancéreux est dû à une défaillance dans le métabolisme de la phosphocholine au niveau de la membrane cellulaire. Quant à Moreno *et al.*, ils ont accédé à une meilleure compréhension du métabolisme des tumeurs colorectales grâce à l'identification de métabolites tels que la taurine, la phosphocholine ou la créatine.

D'autres études ont comparé l'efficacité de différents solvants d'extraction, dont l'acide perchlorique. Par exemple, Kaiser *et al.* ont testé l'efficacité de différentes méthodes d'extraction sur des tissus de plantes (*Arabidopsis thaliana*) par RMN du proton à une dimension [31]. Les solvants (ici, acide perchlorique dans l'eau, acétonitrile/eau, méthanol/eau/chloroforme, méthanol/eau dans différentes proportions) ont été choisis afin qu'ils puissent à la fois arrêter immédiatement l'activité enzymatique (ou « quenching ») et rompre les membranes pour libérer les métabolites intracellulaires. Cette étude a permis la mise en évidence des inconvénients liés à l'utilisation de l'acide perchlorique par l'introduction de nombreuses sources d'erreur dues à l'ajustement des pH. De plus, malgré une dénaturation et une rapide inactivation des enzymes, son emploi conduit à la destruction de certaines espèces comme le pyruvate, NAD et NADH⁺ ou encore le sucrose, ce qui complique les interprétations biologiques du profil métabolique. L'utilisation de l'extraction méthanol/chloroforme/eau a montré la plus grande variabilité contrairement à la méthode acétonitrile/eau. Par contre, l'inconvénient majeur de cette dernière est la difficulté de séparation de la phase aqueuse et organique, induisant une contamination de la phase aqueuse par les lipides. L'équipe conclut sur le fait que la méthode d'extraction est propre à chaque espèce et/ou matrice et à chaque technique utilisée. L'étude réalisée par Lin *et al.* [58] sur le foie et le muscle de poissons tend à confirmer certaines des conclusions tirées par Kaiser *et al.* Après avoir testé différentes méthodes d'extraction avec différentes quantités de solvants (méthanol/eau, acétonitrile/eau, acide perchlorique, méthanol/chloroforme/eau avec et sans KCl), l'analyse en composantes principales réalisée à partir des spectres proton a montré la non-répétabilité de l'extraction à l'acide perchlorique et la répétabilité de l'extraction méthanol/chloroforme/eau. Les auteurs insistent également sur l'intérêt de bien associer la méthode d'extraction avec l'étude RMN qui suit. De même, Le Belle *et al.* ont comparé deux méthodes d'extraction (méthanol/chloroforme/eau et acide perchlorique) pour l'analyse ciblée de quelques métabolites dans des milieux complexes (astrocytes et tissus du cerveau) [30]. Les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec la méthode méthanol/chloroforme/eau, notamment pour quelques métabolites tels que la créatine ou l'alanine. Cette méthode d'extraction a également été appliquée par Tyagi *et al.*, mais avec des rapports de volumes différents sur des mélanomes de souris afin d'obtenir une extraction

simultanée de lipides et des métabolites : les premiers se retrouvent dans le chloroforme et les seconds dans la phase méthanol/eau [59]. Les échantillons ont été analysés par RMN ^{13}C et ^{31}P et les résultats ont été comparés à ceux obtenus après extractions classiques (acide perchlorique et extraction de lipides par la méthode de Folch). La méthode d'extraction méthanol/chloroforme/eau permet d'accéder à de meilleurs rendements que les deux autres méthodes du fait de l'absence de sels dans les échantillons et de la récupération des lipides et des métabolites dans deux phases distinctes.

La méthode d'extraction méthanol/chloroforme/eau a également été utilisée seule dans plusieurs études métabolomiques et métabonomiques. Ainsi, une application sur des foies de poissons a été menée par RMN et SM afin d'étudier l'influence du nombre d'étapes (une ou deux) dans le protocole d'extraction : celui en 2 étapes a donné des résultats plus répétables et reproductibles que celui en une étape [60]. Une analyse métabonomique par RMN ^1H sur des extraits de tissus de cerveau de chien a été réalisée par Woo *et al.* afin de quantifier certains métabolites à l'aide d'échantillons « fantômes » (préparés avec une dizaine de métabolites) [61]. Dans le domaine médical, les applications de ce protocole d'extraction sont nombreuses : Miccheli *et al.* ont étudié la manière dont le glucose marqué est absorbé et utilisé dans le cycle métabolique des cellules T de la leucémie par un suivi métabolomique en RMN ^{13}C [62]. Akhtar *et al.* ont étudié l'influence d'un virus sur des cellules cancéreuses développées par les enfants et les adolescents (rhabdomyosarcomes) par RMN ^1H quantitative sur des extraits lipidiques et métaboliques obtenus après extraction par méthanol/chloroforme/eau [63]. Ils ont ainsi déterminé quels métabolites étaient absents dans les cellules non infectées (glutamine, phosphocholine et glycine) et montré que la quantité de métabolites diminue jusqu'à disparaître sous l'effet de l'infection, contrairement aux lipides qui restent présents en même quantité dans les cellules infectées et non infectées. Dans le cancer des poumons, Gottschalk et son équipe ont étudié la résistance au traitement de différentes lignées à partir de cellules entières (récupérées à l'aide de la trypsine) et d'extraits cellulaires (lipidiques et aqueux), obtenus après extraction par la méthode méthanol/chloroforme/eau [64]. Après analyse par RMN ^1H et traitement des données, les résultats ont montré une plus grande quantité de lactate, de glutamate et de choline et une plus faible quantité de créatine, de myo inositol et de glycine dans les lignées résistantes au traitement. Enfin, Beckonert *et al.* [65] et Teng *et al.* [6] ont travaillé sur le cancer du sein. Pour les premiers, les extraits de tissus, obtenus par extraction méthanol/chloroforme/eau, ont été analysés par RMN proton afin de comparer les profils des spectres des différents groupes de tissus. Ils ont mis en évidence l'évolution de la concentration de certains métabolites en fonction de l'état du tissu (sain ou malade) : augmentation de la quantité de phosphocholine avec le stade du cancer, forte concentration en taurine dans les cellules malades, grande concentration en glucose et en myo-inositol dans les échantillons de contrôle sains. Pour les seconds, une étude comparative a été menée sur le choix de la méthode de « quenching » et de récupération des cellules adhérentes sur la paroi des flasques dans lesquelles ces cellules croissent. Après élimination et rinçage du milieu de culture avec du PBS, deux protocoles ont été appliqués. Le premier protocole a consisté à collecter les cellules à l'aide de la trypsine,

puis celles-ci ont été rincées et centrifugées dans une solution PBS avant ajout de méthanol pour stopper le métabolisme cellulaire. Dans le second protocole, le « quenching » a été réalisé avec du méthanol et les cellules ont été détachées de la paroi des flasques manuellement à l'aide d'un grattoir. Ensuite, la méthode d'extraction méthanol/chloroforme/eau a été appliquée aux cellules de cancer du sein. Le deuxième protocole a permis de récupérer plus de métabolites (pas de dénaturation causée par l'utilisation de la trypsine) et un gain de temps considérable du fait qu'elle contient moins d'étapes que le premier protocole.

En conclusion, même si de nombreuses méthodes d'extraction ont été testées et que celle utilisant les solvants méthanol, chloroforme et eau semble la plus souvent choisie, aucune étude n'a réellement montré l'influence de la méthode sélectionnée sur les métabolites récupérés et leurs quantités dans les cellules humaines. De plus, la reproductibilité et la répétabilité de ces protocoles d'extraction n'ont guère été évaluées. Une étude comparative plus approfondie des méthodes d'extraction utilisées dans la littérature semble donc être indispensable, pour différencier les phénotypes des lignées cellulaires par RMN quantitative et par SMRI.

1.3.5 Intérêts relatifs de la spectrométrie de masse et de la RMN

La spectrométrie de masse présente l'avantage d'être très sensible et d'atteindre des limites de détection plus basses que la RMN : en effet, la limite de détection est de l'ordre de la nanomole pour la RMN alors qu'elle peut atteindre la femtomole pour la spectrométrie de masse [66]. Cette technique permet donc d'utiliser des quantités d'échantillons plus faibles que la RMN. Cependant, une dérivation des analytes est souvent nécessaire afin qu'ils soient séparés et ne restent pas adsorbés sur les colonnes chromatographiques [67]. De plus, la spectrométrie de masse est une technique destructive et sélective, contrairement à la RMN. En effet, les échantillons ne peuvent être récupérés en fin d'analyse et tous les produits ne pourront pas être analysés s'ils ont trop d'affinités avec la phase stationnaire de la colonne. Enfin, la variabilité de l'efficacité de l'ionisation des produits rend l'identification et la quantification plus difficiles, puisque l'ionisation varie en fonction des sources de spectromètre de masse [28, 68, 69].

Même si le choix d'une technique d'analyse dépend des métabolites à étudier ou de la matrice considérée, la RMN reste la technique la plus efficace pour l'élucidation structurale des métabolites. L'utilisation de la RMN limite aussi les étapes de préparation d'échantillon, ce qui la rend plus stable et reproductible pour l'établissement de profils métaboliques de tissus ou de fluides biologiques [28].

2 L'analyse isotopique

2.1 Effets isotopiques et fractionnement isotopique

Les isotopes légers sont plus abondants que les isotopes lourds (Tableau I), leurs abondances naturelles étant généralement inférieures ou égales à 1%. Bien que les isotopes lourds n'existent la plupart du temps qu'en très faibles proportions, leurs quantités peuvent tout de même être mesurées de façon suffisamment précise.

En abondance naturelle, les isotopes lourds sont minoritaires dans les molécules organiques, mais leur abondance peut varier en fonction des processus enzymatiques et/ou physico-chimiques qui ont eu lieu pour produire ces molécules organiques. On définit ainsi les notions d'isotopologues et d'isotopomères : les premiers sont des molécules différant uniquement par leur composition isotopique et les seconds sont des isomères se distinguant les uns des autres par la position de l'atome isotopiquement substitué (par exemple, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OD}$ est un isotopomère de $\text{CH}_3\text{-CHD-OH}$).

Tableau I : Abondances naturelles de différents isotopes stables [70, 71].

Elément	Isotopes stables	Abondance naturelle (%)
Hydrogène	^1H	99,9844
	^2H (ou D)	0,0156
Azote	^{14}N	99,635
	^{15}N	0,365
Carbone	^{12}C	98,892
	^{13}C	1,108
Oxygène	^{16}O	99,763
	^{17}O	0,037
	^{18}O	0,200

Afin d'étudier cette différence de composition isotopique, différentes grandeurs et notions doivent être définies :

- Le rapport isotopique consiste à mesurer le rapport de la quantité d'isotope lourd sur celle de l'isotope léger (**1**)

$$R = \frac{\text{Lourd}}{\text{Léger}} \quad (1)$$

- La notion d'abondance isotopique est, quant à elle, définie par la proportion d'isotope lourd (2)

$$A = \frac{\text{Lourd}}{\text{Léger} + \text{Lourd}} \quad (2)$$

- Du fait des faibles variations des deux grandeurs définies précédemment, une autre grandeur, exprimée en ‰, est généralement utilisée : la déviation isotopique (3)

$$\delta = \frac{R_{ech} - R_{std}}{R_{std}} \times 1000 \quad (3)$$

Elle est définie par rapport à un standard, permettant ainsi de normaliser les mesures entre les différents laboratoires. Ainsi, un échantillon ayant une valeur positive de δ sera plus riche en isotope lourd que le standard et inversement pour une valeur négative de δ . Le Tableau II regroupe quelques uns de ces standards avec leur rapport isotopique.

Tableau II : Principaux standards internationaux utilisés pour la normalisation des mesures de delta [72].

Elément	Standard	Rapport isotopique
Hydrogène	Eau médio-océanique (SMOW ^a)	$^2\text{H}/^1\text{H} = 0,00015575$
Azote	N ₂ atmosphérique	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0,0036765$
Carbone	Rostre fossile de bélemnite (PDB ^b)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,0112372$
Oxygène	Eau médio-océanique (SMOW)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = 0,002052$

^a SMOW : Standard Mean Ocean Water

^b PDB : Pee Dee Belemnite

Des isotopes ne possèdent pas les mêmes propriétés physiques et/ou chimiques et/ou enzymatiques. Il en résulte qu'au cours de réactions chimiques ou biochimiques, les rapports isotopiques d'un composé peuvent changer : cette variation de composition isotopique est appelée effet isotopique. Il est noté α et est défini par l'équation (4) :

$$\alpha = \frac{R_{substrat}}{R_{produit}} \quad (4)$$

Cette grandeur permet d'introduire la notion de discrimination ou de fractionnement isotopique, qui est plus couramment utilisée (5) :

$$\Delta = \frac{\delta_{\text{substrat}} - \delta_{\text{produit}}}{1 + \delta_{\text{produit}}} \quad (5)$$

δ_{produit} est très petit par rapport à l'unité, cette relation peut donc être approximée par (6) :

$$\Delta \approx \delta_{\text{substrat}} - \delta_{\text{produit}} \quad (6)$$

2.2 Etat des lieux des techniques existantes

2.2.1 En milieu enrichi en isotopes stables

La mesure d'effets isotopiques en milieu enrichi est principalement faite par spectrométrie de masse. Avec cette technique, les échantillons sont tout d'abord placés dans une source où ils sont ionisés. Les ions moléculaires ainsi produits sont ensuite accélérés et triés à l'aide d'un analyseur en fonction de leur masse m/z . Enfin, les fragments ionisés sont collectés et le signal reçu est converti en signal électrique. Les données sont représentées à l'aide d'un spectre de masse sur lequel chaque pic correspond à une masse m/z donnée dont l'intensité est proportionnelle au signal reçu.

La RMN du ^{13}C , mais également la RMN 2D, sont utilisées pour mesurer les teneurs isotopiques dans les milieux enrichis. L'incorporation de molécules marquées permet, par exemple, de suivre les flux métaboliques [73, 74], d'étudier le métabolisme cellulaire [75] ou de mesurer le taux d'enrichissements de molécules [76, 77].

2.2.2 En abondance naturelle

Pour mesurer des différences isotopiques en abondance naturelle, l'une des techniques utilisées est la Spectrométrie de Masse des Rapports Isotopiques (SMRI) [72]. Le principe de celle-ci est le suivant : tout d'abord, les échantillons organiques sont oxydés en gaz par combustion (CO_2 pour l'analyse ^{13}C , N_2 pour l'analyse ^{15}N). Ensuite, les gaz sont introduits dans la source où ils sont ionisés. Les ions moléculaires produits sont ensuite accélérés et placés dans un champ magnétique. Ils sont récupérés en sortie dans des collecteurs (cages de Faraday) reliés à des amplificateurs électriques. Chaque collecteur est dédié à une masse d'isotopomères : ainsi, pour l'azote, les isotopomères $^{14}\text{N}-^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}-^{15}\text{N}$ et $^{15}\text{N}-^{15}\text{N}$ sont respectivement collectés dans les cages de Faraday dédiées aux masses 28, 29 et 30. Pour le carbone, les collecteurs de masse 44, 45 et 46 correspondent aux isotopomères $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ et/ou $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ et/ou $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ et/ou $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$.

La SMRI possède différents avantages : c'est une technique précise (0,2 ‰ pour les analyses $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) et elle nécessite une faible masse de produit pour réaliser les analyses (une

quantité d'environ 1 mg pour un échantillon contenant à peu près 9% de N et 35% de C est suffisante pour mesurer les rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, ce qui en fait une technique sensible. Toutefois, elle ne fournit que les teneurs isotopiques globales des molécules et non pas les valeurs pour chaque site des molécules. La RMN, en revanche, permet d'accéder aux informations portées par chacun des sites des différentes molécules étudiées. Cette technique est donc site-spécifique et apporte des données complémentaires à celles fournies par la SMRI.

La RMN quantitative a donc été développée afin de mesurer les teneurs sur chaque site de la molécule étudiée tout d'abord en deutérium, avant de s'étendre au carbone. Au début des années 80, la méthode SNIF-NMR (Site-specific Natural Isotope Fractionation measured by Nuclear Magnetic Resonance) a permis d'étudier la chaptalisation des vins par le saccharose en mesurant la teneur isotopique en deutérium dans l'éthanol [78]. Son principe est basé sur la mesure des aires des signaux des isotopomères d'une molécule, celles-ci étant proportionnelles à la concentration des isotopomères dans des conditions quantitatives. Ces mesures se font par rapport à une référence, la TétraMéthyl Urée (TMU). Ainsi, il a été possible de créer des bases de données en collectant des informations à partir d'un grand nombre d'échantillons provenant de différentes origines : la comparaison d'un échantillon inconnu avec les exemplaires de la base de données permet donc de l'identifier. Cette technique a ensuite été utilisée pour mesurer les rapports $^2\text{H}/^1\text{H}$ d'autres molécules comme la vanilline par exemple.

Lorsque l'analyse en deutérium ne permet pas de distinguer différentes origines, l'analyse de la teneur en ^{13}C [79, 80] permet d'apporter des informations complémentaires sur les composés concernés. Celle-ci présente certains avantages par rapport à la RMN ^2H : le deutérium est plus sujet aux phénomènes d'échange que le carbone et a une gamme de déplacement chimique plus étroite, ce qui engendre plus souvent des recouvrements de pics. Ces techniques site-spécifique nécessitent de très grandes quantités d'échantillons (de l'ordre de 100 mg) et sont donc difficilement utilisables pour déterminer les teneurs isotopiques dans des milieux biologiques contenant de faibles quantités de métabolites.

2.3 Les applications de l'analyse isotopique

2.3.1 Avantages de l'utilisation des isotopes stables

L'utilisation des isotopes stables dans le domaine de la santé présente de nombreux avantages [81]. Tout d'abord, ceux-ci ne sont pas radioactifs et constituent donc d'excellents marqueurs et traceurs biologiques. Par conséquent, le marquage de molécules par des isotopes stables ne présente pas de danger pour le patient qui va recevoir ces molécules marquées. Contrairement aux isotopes radioactifs, l'utilisation des isotopes stables ne fait pas l'objet de restrictions réglementaires strictes et permet l'établissement de protocoles cliniques ayant un haut niveau

éthique. De plus, les molécules marquées rejetées par l'organisme ne sont pas nocives pour l'environnement.

Un autre avantage réside dans le marquage en lui-même, qui est réalisé de façon quantitative : ce point est important, notamment dans l'étude et le suivi de métabolismes ou du renouvellement de métabolites lors des cycles cellulaires.

2.3.2 Avantages de l'analyse isotopique

Les analyses isotopiques se sont développées ces dernières années [81]. En effet, les appareils mis sur le marché pour mesurer les teneurs isotopiques sont devenus de plus en plus performants grâce aux avancées technologiques réalisées ces dernières années. Par conséquent, les mesures des rapports isotopiques sont effectuées avec une grande précision, sensibilité et exactitude et ainsi, les analyses ne nécessitent que de faibles quantités d'échantillons et/ou un niveau de marquage très bas. Enfin, les échantillons peuvent être analysés sous n'importe quelle forme (liquide, solide ou gazeux) et qu'ils soient complexes ou non : ceci est possible grâce aux couplages entre appareils d'analyses isotopiques et d'autres systèmes de type analyseur élémentaire, séparation chromatographique ou systèmes de pyrolyse.

2.3.3 Applications

Les effets et le fractionnement isotopiques sont appliqués à de nombreux domaines comme la géologie (pour comprendre l'évolution biologique [82] ou étudier la composition des roches [83] ou des météorites [84]), l'écologie pour tracer les habitudes alimentaires des animaux [85-87] ou encore l'environnement (pour l'analyse de contaminants [88]). Des applications sont également réalisées dans d'autres domaines comme l'agro-alimentaire (vérification de l'origine des aliments et détection des fraudes [89, 90]), la police scientifique [91, 92], l'étude de métabolismes [8] ou encore l'industrie pharmaceutique (authentification de composés et détection des contrefaçons [93, 94]). Nous nous intéresserons plus spécifiquement aux applications réalisées dans le domaine de la santé.

2.3.3.1 Dans le domaine de la biologie humaine

Dans le cadre de la recherche contre le cancer, l'utilisation d'isotopes stables comme traceur a remplacé les traceurs radioactifs du fait de leur non toxicité. Ainsi, Lane *et al.* ont rappelé leur utilité dans la compréhension des métabolismes. En effet, l'utilisation de traceurs enrichis en ^{13}C et/ou en ^{15}N est selon eux la seule façon de pouvoir suivre son incorporation dans des voies métaboliques et de montrer un possible dysfonctionnement en comparant les cellules cancéreuses avec les non-cancéreuses à l'aide de la RMN et de la spectrométrie de masse [8]. Rittler *et al.* ont réalisé une étude sur le cancer colorectal par SMRI en milieu enrichi en ^{13}C afin d'établir une relation entre la prolifération de la maladie et le taux de protéines synthétisées : ils ont mesuré le fractionnement isotopique de celles-ci avec pour objectif d'en faire un indicateur de la prolifération [95].

Un autre sujet d'étude utilisant les isotopes stables est l'analyse de fluides biologiques. Ainsi, Wang *et al.* ont mesuré les teneurs en $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée par SMRI en modifiant le système déjà existant au sein de leur laboratoire : ils ont ajouté en amont de leur AE-SMRI une valve à quatre voies et un piège froid afin d'éliminer le CO_2 pour qu'en sortie de l'appareil, la masse 28 de CO ne vienne pas se superposer à la masse 28 de N_2 [10]. Ils ont vérifié la linéarité, la reproductibilité et la précision de leur montage afin d'en faire une technique d'analyse pour des mesures en routine, en particulier sur les biofluides. Ferchaud *et al.* ont mis au point une nouvelle méthode analytique pour mesurer l'enrichissement en ^{13}C d'acides organiques dans le plasma humain par GC-C-SMRI (Chromatographie gazeuse couplée à un four à combustion et couplée à un spectromètre de masse de rapports isotopiques) [96]. Les résultats ont été validés par comparaison avec ceux obtenus en GC-MS après vérification de la précision, de la répétabilité et de la reproductibilité des mesures.

L'utilisation des isotopes stables permet également de se concentrer sur certains composés en particulier afin de comprendre leur implication dans des processus biologiques. Dans ce cadre, le glutathion (GSH) a été l'objet de plusieurs études. Par exemple, Tea *et al.* ont étudié le rôle du GSH chez les nouveau-nés ayant un petit poids [9]. Une baisse de la concentration en GSH a été mise en évidence chez cette population. Des différences sont observées sur la vitesse de synthèse du GSH, ce qui montre le rapide renouvellement du GSH. Darmaun *et al.* ont quant à eux cherché à comprendre l'origine de la baisse de concentration en GSH chez les diabétiques de type 1 [97]. Celle-ci peut engendrer des complications médicales, en particulier vasculaires. Les raisons possibles sont soit une diminution de la vitesse de synthèse du GSH, soit une grande utilisation du GSH ou soit une combinaison des deux. L'analyse par GC-MS en deutérium des globules rouges a permis de montrer que cette baisse était due à une grande utilisation de GSH.

Une étude a été menée sur la teneur isotopique en hydrogène des cheveux : ceux-ci contiennent de la kératine, elle-même étant constituée de protéines. Les sources de ces dernières sont l'eau et la nourriture ingurgitées. La composition chimique du cheveu varie, et ces fluctuations dans le temps se retrouvent sur la longueur du cheveu. Sharp *et al.* ont donc mesuré la teneur isotopique de l'hydrogène des cheveux et de l'urine pour déterminer quelle quantité d'eau est incorporée dans le cheveu [92]. Ils ont montré qu'un tiers de l'hydrogène provenait de l'eau ingurgitée, le reste provenant de la nourriture. De plus, sur une même journée ainsi que sur plusieurs semaines, ils ont mis en évidence un possible suivi du régime alimentaire de l'individu. Enfin, une étroite corrélation entre les valeurs de δD des cheveux et des aliments et celles des précipitations météorologiques de la région concernée a été mise en évidence.

Enfin, les bactéries constituent un autre domaine biologique pouvant être étudié à l'aide des isotopes stables. Certains acides gras comme les MBFAs (Methyl-Branched Fatty Acids) sont présents dans des bactéries, ce qui permet de faire de leur détection un moyen de contrôler la qualité des aliments. Vetter *et al.* ont mesuré la teneur isotopique en ^{13}C par GC-SMRI de ces acides gras après enrichissement afin de déterminer leur origine (reliée à la bactérie et/ou à

des substrats différents de ceux utilisés dans la biosynthèse des acides gras à chaîne droite) [98]. Leurs résultats ont permis de confirmer leur deuxième hypothèse (concernant une synthèse différente). Horita *et al.* ont travaillé sur des souches bactériennes (de type Gram positif et Gram négatif) pour étudier la façon dont elles assimilent le milieu de culture [91]. Ils ont mesuré les rapports D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ par SMRI et ont observé que la composition isotopique des souches correspondait à celle des substrats et du milieu de culture. Des applications de ces résultats ont été réalisées dans des enquêtes de police scientifique, en particulier pour la création d'une base de données afin d'identifier les origines des attaques biologiques liées au terrorisme.

2.3.3.2 Dans l'établissement de diagnostics

Les récents développements consacrés à l'analyse isotopique ont permis d'améliorer le diagnostic de différentes pathologies.

Un exemple important concerne les tests respiratoires au ^{13}C . Ces tests consistent à étudier des systèmes enzymatiques utilisant le CO_2 . Ils se déroulent de la façon suivante : tout d'abord, un atome de ^{12}C est substitué par un atome de ^{13}C sur un substrat donné. Ensuite, cet atome ^{13}C est oxydé en dioxyde de carbone par un système biologique. Enfin, le $^{13}\text{CO}_2$ formé est éliminé par la respiration. L'enrichissement isotopique des gaz expirés permet de refléter ce qui s'est passé au moment de l'oxydation du substrat et donc de comprendre le fonctionnement de systèmes enzymatiques.

Ces tests sont principalement utilisés dans le domaine de la gastro-entérologie afin d'étudier des processus métaboliques et physio-pathologiques de façon indirecte, en considérant le $^{13}\text{CO}_2$ comme un traceur des processus étudiés [81]. Par exemple, ces tests respiratoires permettent de détecter la présence d'*Helicobacter pylori*, une bactérie colonisant la muqueuse gastrique et pouvant déclencher à long terme des ulcères gastro-duodénaux [99]. Cette bactérie a une forte activité sur l'enzyme uréase : cette dernière permet à *Helicobacter pylori* d'hydrolyser l'urée en dioxyde de carbone. Par conséquent, le test respiratoire au ^{13}C va permettre de suivre cette réaction d'hydrolyse en administrant au patient de l'urée marquée au ^{13}C et puis en mesurant l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 expiré. Si la valeur mesurée est plus élevée que celle attendue, la présence de la bactérie *Helicobacter pylori* est détectée. Les tests respiratoires servent également à étudier la fonction métabolique hépatique, et notamment les défaillances et les spécificités de l'action du système cytochrome P450. Cette importante famille d'enzymes métabolise un grand nombre de médicaments et est principalement localisée dans le foie. Des applications ont été réalisées pour étudier la fonction hépatique chez des enfants souffrant de maladies [100, 101], l'influence de médicaments sur la fonction hépatique [102] ou la maturation des cytochromes P450 [103].

Les tests respiratoires au ^{13}C présentés dans ce paragraphe mettent en évidence que des défaillances dans les voies métaboliques peuvent être détectées par analyse de l'enrichissement en ^{13}C . Par conséquent, ils laissent penser que ces défaillances de métabolismes pourraient également être mises en évidence dans d'autres types de matrices,

comme par exemple les cellules de cancer du sein. Si des différences de métabolismes existent entre les lignées de cancer du sein, il peut être envisagé de les analyser en mesurant des teneurs isotopiques en abondance naturelle afin de voir si un fractionnement isotopique peut être observé et de le corrélérer avec les facteurs biomédicaux de la lignée étudiée.

3 La RMN 2D quantitative

Le concept de RMN 2D a été introduit par J. Jeener [13] en 1971 lors d'une conférence en Yougoslavie, puis a été repris par l'équipe de Richard Ernst qui publia les premières expériences de 1974 à 1976 [14, 15].

3.1 Principe de la RMN 2D

Celui-ci repose sur l'acquisition d'un FID à deux dimensions ainsi que sur l'obtention du spectre à deux dimensions correspondant après application d'une double transformation de Fourier. Les étapes constitutives d'une expérience de RMN 2D aboutissant à l'acquisition du FID sont représentées Figure 5.

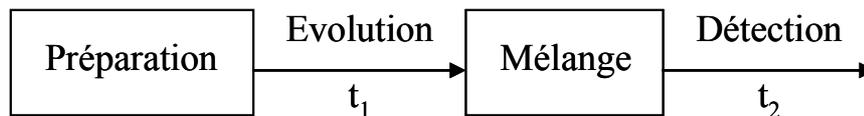


Figure 5 : Etapes permettant l'acquisition d'une expérience de RMN 2D.

La première étape sert à préparer le système de spins pour l'expérience RMN : généralement, cette période de préparation se compose d'au moins un délai de retour à l'équilibre de l'aimantation et d'un motif d'excitation avec une impulsion à 90° servant à faire basculer l'aimantation dans le plan transversal. Après excitation de l'aimantation, celle-ci évolue pendant un temps variable t_1 avec la fréquence Ω_1 sous l'effet des couplages et/ou des déplacements chimiques. Vient ensuite la période de mélange qui permet un échange d'information (transfert d'aimantation, de polarisation, etc.) entre les spins. Cette étape n'apparaît pas systématiquement dans toutes les séquences de RMN 2D. Enfin, le signal évolue à la fréquence Ω_2 pendant le temps t_2 et est détecté sous forme d'un FID.

La Figure 5 met en évidence la nécessité d'avoir deux variables temporelles indépendantes afin de pouvoir réaliser des expériences RMN à 2D. Comme il ne peut exister deux échelles de temps, « l'astuce » proposée par Jeener [13] a été de créer cette deuxième variable temporelle en répétant l'expérience plusieurs fois et en incrémentant le temps t_1 d'un délai Δt_1 entre chaque accumulation. Le signal est ensuite uniquement détecté pendant t_2 après chaque incrémentation de t_1 , ce qui permet d'obtenir un FID à deux dimensions représenté sur la Figure 6a.

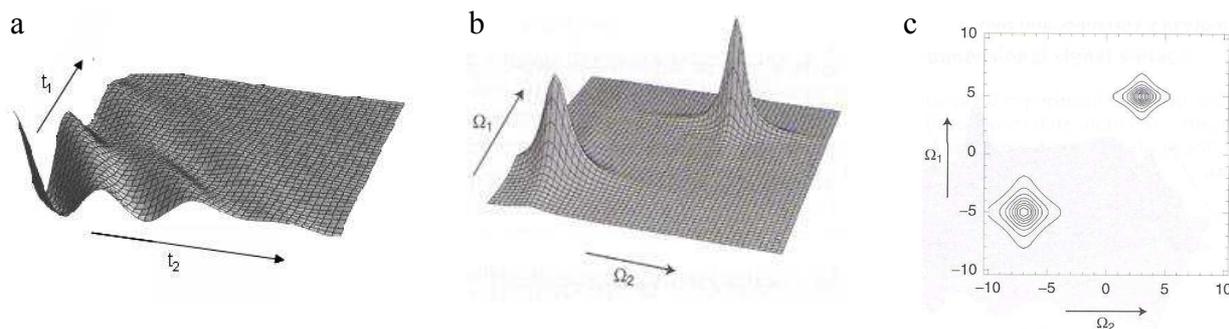


Figure 6 : Données d'une expérience de RMN 2D (a) FID d'une expérience RMN 2D (b) spectre correspondant après transformation de Fourier dans les deux dimensions (c) coupe horizontale du spectre 2D[104].

Après acquisition du FID, le signal est traité par double transformation de Fourier, tout d'abord dans la dimension 2 puis dans la dimension 1 : le spectre obtenu se présente sous forme d'une surface « en 3 dimensions » appelée « stacked plot » (cf. Figure 6b) mais la représentation la plus aisée à employer est celle de la Figure 6c sous forme de coupe horizontale avec des courbes de niveaux (« contour plot »).

3.2 Quelques techniques de RMN 2D

Dans ce paragraphe sont présentées les séquences de RMN 2D les plus couramment employées et qui ont été utilisées dans nos travaux : les séquences J-résolue, COSY, COSY-DQF, TOCSY et INADEQUATE, qui sont des expériences de corrélation homonucléaire (*i.e.* qui relient les paramètres, comme les couplages et/ou les déplacements chimiques, d'un même noyau) et la HSQC qui est une séquence de corrélation hétéronucléaire (*i.e.* qui montre les interactions entre des noyaux différents).

3.2.1 Spectroscopie J-résolue

La séquence J-résolue a été présentée la première fois par Aue *et al.* [105]. Le motif d'impulsions de cette séquence et le spectre correspondant sont représentés sur la Figure 7.

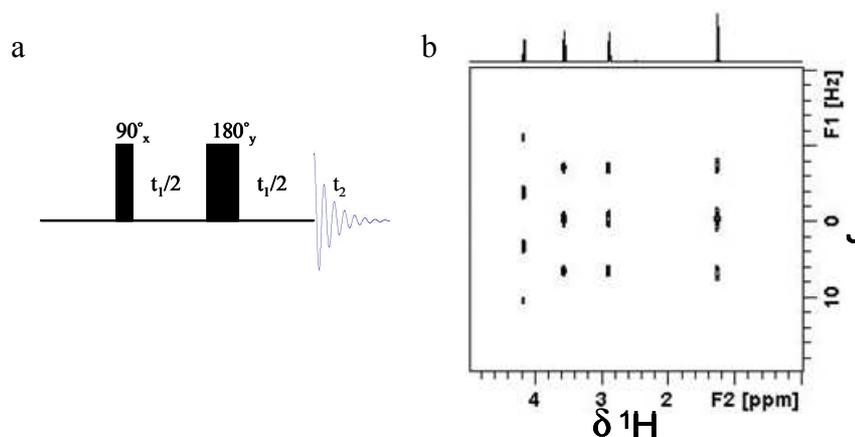


Figure 7 : J-résolue (a) Séquence d'impulsions (b) spectre J-résolu ^1H du 3-bromopropionate d'éthyle.

Cette séquence (Figure 7a) permet de corrélérer les déplacements chimiques proton, exprimés dans la dimension F2, aux constantes de couplage ^1H - ^1H , représentées dans la dimension F1 (cf. spectre Figure 7b). Pendant la période de préparation, les aimantations reviennent à l'équilibre puis sont basculées à l'aide d'une impulsion à 90° dans le plan transversal. Ensuite, elles sont soumises à un écho de spin qui touche à la fois les spins couplés et les spins excités : elles évoluent librement sous l'effet des couplages tandis que l'impulsion 180° permet de refocaliser les déplacements chimiques. Enfin, le signal est détecté pendant t_2 , les aimantations étant à nouveau soumises à l'effet des couplages et des déplacements chimiques.

3.2.2 COSY et COSY-DQF (CORrelated SpectroscopY-Double Quantum Filtered)

La séquence COSY [14] est la première séquence 2D à avoir été présentée. Tout comme la séquence J-résolue, la COSY (Figure 8a) débute par un délai de récupération suivi d'une impulsion de 90° pour faire basculer l'aimantation. Pendant la période d'évolution t_1 , les déplacements chimiques et les couplages s'expriment librement avant que l'impulsion à 90° , précédant la période de détection, ne permette le transfert de cohérence entre spins couplés. Enfin, le signal de précession libre est enregistré pendant le temps t_2 .

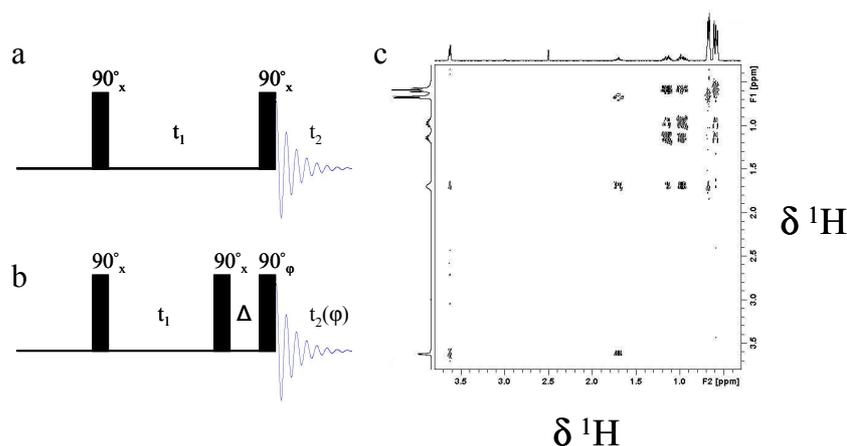


Figure 8 : COSY et COSY-DQF (a) séquence d'impulsions de la COSY (b) séquence d'impulsions de la COSY-DQF (c) spectre COSY-DQF ^1H de la L-isoleucine. φ : cycle de phase (x,y,-x,-y)[106].

Les spectres obtenus ont une fenêtre spectrale plus étendue dans la dimension F1 que les spectres J-résolus du fait de l'expression des déplacements chimiques pendant la période d'évolution : ainsi, il est possible d'obtenir une meilleure séparation des multiplets sur les spectres COSY. Cependant, ces spectres présentent un inconvénient qui peut s'avérer extrêmement gênant dans le cadre d'analyses quantitatives : en effet, les pics diagonaux sont intenses et peuvent parfois recouvrir les pics de corrélation proches de la diagonale. La séquence COSY-DQF [107] a donc été proposée pour s'affranchir de cet inconvénient. Cette séquence, présentée sur la Figure 8b, découle directement de la séquence COSY et diffère de celle-ci par l'ajout d'une impulsion à 90° accolée à l'impulsion de détection. La deuxième et la troisième impulsions à 90° , séparées par un court délai Δ , constituent un filtre double quanta qui élimine les signaux non-couplés (période de mélange), réduisant alors les perturbations dues aux signaux diagonaux. Le spectre obtenu à partir de la séquence COSY-

DQF (Figure 8c) permet de corrélérer les déplacements chimiques des protons couplés entre eux par des constantes 3J .

3.2.3 TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY)

La séquence TOCSY [108] (Figure 9a) débute par une période de préparation constituée d'un délai de retour à l'équilibre des aimantations suivi d'une impulsion à 90° . Pendant le temps t_1 , les aimantations évoluent sous l'effet des couplages et des déplacements chimiques. La période de mélange qui suit est constituée d'une série d'impulsions appelée « spin-lock » permettant un transfert de cohérence sur tout le système de spins. Enfin, les aimantations évoluent à nouveau sous l'effet des déplacements chimiques et des couplages et la détection du signal se fait pendant t_2 . Sur le spectre Figure 9b, les pics de corrélation relient entre eux tous les noyaux d'un même système de spins.

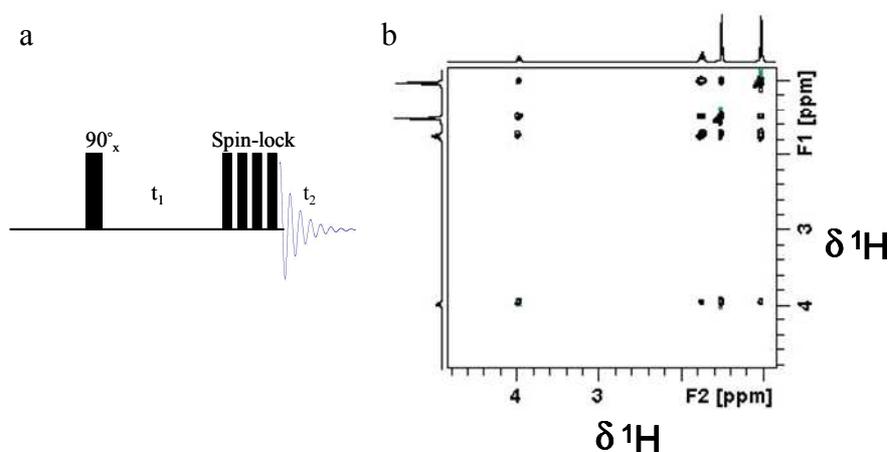


Figure 9 : TOCSY (a) séquence d'impulsions (b) spectre TOCSY 1H du 2-chlorobutane.

Les spectres TOCSY peuvent parfois présenter des distorsions du signal qui sont créées par les cohérences zéro-quanta. Pour s'en affranchir, un filtre zéro-quantum [109] est ajouté dans la séquence d'impulsions (cf. Figure 19b page 51) : il permet de gagner en sensibilité et d'améliorer la forme des raies en éliminant le signal provenant des cohérences zéro-quanta.

3.2.4 INADEQUATE

La séquence INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment) [29, 110-112] permet d'élucider la structure de molécules organiques à partir des connectivités existant entre les carbones du squelette de ces molécules, et plus précisément à partir des couplages ^{13}C - ^{13}C . Du fait de la faible abondance naturelle du ^{13}C , seulement 1% des molécules possède un ^{13}C et par conséquent, seulement une molécule sur 10000 en comporte deux. Pour pouvoir observer uniquement les connectivités ^{13}C - ^{13}C , le signal dû aux molécules mono-marquées en ^{13}C doit être filtré. Le motif d'impulsions de la séquence, présenté sur la Figure 10, permet d'éliminer ce signal. Tout d'abord, les aimantations reviennent à l'équilibre pendant la période de préparation avant d'être basculées dans le plan transversal par une impulsion à 90° . L'écho de spin qui suit permet de refocaliser les déplacements chimiques mais pas les couplages. La deuxième impulsion à 90° fait passer les

aimantations dans un état multi-quanta. Ensuite, pendant la période d'évolution, les aimantations évoluent dans un état double quanta avant que la dernière impulsion à 90° ne les fasse repasser dans un état simple quanta. Enfin, les aimantations évoluent à nouveau librement et le signal est détecté pendant t_2 . Le spectre obtenu à partir de cette séquence permet de corrélérer les déplacements chimiques des carbones ^{13}C couplés entre eux par des constantes $^1J_{\text{CC}}$.

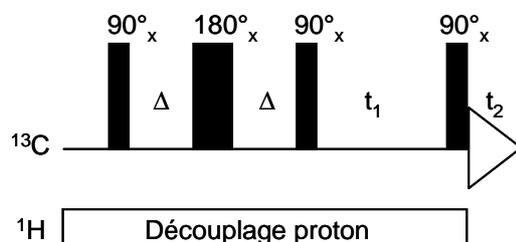


Figure 10 : Schéma d'impulsions de la séquence INADEQUATE.

Bien que cette séquence soit surtout utilisée pour étudier les connectivités ^{13}C - ^{13}C , elle a également été adaptée pour analyser les couplages proton [111, 113, 114].

3.2.5 HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

La séquence HSQC [115] (Figure 11a) permet de corrélérer entre eux les protons et les carbones qui les portent. Après relaxation des aimantations ^1H , un motif INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) [116] est appliqué afin de transférer l'aimantation des protons sur les carbones. Ensuite, pendant la période d'évolution, un écho de spins permet de refocaliser les couplages et de laisser évoluer librement les déplacements chimiques. Un motif rétro-INEPT est ensuite utilisé afin de transférer l'aimantation des ^{13}C vers les ^1H avant la détection du signal pendant le temps t_2 .

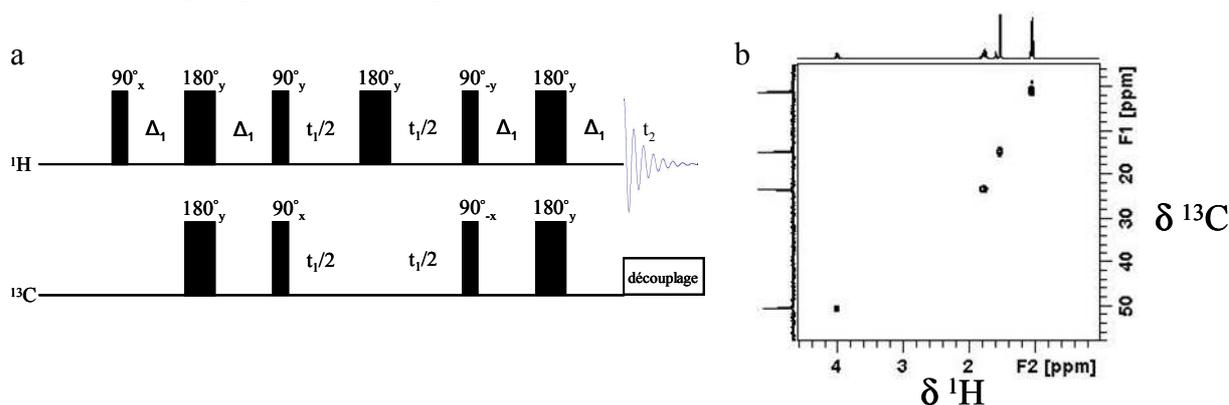


Figure 11 : HSQC (a) séquence d'impulsions (b) spectre HSQC ^1H - ^{13}C de 2-chloro-butane.

3.3 Intérêt de la RMN 2D pour l'analyse quantitative

La RMN 1D est utilisée depuis des années en tant qu'outil analytique dans l'identification de petites molécules et dans leur quantification. Cependant, dès que le mélange contient plusieurs composés, les risques de superposition s'accroissent et la quantification devient plus

difficilement envisageable (cf. Figure 12a). L'utilisation de la RMN 2D permet de s'affranchir de cette limitation en réduisant le recouvrement, comme le montre la Figure 12: par exemple, sur le spectre 1D, les massifs de composés myo inositol, taurine et arginine se chevauchent autour des 3 ppm alors que sur le spectre 2D, la superposition a totalement disparu et il existe au moins un pic bien séparé des autres pour pouvoir quantifier les métabolites en question [117, 118].

En plus d'apporter une meilleure discrimination des résonances, la RMN 2D présente également l'avantage de regrouper un grand nombre de séquences, et donc de corrélations différentes (dont certaines sont citées au paragraphe 3.2) afin de pouvoir envisager l'élucidation de façon quantitative d'un problème donné [119, 120].

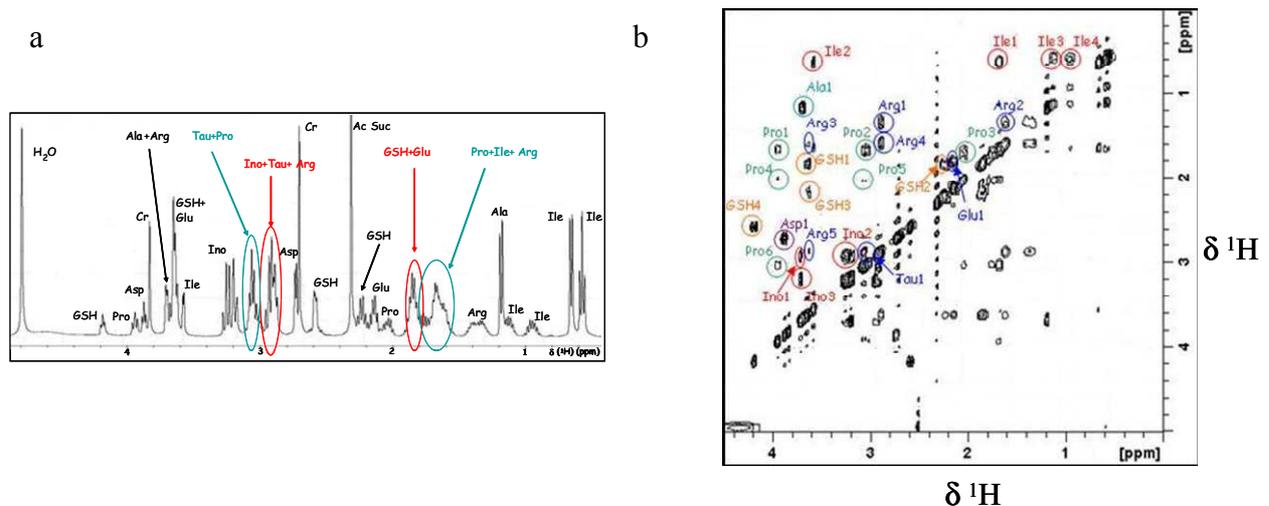


Figure 12 : Spectres RMN d'un mélange de métabolites en RMN- ^1H 1D (a) et en 2D (b). La superposition des signaux de certains métabolites en 1D disparaît lorsque le même mélange est analysé en 2D (dans l'exemple ci-dessus, avec une séquence TOCSY).

3.4 Inconvénients de la RMN 2D pour l'analyse quantitative

Bien que la RMN 2D soit un outil permettant de limiter les recouvrements des pics, son utilisation pour analyser quantitativement des échantillons nécessite cependant de prendre en compte des contraintes spécifiques liées à la 2D.

Tout d'abord, les volumes des pics ne dépendent pas uniquement de la concentration en métabolite : un grand nombre de paramètres ont une influence sur ces volumes, comme les temps de relaxation, les profils d'excitation, les périodes de mélange et d'évolution ou encore les couplages homo- ou hétéronucléaires [118, 121]. De plus, contrairement aux séquences mono-impulsionnelles couramment employées en 1D, les séquences de RMN 2D sont constituées de plusieurs impulsions, ce qui les rend plus sensibles aux imperfections d'impulsions [122]. Par conséquent, dans le cadre d'analyses quantitatives, il sera nécessaire de vérifier l'influence de ces paramètres, et donc la linéarité des séquences étudiées, par l'établissement de courbes d'étalonnage.

L'un des autres inconvénients majeurs de la RMN 2D est la durée d'expérience : en effet, celle-ci est à la fois proportionnelle au nombre d'incrémentations dans la première dimension, permettant d'échantillonner correctement cette dimension, et au nombre d'accumulations (ou nombre de scans ns) nécessaire pour obtenir un rapport signal-sur-bruit permettant d'atteindre la précision souhaitée. Pour que ces contraintes soient remplies, ces deux paramètres doivent être suffisamment grands, ce qui a pour conséquence d'allonger de façon considérable la durée des expériences RMN. En plus de générer des problèmes d'occupation des spectromètres, les expériences deviennent alors plus sensibles aux instabilités temporelles de l'appareillage, qui s'expriment d'autant plus que le temps d'acquisition est long [16].

3.5 RMN 2D quantitative appliquée aux milieux complexes

Quelques études de RMN 2D quantitative ont été menées en HR-MAS à l'aide de la séquence TOCSY ([123, 124]). A partir de cellules cancéreuses du sein, de la prostate, etc., une étude comparative entre celles-ci et les fibroblastes (jeunes cellules du tissu conjonctif) a été réalisée, ainsi qu'une étude sur la réponse cellulaire vis-à-vis d'un traitement de chimiothérapie [123]. La quantification s'est faite à l'aide d'un logiciel informatique après ajout d'une référence interne dans les échantillons. La mesure des concentrations en métabolites a permis d'établir des profils métaboliques des lignées cellulaires étudiées et mettre en évidence les voies métaboliques touchées par le traitement médical. Morvan *et al.* ont quant à eux travaillé sur des souris en leur injectant des tumeurs cancéreuses (mélanome et carcinome du poumon) et pour certaines d'entre elles un traitement contre la maladie, leur but étant d'étudier la réponse tumorale à des traitements et de déterminer la (les) voie(s) métabolique(s) associée(s) [124]. Après ajout d'une référence interne et analyse, la quantification s'est faite par intégration des signaux (rectangle autour des tâches d'intérêt) à l'aide d'un logiciel adapté et le calcul des concentrations a permis d'élucider le métabolisme de la tumeur.

En RMN du liquide, plusieurs équipes se sont également intéressées à la quantification de métabolites dans les milieux complexes. Ainsi, Massou *et al.* ont travaillé en milieu enrichi en ^{13}C sur les cellules *Escherichia Coli* afin d'analyser de façon quantitative les flux métaboliques : pour cela, ils ont utilisé la séquence TOCSY optimisée par un filtre zéro quantum [74, 77]. Gowda *et al.* ont aussi travaillé en milieu enrichi en marquant du plasma avec du ^{15}N -éthanolamine et du ^{13}C -acide formique afin d'augmenter la sensibilité et la résolution des expériences TOCSY et HSQC (^1H - ^{15}N et ^1H - ^{13}C) [125]. Dans certains échantillons, ils ont ajouté un mélange modèle puis ont mesuré les concentrations des métabolites par rapport à une référence interne : la comparaison des concentrations des échantillons avec et sans ajout du mélange modèle a montré la bonne adéquation des résultats et donc la faisabilité de la quantification.

Ludwig *et al.* ont étudié des extraits de gonades de poissons à l'aide de la séquence J-résolue [126]. Pour la quantification, ils ont établi des courbes de corrélation entre les concentrations

calculées à partir des spectres 2D et celles calculées à partir de la 1D et ont montré que cette séquence pouvait être envisagée pour la quantification de métabolites. Dans le même but, Alonso *et al.* ont calculé les concentrations de métabolites dans les muscles de grenouille à partir de la séquence COSY-DQF [127].

La potentialité de la séquence HSQC pour la quantification de métabolites dans les milieux complexes a été traitée dans un certain nombre de publications. Ainsi, pour comprendre le métabolisme cellulaire dans le cancer du sein, Richardson *et al.* ont quantifié les métabolites après extraction dans un mélange chloroforme/méthanol en utilisant la méthionine en tant que référence interne [128]. Hu *et al.* ont travaillé avec la séquence HSQC ^1H - ^{13}C sur le lait pour en contrôler la qualité : après optimisation sur un mélange modèle de métabolites pour vérifier la proportionnalité entre le signal récupéré et la concentration, l'application a été faite de manière concluante sur les composés du lait [129]. Xi *et al.* sont également partis d'un mélange modèle pour mettre au point un programme de reconnaissance des pics et de calcul de l'intensité [130]. Après comparaison avec les résultats obtenus en 1D pour la quantification, ils ont appliqué avec succès leur méthode sur différentes matrices biologiques (sur des muscles d'ormeau, sur des œufs de poisson et sur des foies de truite). Gronwald *et al.* ont eux aussi tracé des courbes d'étalonnage pour quantifier les métabolites présents dans l'urine : elles ont permis d'établir des limites de détection et de quantification de certains métabolites [7].

D'autres équipes ont cherché à prendre en compte les paramètres pouvant influencer la quantification. Par exemple, Heikkinen *et al.* ont quantifié les métabolites de la lignine du bois à l'aide de la séquence Q-HSQC (avec suppression de la dépendance en J du transfert de polarisation) : ils ont utilisé plusieurs valeurs de délais Δ afin d'obtenir une réponse uniforme sur l'ensemble des valeurs de J_{CH} [131]. Des tests concluants sur un mélange de référence ont permis de vérifier le caractère quantifiable de la séquence Q-HSQC avant de l'appliquer sur la lignine. Rai *et al.* ont eux aussi voulu prendre en compte tous les paramètres influençant l'aire des pics : au lieu de tracer des courbes d'étalonnage, ils ont corrélé le volume des pics (qui dépend d'un certain nombre de paramètres RMN) avec la concentration en métabolite à l'aide d'une équation prenant en compte les couplages hétéronucléaires, la fréquence de résonance des protons ou encore les temps de relaxation [121]. Ils ont ensuite appliqué cet outil avec succès sur des métabolites dans l'urine. Cependant, cette méthode s'avère être longue à employer et pas très adaptée pour un grand nombre de composés.

Dans toutes les études résumées précédemment, aucune mention concernant l'optimisation de la durée des expériences n'a été évoquée. Or, celle-ci représente l'un des inconvénients majeurs de la RMN 2D, comme cela a été mentionné au paragraphe 3.4. Les travaux réalisés par Giraudeau *et al.* [132] et par Lewis *et al.* [117] s'inscrivent dans cette optique. Les premiers ont optimisé deux séquences de RMN 2D (J-résolue et COSY-DQF), et plus particulièrement les paramètres d'acquisition et de traitement, afin d'obtenir des mesures quantitatives en un minimum de temps. Ils ont effectué leurs travaux sur des mélanges tropine/nortropine à différentes concentrations afin d'établir des droites d'étalonnage pour vérifier la faisabilité de leurs expériences. Ils ont ainsi pu réaliser l'acquisition de spectres

J-résolus en moins de trois minutes et de spectres COSY-DQF en 12 minutes. Cependant, cette étude s'est faite sur un mélange modèle et non pas un milieu complexe. Les seconds, quant à eux, ont mis au point une méthode de quantification (FQM : Fast Metabolite Quantification), pour la séquence HSQC ^1H - ^{13}C à partir d'un mélange modèle de 26 métabolites. Ils ont ainsi obtenu des spectres en 12 min, puis tracé des courbes d'étalonnage représentant l'intensité absolue de chaque pic en fonction de la concentration : les valeurs atteintes sont comprises entre 230 mM et 40 μM . Pour finir, ils ont appliqué leur méthode sur des extraits de tissus de plantes et ont ainsi pu quantifier les métabolites présents dans ces échantillons.

Partie 2 : Optimisation de la RMN 2D quantitative pour l'étude de milieux complexes

1 Introduction

Comme cela a été présenté au paragraphe 1.3.4, de nombreuses études ont permis de montrer l'intérêt de la RMN dans le cadre de la métabolomique et de la métabonomique. En effet, cette technique, associée à une méthode d'extraction adéquate et à une analyse statistique des résultats, permet de comprendre les phénomènes biologiques mis en jeu dans certaines pathologies par exemple. Cependant, les informations obtenues restent généralement partielles du fait du recouvrement de certains signaux qui empêche la quantification précise des métabolites (cf. Figure 12a).

La RMN 2D semble être une solution à ce problème : en effet, l'acquisition des données dans deux dimensions permet d'envisager une meilleure discrimination des signaux et donc de quantifier avec une meilleure précision les composés correspondants. Malgré ce fort potentiel, cette technique n'a été que peu utilisée jusqu'à maintenant pour mesurer les concentrations de métabolites dans des milieux complexes, comme le montrent les exemples cités au paragraphe 3.5. Nous avons donc envisagé cette approche afin de quantifier les métabolites présents dans les cellules de cancer du sein et d'identifier des marqueurs biologiques potentiels de cette pathologie.

Cependant, l'un des inconvénients majeurs reste le temps d'expérience. En effet, ce dernier dépend de la construction de la première dimension, puisqu'il est proportionnel au nombre d'incrément t_1 servant à obtenir des spectres correctement résolus dans la dimension F_1 , mais également du nombre de scans nécessaire pour accumuler suffisamment de signal. Ce temps d'expérience doit donc être assez long afin de permettre l'obtention de spectres ayant une sensibilité et une résolution correctes, ce qui entraîne, en plus des problèmes de logistique liés à l'occupation des spectromètres, une sensibilité des expériences aux instabilités temporelles des appareils. Par conséquent, avant d'envisager la quantification des métabolites par RMN 2D, il est indispensable d'optimiser la méthode d'acquisition des données de RMN 2D afin d'aboutir à des analyses suffisamment rapides et qui soient quantitatives.

2 Etude préliminaire

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur un mélange modèle constitué de onze métabolites susceptibles de se trouver dans les cellules du cancer du sein afin de sélectionner

des séquences présentant un intérêt pour le quantitatif, celles-ci devant par la suite permettre de quantifier des métabolites de façon précise et en un temps réduit.

2.1 Préparation de l'échantillon

Une solution tampon phosphate ($C = 2 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 2$ car une faible valeur de pH permet de protoner tous les métabolites et donc de minimiser les interactions entre eux) a été préparée dans du D_2O . Les onze métabolites constituant le mélange modèle (créatine, L-alanine, glutathion, L-isoleucine, L-acide aspartique, L-proline, acide succinique, taurine, L-arginine, myo-inositol et L-glutamine) ont été pesés de façon à ce qu'une fois dissous dans un millilitre de tampon, leur concentration soit de 50 mmol/L dans l'échantillon. Après homogénéisation, l'échantillon a été filtré puis analysé dans un tube de 5 mm de diamètre.

2.2 Partie expérimentale

L'acquisition des spectres a été réalisée sur un spectromètre Bruker Avance DPX 400 muni d'une sonde double accord $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ dual+ 5 mm et opérant à la fréquence proton de $400,13 \text{ MHz}$. Les mesures ont été effectuées à une température de 298 K et les spectres ont été acquis et traités à l'aide du logiciel Topspin.

Les séquences utilisées sont celles présentées dans le paragraphe 3.2 : spectroscopie J-résolue, HSQC, COSY-DQF, TOCSY et COSY-45 (Par rapport à une COSY, la seconde impulsion à 90° est remplacée par une impulsion à 45° dans la COSY-45 [14] : les raies, et en particulier celles d'auto-corrélation, sont alors moins intenses, ce qui permet de mettre en évidence les massifs de corrélation proches de la diagonale). Nous avons également employé une sixième séquence : l'INADEQUATE symétrisée proton, modifiée à partir de la séquence disponible sur le spectromètre en ajoutant un motif de présaturation de l'eau. Le motif d'impulsions est présenté sur la Figure 13.

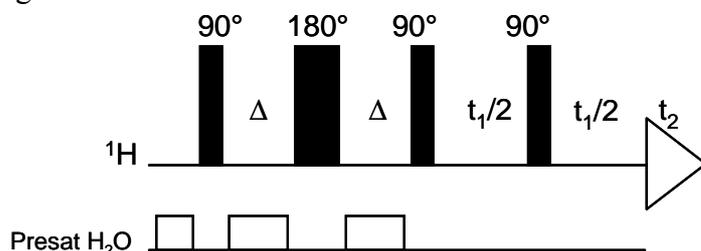


Figure 13 : Séquence d'impulsions de l'INADEQUATE symétrisée proton ($\Delta = 1/4J_{\text{HH}}$).

Pendant la période de préparation, les aimantations, revenues à l'équilibre, sont basculées dans le plan transversal par une impulsion à 90° . L'écho de spin qui suit permet de refocaliser les déplacements chimiques mais pas les couplages. La deuxième impulsion à 90° fait passer les aimantations dans un état multi-quanta. Pendant la première moitié de la période d'évolution, les aimantations évoluent donc dans un état double quanta avant que la dernière

impulsion à 90° ne les fasse repasser dans un état simple quanta. Enfin, les aimantations évoluent à nouveau librement et le signal est détecté pendant t_2 . Le spectre obtenu à partir de cette séquence permet de corrélérer les déplacements chimiques des protons couplés entre eux par des constantes 3J .

Le terme « symétrisée » provient du fait que la dernière impulsion à 90° sépare la période d'évolution en deux, ce qui mène à l'obtention d'un spectre RMN-2D ayant la même gamme dans les deux dimensions, contrairement au spectre 2D obtenu avec une séquence INADEQUATE standard où la gamme dans la dimension 1 est le double de celle de la dimension [111].

Cette séquence permet l'acquisition de spectres ayant des raies diagonales nettement moins intenses que celles de la TOCSY et des différentes COSY. Cette forte atténuation du signal diagonal limite les risques de superpositions éventuelles entre les massifs de la diagonale et les massifs de corrélation, ce qui rend les spectres plus "propres" et donc plus propices à être utilisés pour la quantification.

Toutefois, les spectres INADEQUATE- 1H présentent des pics supplémentaires et non-symétriques. Ces pics sont à priori dus à des couplages au second ordre et ne peuvent être supprimés par un cycle de phase car leur ordre de cohérence est le même que celui des pics d'intérêt (l'ajout de gradients, présenté dans le paragraphe 3.1.2.1, ne peut également pas les éliminer). Une symétrisation du spectre par rapport à la diagonale permet d'éliminer des raies supplémentaires mais elle engendre en revanche des raies artificielles : par conséquent, une fois les raies identifiées sur les spectres symétrisés, ces derniers sont à nouveau traités afin que la quantification soit réalisée sur des spectres non symétrisés.

Sur la totalité des spectres, le signal de l'eau a été supprimé en appliquant dans les séquences d'impulsions une onde continue de faible amplitude à la fréquence de résonance des protons de l'eau pendant le délai de récupération d_1 , le filtre BIRD (pour la HSQC) et la période d'évolution double quanta (pour l'INADEQUATE symétrisée proton).

Chaque séquence a été réalisée avec deux protocoles : l'un standard, tenant compte des paramètres de base proposés par le constructeur, et l'autre dans lequel les paramètres d'acquisition (nombre de scans n_s et nombre d'incrémentations TD1) ont été optimisés pour obtenir un temps d'expérience minimum sans perte de justesse ou de précision. La séparation des raies ainsi que la comparaison du rapport signal-sur-bruit entre les différents spectres permettent d'évaluer l'efficacité des séquences étudiées [132].

2.3 Résultats et discussion

Les critères de sélection de ces séquences sont les suivants : l'identification précise d'un maximum de métabolites, la résolution, la sensibilité, la précision, la possibilité de réduire le temps d'analyse pour réaliser un outil diagnostique à partir de cette méthode.

Pour les séquences J-résolue, HSQC et TOCSY, les spectres obtenus et les valeurs des rapports S/B mesurés avec des temps d'acquisition longs et courts sont regroupés sur la Figure 14 et dans le Tableau III:

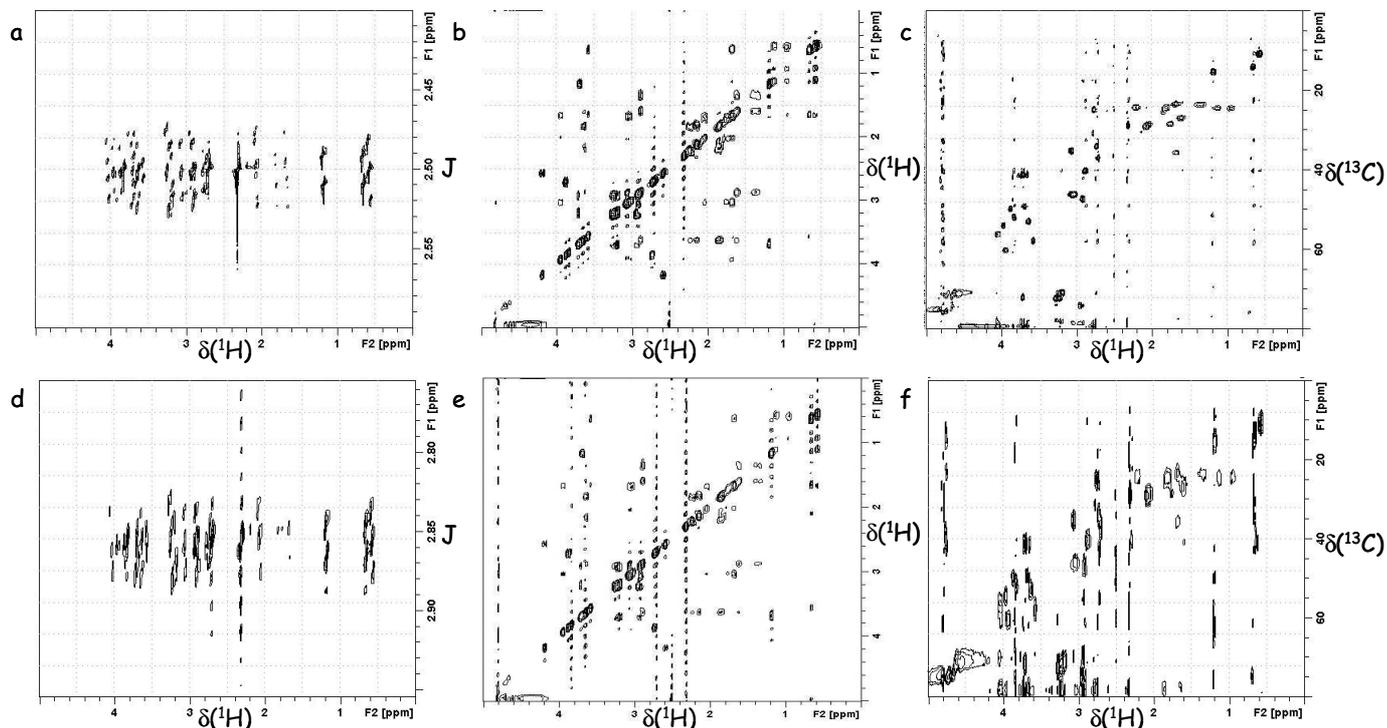


Figure 14 : Spectres du mélange modèle en haut réalisés avec un temps d'expérience long et en bas avec un temps d'expérience court. (a) et (d) J-résolue (3h23min et 4min), (b) et (e) TOCSY (1h44min et 26 min), (c) et (f) HSQC (3h30min et 30min).

Tableau III : Rapports signal-sur-bruit selon les deux dimensions mesurés sur les raies de l'isoleucine (première ligne) et du glutathion (deuxième ligne) pour les séquences J-résolue, TOCSY et HSQC.

Temps d'acquisition	S/B (selon F1)			S/B (selon F2)		
	J-résolue	TOCSY	HSQC	J-résolue	TOCSY	HSQC
- long	84,54	31,46	23,05	739,87	98,51	20,37
	71,07	50,22	36,15	151,06	160,3	59,56
- court	17,35	17,27	11,88	225,49	143,68	11,15
	16,35	11,64	12,51	150,44	430,77	14,88

Les raies obtenues sur les spectres HSQC sont nettement séparées les unes des autres, plus particulièrement pour un temps d'expérience long, ce qui signifie qu'au moins une raie par

métabolite peut être identifiée et donc utilisée pour la quantification. Cependant, du fait de la faible abondance du ^{13}C , les rapports S/B mesurés sont peu élevés et ce, pour des échantillons à l'évidence plus concentrés que ceux qui seront obtenus à partir des extraits cellulaires : par conséquent, malgré une bonne discrimination grâce à la corrélation ^{13}C - ^1H , la séquence HSQC ne sera pas utilisée pour le reste de l'étude.

La séquence J-résolue a permis l'acquisition de spectres ayant un rapport signal-sur-bruit identique voire même supérieur à ceux obtenus avec la séquence TOCSY. Cependant, quelle que soit la durée d'expérience, les signaux des spectres J-résolus se recouvrent, ce qui rend difficile la quantification des métabolites. En revanche, pour chaque composé du mélange modèle, nous pouvons identifier au moins une raie bien séparée des autres sur les spectres TOCSY, ce qui permet d'envisager leur quantification. Par conséquent, la séquence J-résolue ne peut être conservée pour la suite de l'étude, contrairement à la séquence TOCSY.

Passons maintenant aux trois autres séquences (COSY-DQF, COSY-45 et INADEQUATE symétrisée proton) qui permettent d'obtenir le même type d'informations, c'est-à-dire la corrélation des déplacements chimiques des protons couplés entre eux par des constantes 3J . Les spectres obtenus en utilisant des durées d'expérience courtes et longues sont représentés sur la Figure 15.

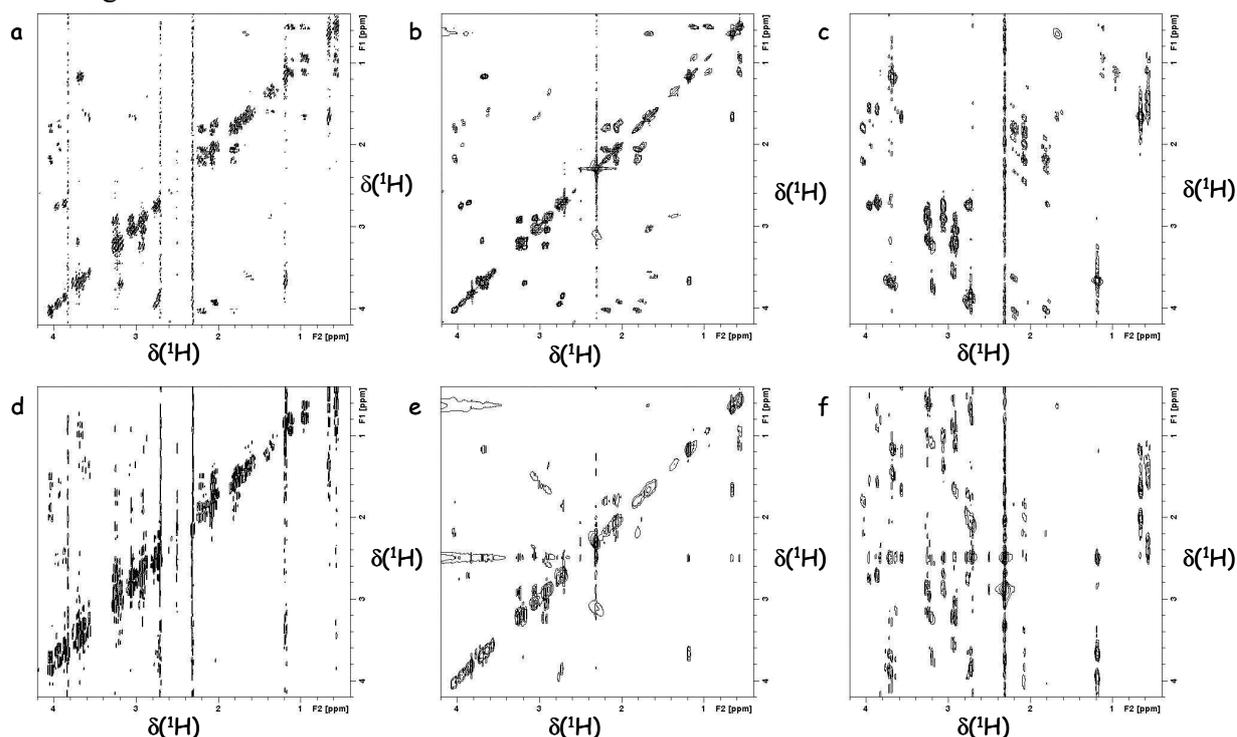


Figure 15 : Spectres du mélange modèle obtenus avec des temps d'acquisition long (spectres du haut) et court (spectres du bas). (a) et (d) COSY-DQF (6h02 et 22 min), (b) et (e) COSY-45 (6h02 et 24 min), (c) et (f) INADEQUATE symétrisée proton (6h05 et 25 min).

En ce qui concerne la séquence COSY-DQF, certains métabolites peuvent être identifiés sur le spectre (a) grâce à la discrimination de raies mais ce n'est pas le cas sur le spectre (d) sur lequel les raies sont mal résolues. De plus, les raies de la diagonale des spectres COSY-DQF sont plus intenses que celles des spectres réalisés à partir de la COSY-45, ce qui rend cette

dernière plus sensible et limite les risques de chevauchements entre les raies de la diagonale et les raies de corrélation qui en sont proches. Enfin, les rapports S/B mesurés (cf. Tableau IV) sont plus faibles que ceux des spectres COSY-45 et INADEQUATE proton. Par conséquent, la séquence COSY-DQF ne répond pas à première vue aux critères de sélection cités en début de ce paragraphe. Cependant, comme Giraudeau *et al.* ont montré récemment qu'elle présentait un potentiel intéressant dans le cadre d'analyses quantitatives rapides et précises [132], elle sera conservée pour la suite de l'étude.

Tableau IV : Rapports signal-sur-bruit selon les deux dimensions mesurés sur les raies de l'isoleucine (première ligne) et du glutathion (deuxième ligne) pour les séquences COSY-DQF, COSY-45 et INADEQUATE symétrisée proton.

Temps d'acquisition	S/B (selon F1)			S/B (selon F2)		
	COSY-DQF	COSY-45	INADEQUATE symétrisée proton	COSY-DQF	COSY-45	INADEQUATE symétrisée proton
- long	14,54	104,56	41,63	517,69	667,94	2062,32
	88,69	107,58	26,39	128,12	205,14	296,85
- court	3,48	14,85	19,22	65,82	58,36	610,52
	12,43	24,42	23,83	14,40	23,86	137,01

Les séquences COSY-45 et INADEQUATE symétrisée proton permettent d'identifier les mêmes métabolites, et les spectres correspondants sont obtenus avec des durées comparables. La mesure des rapports S/B met en évidence une plus grande sensibilité de la séquence INADEQUATE symétrisée proton vis-à-vis de la COSY-45. Cette dernière ne sera donc pas conservée pour la suite de l'étude. En ce qui concerne le spectre proton obtenu par réduction du temps d'expérience de l'INADEQUATE, celui-ci semble présenter un plus grand nombre de signaux que celui acquis avec un temps d'expérience plus long. L'INADEQUATE rapide sera donc à optimiser afin de vérifier que les raies obtenues sont bien des raies de corrélation attendues et non pas des signaux indésirables.

Ces premiers résultats montrent que les spectres 2D TOCSY et INADEQUATE proton obtenus sur le mélange modèle remplissent les critères de sélection énoncés au début du paragraphe 2.3. Par la suite, les séquences choisies vont donc être optimisées et comparées afin de déterminer leur potentialité en termes de quantification. Comme expliqué précédemment, la séquence COSY-DQF vient s'ajouter aux deux autres séquences sélectionnées pour le développement de notre méthode analytique.

3 Mise au point d'une méthode rapide de RMN 2D quantitative pour l'étude des cellules du cancer du sein

Cette partie aborde le dernier point de notre étude : l'optimisation et l'évaluation d'une méthode rapide de RMN 2D pour la quantification de métabolites dans les milieux complexes. Après la sélection préalable des séquences présentant un intérêt pour ce type d'analyse, nous avons procédé à l'optimisation de celles-ci afin de réduire les temps d'expérience tout en obtenant des mesures précises. La séquence donnant les meilleurs résultats a ensuite été conservée pour étudier la répétabilité et la linéarité de cette méthode sur des mélanges modèles à différentes concentrations. Enfin, l'applicabilité de notre méthode aux extraits cellulaires a été vérifiée.

Les séquences choisies sont finalement au nombre de trois : ZQF-TOCSY, INADEQUATE symétrisée proton et COSY-DQF. La première est une TOCSY à laquelle a été ajoutée un filtre zéro quantum avant et après la période de mélange, afin d'apporter un gain en sensibilité et d'améliorer la forme des raies [109]. La sélection de celle-ci semble évidente puisqu'elle a déjà été optimisée pour l'analyse quantitative précise en un temps minimal [74, 77]. La deuxième et la troisième séquences sont sélectionnées pour la suite de l'étude pour les raisons énoncées au paragraphe 2.3.

3.1 Choix de la séquence de RMN 2D

3.1.1 Préparation de l'échantillon

La poursuite de l'étude a été réalisée à partir d'un nouveau mélange modèle contenant moins de métabolites que le précédent, notamment pour que l'optimisation de l'INADEQUATE symétrisée proton ne soit focalisée que sur un nombre restreint de métabolites et donc de signaux. Pour cela, une solution tampon phosphate (pH = 2, C = 0,1 mol/L) a été préparée dans D₂O. Les six métabolites constituant ce mélange modèle (L-alanine, glutathion, acide lactique, L-proline, taurine et myo-inositol) ont été pesés de façon à ce qu'une fois dissous dans un millilitre de tampon, leur concentration soit de 50 mmol/L dans l'échantillon. Après homogénéisation, l'échantillon a été filtré puis analysé dans un tube de 5 mm de diamètre.

3.1.2 Optimisation de la séquence INADEQUATE symétrisée proton

Avant de travailler sur la comparaison des trois séquences sélectionnées, un développement de la séquence INADEQUATE symétrisée proton est nécessaire afin d'en faire un outil pour l'analyse quantitative rapide, car elle n'a jamais été optimisée, contrairement aux autres séquences choisies.

3.1.2.1 Paramètres d'acquisition et de traitement

L'acquisition des spectres a été réalisée sur un spectromètre Bruker Avance DPX 400 opérant à la fréquence proton de 400,13 MHz et muni d'une sonde double accord $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ dual+ 5 mm équipée de gradients selon l'axe z. Les mesures ont été effectuées à une température de 298 K et les spectres ont été acquis et traités à l'aide du logiciel Topspin. Sur tous les spectres, le signal de l'eau a été supprimé en appliquant une onde continue de faible amplitude à la fréquence de résonance des protons de l'eau pendant le délai de récupération d_1 et la période d'évolution double quanta pour l'INADEQUATE symétrisée proton.

Le temps d'expérience est proportionnel au nombre d'accumulations (ou nombre de scans ns) ainsi qu'au nombre de points TD1 nécessaire pour échantillonner le signal dans la dimension indirecte F_1 . Par conséquent, pour réduire le temps d'analyse, les paramètres TD1 et ns doivent être les plus petits possibles tout en obtenant des mesures qui soient précises et des spectres possédant une résolution suffisante pour séparer les massifs d'intérêt. Chaque séquence de RMN 2D possède un cycle de phase avec un nombre N de pas : il permet de sélectionner les chemins de cohérence aboutissant au signal souhaité et d'éliminer les imperfections dues aux impulsions. La séquence INADEQUATE- ^1H , fournie par le constructeur, qui nous a servi de point de départ est dotée d'un cycle de phase à 64 pas. Avant de pouvoir diminuer TD1 et/ou ns, il faut donc tout d'abord réduire le nombre de pas de ce cycle de phase tout en conservant le signal voulu sur les spectres, avec un rapport S/B suffisant et une bonne présaturation de l'eau. Afin de compenser la réduction du cycle de phase, nous avons ajouté des gradients dans la séquence : ils permettent d'améliorer la sélection de cohérence aboutissant au signal double quanta souhaité et d'éliminer les signaux simple quanta (diagonale). La séquence avec gradients est présentée sur la Figure 16.

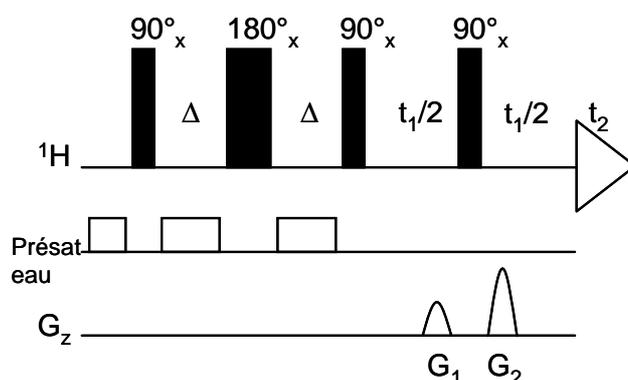


Figure 16 : Séquence INADEQUATE symétrisée proton avec $\Delta = 1/(4J_{\text{HH}}) = 35,7$ ms, $G_1 = 40\%$ et $G_2 = 80\%$ appliqués pendant 2 ms.

Après acquisition des spectres en mode magnitude, nous avons optimisé les paramètres de traitement : une fonction d'apodisation de type Lorentz-Gauss, avec $\text{LB} = -1$ Hz et $\text{GB} = 0,15$, est finalement appliquée dans les deux dimensions avant transformation de Fourier. La ligne de base est corrigée dans les deux dimensions à l'aide d'une fonction polynomiale de degré 3.

3.1.2.2 Résultats de l'optimisation

Pour une question de temps, nous avons tout d'abord travaillé en utilisant une séquence INADEQUATE 1D correspondant au premier incrément de temps dans la dimension indirecte.

Pour choisir le nombre de pas du cycle de phase, une acquisition est réalisée avec le cycle de phase complet constitué de 64 pas. Les rapports S/B sont mesurés sur le pic diagonal de l'eau et sur le pic non diagonal de l'acide lactique. Ensuite, le nombre de pas est réduit à quatre et à huit pas : les rapports S/B sont à nouveau mesurés et comparés aux précédents. Le Tableau V regroupe quelques unes des valeurs de S/B.

Tableau V : Comparaison des rapports S/B mesurés sur les signaux de l'alanine et de l'eau pour des séquences ayant différents cycles de phase. Les différents cycles de phase sont présentés en annexe 1.

Cycle de phase	S/B (acide lactique)	S/B (eau)
Complet	3725	100
8 premiers pas	2313	2230
8 pas (autres)	3245	60
4 premiers pas	5008	2124
4 pas (autres)	4630	1489

La séquence ayant un cycle de phase à 8 pas (autres que les huit premiers pas) permet d'obtenir le meilleur compromis entre diminution du signal de l'eau et conservation de l'intensité du pic de l'acide lactique : son comportement se rapproche de celui de la séquence ayant le cycle de phase complet, d'où le choix du cycle de phase à 8 pas.

A partir de ce résultat, nous avons effectué différents essais pour finalement conserver trois séquences : - une sans gradient et avec un cycle de phase à 8 pas ;

- une avec gradients et un cycle de phase à 8 pas ;

- une avec gradients et sans cycle de phase.

Les séquences sont ensuite utilisées en 2D pour étudier leur répétabilité, avec $n_s = 8$ et $TD1 = 128$. La répétabilité des séquences de RMN 2D est étudiée par l'acquisition successive de cinq spectres et déterminée par le calcul de la moyenne et de l'écart-type sur le rapport des volumes des raies par rapport à un composé de référence (acide lactique), ainsi que du coefficient de variation associé. De plus, le rapport signal-sur-bruit est également mesuré pour les pics d'intérêt. Ces derniers sont identifiés sur la Figure 23.

La Figure 17 regroupe l'ensemble des résultats obtenus. Pour chacune des séquences, les valeurs des coefficients de variation sont comprises entre 1,3% et 0,2% : elles changent peu d'une séquence à l'autre et restent inférieures à 2%. Pour la suite de l'optimisation de

l'INADEQUATE symétrisée proton, une seule séquence sera conservée, celle sans cycle de phase avec gradients : en effet, l'absence de cycle de phase permet une possible réduction de ns jusqu'à une valeur de 1 si besoin, donc une plus grande marge de manœuvre pour réduire le temps d'expérience.

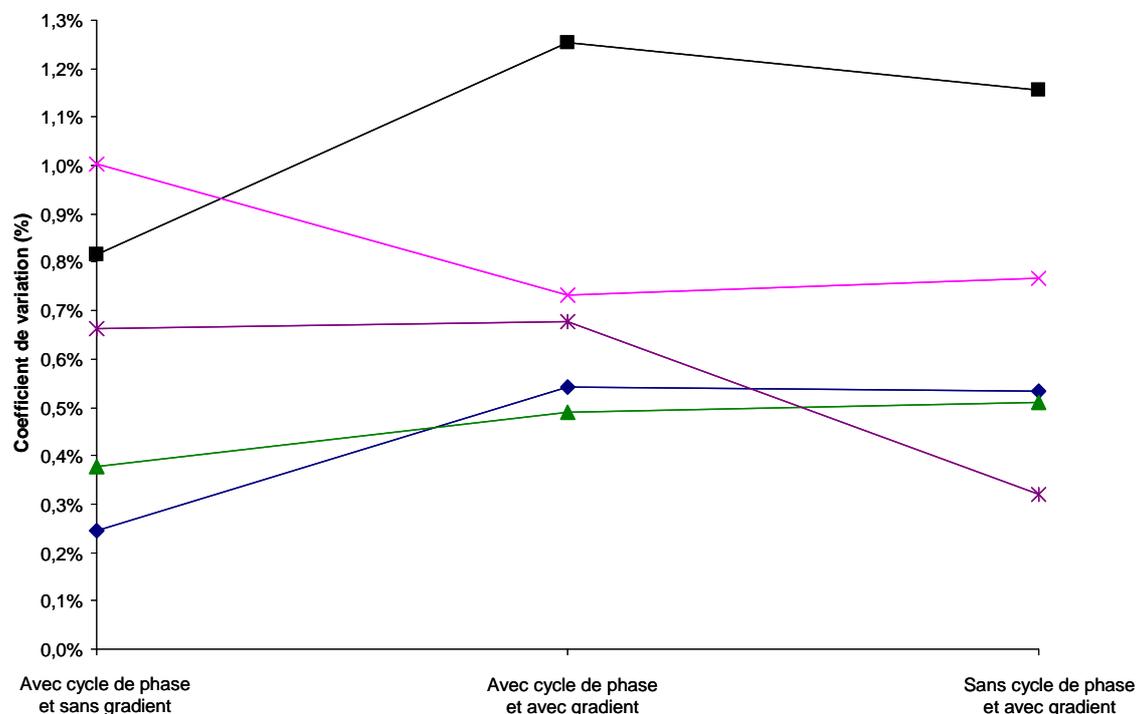


Figure 17 : Répétabilité des trois séquences INADEQUATE-¹H : représentation du coefficient de variation du rapport des volumes en fonction de la séquence utilisée. (◆) Alanine/Acide Lactique, (■) Proline/Acide Lactique, (▲) Myo Inostiol/Acide Lactique, (*) Taurine/Acide Lactique, (*) GSH/Acide Lactique.

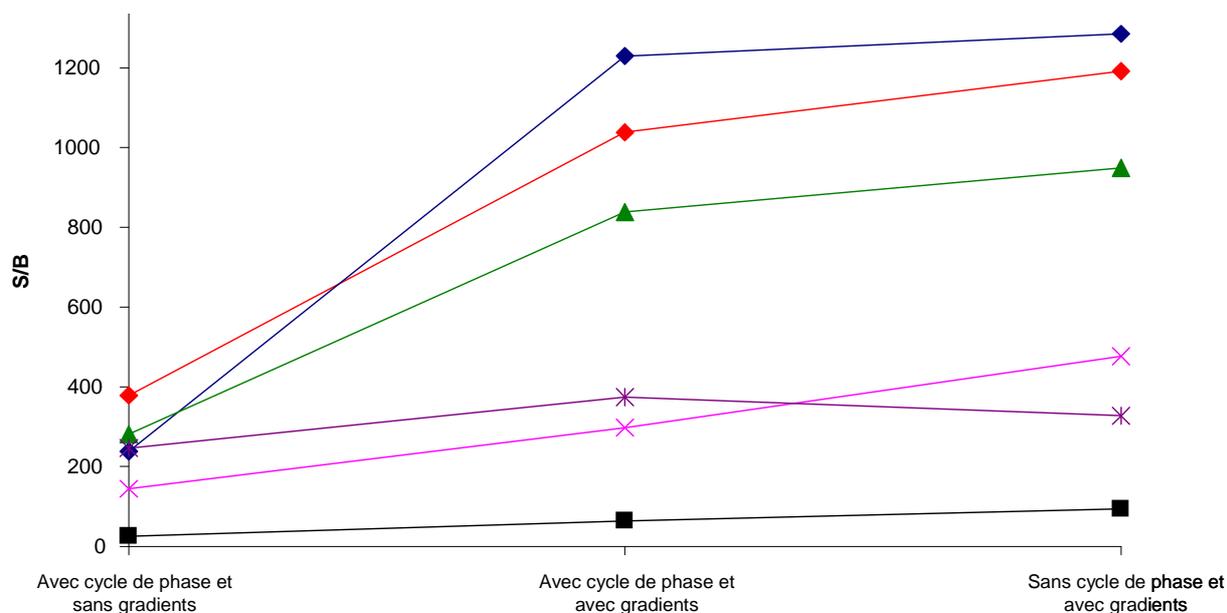


Figure 18 : Moyenne des S/B calculés sur les cinq expériences répétées en fonction de la séquence utilisée. ◆ Acide Lactique, ◆ Alanine, ■ Proline, ▲ Myo inositol, * Taurine, * GSH.

La mesure des rapports S/B permet également d'appuyer ce choix (Figure 18) : en effet, la séquence avec gradients et sans cycle de phase permet d'obtenir des valeurs globalement plus élevées que la séquence avec gradients et avec cycle de phase, et nettement plus élevées que celle sans gradients.

La séquence INADEQUATE symétrisée proton étant à présent optimisée, la suite consiste à évaluer laquelle des trois séquences sélectionnées permettra d'obtenir des mesures précises et quantitatives en un temps minimum.

3.1.3 Réduction du temps d'expérience

3.1.3.1 Paramètres d'acquisition et de traitement

Les conditions d'acquisition restent les mêmes que précédemment (spectromètre, température, présaturation du signal de l'eau, ...). Les séquences d'impulsions utilisées pour la ZQF-TOCSY et la COSY-DQF sont représentées sur la Figure 19.

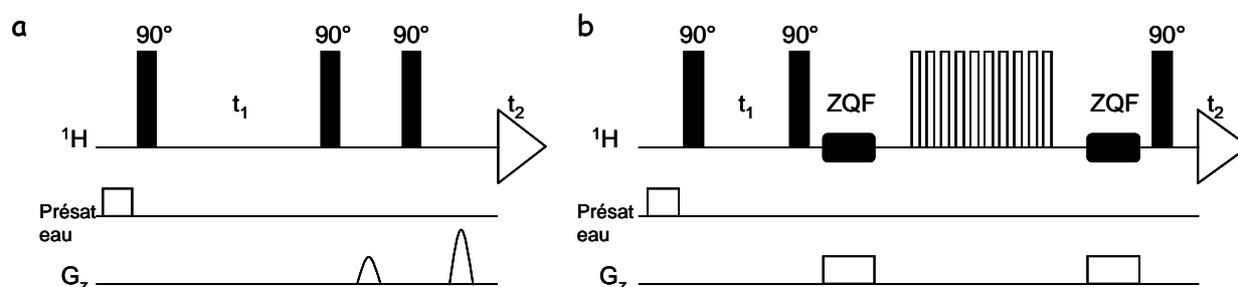


Figure 19 : Séquences d'impulsions (a) de la COSY-DQF, avec $G_1 = 40\%$ et $G_2 = 80\%$ appliqués pendant 2 ms et (b) de la ZQF-TOCSY avec le premier gradient appliqué pendant 50 ms et le second pendant 30 ms.

Par rapport à la TOCSY présentée dans le paragraphe 3.2.3, la ZQF-TOCSY comporte un filtre qui permet de gagner en sensibilité et d'améliorer la forme des raies en éliminant le signal provenant des cohérences zéro-quanta. Chacune des trois séquences est constituée d'un cycle de phase à un seul pas et de gradients. Le temps d'acquisition est de 0,5 s dans les trois séquences d'impulsions. Les paramètres de traitement ont été optimisés par Patrick Giraudeau [16] pour les séquences TOCSY et COSY-DQF et dans la partie 3.1.2.1 pour l'INADEQUATE symétrisée proton. Pour la ZQF-TOCSY, les FIDs sont multipliés par une fonction d'apodisation exponentielle de $LB = 0,3$ Hz avant transformation de Fourier et phasage des spectres. Pour obtenir les spectres COSY-DQF, traités en mode magnitude, une fonction d'apodisation sinus carré décalé de $\pi/24$ est appliquée aux FIDs dans la dimension F_2 et une de type sinus décalé de $\pi/8$ dans la dimension F_1 , le tout avant transformation de Fourier. Comme pour les spectres INADEQUATE- ^1H , une correction de ligne de base, de forme polynomiale de degré 3, est appliquée dans les deux dimensions. La répétabilité des séquences de RMN 2D est étudiée par l'acquisition successive de cinq spectres et déterminée par le calcul de la moyenne, de l'écart-type et du coefficient de variation sur le rapport des volumes des raies par rapport à un composé de référence (ici l'alanine). De plus, le rapport signal-sur-bruit est également mesuré pour les pics d'intérêt.

3.1.3.2 Résultats et discussion

Afin de réduire le temps d'expérience, nous avons tout d'abord travaillé en fixant le nombre d'incrément dans la dimension F_1 à 128 et en faisant varier le nombre de scans d'une valeur de 8, soit 1h36 d'expérience, à une valeur de 1, ce qui correspond à 12 min d'expérience. Les valeurs des coefficients de variation calculées pour chaque valeur de ns et chaque séquence sont regroupées sur la Figure 20.

Cette figure met tout d'abord en évidence le fait que la précision des mesures s'améliore lorsque le nombre de scans diminue (en excluant les mesures réalisées avec la ZQF-TOCSY à $ns = 8$ et avec la COSY-DQF à $ns = 1$). Pour cette dernière, on peut émettre l'hypothèse que la dégradation de la valeur de CV est liée au fait que la COSY-DQF ne peut se passer d'un cycle de phase minimum. Ces résultats confirment ce qui a déjà été mis en évidence dans certaines publications ([132, 133]), à savoir que les expériences courtes sont moins sensibles aux instabilités du spectromètre et donc plus répétables et plus précises, tant que la résolution et le rapport signal-sur-bruit restent suffisants pour la quantification.

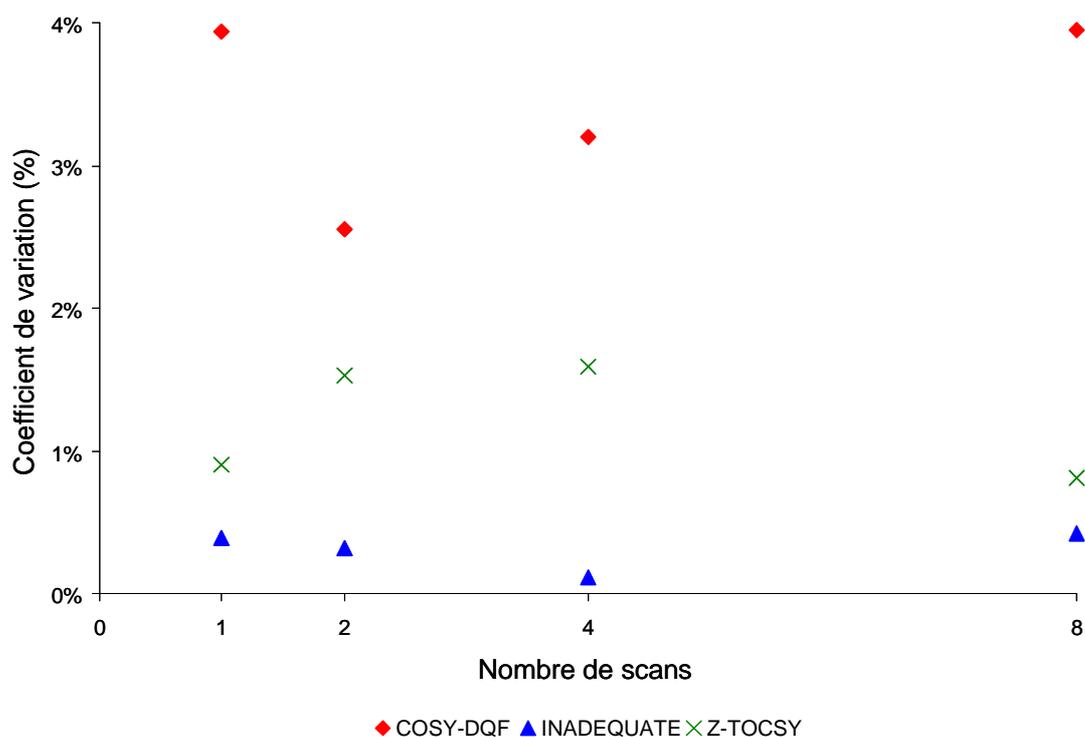


Figure 20 : Evolution du coefficient de variation en fonction du nombre de scans pour les séquences COSY-DQF, ZQF-TOCSY et INADEQUATE symétrisée proton. Les valeurs représentées sont celles obtenues à partir de la mesure du rapport des volumes des pics acide lactique/alanine. Pour $ns = 4$, $T_{exp} = 48$ min et pour $ns = 2$, $T_{exp} = 24$ min. Des courbes similaires ont été obtenues pour les autres rapports de volumes.

La Figure 20 montre également que pour l'INADEQUATE symétrisée proton, les coefficients de corrélation restent globalement constants et inférieurs à 1%, contrairement à ceux obtenus pour la ZQF-TOCSY et la COSY-DQF, et ce, quelle que soit la valeur de ns (8, 4, 2 ou 1). Par conséquent, cette séquence permet d'obtenir les mesures les plus répétables. Une explication

envisagée est la construction de la séquence INADEQUATE- ^1H , qui permet d'obtenir des spectres avec une diagonale plus propre, avec pas ou peu de raies sur celle-ci, donc des spectres présentant nettement moins de risque de chevauchement entre les raies de corrélation et les raies diagonales. Ceci est visible sur la Figure 21 qui regroupe les spectres obtenus avec $n_s = 1$: elle met en évidence la propreté de la diagonale du spectre INADEQUATE par rapport aux spectres ZQF-TOCSY et COSY-DQF. De plus, les raies de corrélation y sont plus intenses par rapport à celles de la diagonale, contrairement à celles des deux autres spectres. Cependant, les signaux de la diagonale ne disparaissent pas totalement : cela nécessiterait sans doute des gradients de sélection de cohérence plus longs et/ou plus intenses, mais qui entraîneraient une perte de sensibilité due aux effets de diffusion moléculaire.

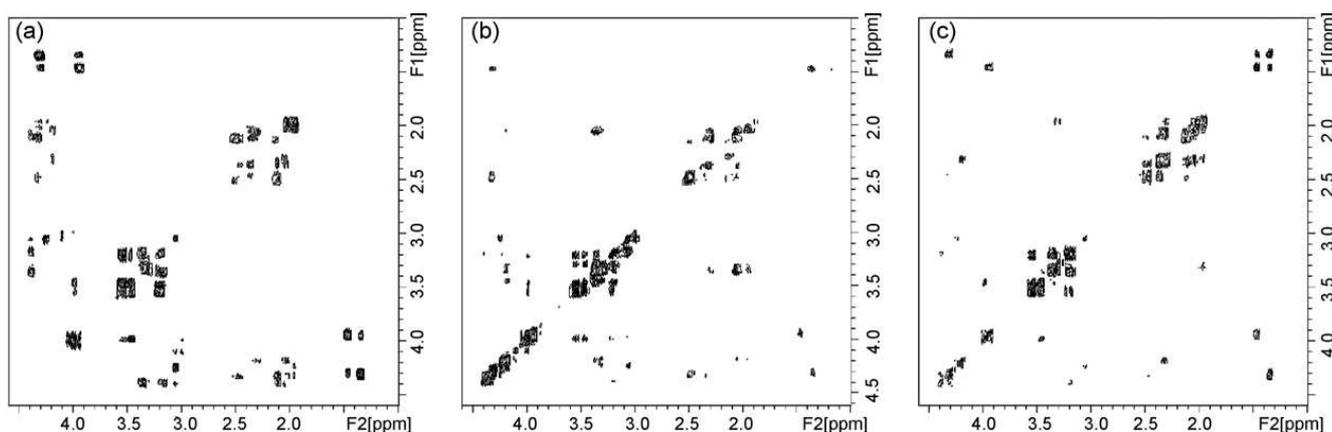


Figure 21 : Comparaison des spectres INADEQUATE- ^1H symétrisée (a), ZQF-TOCSY (b) et COSY-DQF (c) réalisé sur un mélange modèle à 50 mmol/L.

Par conséquent, ces résultats nous permettent de conserver uniquement la séquence INADEQUATE symétrisée proton au détriment de la COSY-DQF et de la ZQF-TOCSY.

L'étude ne s'arrête cependant pas à ce stade, puisque la réduction du temps d'expérience peut également passer par une diminution du nombre d'incrément dans la dimension F_1 . A partir des résultats précédents, nous avons étudié l'influence de la valeur de TD1 sur l'allure des spectres, ainsi que sur la répétabilité et la précision des mesures. Pour ce faire, l'acquisition de spectres a été réalisée avec deux valeurs de TD1, à savoir 128 et 64, avec les mêmes valeurs de n_s que précédemment. Un essai a été tenté avec $\text{TD1} = 32$ mais du fait de la mauvaise résolution des spectres selon F_1 , cette valeur a été abandonnée.

Sur la Figure 22, les coefficients de variation calculés, ainsi que les rapports S/B mesurés ont été représentés en fonction du nombre de scans pour les deux valeurs de TD1. Sur la Figure 22a, nous pouvons observer que les coefficients de variation sont proches et inférieurs à 0,44%, quelles que soient les valeurs de TD1 et n_s : les mesures restent donc répétables et précises. La Figure 22b laisse apparaître une dégradation des valeurs de S/B en fonction du nombre d'incrément mais celles-ci restent suffisantes pour envisager des mesures quantitatives aux concentrations étudiées. Il pourra bien sûr être nécessaire d'augmenter le nombre de scans pour des études à des concentrations plus faibles (échantillons biologiques).

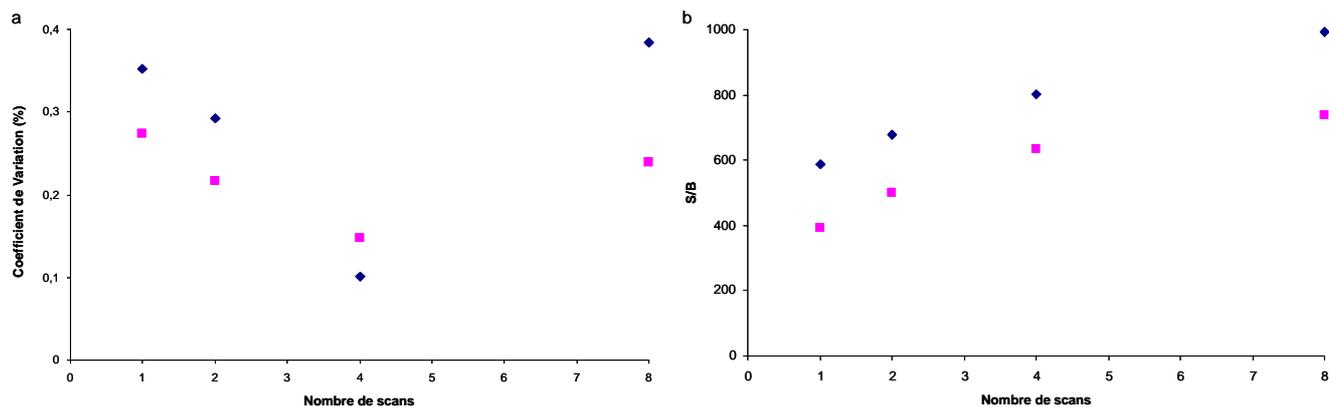


Figure 22 : Influence du nombre d'incrments dans la dimension F_1 sur le coefficient de variation (a) et sur le rapport signal-sur-bruit (b), avec \blacklozenge TD1 = 128 et \blacksquare TD1 = 64. Les valeurs représentées sur (a) sont celles obtenues à partir de la mesure du rapport des volumes des pics acide lactique/alanine, alors que celles sur (b) ont été mesurées pour l'acide lactique. Des courbes similaires ont été obtenues pour les autres métabolites.

Ces résultats mènent à la conclusion que la séquence INADEQUATE symétrisée proton est le meilleur candidat remplissant les critères énoncés précédemment : l'acquisition des spectres peut se faire en sept minutes (avec TD1 = 64 et ns = 1) tout en ayant une sensibilité et une résolution correctes, une répétabilité des mesures excellente et des métabolites qui peuvent être identifiés de façon précise. Le spectre optimisé correspondant est illustré par la Figure 23.

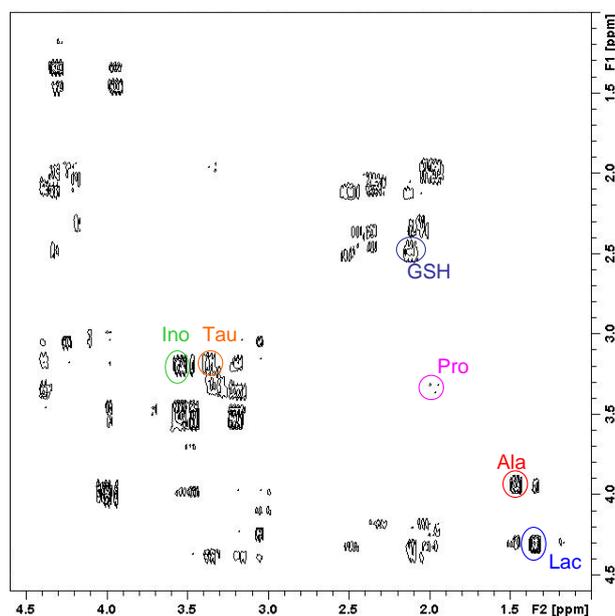


Figure 23 : Spectre INADEQUATE- ^1H obtenu en 7 min. Les raies choisies pour l'intégration sont indiquées pour chaque métabolite. Ala : alanine ; Lac : acide lactique ; Pro : proline ; Tau : taurine ; Ino : myo inositol ; GSH : glutathion.

Il est important de souligner que toutes les mesures ont été réalisées dans des conditions de saturation partielle, ce qui permet également de limiter le temps d'expérience. La détermination du temps de répétition a été effectuée à partir de la mesure des temps de

relaxation longitudinaux T_1 (Tableau VI) : ceux-ci ont été déterminés sur plusieurs signaux protons pour des mélanges à différentes concentrations à pH = 2.

Tableau VI : Valeurs des temps de relaxation longitudinaux T_1 de différents métabolites à pH = 2.

Métabolites	Acide lactique	Alanine	Proline	Taurine	Myo inositol	GSH
T_1 (s)	2,120	1,855	3,658	3,149	2,740	0,642

D'autre part, les valeurs de T_1 obtenues ne varient pas de façon significative en fonction de la concentration, la valeur la plus élevée étant obtenue pour la proline avec $T_1 = 5,45$ s. Par conséquent, il faudrait un temps de répétition de 25 s (environ cinq fois le T_1) pour s'assurer que l'aimantation est bien revenue à l'équilibre avant de la rebasculer et ainsi ne pas être dans des conditions de saturation partielle. Nous avons donc comparé la répétabilité de la séquence INADEQUATE- ^1H avec et sans saturation partielle.

Tableau VII : Coefficients de variation mesurés à partir du rapport des volumes des pics obtenus par la séquence INADEQUATE symétrisée proton avec et sans saturation partielle.

Rapport de métabolites	CV (%)	
	$d_1 = 27$ s	$d_1 = 5,45$ s
Alanine/Acide Lactique	0,35	0,54
Proline/Acide Lactique	0,82	0,94
Taurine/Acide Lactique	1,18	0,49
Myo inositol/Acide Lactique	2,22	0,76
GSH/Acide Lactique	0,60	1,14

Pour un même rapport de volumes de pics de métabolites, les valeurs de coefficients de variation restent similaires en fonction des conditions de saturation ou non. Par conséquent, nous avons fait le choix de travailler en saturation partielle, avec un délai de récupération de 5,5 s, soit un temps de répétition de 6 s. L'évaluation analytique présentée dans le paragraphe 3.2 a permis de confirmer *a posteriori* que ce choix était un bon compromis en montrant la bonne linéarité de notre méthode.

Maintenant que nous avons choisi la séquence INADEQUATE- ^1H et que nous l'avons optimisée afin que le temps d'expérience soit minimal tout en obtenant des mesures précises, nous devons montrer que cette séquence peut être utilisée pour la quantification en vérifiant la linéarité de notre méthode.

3.2 Evaluation analytique de l'INADEQUATE symétrisée proton

3.2.1 Préparation des échantillons et conditions d'acquisition

Pour effectuer l'évaluation analytique de l'INADEQUATE-¹H, une solution tampon phosphate (pH = 2, C = 0,1 mol/L) a été préparée dans D₂O afin d'y dissoudre six mélanges modèles. Ceux-ci sont constitués de six métabolites (L-alanine, glutathion, acide lactique, L-proline, taurine et myo-inositol) qui ont été pesés de façon à ce qu'une fois dissous dans un millilitre de tampon, la concentration de l'alanine soit constante et à 50 mmol/L tandis que celle des autres métabolites est comprise entre 0,08 mmol/L (échantillon le moins concentré) et 50 mmol/L (échantillon le plus concentré). Après homogénéisation, les échantillons ont été filtrés puis analysés dans des tubes de 5 mm de diamètre.

L'acquisition des spectres a été réalisée sur un spectromètre Bruker Avance III 500 opérant à la fréquence proton de 500,13 MHz et muni d'une sonde cryogénique [134] double accord ¹H/¹³C 5 mm équipée de gradients selon l'axe z. Les mesures ont été effectuées à une température de 298 K et les spectres ont été acquis et traités à l'aide du logiciel Topspin. Pour rappel, le motif d'impulsions utilisé est présenté sur la Figure 16, avec suppression du signal de l'eau comme décrit au paragraphe 3.1.2.1. Chaque spectre a été acquis avec quatre pré-accumulations¹ (ou « dummy scans »), un scan, un nombre d'incrément TD1 = 64, un délai de récupération de 5,45 s et un temps d'acquisition de 0,5 s. Les paramètres de traitements sont ceux présentés au paragraphe 3.1.2.1.

3.2.2 Résultats et discussion

Afin d'évaluer les performances de la méthode optimisée pour la quantification de métabolites, chaque mélange a été étudié avec la séquence optimisée et les volumes des pics 2D ont tous été mesurés par rapport au volume du pic de référence, à savoir l'alanine. La concentration de cette dernière a été maintenue constante à 50 mmol/L, même dans le mélange le moins concentré, afin de vérifier que les conditions quantitatives peuvent être respectées même dans des conditions défavorables, pour lesquelles les pics de corrélation auraient quasiment la même intensité que le bruit t_1 issu du signal de cette référence. Comme précédemment, la répétabilité des séquences de RMN 2D a été étudiée par l'acquisition successive de cinq spectres et déterminée par le calcul de l'écart-type sur le rapport des volumes des raies par rapport à un composé de référence et du coefficient de variation. De plus, le rapport signal-sur-bruit a également été mesuré pour les pics d'intérêt et moyenné sur les cinq expériences d'une même série. Il est important de noter que l'origine et la nature du bruit diffèrent entre les deux dimensions spectrales : en effet, le bruit dans la dimension F₂ est essentiellement du bruit thermique alors que celui dans la dimension F₁ est du bruit t_1 engendré par les instabilités instrumentales [135], et le premier a des valeurs plus faibles que

¹ Exécutions complètes de la séquence d'impulsions durant lesquelles le FID n'est pas recueilli

le dernier. Par conséquent, les valeurs limitantes sont celles mesurées dans la dimension indirecte.

Le Tableau VIII répertorie les résultats obtenus en termes de répétabilité et de rapport signal-sur-bruit sur les différents mélanges modèles.

Tableau VIII : Rapports signal-sur-bruit (S/B) minimal et maximal mesurés dans la dimension indirecte, ainsi que les coefficients de variation calculés à partir des spectres INADEQUATE-¹H sur les six mélanges modèles (concentrations comprises entre 0.08 mM et 50 mM).

	S/B (concentration la plus élevée)	S/B (concentration la plus faible)	CV (min)	CV (max)
Acide Lactique	657 (47,88 mM)	283 (0,41 mM)	0,04%	1,63%
Proline	33 (47,73 mM)	7 (0,09 mM)	0,83%	7,25%
Myo-Inositol	599 (48,04 mM)	280 (0,28 mM)	0,42%	1,70%
Taurine	182 (49,44 mM)	136 (0,08 mM)	0,48%	1,32%
GSH	48 (47,98 mM)	2 (0,10 mM)	0,90%	8,06%

Comme attendu, les résultats montrent une corrélation entre les valeurs des coefficients de variation et celles des rapports signal-sur-bruit : les faibles valeurs de CV sont obtenues quand S/B est maximum et inversement. Pour la proline et le glutathion, les coefficients de variation sont supérieurs à 2%, ce qui correspond à des rapports signal-sur-bruit inférieurs à 10 (valeur représentant la limite de quantification définie par l'ICH-Q2A (Texte sur la validation des procédures analytiques pour l'industrie [136]) : la précision sur la mesure du rapport des volumes reste cependant inférieure à 10%, *i.e.* inférieure à la valeur limite que nous nous étions fixés. Ces résultats permettent de confirmer les potentialités de notre méthode pour la quantification de métabolites.

La vérification de la linéarité est nécessaire pour finaliser l'évaluation analytique de l'INADEQUATE symétrisée proton. En effet, les volumes des raies 2D varient d'un métabolite à l'autre pour des concentrations identiques et même d'un massif à un autre pour le même métabolite. Ils sont dépendants d'un grand nombre de paramètres, tels que le nombre de noyaux, les constantes de couplages, le temps de relaxation transversale, les déphasages entre les raies d'un même multiplet ou encore les recouvrements de signaux. Par conséquent, une courbe d'étalonnage est nécessaire et, grâce à notre optimisation préalable, la diminution

du temps d'expérience à une durée de 7 min rend possible sa construction en un temps relativement court : une bonne linéarité permettra d'obtenir des résultats quantitatifs pour l'INADEQUATE-1H. Ainsi, pour chaque métabolite, une courbe d'étalonnage représentant le rapport du volume des pics en fonction du rapport de concentration a été tracée, ainsi que la droite de régression associée (Figure 24). Le Tableau IX regroupe les paramètres de corrélation pour chacun des métabolites.

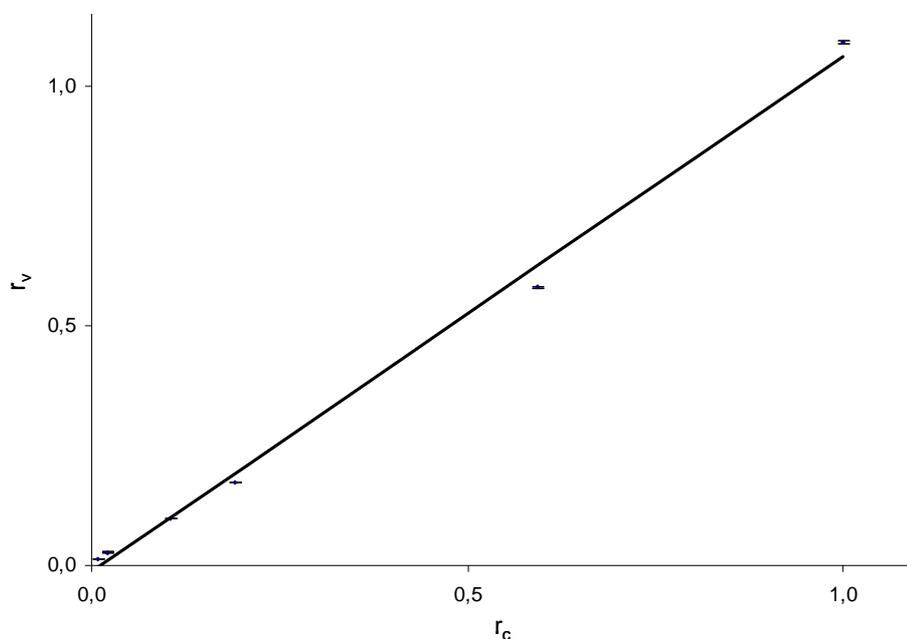


Figure 24 : Représentation du rapport r_v du volume du pic de l'acide lactique sur celui de l'alanine en fonction du rapport des concentrations r_c pour la séquence INADEQUATE symétrisée proton. Des courbes similaires sont obtenues pour les autres métabolites. Les paramètres de la corrélation sont regroupés dans le **Tableau IX**.

Tableau IX : Paramètres de corrélation entre chaque rapport r_v de volumes de pics et les rapports r_c de concentrations associées.

	Pente	Ordonnée à l'origine	R ²
Acide Lactique/Alanine	1,074 ± 0,035	-0,013 ± 0,017	0,9958
Proline/Alanine	0,022 ± 0,002	0,001 ± 0,001	0,9546
Myo Inositol/Alanine	0,825 ± 0,009	-0,003 ± 0,002	0,9994
Taurine/Alanine	0,313 ± 0,004	0,003 ± 0,002	0,9995
Glutathion/Alanine	0,048 ± 0,002	-0,002 ± 0,001	0,9932

Les valeurs élevées des coefficients de corrélation montrent l'excellente linéarité de notre méthode, confirmant donc l'hypothèse que celle-ci peut être utilisée en tant qu'outil de

quantification. De plus, les valeurs des ordonnées à l'origine sont très proches de zéro, ce qui montre l'absence de biais dans cette méthode. Nous pouvons également noter l'hétérogénéité de la réponse RMN, mise en évidence par une variation des pentes des courbes de régression linéaire pour chaque métabolite. Enfin, pour la proline, la linéarité est moins bonne que pour les autres métabolites : ceci peut être relié aux faibles valeurs de S/B mesurées pour les raies 2D.

Cette étude montre que l'INADEQUATE symétrisée proton est un bon outil analytique pour l'analyse rapide et quantitative de mélanges de métabolites : en sept minutes, des concentrations de l'ordre du millimolaire peuvent être mesurées avec une précision de l'ordre de 2%. Pour étudier des échantillons trop faiblement concentrés, il faudra cependant accumuler du signal en augmentant le nombre de scans.

3.3 Applicabilité à un échantillon biologique

L'application de l'INADEQUATE-¹H est réalisée sur un échantillon biologique constitué d'extraits de cellules de cancer du sein.

Les cellules cancéreuses issues de la lignée MDA-MB-468 (cf. Tableau XVI) sont cultivées dans deux flasques identiques de 75 cm² ($2,5 \times 10^6$ cellules/mL pour une flasque). Leur croissance est effectuée dans une étuve à 37°C sous une atmosphère riche en CO₂ (5%). Le milieu nutritif nécessaire à leur croissance est du D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1% d'antibiotiques (pénicilline 10000 U/mL – streptomycine 10000 µg/mL). Une fois que les cellules sont suffisamment nombreuses, le milieu de culture est éliminé, les cellules sont lavées deux fois avec du tampon D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) pour bien éliminer le milieu. L'arrêt du métabolisme est réalisé avec 3 mL de méthanol et les cellules sont décollées de leur flasque à l'aide d'un grattoir et récupérées dans un tube de centrifugation de 15 mL (cf. partie 5 paragraphes 2.1.2 et 2.1.3).

Pour l'extraction des métabolites, un mélange méthanol/chloroforme/eau (4/4/2,85) est utilisé directement après récupération des cellules, puis l'échantillon est centrifugé pendant cinq minutes à 300 g et à 20°C. La phase aqueuse contenant les métabolites se situe au dessus de la phase organique, constituée des métabolites non polaires comme par exemples les lipides, tandis que l'ajout de méthanol et de chloroforme piège les protéines et les macromolécules biologiques entre les deux phases. La phase aqueuse est récupérée, les solvants sont éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'échantillon est finalement dissout dans un millilitre de tampon phosphate (pH = 2, C = 0,1 mol/L) dans le D₂O, homogénéisé puis filtré avant analyse par RMN dans un tube de 5 mm de diamètre. Il est toutefois important de noter qu'à ce stade, la méthode d'extraction n'avait pas encore été optimisée (ce point sera abordée dans la partie 3).

Le spectre présenté sur la Figure 25 a été obtenu à partir de la séquence INADEQUATE- ^1H , dans les conditions optimisées et énoncées au paragraphe 3.2.1.

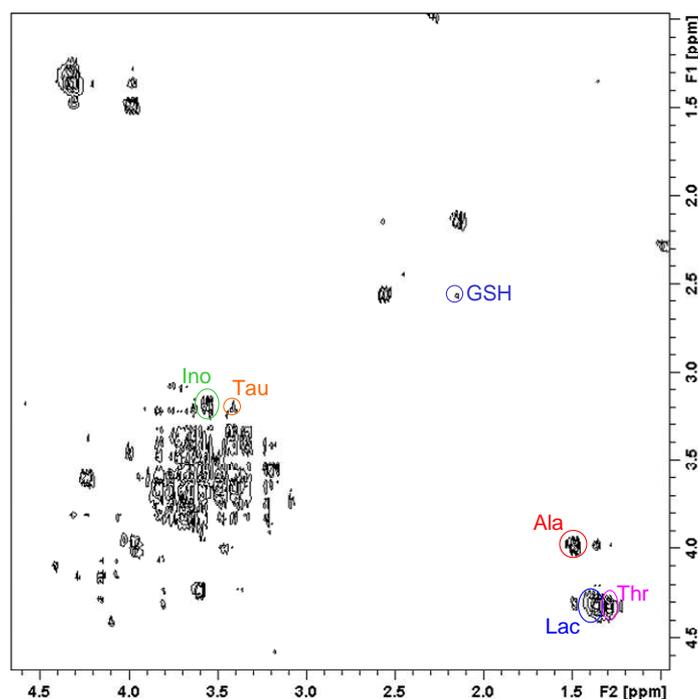


Figure 25 : Spectre INADEQUATE- ^1H d'extraits cellulaires obtenus à partir des cellules MDA-MB-468. L'acquisition a été effectuée sur un spectromètre 500 MHz équipé d'une sonde cryogénique double accord ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) 5 mm avec $n_s = 1$ et $\text{TD1} = 64$, pour une durée d'expérience de sept minutes. Ala : alanine ; Lac : acide lactique ; Thr : thréonine ; Tau : taurine ; Ino : myo inositol ; GSH : glutathion.

Plusieurs métabolites dont le signal se trouve au dessus de la limite de quantification peuvent être identifiés : acide lactique, alanine, myo inositol, glutathion, thréonine, taurine, glutamate, glutamine, valine, isoleucine, proline, aspartate, histidine, sérine, choline. Ce résultat confirme donc que notre méthode est appropriée pour étudier des échantillons biologiques. Le nombre de métabolites quantifiables est encore inférieur à ce que permet une approche hétéronucléaire telle que le protocole d'analyse rapide mis en œuvre par Lewis *et al.* à partir de la séquence HSQC [117]. Ceci est notamment dû aux recouvrements observés dans la zone située entre 3 et 4 ppm. Toutefois, l'INADEQUATE- ^1H présente une plus grande sensibilité par unité de temps et il est tout de même possible d'identifier et de quantifier un nombre suffisant de métabolites pour permettre une caractérisation cellulaire.

4 Conclusion et perspectives

Cette partie nous a permis de mettre au point un outil d'analyse quantitative rapide pour l'étude de milieux complexes : les spectres INADEQUATE- ^1H sont obtenus en sept minutes avec une excellente linéarité et avec une répétabilité inférieure ou égale à 2% pour des métabolites de concentrations allant jusqu'à 0,1 mmol/L. L'application de la séquence choisie

sur un échantillon réel constitué d'extraits cellulaires montre l'intérêt de cet outil pour les études métabonomiques.

Par la suite, la précision des mesures pourrait encore être améliorée par l'addition d'impulsions adiabatiques afin de compenser les éventuelles imperfections RF et/ou par l'optimisation du motif des gradients de sélection de cohérence. Une autre amélioration serait de pouvoir réduire encore plus le temps d'expérience. A ce stade, cette diminution semble impossible du fait de la nécessité d'avoir une résolution spectrale suffisante, dans notre cas avec un nombre d'incrément égal à 64, pour pouvoir identifier les pics d'intérêt et les quantifier de façon précise. Une première alternative serait l'échantillonnage non uniforme de la dimension indirecte [137-139] : ainsi, il est possible de diminuer le nombre d'incrément dans la première dimension tout en conservant la résolution spectrale et la sensibilité. Une seconde alternative serait l'utilisation de la RMN 2D ultrarapide [140] : celle-ci permet l'obtention de spectres en moins d'une seconde. Giraudeau *et al.* ont évalué analytiquement quelques séquences de RMN 2D ultrarapide pour la quantification de mélanges de métabolites, obtenant des mesures répétables et une excellente linéarité pour les séquences J-résolue et TOCSY [133].

Une autre amélioration à apporter concernera la quantification des métabolites, qui, pour l'instant, ne peut se faire que de façon relative avec notre méthode optimisée. L'ajout d'une référence comporte de nombreux impératifs, comme le fait que les déplacements chimiques de celle-ci ne doivent pas se superposer à ceux des composés d'intérêt, qu'elle ne doit pas interagir avec eux ou encore qu'elle doit posséder des T_1 proches de ceux de l'échantillon. Du fait de la complexité des milieux réels, ces conditions risquent d'être difficiles à remplir pour pouvoir envisager une quantification absolue des métabolites. Une alternative serait l'implantation de la méthode ERETICTM (Electronic REference To access *In vivo* Concentrations), qui est une référence électronique présentant toutes les caractéristiques d'un FID et qui, après transformation de Fourier, engendre un pic supplémentaire dont la position sur le spectre peut être ajustée. Une étude préalable a montré la possibilité de l'implémenter dans des séquences de RMN 2D [141].

L'application réalisée à partir de l'INADEQUATE-¹H symétrisée proton sera l'étude d'extraits cellulaires provenant de différentes lignées cancéreuses afin de quantifier des métabolites présents. Cette étude sera complétée par une analyse statistique afin de déterminer si les composés quantifiés sont des marqueurs biologiques permettant de différencier les lignées entre elles. Avant de pouvoir aborder ce point, il est nécessaire de s'assurer de l'extraction d'un maximum de métabolites. Dans la littérature, différents protocoles ont été appliqués (cf. paragraphe 1.3.4) : nous allons donc réaliser une étude comparative de certains d'entre eux afin de déterminer le protocole qui est le mieux adapté à notre objectif, à savoir d'extraire un maximum de métabolites quantifiable par notre méthode.

Partie 3 : Choix d'une procédure d'extraction pour l'analyse métabolomique par RMN de cellules de cancer du sein

1 Introduction

Depuis quelques dizaines d'années, les études métabolomiques sont de plus en plus utilisées dans un grand nombre de domaines, notamment en médecine afin d'étudier des pathologies telles que les cancers [41, 42, 51, 53, 54]. Elles permettent de caractériser l'ensemble du métabolome d'échantillons biologiques et de déterminer des biomarqueurs représentatifs des phénomènes étudiés. La plupart du temps, ces études métabolomiques impliquent l'extraction des métabolites constituant les tissus, les cellules ou les fluides biologiques afin d'établir leurs profils métaboliques. L'analyse de ces derniers donne des informations importantes concernant les changements ou les perturbations pouvant se produire au sein du métabolisme, par exemple lors du développement de maladies ou lors de l'effet de l'ingestion de médicaments. Un des outils d'analyse utilisé en métabolomique est la RMN car elle fournit des informations rapidement et de façon répétable.

L'étape la plus critique est probablement l'extraction de ces métabolites. En effet, celle-ci conditionne les informations qui seront récoltées et interprétées en fonction du problème étudié. Le choix de la méthode d'extraction dépend de la méthode d'analyse qui va être utilisée. En effet, chaque technique possède des avantages et des inconvénients qui doivent être pris en compte avant de débiter l'étude métabolomique : par exemple, la RMN est moins sensible et a des limites de détection plus basses que la GC-MS et la LC-MS, mais elle est non-sélective. De plus, les protocoles d'extraction employés en LC-MS ou en GC-MS ne peuvent être appliqués pour les études par RMN car ils comportent des étapes (telles que des dérivations et/ou l'utilisation de colonnes chromatographiques) susceptibles d'éliminer des métabolites détectables directement par RMN.

Dans la littérature, de nombreux exemples ont été recensés (cf. paragraphe 1.3.4 et 1.3.4) et les recherches concernant la reproductibilité et l'efficacité de l'extraction pour les analyses métabolomiques ont considérablement avancé, notamment dans le cadre d'études sur les tissus d'animaux, de plantes ou encore sur les bactéries [31, 32, 58, 142]. Cependant, ces protocoles d'extraction ne sont pas directement applicables pour étudier les cellules de culture humaine par RMN métabolomique du fait des différences physiques et chimiques qui existent entre toutes ces espèces. Le choix de cette méthode d'extraction doit se faire en fonction de ce que l'on souhaite observer, à savoir le métabolome tout entier ou seulement quelques métabolites (comme cela est par exemple le cas dans l'étude de Le Belle *et al.* concentrée uniquement sur sept métabolites [30]), ou encore les extraits lipophiles ou plutôt les extraits

hydrophiles. Dans la littérature, des études sur différents types de cellules ont été réalisées, notamment sur les cellules du cancer du colon, du sein ou du poumon : dans certains cas, la méthode d'extraction utilisant de l'acide perchlorique a été employée afin de récupérer préférentiellement les métabolites polaires [5, 52], alors que dans d'autres cas, la méthode d'extraction méthanol/chloroforme/eau a permis d'extraire séparément les composés hydrophiles et lipophiles [64]. Le Tableau X regroupe quelques uns des protocoles de préparation d'échantillons existants.

Tableau X : Protocoles de préparation d'échantillons de cellules adhérentes de culture humaine pour la RMN métabolomique.

Type de cellules	Rinçage	Quenching	Extraction	Séchage	Réf.
Rhabdomyosarcome	2 x PBS glacé	trypsination	10% d'ATC dans l'eau	oui	[143]
Rhabdomyosarcome	2 x PBS glacé	trypsination	D ₂ O tamponnée (50 µl PBS 10x et 450µl D ₂ O)	non	[63]
Cellules T (leucémie)	PBS	non	MeOH/CHCl ₃ /H ₂ O (2/1/1)	oui	[62]
Carcinome du poumon	PBS	trypsination	MeOH/CHCl ₃ glacé (2/1) et CHCl ₃ /H ₂ O glace (1/1)	oui	[64]
Cancer du sein	2 x PBS glacé	MeOH	MeOH/CHCl ₃ /H ₂ O (4/4/2,85)	oui	[6]
Ostéosarcome	PBS froid	immédiatement dans la glace	30% d'APC dans l'eau	oui	[144]

Bien qu'il n'existe pas de méthode d'extraction idéale pour étudier l'ensemble du métabolome, peu de travaux concernent l'optimisation des méthodes d'extraction afin de choisir la plus adaptée. Une méthode d'extraction optimale doit permettre d'extraire le plus grand nombre de métabolites, doit être robuste, répétable et adaptée à la technique d'analyse. A notre connaissance, peu d'études de ce type ont été réalisées sur les cellules de culture humaine afin de montrer l'influence des solvants d'extraction sur les composés récupérés et sur leurs quantités. L'une d'elles a été effectuée par Lorenz *et al.* sur des cellules pancréatiques clonées INS-1 (sécrétion de l'insuline) mais en HPLC-MS [46]. Le but de cette partie est donc d'établir une stratégie d'analyse afin de choisir une méthode d'extraction adaptée pour l'étude par RMN métabolomique des cellules de cancer du sein : cette méthode doit permettre d'extraire un maximum de composés en quantité suffisante tout en étant robuste et répétable. Une fois sélectionnée, une application sur plusieurs lignées de cancer du sein est réalisée afin de vérifier qu'une discrimination des cellules est possible et de déterminer des marqueurs biologiques potentiels de chacune d'entre elles.

2 Stratégie de sélection de la méthode d'extraction et application aux lignées de cancer du sein

2.1 Etude préliminaire

L'étude porte sur les cellules de cancer du sein : leur croissance cellulaire est effectuée dans des flasques ayant subi un traitement afin que les cellules adhèrent au fond de celles-ci. Par conséquent, pour pouvoir extraire les métabolites intracellulaires, il est nécessaire de décoller les cellules en les dégradant le moins possible. Habituellement, la trypsine est utilisée pour détacher les cellules [145, 146] : en effet, cette enzyme coupe les liaisons peptidiques qui s'établissent entre les cellules et le fond des flasques, permettant ainsi leur décollement. Cependant, Teng *et al.* ont montré que l'utilisation de la trypsine avait tendance à dégrader l'environnement cellulaire et ont donc développé une méthode de « quenching » basée sur l'ajout de méthanol pour stopper le métabolisme cellulaire et l'emploi d'un grattoir pour récolter les cellules [6]. Après cette étape, ils ont pu alors appliquer directement leur protocole d'extraction de métabolites. Le fait que le grattoir puisse sans doute altérer l'intégrité des membranes cellulaires ne pose pas de problème puisque tout est récupéré dans le méthanol et que la méthode d'extraction est appliquée juste après la récolte. Au contraire, après détachement des cellules avec la trypsine, il est nécessaire de rincer une ou deux fois les cellules avec du tampon à pH physiologique. Par conséquent, ce rinçage peut conduire à l'élimination de composés qui seraient solubles dans le surnageant : nous avons donc choisi de décoller les cellules à l'aide d'un grattoir.

Afin de comparer différentes méthodes d'extraction, il faut partir d'une même quantité d'échantillon pour chacune d'entre elles. Deux possibilités sont envisagées :

- soit les cellules sont récupérées avec de l'eau, puis congelées (48h) et lyophilisées (48h) afin de démarrer les extractions avec une même quantité de produit sec ;
- soit les cellules sont récupérées avec du méthanol et le protocole d'extraction est appliqué juste après. Il est alors nécessaire de réaliser l'extraction sur un nombre identique de cellules [6].

La comparaison de ces deux méthodes de « quenching » a été réalisée sur une même quantité de cellules ($2,5 \times 10^6$ cellules/mL pour une flasque). Chaque échantillon a été extrait avec un mélange méthanol/chloroforme/eau (dans les proportions 4/4/2,85) et centrifugé (300 g, 5 min). La phase aqueuse contenant les métabolites a été récupérée et les solvants ont été éliminés sous un flux de N_2 à 70 °C. Les deux échantillons obtenus ont été dissous dans un tampon phosphate ($C = 0,1$ mol/L et $pH = 7,4$) préparé dans D_2O . Nous avons choisi de travailler à $pH = 7,4$ (pH physiologique) car dans les bases de données, les métabolites sont référencés à cette valeur : ainsi, leur identification sera facilitée dans la suite de l'étude.

Ensuite, les échantillons ont été analysés en RMN- ^1H dans les mêmes conditions à l'aide de la séquence NOESY 1D avec présaturation du signal de l'eau.

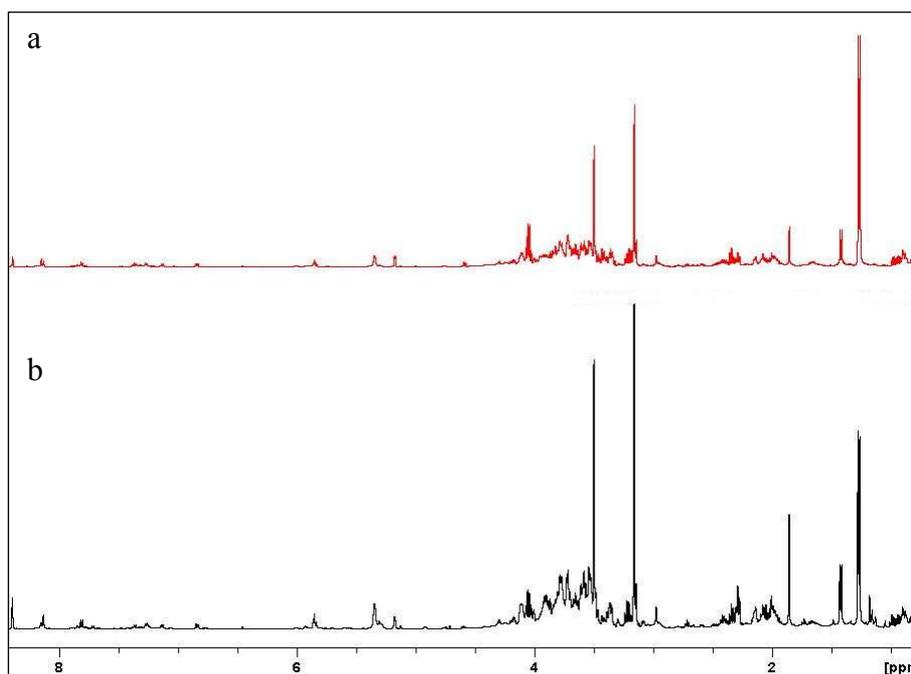


Figure 26 : Comparaison des spectres obtenus sur des échantillons ayant subi deux méthodes de « quenching » différentes : cellules récupérées avec de l'eau, puis congelées et lyophilisées (a) ou cellules récoltées avec du méthanol (b).

Tableau XI : Comparaison des rapports signal-sur-bruit de quelques métabolites mesurés sur les spectres d'échantillons ayant subi deux méthodes de « quenching » différentes.

Métabolite	S/B (« quenching » méthanol)	S/B (« quenching » eau)
Alanine	1218	1078
Choline	5901	4545
Myo Inositol	539	527
Taurine	608	594
Glutathion	413	341
Histidine	194	152

Les deux spectres obtenus (Figure 26) ont des allures similaires. Cependant, le rapport signal-sur-bruit (Tableau XI) est globalement plus élevé sur le spectre de l'échantillon non lyophilisé (Figure 26b). De plus, l'obtention de cet échantillon est plus rapide du fait de l'absence de congélation et de lyophilisation. Par conséquent, la méthode de « quenching » utilisée avant extraction des composés sera celle qui utilise le méthanol.

Cette étude préliminaire étant faite, nous allons aborder le point le plus important de cette partie, à savoir la sélection de la méthode d'extraction permettant de récupérer un maximum de métabolites afin de réaliser des études métabolomiques par RMN.

2.2 Matériels et méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

Pour la comparaison des méthodes d'extraction, les cellules cancéreuses issues de la lignée MDA-MB-468 (cf. Tableau XVI) ont été cultivées dans deux flasques identiques de 75 cm² (soit $2,5 \times 10^6$ cellules/mL pour une flasque) à différents passages cellulaires : p+39, p+41 et p+43 pour les méthodes d'extraction en deux étapes, p+20 et p+21 pour la méthode d'extraction en une étape. Pour la discrimination des lignées cellulaires, l'étude a porté sur les lignées MDA-MB-468, ZR75-1, SKBR3 et MCF-7. Elles ont aussi été cultivées dans deux flasques de 75 cm² afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour l'analyse en RMN : $1,8 \times 10^7$ (MDA-MB-468 p+20 et p+21), $4,3 \times 10^6$ (ZR75-1 p+13), $7,3 \times 10^6$ (ZR75-1 p+15), $6,4 \times 10^6$ (ZR75-1 p+17), $2,7 \times 10^7$ (SKBR3 p+27 et p+30), $2,8 \times 10^7$ (SKBR3 p+28), $1,6 \times 10^7$ (SKBR3 p+29), $2,5 \times 10^7$ (SKBR3 p+26 et MCF-7 p+9), $2,4 \times 10^7$ (MCF-7 p+8), $3,3 \times 10^7$ (MCF-7 p+11), $8,5 \times 10^6$ (MCF-7 p+12), $1,8 \times 10^7$ (MCF-7 p+13).

Les cellules effectuent leur croissance dans une étuve à 37°C sous une atmosphère riche en CO₂ (5%), à l'aide du milieu nutritif D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1% d'antibiotiques (pénicilline 10000 U/mL – streptomycine 10000 µ/mL). Pour MCF-7, il est nécessaire d'ajouter de l'insuline à 0,1 mg/mL dans le milieu de culture pour permettre une meilleure adhérence des cellules au fond des flasques. Une fois que les cellules sont à confluence (après deux à quatre jours de croissance), le milieu de culture est éliminé, les cellules sont lavées deux fois avec du tampon D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) pour bien éliminer le milieu. Le métabolisme est arrêté par l'ajout de 3 mL de méthanol, puis les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir et récupérées dans un tube de centrifugation (cf. partie 5 paragraphes 2.1.2 et 2.1.3).

2.2.2 Méthodes d'extraction

Après l'étape de quenching, la méthode d'extraction peut être appliquée. A partir de la littérature, nous avons choisi de tester cinq mélanges de solvants de polarité différente : méthanol, acétonitrile/eau, méthanol/eau, acide perchlorique/eau et méthanol/chloroforme/eau [30, 31, 58-63, 147]. Cette dernière méthode a été étudiée avec deux variantes : soit avec deux extractions successives, soit avec une seule extraction. Par la suite, pour distinguer les deux méthodes CHCl₃/MeOH/H₂O, celle répétée deux fois sera nommée CHCl₃/MeOH/H₂O (2) et l'autre CHCl₃/MeOH/H₂O (1).

L'acide perchlorique permet de déprotéiniser et de dissoudre les métabolites soufrés, le chloroforme, le méthanol et l'acétonitrile dissolvent les lipides. Le Tableau XII regroupe les

différents mélanges de solvants envisagés ainsi que les informations sur la façon dont ils ont été utilisés.

Tableau XII : Récapitulatif des solvants d'extraction utilisés et de leurs mises en œuvre.

Méthodes d'extraction	ACN/H ₂ O	APC/H ₂ O	MeOH	MeOH/H ₂ O	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O	
Volumes (mL)	4,8/1,2	0,12/5,88	6	4,8/1,2	2/2/1,43	6/6/5,4
Nombre d'extractions	2	2	2	2	2	1
Centrifugation	Vitesse	300 g ^a	300 g ^a	300 g ^a	300 g ^a	5000 g ^a
	Durée	5 min	5 min	5 min	5 min	15 min
	Température	20°C	20°C	20°C	20°C	4°C

^ag : unité d'accélération radiale pour la centrifugation

Pour toutes les méthodes sauf CHCl₃/MeOH/H₂O, l'extraction a été réalisée deux fois successivement. Pour la méthode APC/H₂O, avant la reprise du culot pour la deuxième extraction, une solution de KOH (1M) a été ajoutée pour neutraliser l'acide perchlorique. Les sels de KClO₄ alors formés ont été éliminés après centrifugation. Pour la méthode CHCl₃/MeOH/H₂O, il se forme trois phases dans le tube après centrifugation : la phase supérieure contient les métabolites aqueux tandis que la phase inférieure organique est constituée des composés lipophiles. Les protéines et autres macromolécules sont précipitées par l'ajout de méthanol et de chloroforme et se retrouvent piégées entre les deux phases. Pour la méthode CHCl₃/MeOH/H₂O (2), après la première extraction, la phase aqueuse a été conservée et la phase organique a été reprise une seconde fois avec les solvants d'extraction puis centrifugés. La seconde phase aqueuse a ensuite été ajoutée à la première.

Une fois les phases contenant les métabolites polaires récupérées, celles-ci ont été séchées sous un flux de N₂ afin d'éliminer toute trace de solvant. Ensuite, elles ont été dissoutes dans un millilitre de solution tampon phosphate (pH = 7,4, C = 0,1 mol/L) préparée dans D₂O. Cette solution contient du NaN₃ afin d'empêcher toute contamination bactériologique. Les échantillons ont été homogénéisés, ajustés à pH = 7,4 ± 0,5, filtrés et analysés dans des tubes RMN de 5 mm de diamètre.

Pour chaque méthode d'extraction, les lignées issues de trois divisions cellulaires différentes ont été mises en croissance afin d'étudier la reproductibilité biologique. De plus, pour chaque division cellulaire et chaque méthode d'extraction, trois échantillons ont été préparés pour étudier la répétabilité de l'extraction.

2.2.3 Paramètres d'acquisition et de traitement RMN

L'acquisition des spectres a été réalisée sur un spectromètre Bruker Avance III 500 opérant à la fréquence proton de 500,13 MHz et muni d'une sonde cryogénique double accord ¹H/¹³C 5 mm. Les mesures ont été effectuées à une température de 298 K et les spectres ont été

acquis et traités à l'aide du logiciel Topspin. Pour rappel, le motif d'impulsions utilisé est décrit au paragraphe 1.3.4 (partie 1), avec suppression du signal de l'eau pendant le délai de récupération d_1 et la période de mélange d_8 par application d'une onde continue de faible amplitude à la fréquence de résonance des protons de l'eau. Chaque spectre a été acquis avec 128 scans, un délai de récupération de 5 s, un délai δ de 20 μ s et un temps d'acquisition de 2 s. Après acquisition, les FIDs ont été multipliés par une fonction d'apodisation de forme exponentielle ($LB = 0,30$ Hz) avant transformation de Fourier. Les spectres ont ensuite été phasés et calibrés par rapport au doublet de l'alanine, puis une correction de ligne de base automatique par un polynôme d'ordre zéro a été appliquée. La répétabilité RMN a été vérifiée par l'acquisition de cinq spectres successifs sur un échantillon d'extraits cellulaires obtenus à partir de chaque méthode d'extraction. Ensuite, la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation sur les aires des « buckets » ont été calculés. De plus, la reproductibilité des expériences RMN a été vérifiée pour un même échantillon par l'acquisition de spectres 1D à une semaine d'intervalle.

Après identification des métabolites d'intérêt, les spectres ont été découpés en « buckets » (cf. paragraphe 2.3.1 pour la justification du découpage) puis les aires de chaque « bucket » ont été mesurées à l'aide du logiciel AMIX (version 3.8.4, Bruker). Les valeurs ont été normalisées en divisant l'aire de chaque « bucket » par l'aire totale des spectres. Ensuite, les valeurs ont été regroupées dans un tableur Excel (Microsoft Office 2003) pour être analysées de façon statistique.

2.2.4 Analyses statistiques des données RMN

Le tableur Excel permet de construire une matrice des données regroupant l'ensemble des aires normalisées pour chaque échantillon (individu) et pour chaque « bucket » (variable). Une analyse en composantes principales (ACP) [148] a été effectuée à partir de cette matrice grâce au logiciel SIMCA-P+ : chaque point de l'ACP représente un spectre RMN d'un échantillon d'extraits cellulaires donné, leur discrimination étant induite par les variables RMN. Ces dernières ont pu être représentées sur une courbe de « loadings » (corrélation entre les différentes variables), leur position pouvant être reliée à celle des échantillons sur l'ACP. Cette analyse statistique a été complétée par des tests de Mann-Whitney : ils ont permis d'expliquer les différences obtenues sur l'ACP en comparant deux à deux les techniques d'extraction pour chaque « bucket » à partir des valeurs des aires normalisées.

2.3 Résultats et discussion

Notre stratégie pour choisir une procédure d'extraction va se dérouler en plusieurs étapes : dans un premier temps, la variabilité due aux différentes méthodes d'extraction et à la croissance cellulaire est évaluée. Ainsi, nous déterminons l'efficacité de la méthode d'extraction la plus répétable et la plus robuste permettant d'extraire un maximum de

métabolites. Dans un second temps, une fois la méthode choisie, son potentiel en termes de discrimination de lignées est étudié.

2.3.1 Analyse des spectres RMN

Dans cette partie, nous nous concentrerons sur l'interprétation de l'ensemble des spectres obtenus à partir de tous les échantillons, en utilisant l'analyse en composantes principales.

Après acquisition et traitement des données RMN, les métabolites présents sur les spectres sont identifiés à partir des publications de Teng *et al.* et de Nicholson *et al.* [6, 149]. Ces informations sont également combinées à celles apportées par les bases de données RMN métabolomique : Madison Metabolomics Consortium Database [150, 151] et Human Metabolome DataBase [152, 153]. La Figure 27 présente l'identification de ces métabolites.

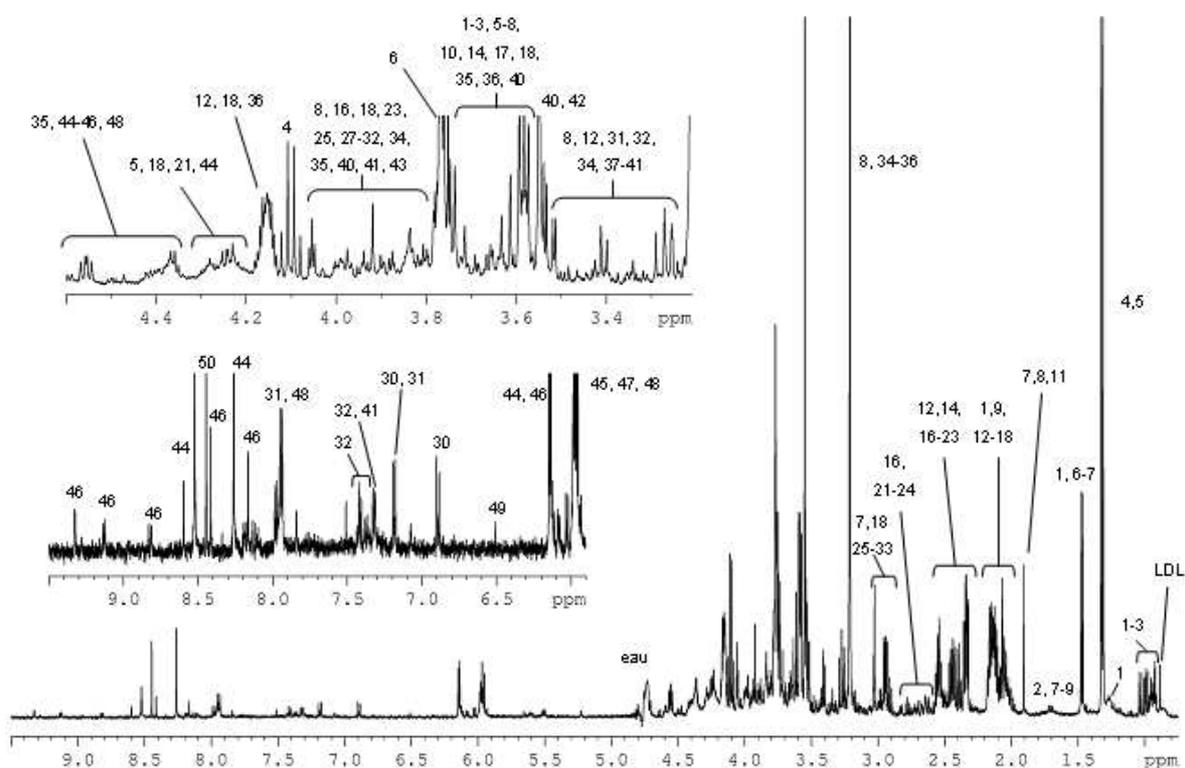


Figure 27 : Spectre NOESY 1D d'extraits cellulaires obtenus par $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1). Identification des métabolites : 1, isoleucine; 2, leucine; 3, valine; 4, lactate; 5, thréonine; 6, alanine; 7, lysine; 8, arginine; 9, glutarate; 10, citruline; 11, acétate; 12, proline; 13, N-acetyl aspartate; 14, glutamate; 15, N-acetyl amino acide; 16, méthionine; 17, glutamine; 18, glutathion; 19, pyruvate; 20, succinate; 21, malate; 22, citrate; 23, aspartate; 24, diméthylamine; 25, asparagine; 26, oxalacetate; 27, créatine; 28, cystéine; 29, créatinine; 30, tyrosine; 31, histidine; 32, phénylalanine; 33, malonate; 34, choline; 35, glycérophospho-choline; 36, phosphocholine; 37, taurine; 38, bétaine; 39, triméthylamine N-oxyde; 40, myo inositol; 41, tryptophane; 42, glycine; 43, sérine; 44, AXP; 45, GXP; 46, NAD^+ ; 47, maléate; 48, UXP; 49, fumarate; 50, formate.

A partir de cette identification, le logiciel AMIX permet de définir des « buckets » et de calculer leurs aires. Par définition, une « bucket » représente une zone du spectre pouvant contenir le signal d'un ou de plusieurs métabolites. Le découpage se fait en fonction des déplacements chimiques des composés et des recouvrements, par conséquent les « buckets »

ont des tailles différentes. Ceci est illustré sur la Figure 28 : le spectre NOESY est découpé en 76 « buckets » de tailles variables.

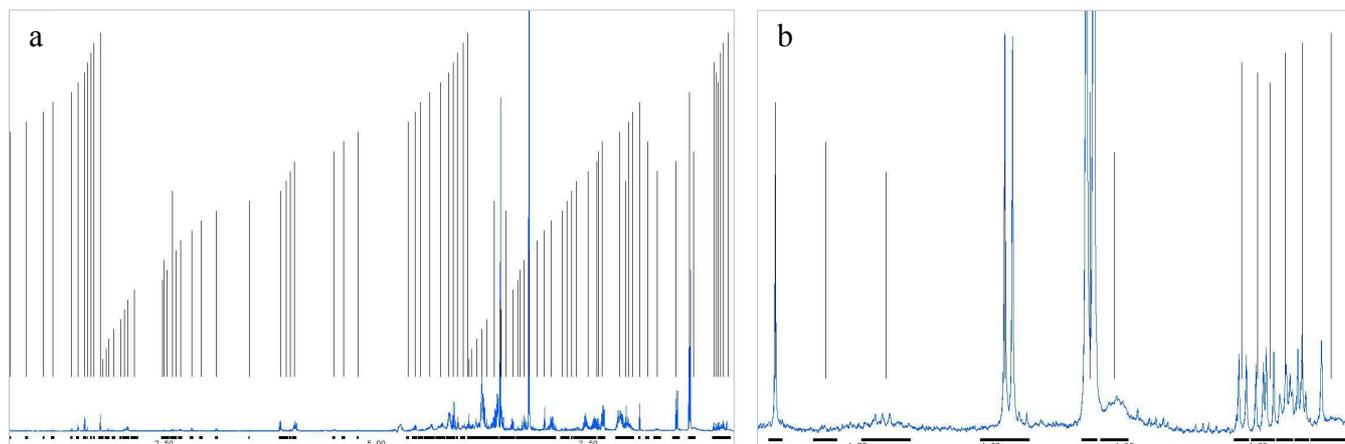


Figure 28 : Découpage sous forme de « buckets » d'un spectre d'extraits cellulaires obtenus par la méthode $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1) (a) sur le spectre entier (b) sur un agrandissement du spectre. Les zones de tailles différentes sont clairement visibles sur ce zoom. Les barres verticales symbolisent le centre des « buckets ».

Afin de comparer la variabilité des cinq méthodes d'extraction à partir des spectres NOESY, les résultats obtenus sous AMIX sont interprétés à l'aide d'une analyse en composantes principales présentée sur la Figure 29.

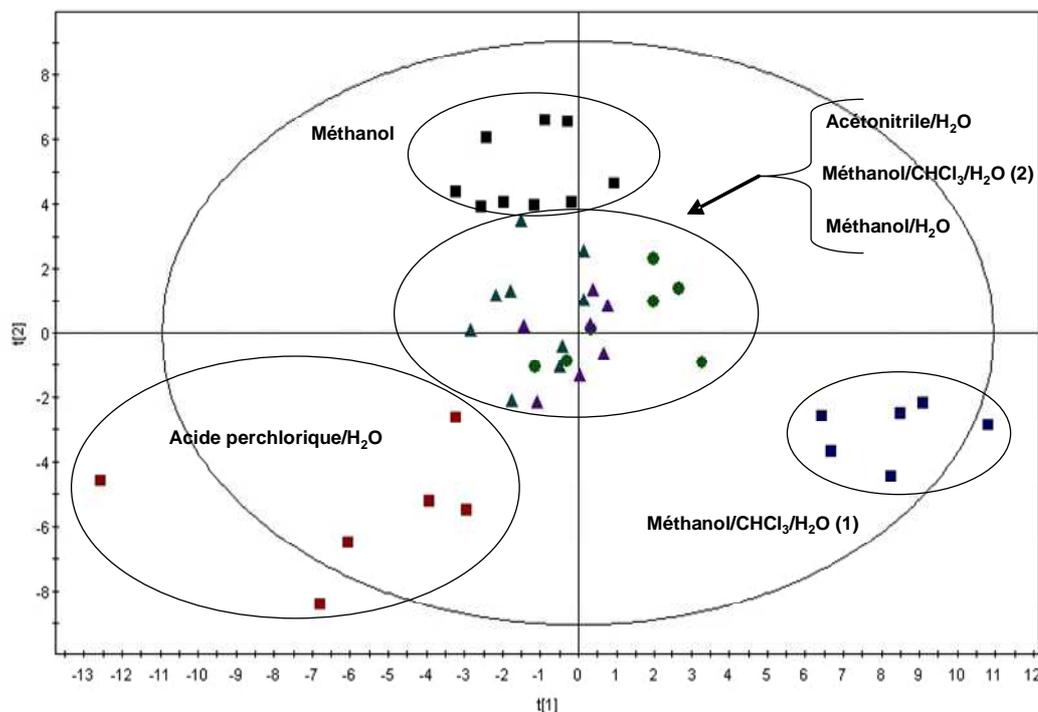


Figure 29 : Analyse en composantes principales obtenue à partir de 38 spectres d'extraits cellulaires de la lignée MDA-MB-468. Les première et deuxième composantes représentent respectivement 25% et 17% de la variabilité totale.

Cette ACP permet de distinguer clairement quatre groupes : un premier constitué par les échantillons extraits par acide perchlorique/eau, un deuxième composé des échantillons

obtenus par $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1), un troisième formé par les échantillons issus de l'extraction au méthanol et un quatrième regroupant les autres échantillons. La discrimination des groupes est ici possible car les méthodes d'extraction influencent l'allure des spectres en fonction de l'affinité des composés avec les solvants d'extraction, et donc des quantités extraites.

Le premier groupe cité est très étalé sur l'ACP. Une explication peut être apportée pour justifier ce comportement : les spectres correspondants aux extraits obtenus par cette méthode d'extraction présentent des profils assez différents d'un échantillon à l'autre. De plus, leurs lignes de base sont plus accidentées que celles des autres spectres. Ceci est clairement visible sur les spectres de la Figure 30 : la ligne de base est plus bosselée sur le spectre du haut, correspondant aux extraits obtenus par la méthode acide perchlorique/eau, que sur le spectre du bas, réalisé après extraction des métabolites par méthanol/chloroforme/eau.

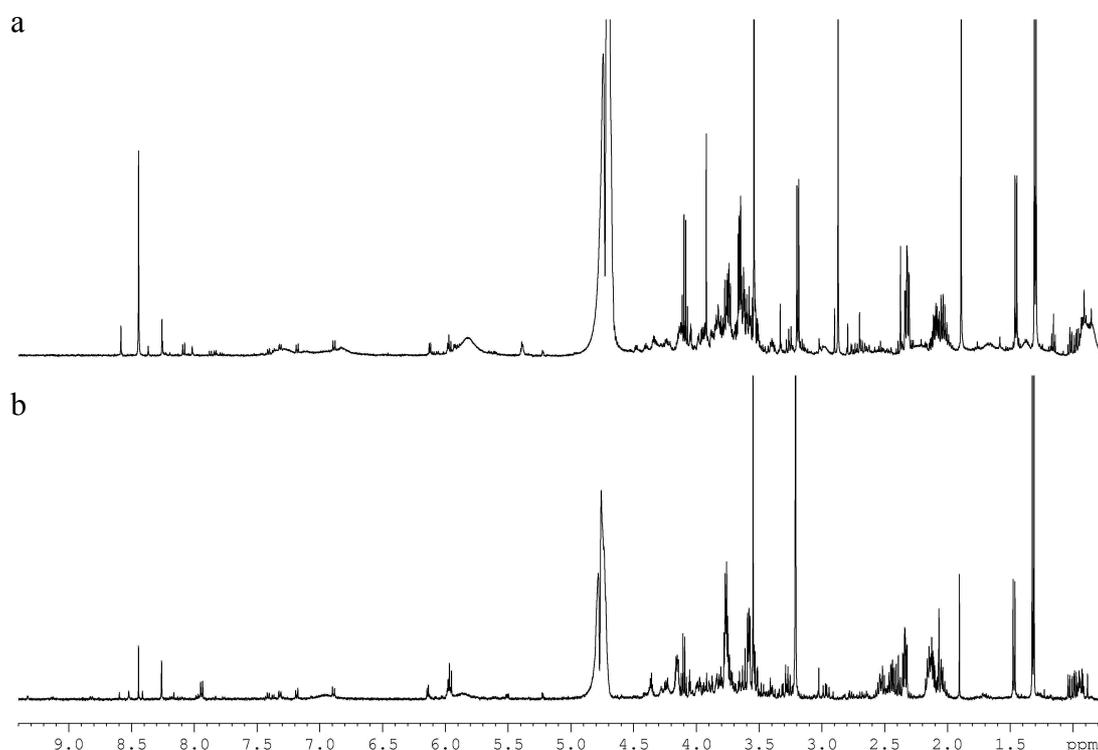


Figure 30 : Spectres NOESYPR1D des métabolites intracellulaires extraits à partir de cellules de cancer du sein MDA-MB-468 (a) avec la méthode acide perchlorique/eau (b) avec la méthode méthanol/chloroforme/eau.

Par conséquent, cette méthode d'extraction est éliminée de la suite de l'étude. Cette hétérogénéité est sans doute due à la méthode de préparation : l'acide perchlorique a dû être neutralisé par le KOH et de fortes variations de pH ont compliqué son ajustement à une valeur de 7,4. Cette observation est cohérente avec quelques travaux qui ont été faits sur des tissus d'animaux ou des bactéries [30, 58].

L'ACP ne permet pas à elle seule de déterminer parmi les méthodes d'extraction restantes celle qui récupère un maximum de métabolites en quantité suffisante. Une analyse plus

poussée utilisant des outils statistiques est donc nécessaire pour pouvoir comparer ces méthodes et finaliser le choix de la procédure d'extraction.

2.3.2 Efficacité des différents protocoles d'extraction

Pour pouvoir sélectionner la méthode d'extraction permettant d'obtenir un plus grand nombre de métabolites et en plus grande quantité, nous avons mis au point la stratégie qui sera décrite dans cette partie.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné les « buckets » possédant un rapport signal-sur-bruit supérieur ou égal à 20. Pour cela, pour une même méthode d'extraction, nous avons sommé les spectres d'extraits cellulaires puis déterminé quelles « buckets » ont un rapport S/B supérieur ou égal à 20 fois la racine carrée du nombre de spectres. Sur les 76 « buckets » initiales, entre 40 et 44 « buckets » remplissent le critère de sélection, dont 36 en commun pour les cinq méthodes : cette légère variation montre qu'il n'y a pas de différence significative sur le choix des « buckets » correspondant à $S/B \geq 20$.

Dans un second temps, pour pouvoir comparer l'efficacité des protocoles d'extraction, nous avons utilisé une représentation géométrique à l'aide d'un pentagone régulier : le choix de cette figure se justifie par le fait que nous souhaitons mettre en évidence les différences pouvant exister entre cinq méthodes d'extraction. La construction s'est faite de la façon suivante :

- tout d'abord, la moyenne des aires A_i^b est calculée pour chaque « bucket » b et pour chaque méthode d'extraction i ;

- ensuite, le « poids » relatif μ_i^b de chaque « bucket » est déterminé pour chaque méthode d'extraction selon l'équation (7), dans laquelle j symbolise chaque méthode d'extraction :

$$\mu_i^b = \frac{A_i^b}{\sum_{j=1}^5 A_j^b} \quad (7)$$

- puis, le pentagone dont chaque sommet représente une des méthodes d'extraction est tracé ;

- enfin, les coordonnées x_b et y_b de chaque « bucket » sont calculées (8) :

$$x_b = \frac{\sum_{j=1}^5 \mu_j^b x_j}{\sum_{j=1}^5 \mu_j^b} = \sum_{j=1}^5 \mu_j^b x_j$$

et

$$y_b = \frac{\sum_{j=1}^5 \mu_j^b y_j}{\sum_{j=1}^5 \mu_j^b} = \sum_{j=1}^5 \mu_j^b y_b \quad (8)$$

Cette représentation géométrique va permettre d'évaluer la contribution des « buckets » dans la discrimination des protocoles d'extraction. En effet, une « bucket » positionnée au centre du pentagone aura le même « poids » pour les cinq méthodes d'extraction alors qu'une « bucket » qui se rapproche de l'un des axes reliant le centre du pentagone à l'un des sommets montrera une plus grande contribution de la « bucket » pour la méthode considérée. Le pentagone est illustré sur la Figure 31 : chaque carré bleu représente une « bucket ».

Sur la Figure 31, une grande majorité des « buckets » a tendance à se rapprocher des axes associés aux extractions MeOH et MeOH/CHCl₃/H₂O (1). Ceci est confirmé par la position du barycentre déterminée à partir de l'ensemble des contributions des « buckets ». Le calcul des distances entre celui-ci et les sommets du pentagone donne les résultats suivants : 0,908 (méthanol), 0,950 (méthanol/chloroforme/eau (1)), 1,001 (méthanol/eau), 1,062 (méthanol/chloroforme/eau (2)) et 1,091 (acétonitrile/eau). Ces valeurs montrent que le barycentre est également plus proche des axes méthanol et méthanol/chloroforme/eau (1) puisque les distances associées sont les plus courtes. Par conséquent, ces deux méthodes d'extraction sont les plus efficaces pour récupérer un maximum de métabolites.

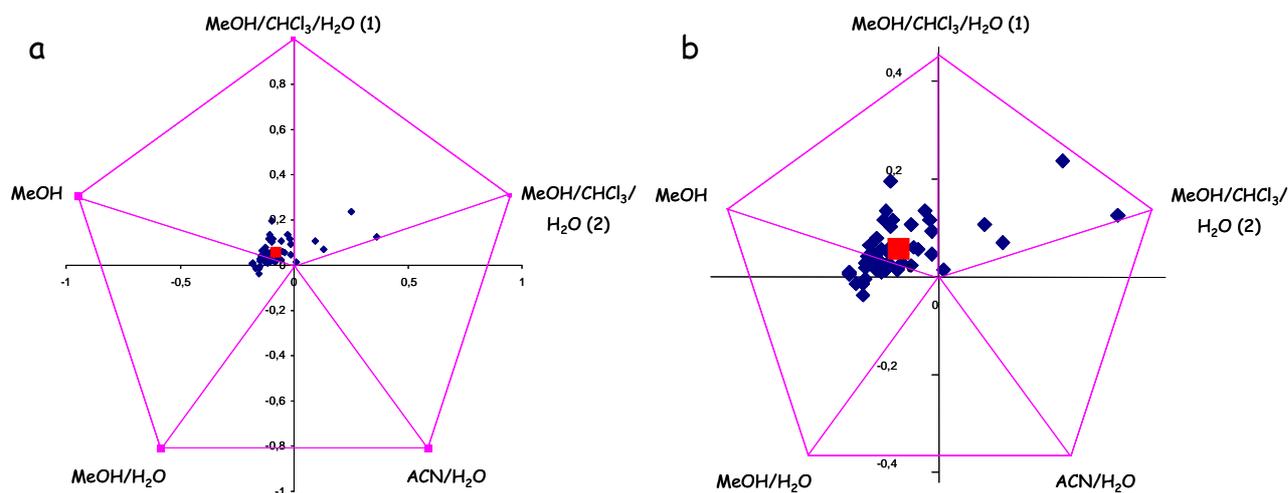


Figure 31 : Représentation géométrique des « buckets » en fonction de leur contribution pour les cinq méthodes d'extraction (acétonitrile/eau, méthanol, méthanol/eau, chloroforme/méthanol/eau (1) et chloroforme/méthanol/eau (2)) (a) pentagone entier (b) agrandissement de la zone d'intérêt. Le carré rouge symbolise le barycentre calculé sur l'ensemble des « buckets ».

Après avoir sélectionné ces deux protocoles, nous avons terminé l'étude en les comparant à l'aide de tests de Mann-Whitney afin de déterminer la méthode qui permet de récolter les métabolites en plus grande quantité. Sur les 44 « buckets », les aires de 36 « buckets » sont significativement différentes avec une valeur de probabilité $p < 0,05$. Le Tableau XIII regroupe les métabolites extraits préférentiellement en fonction de la méthode utilisée.

La méthode MeOH extrait peu de métabolites en grande quantité (essentiellement le pyruvate, la bétaine, la taurine ou encore la glycine) contrairement à la méthode MeOH/CHCl₃/H₂O (1) qui optimise la récupération d'un grand nombre de composés tels que le glutathion, la choline et la glycérophospho-choline, la leucine, le formate, ... Le choix du protocole d'extraction semble donc se diriger vers la méthode MeOH/CHCl₃/H₂O (1).

Tableau XIII : Récapitulatif des métabolites extraits majoritairement en fonction du protocole utilisé.

Extraction MeOH	Extraction MeOH/CHCl ₃ /H ₂ O (1)
Isoleucine	Acétate
Lactate	N-acetyl amino acide
N-acetyl aspartate	Méthionine
Pyruvate	Glutarate
Bétaine	Glutathion
Triméthylamine N-oxyde	Malate
Taurine	Citrate
Glycine	Aspartate
	Asparagine
	Oxalacétate
	Glycérophosphocholine
	Leucine
	Sérine
	Créatine
	Tyrosine
	Cystéine
	Choline
	AXP
	GXP
	UXP
	NAD+
	Maléate
	Formate

Afin de confirmer ce choix, les répétabilités biologique (croissance cellulaire) et de l'extraction sont déterminées : pour cela, nous avons calculé le coefficient de variation sur les aires des « buckets » dont le rapport signal-sur-bruit est supérieur ou égal à 20, soit sur 46 « buckets ». Pour chaque méthode d'extraction, le nombre de « buckets » est représenté graphiquement en fonction de la valeur du coefficient de variation (Figure 32) : sur la Figure 32a, le coefficient de variation est calculé à partir des aires de trois échantillons correspondant à un même passage cellulaire et sur la Figure 32b, celui-ci est déterminé sur l'ensemble des aires des échantillons extraits par la même méthode.

Ces graphiques permettent de mettre en évidence un comportement différent des méthodes d'extraction en termes de répétabilité : en effet, le nombre de « buckets » pour les trois valeurs de coefficient de variation fluctue d'une méthode d'extraction à une autre, montrant une différence de répétabilité des cinq méthodes. Le plus grand nombre de « buckets » ayant un coefficient de variation inférieur à 10% est obtenu pour la méthode d'extraction méthanol/chloroforme/eau (1), avec 39 « buckets » sur la Figure 32a et 36 « buckets » sur la Figure 32b : ceci confirme les conclusions obtenues précédemment, à savoir que ce protocole est le plus répétable pour récupérer, à partir des cellules de cancer du sein, un maximum de métabolites. Avec cette méthode d'extraction, les protéines sont dénaturées, les lipides sont plus facilement séparés des métabolites solubles et aucun sel n'est formé, ce qui limite les fluctuations du pH avant ajustement.

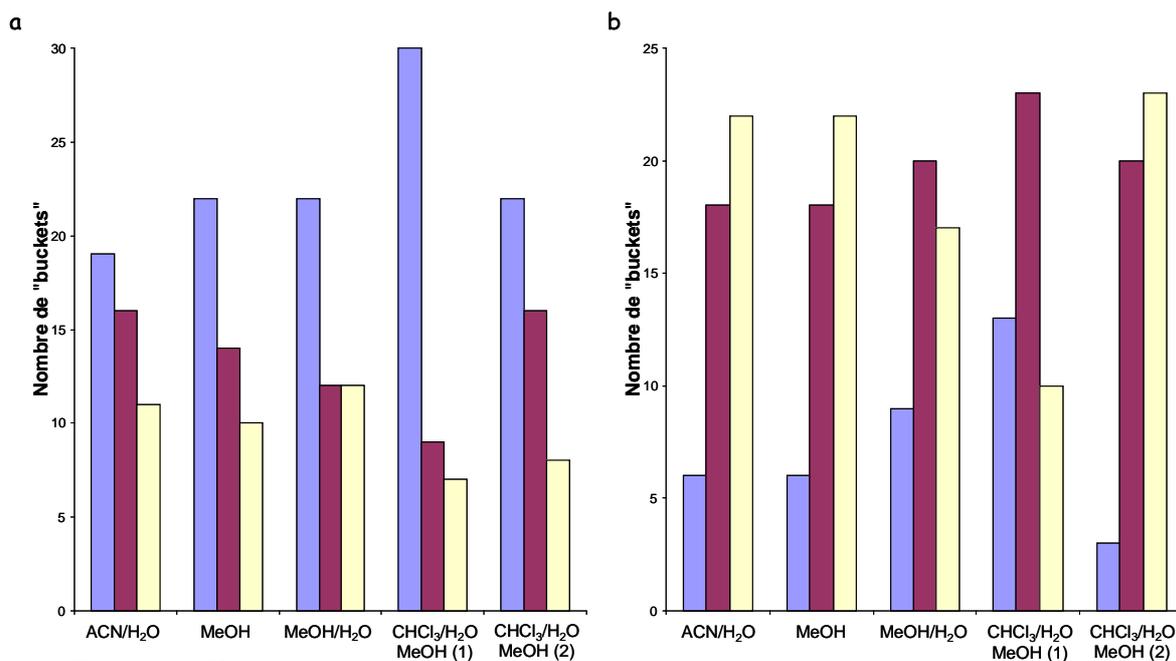


Figure 32 : Histogrammes représentant le nombre de « buckets » pour différentes valeurs de CV et pour chaque méthode d'extraction (a) répétabilité de la méthode d'extraction (b) répétabilité biologique ou de la croissance cellulaire. ■ CV < 5%, ■ 5% < CV < 10% et ■ 10% < CV.

La stratégie développée dans cette partie a donc abouti à la sélection du protocole d'extraction méthanol/chloroforme/eau afin d'étudier les composés intracellulaires par RMN métabolomique. L'efficacité de cette méthode doit donc être à présent évaluée sur plusieurs lignées cellulaires afin de tenter une discrimination de celles-ci.

2.3.3 Evaluation du protocole d'extraction pour l'analyse métabolomique de lignées de cancer du sein

La vérification de l'efficacité de la méthode d'extraction est une étape importante pour confirmer le choix final de celle-ci. Elle va également permettre d'évaluer la variabilité biologique associée aux conditions de croissance cellulaire.

Cette étude a été réalisée sur quatre lignées cellulaires : MDA-MB-468 (en reprenant les échantillons des parties 2.3.1 et 2.3.2, extraits à partir de la méthode méthanol/chloroforme/eau (1)), ZR75-1, SKBR3 et MCF-7 (cette dernière lignée est non-invasive, contrairement aux trois autres). Pour ces trois dernières lignées, les échantillons ont été récoltés selon la procédure détaillée dans la partie Matériels et méthodes (cf. 0) : pour chaque lignée, les cellules contenues dans deux flasques ont été récoltées à l'aide de méthanol et d'un grattoir. Puis, la méthode d'extraction MeOH/CHCl₃/H₂O (1) a été appliquée afin de récupérer les métabolites intracellulaires. Après centrifugation (15 min, 5000 g, 4°C) et prélèvement de la phase aqueuse, les échantillons ont été séchés sous un flux de N₂ pour éliminer les solvants d'extraction. Ils ont ensuite été dissous dans une solution tampon phosphate (pH = 7,4, C = 0,1 mol/L, préparée dans du D₂O), puis homogénéisés, ajustés à pH = 7,4 ± 0,5. Enfin, les échantillons ont été filtrés et placés dans des tubes de 5 mm de diamètre pour analyse par RMN métabolomique. Pour ces trois lignées, un échantillon par

passage cellulaire a été récolté, et ce sur plusieurs passages (entre 3 et 6 en fonction des lignées).

Les acquisitions et les traitements des données ont été réalisés en utilisant les paramètres décrits dans les paragraphes 2.2.3 et 2.2.4. Pour l'ACP (Figure 33), les échantillons extraits à partir des quatre lignées cellulaires représentent les individus et les 46 « buckets » les variables d'étude.

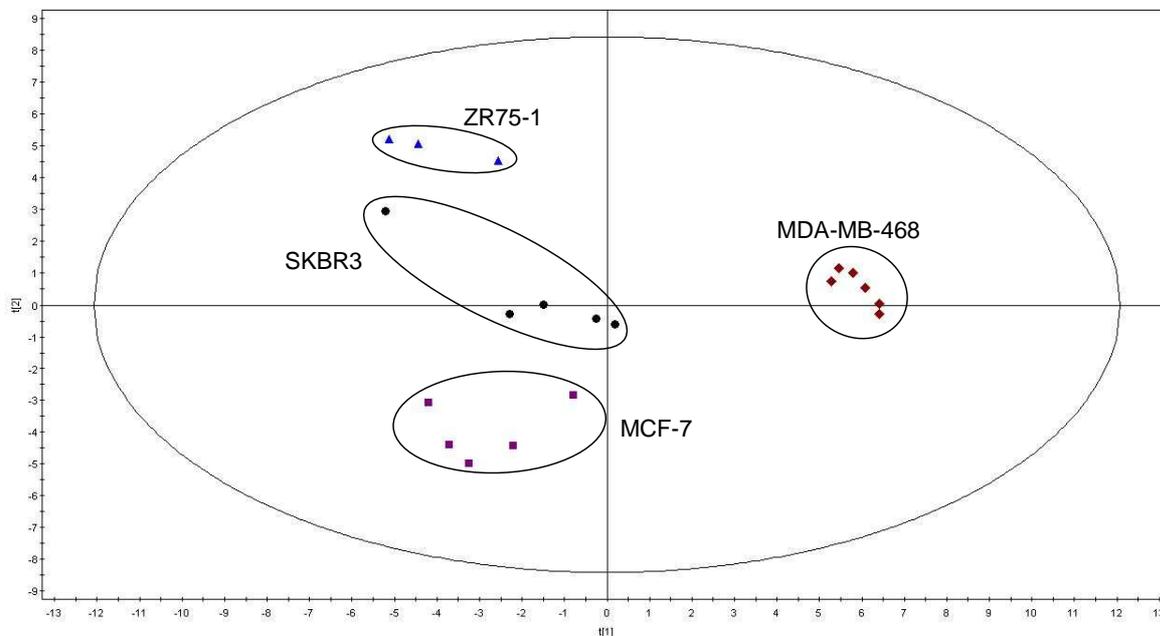


Figure 33 : Analyse en composantes principales obtenue à partir de 19 spectres d'extraits cellulaires de quatre lignées de cellules de cancer du sein. Les première et deuxième composantes représentent respectivement 43% et 21% de la variabilité totale.

Sur la Figure 33, une séparation très claire des quatre lignées apparaît : celle-ci confirme le caractère discriminatoire de la méthode d'extraction méthanol/chloroforme/eau (1) pour différencier les lignées cellulaires. L'ACP permet également de mettre en évidence une faible variabilité biologique en fonction du passage cellulaire des échantillons, avec des groupes légèrement dispersés sur celle-ci.

Pour compléter cette étude sur la discrimination des lignées de cancer du sein, des tests de Mann-Whitney sont effectués sur les aires des « buckets » pour comparer deux à deux les lignées et ainsi déterminer des biomarqueurs caractéristiques de chaque lignée. Ceux-ci sont répertoriés dans le Tableau XIV.

Tableau XIV : Biomarqueurs caractéristiques de quatre lignées de cancer du sein.

SKBR3	MDA-MB-4668	MCF-7	ZR75-1
LDL	Thréonine	Isoleucine	Lactate
Bétaine	Arginine	Valine	Acétate
Triméthylamine N- oxyde	Proline	Nacétyl aspartate	Créatine
Taurine	Glutamate	Asparagine	Tyrosine
	Nacétyl amino acide	Oxalacétate	
	Glutamine		
	Glutarate		
	Glutathion		
	Pyruvate		
	Succinate		
	Glycérophospho- choline		
	Phosphocholine		
	Glycine		
	AXP		
	GXP		
	UXP		
	NAD+		
	Maléate		
	Formate		

3 Conclusion et perspectives

Dans cette partie, nous avons développé une stratégie afin de sélectionner une méthode d'extraction qui soit robuste et répétable pour l'analyse métabolomique de cellules de cancer du sein. Cette stratégie consiste à comparer l'efficacité de plusieurs procédures sur une même lignée cancéreuse par l'acquisition de spectres RMN à une dimension, puis à analyser les résultats obtenus à l'aide d'outils statistiques (analyse en composantes principales associée à des tests de Mann-Whitney). Une étude de répétabilité sur la croissance cellulaire et sur l'extraction a également été menée afin de confirmer le choix de la procédure. La sélection s'est finalement portée sur la méthode méthanol/chloroforme/eau en une seule étape : en effet, nous avons montré que celle-ci est la plus appropriée pour récupérer un maximum de métabolites intracellulaires en quantité suffisante. Pour confirmer ce choix, cette méthode d'extraction a été appliquée à quelques lignées cellulaires de cancer du sein : une discrimination sur l'analyse en composantes principales a alors permis de souligner des différences biologiques entre celles-ci et de déterminer des biomarqueurs responsables de ces différences. Par conséquent, notre stratégie a permis de choisir une procédure d'extraction robuste pour mener des études métabolomiques sur les cellules de cancer du sein mais cette stratégie pourra tout aussi bien s'appliquer à d'autres études métabolomiques par RMN sur d'autres types de cellules.

La suite de cette étude abordera l'approche métabonomique, comme expliquée au paragraphe 4 de la deuxième partie : les échantillons analysés dans le paragraphe 2.3.3 lors de la discrimination des lignées cellulaires seront utilisés pour la quantification des métabolites. La

séquence utilisée pour mesurer la concentration des métabolites sera l'INADEQUATE symétrisée proton, qui a été optimisée dans la partie 2.

Partie 4 : Applicabilité de l'INADEQUATE-¹H sur des extraits cellulaires

1 Introduction

Comme cela a été présenté au paragraphe 3.5, quelques études ont montré les potentialités de la RMN 2D en tant qu'outil de quantification de métabolites contenus dans des milieux complexes [7, 74, 77, 125-131]. En effet, cette technique permet de s'affranchir des recouvrements des signaux existants en RMN 1D du fait de la complexité des milieux biologiques, et donc de pouvoir quantifier avec une meilleure précision les composés. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser cette technique pour différencier les cellules de cancer du sein en quantifiant leurs métabolites intracellulaires.

Ainsi, avant d'envisager la quantification des métabolites intracellulaires, nous avons mis au point un outil d'analyse quantitative rapide pour permettre l'étude de milieux complexes tels que les cellules du cancer du sein. Dans la partie 2, nous avons comparé les potentialités de plusieurs séquences de RMN 2D. Après optimisation de différents paramètres, la séquence INADEQUATE-¹H symétrisée a permis de répondre à l'objectif fixé, grâce à l'obtention de spectres en sept minutes ayant une excellente linéarité et avec une répétabilité inférieure ou égale à 2% pour des métabolites de concentrations allant jusqu'à 0,1 mmol/L.

Pour pouvoir réaliser l'application de cette séquence sur des extraits cellulaires de cancer du sein, nous avons comparé différents protocoles d'extraction afin de sélectionner celui qui permet de récupérer un maximum de métabolites intracellulaires (cf. partie 3). Après une étude par RMN métabolomique et à l'aide d'outils statistiques, nous avons choisi la méthode méthanol/chloroforme/eau (1) et déterminé des biomarqueurs caractéristiques de quatre lignées cellulaires.

Dans cette partie, nous allons montrer l'intérêt de l'INADEQUATE-¹H symétrisée pour la réalisation d'études métabonomiques. Cette application est réalisée sur des échantillons d'extraits de trois lignées cellulaires de cancer du sein obtenus après extraction avec méthanol/chloroforme/eau (1). Du fait des contraintes engendrées par l'ajout d'une référence interne, la technique des ajouts dosés est utilisée pour quantifier les métabolites intracellulaires. Un mélange modèle contenant une quinzaine de métabolites est additionné dans les extraits cellulaires afin de quantifier les métabolites choisis. Une droite d'étalonnage permet de remonter à la quantité initiale dans les échantillons avant ajout, la linéarité de la méthode ayant été montrée dans la partie 2. L'utilisation d'outils statistiques termine l'étude afin de mettre ou non en évidence des différences entre les lignées en fonction des valeurs de concentrations déterminées.

2 Matériels et méthodes

Les trois lignées cellulaires étudiées sont : MCF-7 (p+8, p+9 et p+11), MDA-MB-468 (p+20 et p+21 deux fois) et SKBR3 (p+27, p+28 et p+30). Trois échantillons par lignée cellulaire sont préparés selon le protocole décrit aux paragraphes 0 et 2.3.3. Les métabolites susceptibles d'être quantifiés sont sélectionnés à partir des informations apportées par l'étude sur les biomarqueurs caractéristiques des lignées effectuée au paragraphe 2.3.3. La quantification est réalisée sur quinze métabolites qui ont un rapport signal-sur-bruit supérieur ou égal à 10 sur un spectre INADEQUATE-¹H symétrisée d'extraits cellulaires de MCF-7 obtenu en 13 minutes. Le mélange modèle contient les quinze métabolites suivants à une concentration de 0,04 mol/L : lactate, alanine, thréonine, taurine, glutathion, glutamine, valine, isoleucine, proline, aspartate, histidine, sérine, myo inositol, glutamate et choline. Les masses des différents composés sont dissoutes dans 2,5 mL de solution tampon phosphate (pH = 7,4, C = 0,1 mol/L) préparée dans D₂O.

L'analyse par RMN est réalisée avec la séquence INADEQUATE-¹H symétrisée (cf. Figure 13). Les acquisitions et les traitements des spectres sont effectués en utilisant les paramètres décrits dans le paragraphe 3.2.1. Toutefois, en raison de la complexité des échantillons, nous avons choisi de doubler le nombre d'incrément dans la dimension indirecte (TD1 = 128) afin d'améliorer la résolution spectrale. Avant ajout, le pH des extraits cellulaires est ajusté à une valeur de $7,4 \pm 0,5$. Pour quantifier les métabolites intracellulaires, le mélange modèle est ajouté trois fois à une concentration de 0,5 mmol/L dans le tube RMN. Avant ajout et après chaque ajout, l'acquisition de cinq spectres est réalisée afin de mesurer la répétabilité RMN des expériences. Pour chaque spectre, le volume des pics est mesuré puis, pour chaque série de cinq spectres, la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation sont calculés. Enfin, des courbes d'étalonnage sont tracées afin de déterminer la concentration des métabolites intracellulaires avant ajout du mélange modèle (Figure 34).

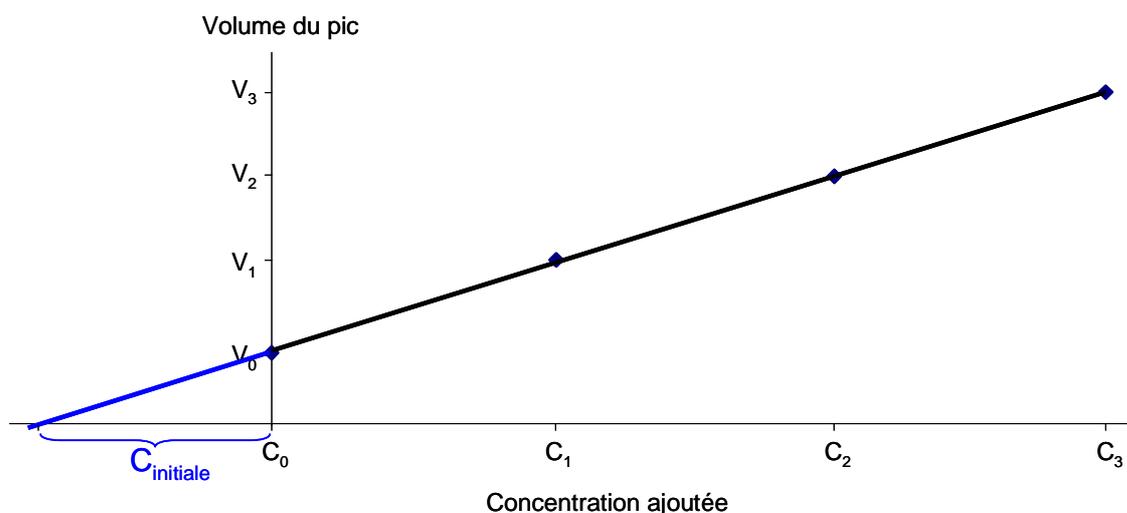


Figure 34 : Courbe d'étalonnage représentant, pour un métabolite donné, le volume du pic 2D en fonction de la concentration ajoutée : détermination graphique de la concentration initiale du métabolite étudié.

Pour chaque métabolite, le volume V_i du pic 2D est reporté en fonction de la valeur de la concentration ajoutée C_i . Ensuite, une régression linéaire permet de tracer la droite passant par un maximum de points expérimentaux, ainsi que de calculer l'équation de cette droite et le coefficient de détermination R^2 . Enfin, la concentration initiale en métabolite peut être déterminée soit à l'aide de l'équation de droite, soit graphiquement en prolongeant la droite de régression (cf. Figure 34) : cette détermination est possible car nous avons montré que la méthode est linéaire et qu'elle ne présente pas de biais (cf.3.2.2).

Chaque échantillon d'extraits cellulaires a été préparé à partir de la récolte de cellules provenant de deux flasques. Les cellules n'ayant pas la même croissance d'une lignée à l'autre, la quantité de départ de cellules varie d'un échantillon à l'autre et d'une lignée à l'autre (dans notre étude, le nombre de cellules est compris entre $1,81 \times 10^7$ et $3,27 \times 10^7$) : par conséquent, celle-ci va influencer la concentration en métabolites intracellulaires calculée à partir de la courbe d'étalonnage. Pour pouvoir comparer les échantillons entre eux, les concentrations mesurées sont normalisées pour une valeur de 2×10^7 cellules.

3 Résultats et discussion

Avant de réaliser la quantification des métabolites intracellulaires, nous avons tout d'abord déterminé le temps d'expérience nécessaire pour obtenir les signaux des métabolites d'intérêt avec un rapport signal-sur-bruit supérieur ou égal à 10. En effet, comme expliqué au paragraphe 2, la concentration des échantillons est dépendante de la lignée cellulaire à partir de laquelle l'échantillon d'extraits a été préparé. Nous avons montré aux paragraphes 3.1.2.2 et 3.1.3.2 que l'absence de cycle de phase pour la séquence INADEQUATE-¹H symétrisée permet de pouvoir diminuer le nombre d'accumulations n_s jusqu'à une valeur de 1. Pour estimer le temps d'expérience, nous avons fait varier la valeur de n_s pour un échantillon d'extraits cellulaire par lignée et mesuré S/B sur les spectres à chaque nouvelle valeur de n_s . Ainsi, nous avons pu conserver une valeur de 1 pour la lignée MCF-7, soit un temps d'acquisition de 13 min. Pour les lignées SKBR3 et MDA-MB-468, la valeur de n_s est de 5, soit une durée d'expérience de 1h05 par spectre.

Ensuite, après avoir déterminé le temps d'expérience en fonction des échantillons, nous avons effectué les mesures des volumes des pics et vérifié la répétabilité analytique de ces mesures. Comme expliqué au paragraphe 2, nous avons calculé le coefficient de variation sur chaque série de cinq spectres : celui-ci est inférieur à 10%. Ces résultats rejoignent ceux obtenus dans l'étude sur les milieux modèles (cf. partie 2).

Après avoir vérifié la répétabilité analytique, nous avons tracé les droites d'étalonnage. La Figure 35 regroupe les courbes d'étalonnage obtenues pour la thréonine extraite à partir de chacune des trois lignées. Cette figure montre également l'excellente linéarité des résultats obtenus pour la thréonine, avec des coefficients de détermination R^2 supérieurs ou égaux à

0,99. De façon plus générale, sur l'ensemble des résultats obtenus pour tous les métabolites, 94% des valeurs de R^2 se trouvent au dessus de 0,99 (les 6% restant se situant entre 0,87 et 0,99).

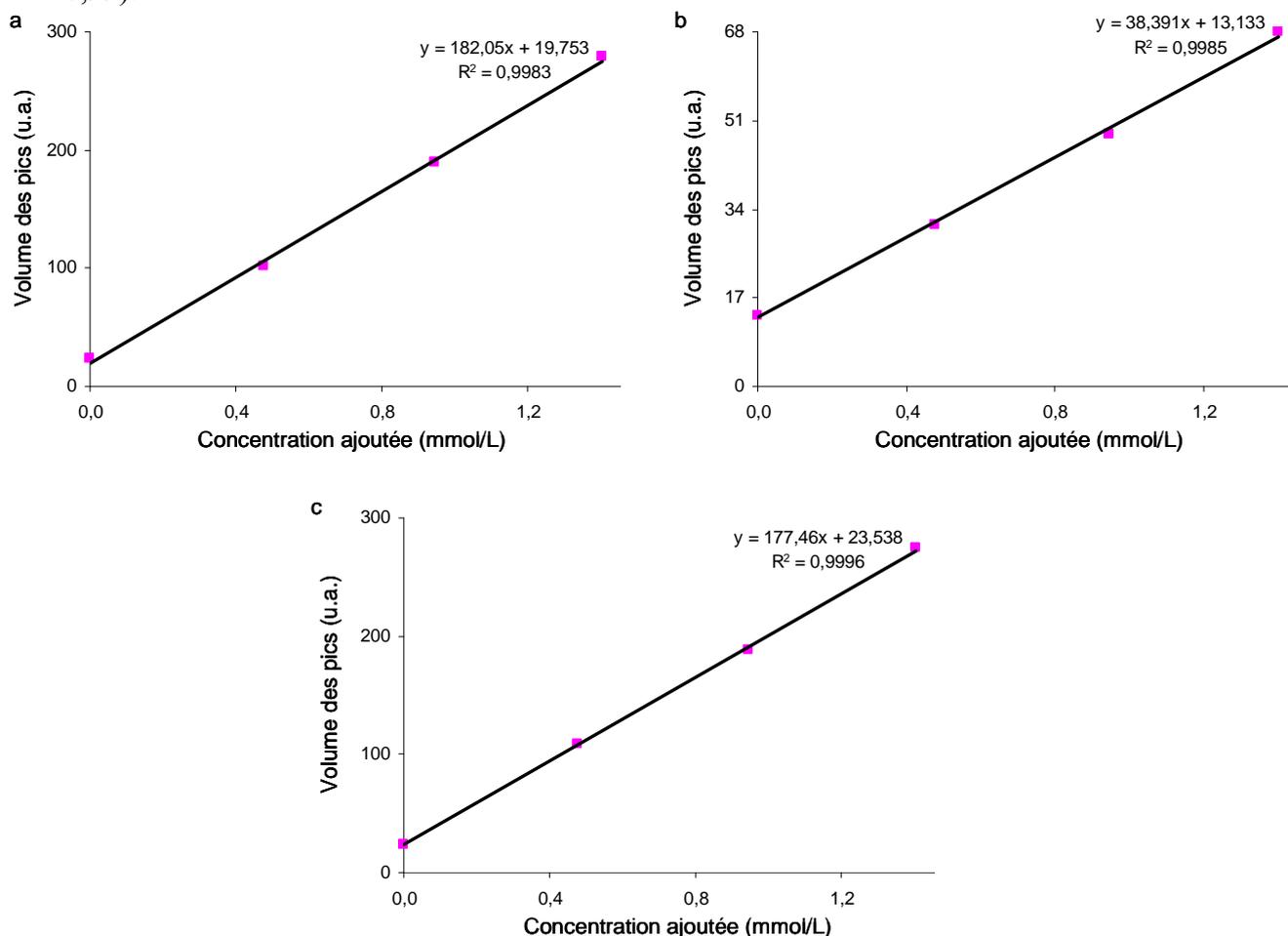


Figure 35 : Courbes d'étalonnage obtenues à partir des spectres INADEQUATE-¹H pour la thréonine extraite à partir de (a) MDA-MB-468, (b) MCF-7 et (c) SKBR3. Les équations des droites de régression linéaire ainsi que les coefficients de déterminations sont également indiqués.

Après avoir tracé les courbes d'étalonnage, nous avons déterminé les concentrations initiales en métabolites pour chaque échantillon. De plus, la moyenne et l'écart-type pour chaque métabolite extrait à partir d'une même lignée ont été calculés. Les valeurs de concentrations obtenues pour chaque lignée et les écart-types associés sont regroupés sur la Figure 36.

Ces résultats montrent tout d'abord que la lignée MCF-7 est globalement plus concentrée en métabolites que les deux autres lignées. Ensuite, ils mettent en évidence que certains métabolites permettent de discriminer les lignées entre elles : par exemple, l'histidine a une concentration moyenne de 2,37 mmol/L pour la lignée MCF-7 et est non détectable pour les lignées SKBR3 et MDA-MB-468. Quant à la valine, la thréonine et l'isoleucine, elles ont des concentrations très proches pour les lignées MDA-MB-468 et SKBR3 mais qui diffèrent de celles de la lignée MCF-7. Par conséquent, l'histidine, l'isoleucine, la thréonine et la valine peuvent être considérées comme des biomarqueurs quantitatifs caractéristiques de la lignée MCF-7. De la même façon, le glutathion permet de différencier SKBR3 par rapport aux deux

autres lignées alors que la proline permet de discriminer MDA-MB-468 par rapport à SKBR3 et MCF-7. Le lactate, quant à lui, a une concentration de 0,66 mmol/L pour MDA-MB-468, de 1,09 mmol/L pour SKBR3 et de 1,77 mmol/L pour MCF-7 : par conséquent, ce métabolite permet de discriminer les trois lignées entre elles. Une conclusion identique peut être tirée pour l'alanine.

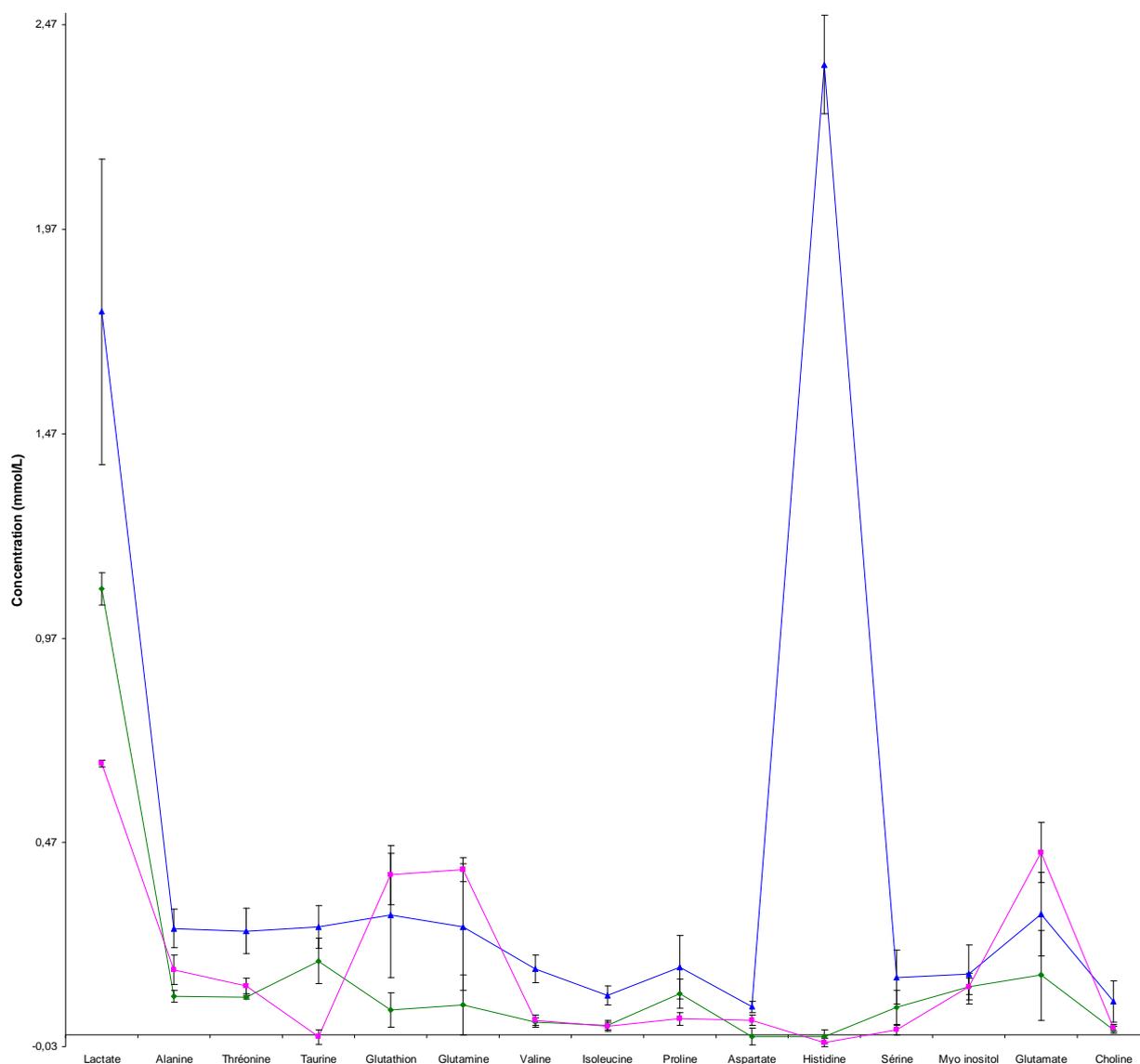


Figure 36 : Concentrations de quinze métabolites intracellulaires déterminées par ajouts dosés pour les lignées MCF-7 (—▲—), SKBR3 (—◆—) et MDA-MB-468 (—■—). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types calculés sur les trois concentrations d'un même métabolite pour une même lignée.

Enfin, nous pouvons également noter que sur la Figure 36, certaines concentrations sont très proches de zéro voire même négatives. Or, une concentration négative n'a pas de sens chimique. Cela signifie que les métabolites concernés sont en dessous de la limite de détection : l'aspartate et l'histidine pour la lignée SKBR3, la taurine, l'histidine et la sérine pour la lignée MDA-MB-468. Comme cela a été précisé au paragraphe 2, la sélection des métabolites quantifiés a été réalisée à partir d'un spectre INADEQUATE-¹H symétrisé

d'extraits cellulaires de MCF-7 : par conséquent, ces métabolites n'auraient peut-être pas été choisis pour la quantification si la sélection avait été réalisée à partir d'un spectre d'extraits cellulaires obtenus sur une autre lignée.

Pour mieux mettre en évidence la discrimination entre ces trois lignées cellulaires, nous avons effectué une analyse en composantes principales : pour cette ACP, les échantillons sont les individus et les concentrations des métabolites sont les variables. Les résultats obtenus sont regroupés sur la Figure 37. Sur l'analyse en composantes principales, une séparation très claire des trois lignées est observée.

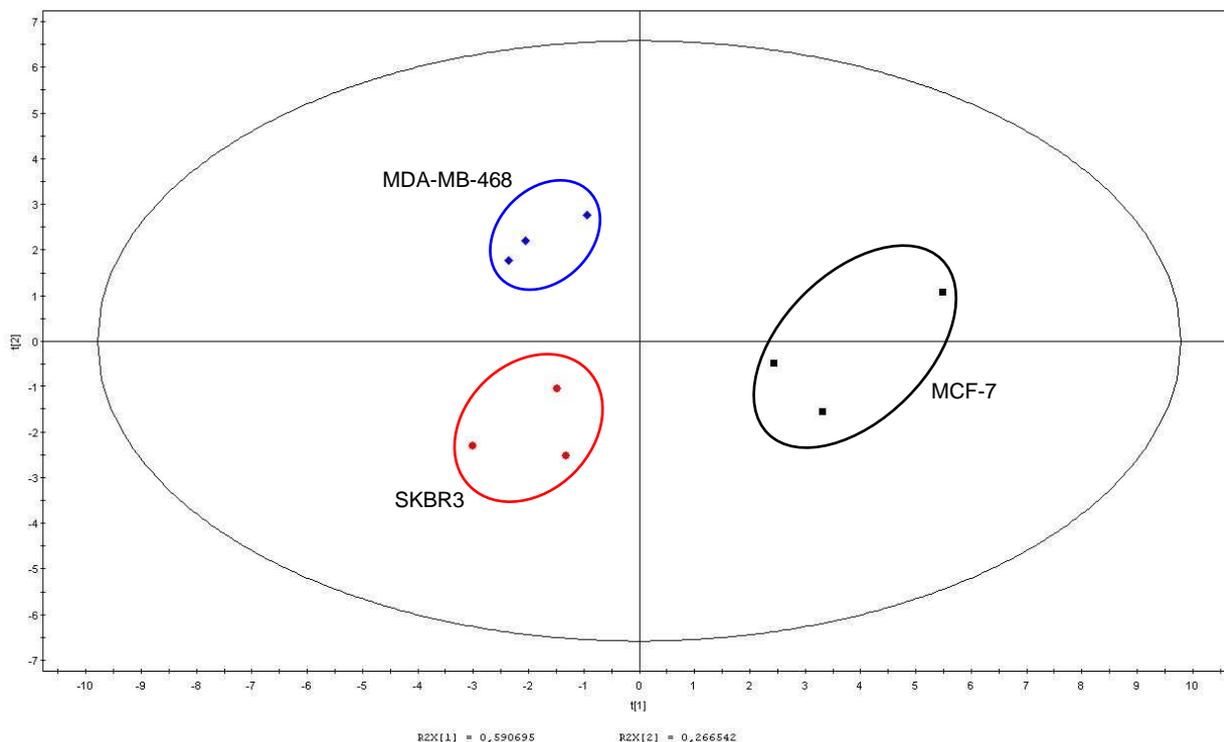


Figure 37 : Analyse en composantes principales obtenue à partir de 9 spectres d'extraits cellulaires de trois lignées de cellules de cancer du sein. Les première et deuxième composantes représentent respectivement 59% et 27% de la variabilité totale.

Afin d'évaluer la précision de la mesure de la concentration initiale des métabolites intracellulaires, nous avons également calculé le taux de recouvrement (%) (9). Dans cette équation, C_{finale} correspond à la concentration en métabolite après x ajouts, $C_{initiale}$ à la concentration en métabolite avant ajout dosé et $C_{ajoutée}$ à la concentration de x ajouts d'un métabolite.

$$\alpha = \frac{C_{finale} - C_{initiale}}{C_{ajoutée}} \times 100 \quad (9)$$

Une valeur inférieure à 100% indique que la concentration initiale est sous-estimée alors que pour $\alpha > 100\%$, celle-ci est surestimée. Le Tableau XV regroupe la moyenne des résultats

obtenus pour chaque ajout pour la lignée MDA-MB-468. Les taux de recouvrement pour les lignées SKBR3 et MCF-7 sont présentés en annexes 2 et 3.

Tableau XV : Taux de recouvrement α (%) calculé pour chaque ajout et pour chaque métabolite pour la lignée MDA-MB-468.

Métabolites	+ 0,5 mmol/L	+ 1 mmol/L	+ 1,5 mmol/L
Lactate	95,47	95,54	100,53
Alanine	94,93	96,39	100,27
Thréonine	93,33	96,83	99,99
Taurine	86,92	95,82	99,53
Glutathion	94,94	98,66	99,75
Glutamine	108,24	99,93	100,94
Valine	94,44	97,35	99,99
Isoleucine	90,03	97,27	99,52
Proline	85,98	95,14	99,56
Aspartate	93,81	97,20	99,96
Histidine	82,65	94,05	99,44
Sérine	74,26	97,25	97,76
Myo Inositol	97,57	97,59	100,29
Glutamate	103,36	89,89	102,73
Choline	93,04	98,14	99,65

Ce tableau permet de montrer que plus la quantité en métabolites ajoutés est élevée, plus le taux de recouvrement se rapproche de 100%.

4 Conclusion et perspectives

Dans cette partie, nous avons montré que la séquence INADEQUATE-¹H symétrisée peut être appliquée pour quantifier des métabolites dans les cellules de cancer du sein : pour cela, nous avons réalisé l'applicabilité de la méthode sur trois lignées cellulaires cancéreuses. L'utilisation de la séquence INADEQUATE-¹H symétrisée permet à la fois de déterminer la

concentration des métabolites intracellulaires mais également de discriminer les trois lignées entre elles. Par conséquent, la séquence INADEQUATE-¹H symétrisée est un bon outil de quantification de métabolites intracellulaires.

Par la suite, la quantification des métabolites pourra être améliorée : avec notre méthode d'analyse optimisée, nous avons quantifié de manière absolue les métabolites intracellulaires grâce à la technique des ajouts dosés. D'autres options existent pour quantifier des composés de façon absolue. Une première solution serait l'ajout d'une référence interne. Cependant, cet ajout nécessiterait de répondre à un grand nombre de conditions, comme par exemple avoir des déplacements chimiques ne se superposant pas à ceux des composés d'intérêt, ne pas interagir avec les composés d'intérêt ou encore posséder des T₁ proches de ceux de l'échantillon. Ces conditions seraient certainement difficiles à remplir du fait de la complexité des milieux réels.

Une seconde alternative serait l'implantation de la méthode ERETICTM (Electronic REference To access *In vivo* Concentrations) [154]. En effet, cette référence électronique présente toutes les caractéristiques d'un FID et engendre, après transformation de Fourier, un pic supplémentaire dont la position sur le spectre peut être ajustée. Par conséquent, l'utilisation de cette méthode permettrait de s'affranchir des contraintes imposées par l'ajout d'une référence interne dans le milieu réel. Une étude préalable a montré la possibilité de l'implémenter dans des séquences de RMN 2D [141].

Une autre perspective concernera la poursuite de la discrimination des lignées cellulaires par l'étude d'un plus grand nombre de lignées de cancer du sein. Avec l'ensemble de ces résultats, il sera alors intéressant d'essayer de relier les informations obtenues par RMN quantitative aux données isotopiques et biologiques caractéristiques de ces lignées.

Partie 5 : Discrimination de cellules de cancer du sein par Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques

Les parties précédentes ont abouti à la mise au point d'un protocole dans le but de réaliser des études métabonomiques par RMN afin de différencier des cellules de cancer du sein. Nous avons donc pu mettre en évidence les différences de métabolismes existant entre les lignées cellulaires étudiées. De façon générale, les métabolites interviennent lors de réactions biochimiques : par conséquent, nous avons choisi de nous intéresser un peu plus en détails à ceux-ci et de déterminer s'ils possèdent un fractionnement isotopique engendré par ces réactions biochimiques. Une seconde technique est envisagée pour atteindre cet objectif : la Spectrométrie de Masse des Rapports Isotopiques (SMRI). Celle-ci apporte des informations complémentaires à celles fournies par la RMN métabolomique. De plus, cette technique est très sensible, rapide et ne nécessite pas d'appliquer une méthode d'extraction aux cellules : l'étude peut donc se faire directement sur les cellules entières. Cette approche isotopique a fait l'objet de nombreuses études (cf. 2.3, partie 1), notamment en médecine afin de comprendre le métabolisme de certaines pathologies. Elle semble donc envisageable et appropriée pour tenter de caractériser l'état physiologique de cellules de cancer du sein et peut-être pour les différencier par l'élaboration de profils isotopiques. Ce point est abordé en détails dans cette cinquième partie.

1 Introduction

L'utilisation des isotopes stables s'est développée durant ces trente dernières années afin de mesurer les infimes variations de composition isotopique de matières biologiques ou géologiques. Ces analyses sont notamment réalisées grâce à la Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques (SMRI) en flux continu, qui permet de mesurer de façon précise, exacte et fine les rapports isotopiques de différents éléments (par exemple, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ou $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Cette technique a été employée dans de nombreux champs d'application, en particulier dans le domaine pétrolier [155], pour déterminer la composition d'entités géologiques [156-162], pour détecter des fraudes ou authentifier l'origine de produits organiques, que ce soit dans le domaine pharmaceutique [93, 94, 163] ou celui de l'alimentation [79, 89, 164-167], ou encore pour relier les effets de la nutrition au métabolisme [168]. Un autre champ d'application concerne la recherche clinique : en effet, les isotopes stables n'étant pas toxiques, ils peuvent être utilisés dans le but de suivre et de comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu dans les tissus, les cellules ou encore les biofluides. Pour l'instant, ces études restent en partie limitées à l'utilisation de traceurs enrichis en isotopes stables pour déterminer les voies

métaboliques impliquées dans différentes pathologies, les analyses étant réalisées par RMN et spectrométrie de masse classique [8, 95, 169].

Dans le domaine du cancer, l'utilisation de la SMRI n'a jamais été envisagée pour comparer des tumeurs cancéreuses et tenter de relier leur composition isotopique à une caractéristique de la pathologie (stade, invasivité, ...). Actuellement, leur différenciation repose sur la diversité morphologique des cellules et l'utilisation de techniques à l'échelle moléculaire comme les puces à ADN [170] et/ou à protéines [171]. Ces techniques permettent d'identifier et de caractériser un grand nombre de gènes et de protéines impliqués à l'intérieur des cellules, et donc d'apporter des informations concernant la pathologie étudiée. Cependant, les procédures de préparation d'échantillons sont lourdes à mettre en œuvre, leurs analyses sont longues et n'aboutissent pas toujours à des résultats discriminants et ces techniques ne sont pas toujours applicables facilement en routine [172].

Nous avons donc proposé un procédé analytique permettant à la fois de différencier des lignées cellulaires avec précision et d'obtenir des analyses peu coûteuses, rapides et faciles à mettre en œuvre pour être à terme utilisées en routine. L'hypothèse de départ est la suivante : si une perturbation du métabolisme (maladie, effet thérapeutique, ...) peut induire une infime variation de la composition isotopique cellulaire, il est alors possible de caractériser l'état physiologique de cellules et de les différencier par l'élaboration de profils isotopiques. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier les cellules de cancer du sein et d'utiliser la SMRI comme outil de discrimination et de caractérisation de lignées cancéreuses.

2 Matériels et méthodes

2.1 Culture cellulaire

2.1.1 Cellules

Dans le cadre de notre étude, six lignées cancéreuses (MDA-MB-468, MDA-MB-231, ZR75-1, SKBR3, Cal51, MCF-7) et une lignée saine (MCF-10A) ont été cultivées et récoltées. Les cellules issues de ces lignées ont la particularité d'adhérer au fond des flasques qui possèdent une surface hydrophile, afin de se multiplier et de croître.

Elles diffèrent les unes des autres par le type de cellules altérées et leur localisation (lobules, canaux galactophores, etc.), par leur probabilité à se propager à d'autres organes ou tissus avoisinants (cellules invasives ou non) ou encore par l'expression de récepteurs présents sur les membranes cellulaires. Ces derniers ont différents rôles : les récepteurs à œstrogène régulent l'activité cellulaire, les récepteurs EGFR (« Epithelial Growth Factor Receptor ») gèrent la croissance des cellules. Quant aux récepteurs appartenant à la famille des tyrosines kinases nommés Her2 (ou ErbB2), ils assurent la régulation de la prolifération, de la

différenciation, de la mobilité et de la mort cellulaire. Dans 30% de tumeurs de cancer du sein, le récepteur Her2 est surexprimé [173].

Le Tableau XVI regroupe l'ensemble des lignées étudiées ainsi que leurs caractéristiques vis-à-vis de l'expression de certains récepteurs.

Tableau XVI : Caractéristiques des lignées de cancer du sein étudiées. Le nom et la numérotation de chaque lignée sont fournis par l'ATCC (American Type Culture Collection) [174]. La pathologie associée, ainsi que la présence (+) ou l'absence (-) de récepteurs à œstrogène (ER), à progestérone (PR), de certaines tyrosines kinases (Her2 ou ErbB2), de facteur de croissance épithélial (EGFR) sont également mentionnées. La mutation ou non du gène p53 est également précisée.

Lignées cellulaires	Groupe de cancers du sein	N° ATCC	ER	PR	Her2	EGFR	Gène p53	Pathologie
MDA-MB-468		HTB-132	-	-	-	+	muté	Métastase d'adénocarcinome
MDA-MB-231	Lignées triples négatives	HTB-26	-	-	+/-	+	muté	Métastase d'adénocarcinome
Cal51		N° DSMZ : ACC 302	-	-	-	+	Non muté	Adénocarcinome
ZR-75-1	Lignées ER+	CRL-1500	+	-	-	+/-	Non muté	Carcinome canalaire invasif
MCF-7		HTB-22	+	?	+/-	-	Non muté	Carcinome canalaire
SKBR-3	Lignées Her2+	HTB-30	-	-	++	-	muté	Adénocarcinome
MCF-10A	Lignées non cancéreuses	CRL-10317	-	-	-	?	Non muté	Maladie fibrokystique (non cancéreuse)

Les lignées de cellules de cancer du sein sont généralement regroupées en trois groupes par les cancérologues pour s'orienter vers une thérapie appropriée. Il s'agit des lignées hormono-dépendantes qui expriment les récepteurs ER/PR (MCF-7 et ZR-75-1), les lignées qui expriment Her2 (SKBR-3) et les lignées non hormono-dépendantes qui n'expriment pas ER/PR/Her2 (MDA-MB-468, MDA-MB-231 et Cal51). Un autre paramètre est pris en compte pour caractériser les cellules saines et cancéreuses : le gène p53 codant pour la

protéine p53 [175]. Celle-ci permet de réguler certaines fonctions telles que la mitose, le cycle cellulaire ou la mort cellulaire (apoptose). Lorsque l'ADN est endommagé, cette protéine joue un rôle important puisqu'elle provoque soit un arrêt transitoire dans le déroulement du cycle cellulaire soit l'apoptose de la cellule afin que l'ADN endommagé ne soit pas répliqué. En revanche, quand cette protéine est inactivée, les cellules accumulent du patrimoine génétique endommagé et sont prédisposées à devenir des cellules cancéreuses. Le gène p53 est donc l'un des plus importants suppresseurs de tumeur. Dans la moitié des cas de cancers, celui-ci est inactif ou muté. Dans le cadre du cancer du sein, le gène p53 n'est pas systématiquement muté si les cellules sont cancéreuses (cf. Tableau XVI).

2.1.2 Milieux de culture

Afin de croître et de se multiplier, les cellules ont besoin d'un milieu nutritif contenant de l'eau, du gaz, des ions minéraux, des sources de carbone, d'énergie et d'azote, des facteurs de croissance. De plus, son pH doit être maintenu constant au pH physiologique de 7,4. Le milieu contient également un indicateur de pH, le rouge de phénol, qui change de couleur en cas de contaminations par des champignons ou des bactéries : afin de les éviter, le milieu de culture est complété avec 1% d'antibiotiques (pénicilline 10000 U/mL – streptomycine 10000 µ/mL).

Les cellules cancéreuses effectuent leur croissance dans une étuve à 37°C sous une atmosphère riche en CO₂ (5%) en se nourrissant de D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), contenant en particulier de la L-glutamine 2 mM, du glucose 4,5 g/L et du pyruvate 110 mg/L et supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) pour assurer la croissance cellulaire. Pour la lignée MCF-7, il faut ajouter de l'insuline à 0,1 mg/mL pour permettre une meilleure adhérence des cellules au fond des flasques. La lignée saine, quant à elle, est cultivée dans du D-MEM/F-12 dans lequel sont ajoutés 5% de sérum de cheval, 0,01% d'EGF (Epidermal Growth Factor), 0,005% de toxine cholérique, 0,1% d'insuline, 0,005% d'hydrocortisone, 1% d'HEPES et de L-glutamine.

Pour décoller et multiplier les cellules cancéreuses d'une flasque à une autre, il faut tout d'abord bien éliminer le milieu de culture en rinçant avec du Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS ou PBS). Ensuite, on ajoute quelques millilitres de trypsine/EDTA 4Na (0,25% / 0,38 g/L) afin de rompre les liaisons peptidiques permettant aux cellules de se coller au fond des flasques. Les cellules sont ensuite suspendues dans du milieu de culture avant d'être déposées dans les nouvelles flasques. Le protocole est identique pour les cellules MCF10-A, en remplaçant le PBS par une solution de dissociation cellulaire et en utilisant un mélange trypsine/solution de dissociation cellulaire (4/1) pour décoller les cellules.

Afin d'évaluer la densité cellulaire, les cellules sont comptées à l'aide d'une lame de Malassez, lorsqu'elles sont encore suspendues dans leur milieu de culture correspondant.

2.1.3 Récupération des cellules

Une fois que les cellules sont à confluence (c'est-à-dire qu'il n'existe que peu d'interstices entre elles), le milieu de culture est éliminé et chaque flasque est rincée deux fois avec du PBS pour les cellules cancéreuses et une fois avec la solution de dissociation cellulaire pour les cellules saines. Les cellules sont ensuite détachées en utilisant de l'eau et un grattoir puis récupérées dans des tubes et stockées au congélateur à -20°C pendant au moins 48 heures. Enfin, elles sont lyophilisées avant d'être analysées par SMRI.

2.1.4 Extractions des lipides, des métabolites solubles, des protéines et de l'ADN

Une fois les cellules lyophilisées, différents composants cellulaires sont séparés : les lipides, les protéines et les métabolites solubles d'une part et l'ADN d'autre part. Ces extractions ont été réalisées sur six lignées cancéreuses (MDA-MB-231, MDA-MB-468, SKBR3, MCF-7, Cal51, ZR75-1).

Pour les trois premiers groupes de constituants, 40 mg de cellules lyophilisées sont pesés. Dans un premier temps, ce sont les lipides qui sont récupérés : pour cela, 2 mL de cyclohexane sont ajoutés à l'échantillon pesé. Après agitation et centrifugation (4000 rpm, 5 minutes, 20°C), le surnageant contenant les lipides est filtré et stocké. Le culot est ensuite repris dans 2 mL de cyclohexane, puis agité et centrifugé. Le surnageant est filtré puis ajouté au précédent avant d'être mis à sécher sous un flux d'azote. Le résidu sec est récupéré dans 60 µL de cyclohexane et enfin deux capsules contenant chacune 25 µL de lipides sont préparées. Celles-ci sont mises à sécher à l'étuve pendant environ deux heures à 60°C pour éliminer le solvant.

Dans un deuxième temps, le culot obtenu après extraction des lipides est récupéré afin d'extraire les métabolites solubles. Le protocole appliqué est similaire à celui réalisé pour les lipides, le seul changement concernant l'utilisation d'un mélange méthanol/eau (80%/20%) en tant que solvant d'extraction. Le culot restant après extraction des métabolites solubles est constitué des protéines : il est lui aussi mis à sécher à l'étuve pour qu'il soit bien sec. Ensuite, deux capsules contenant environ 0,6 mg de protéines sont préparées.

Pour l'extraction de l'ADN, la quantité de départ en cellules est de 15 mg, à laquelle est ajouté un millilitre d'un mélange phénol/chloroforme (50%/50%). Le tout est placé dans un bain à ultra-sons pendant 30 minutes puis centrifugé à 4000 rpm pendant 5 minutes afin de bien éliminer les protéines. Le surnageant est ensuite récupéré et filtré avant ajout d'un millilitre d'isopropanol. Après une légère agitation, une « pelote » d'ADN se forme : la centrifugation (4000 rpm, 5 minutes, 4°C) permet de bien précipiter l'ADN. L'isopropanol est éliminé sous un flux de N₂, puis la « pelote » est lavée avec de l'éthanol à 70% et à nouveau séchée sous N₂. Cette dernière étape (rincage et séchage) est répétée deux fois. Une fois sec, l'ADN est pesé dans deux capsules (environ 0,8 mg).

2.2 Analyses par SMRI

Une masse d'environ $0,800 \pm 0,200$ mg d'extraits secs, de lipides, de protéines, de métabolites solubles et d'ADN de chaque lignée cellulaire est pesée dans une capsule en étain avec une balance de précision 10^{-5} g (Ohaus Discovery DV215CD). Ces capsules sont ensuite insérées dans un Analyseur Élémentaire (Flash EA 1112HT, Thermo) couplé via une interface conflo (Finnigan Conflo III) à un Spectromètre de Masse de Rapports Isotopiques (Delta V Advantage, Thermo) afin de déterminer les différentes déviations et teneurs en carbone et azote de chaque échantillon. Chaque capsule en étain est introduite grâce à un flux d'hélium et d'oxygène dans le four de combustion de l'analyseur élémentaire à 1020°C . A cette température, l'étain se sublime et provoque alors par un transfert d'énergie l'oxydation très rapide de l'échantillon. La composition du four de combustion (oxyde de chrome, cuivre réduit, oxyde de cobalt et cobalt d'argent) et la quantité d'oxygène introduite permet de transformer quantitativement l'échantillon en gaz N_2 , CO_2 et H_2O . Les gaz ainsi produits passent à travers un piège à anhydride (perchlorate de magnésium), qui retient les traces d'eau restantes. Les gaz N_2 et CO_2 produits au cours de la combustion de l'échantillon sont ensuite séparés par une colonne chromatographique et introduits successivement dans le SMRI (Figure 38).

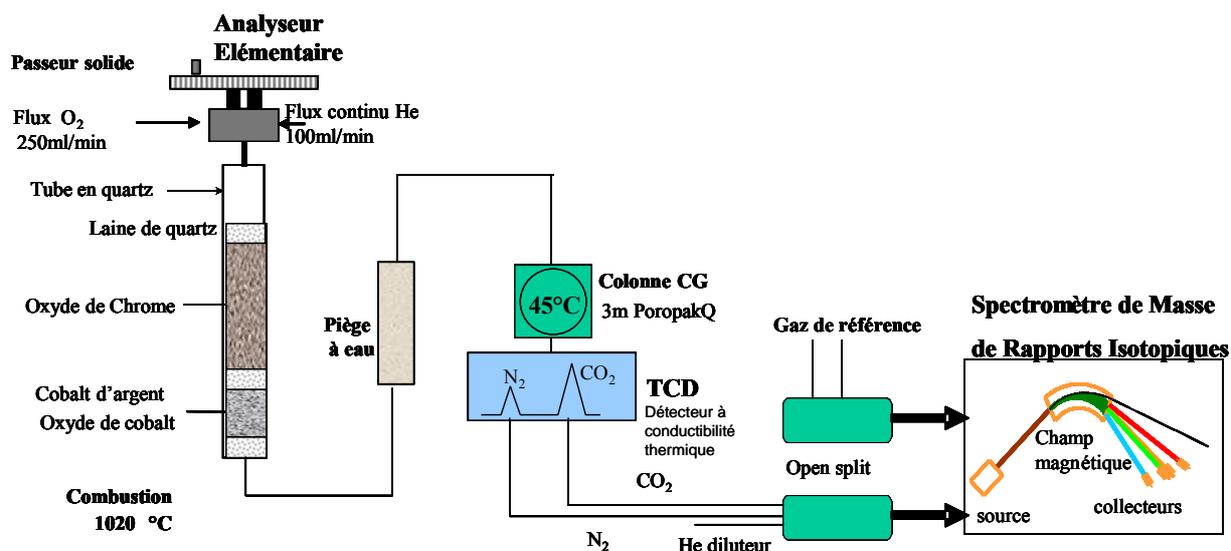


Figure 38 : Schéma représentant un Analyseur Élémentaire couplé à un Spectromètre de Masse de Rapports Isotopiques (AE-SMRI).

Une fois arrivés dans la source du SMRI, les gaz N_2 et CO_2 sont ionisés par impact électronique à 120 eV (électron Volt) sous une pression de 10^{-6} mbar. Les ions moléculaires produits (N_2^+ et CO_2^+) sont ensuite accélérés par un potentiel de 3 kV et sont projetés dans un champ magnétique uniforme de 0,75 Tesla. Ils sont ensuite déviés par ce dernier et recueillis simultanément dans des collecteurs ou cages de Faraday. Celles-ci sont reliées à des amplificateurs et les courants produits sont proportionnels à la quantité respective de chaque espèce d'ions collectés : pour l'azote, les isotopomères de masses atomiques 28, 29, 30 collectés correspondent respectivement aux isotopes du diazote $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ et

pour le carbone, les isotopomères de masses atomiques 44, 45 et 46 détectés correspondent respectivement aux isotopes du dioxyde de carbone $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ou $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$.

Un spectre ou chromatogramme des courants ioniques des isotopomères de N_2 et CO_2 est obtenu en 10 minutes (Figure 39).

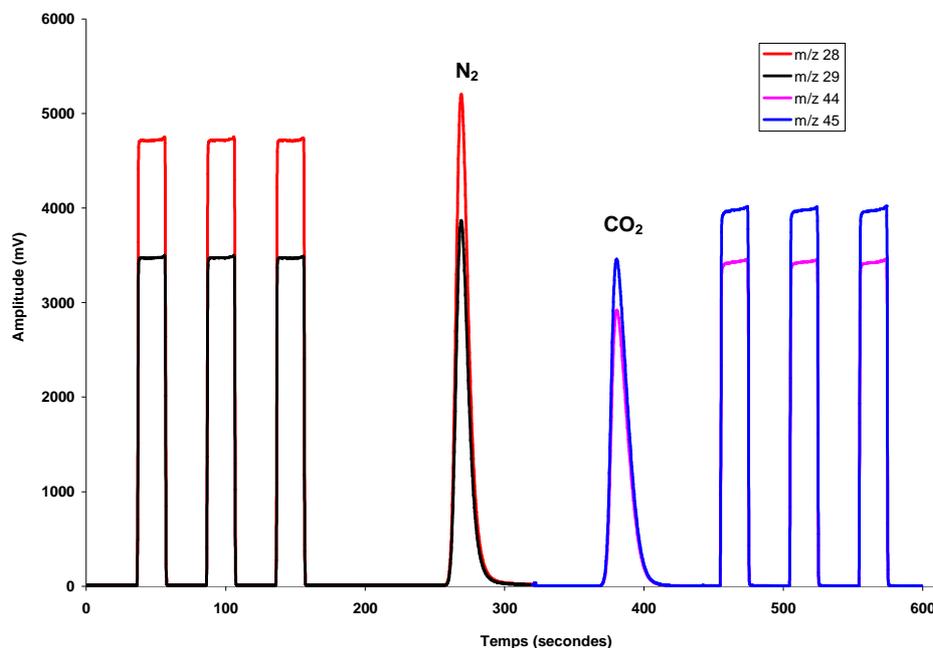


Figure 39 : Chromatogramme des courants ioniques des isotopomères de N_2 et CO_2 obtenu à partir d'un échantillon d'extraits secs de cellules cancéreuses. Les trois pics en début et fin de spectre correspondant respectivement aux injections des gaz de référence N_2 et CO_2 .

La teneur isotopique de l'échantillon est exprimée par le rapport isotopique R des courants ioniques qui est défini par la fraction de l'isotope le plus lourd sur l'isotope le plus léger soit $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. L'utilisation d'une référence permet de comparer le rapport isotopique de l'échantillon à celui de la référence. Les résultats sont alors exprimés avec une grande précision dans l'échelle relative delta δ en ‰ (10) :

$$\delta = \frac{R_{\text{éch}} - R_{\text{réf}}}{R_{\text{réf}}} \times 1000 \quad (10)$$

Les références internationales repérées dans la formule par $R_{\text{réf}}$ sont le carbonate Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) pour le $\delta^{13}\text{C}$ et l'azote atmosphérique pour le $\delta^{15}\text{N}$ (cf. Tableau II). Une valeur positive de δ signifie que l'échantillon a une teneur plus élevée en isotope lourd que la référence, c'est-à-dire qu'il est enrichi, alors qu'une valeur négative exprime une teneur moins élevée en isotope lourd de l'échantillon par rapport à la référence, c'est-à-dire un appauvrissement.

L'acide glutamique est utilisé comme standard de travail : les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ sont connues et stables, respectivement $-27,48 \pm 0,05$ ‰ et $-4,80 \pm 0,08$ ‰. Trois capsules de ce standard sont placées au début de chaque série de mesures pour vérifier la calibration par

rapport à ces deux valeurs théoriques. De plus, deux capsules sont insérées tous les cinq échantillons (soit toutes les dix capsules) afin de contrôler une éventuelle dérive de l'appareil au cours de la série de mesure. La linéarité de l'appareil est de $\pm 0,06\%$; la précision est de $\pm 0,02\%$ pour $\delta^{13}\text{C}$ et pour $\delta^{15}\text{N}$ (données de Thermo Fisher Scientific).

Chaque échantillon de lignée cellulaire a fait l'objet de deux analyses. Le résultat pris en compte est la moyenne des deux résultats de mesure. Pour chaque lignée, l'analyse est effectuée sur plusieurs passages cellulaires afin d'avoir une valeur isotopique représentative de la lignée.

Le processus de recueil de données s'est fait grâce au logiciel d'acquisition Isodat NT 2.5 (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne). Les valeurs de pourcentages de carbone (%C) et d'azote (%N) sont calculées à partir du rapport d'aire sous la courbe du pic de l'échantillon sur le pic du standard de travail. Les données sont ensuite exportées du logiciel d'acquisition vers un tableur Microsoft Excel 2003 où les moyennes et écarts-types des $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ de chaque lignée cellulaire ont été calculés.

3 Résultats et discussion

3.1 Cellules entières

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur les cellules entières, l'objectif étant de déterminer s'il existait un fractionnement isotopique permettant de différencier des lignées cellulaires de cancer du sein.

Tout d'abord, nous avons travaillé sur trois lignées (MDA-MB-231, MDA-MB-468 et SKBR3) afin de vérifier que les conditions de culture cellulaire (nombre de divisions cellulaires ou passages cellulaires et nombre de jours de croissance) n'induisaient pas un fractionnement isotopique, condition nécessaire pour s'assurer que la discrimination isotopique provient uniquement de la cellule elle-même. Le Tableau XVII récapitule l'ensemble des résultats obtenus.

Le passage cellulaire et le nombre de jours de croissance ne semblent pas influencer le fractionnement : en effet, les valeurs des déviations isotopiques varient peu pour une même lignée cellulaire. Cette faible variation est confirmée par le calcul des écart-types qui permet d'obtenir des valeurs inférieures à 0,2 %. De plus, pour une même lignée, les teneurs en azote et en carbone changent peu. Par conséquent, les conditions de culture ne sont pas responsables des variations observées entre les lignées : le fractionnement isotopique pourrait alors être dû aux variations biochimiques qui se produisent au sein de la cellule.

Tableau XVII : Déviations isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$) et pourcentages d'azote et de carbone dans trois lignées de cellules cancéreuses en fonction du nombre de jours de croissance (NJC) et du nombre de divisions cellulaires (NDC).

Lignées cellulaires	NDC	NJC	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	%N	%C
MDA-MB-468	26	2	-2,06	-15,56	7,36	29,45
	48	2	-1,94	-15,44	7,79	31,50
	36	3	-2,03	-15,10	8,02	32,91
	39	3	-2,14	-15,33	8,24	33,35
	31	4	-2,28	-15,28	8,67	33,53
	42	4	-2,15	-15,26	7,77	31,70
Moyenne \pm Ecart-type			-2,10 \pm 0,12	-15,33 \pm 0,16	7,98 \pm 0,45	32,07 \pm 1,54
MDA-MB-231	2	2	-1,16	-16,59	5,21	21,69
	6	2	-1,25	-16,65	5,67	22,72
	5	3	-1,30	-16,53	5,31	22,53
	3	4	-0,97	-17,12	5,33	24,84
Moyenne \pm Ecart-type			-1,17 \pm 0,15	-16,72 \pm 0,27	5,38 \pm 0,20	22,95 \pm 1,34
SKBR3	20	3	-0,64	-16,60	4,05	16,12
	21	3	-0,62	-16,02	5,06	19,94
	22	3	-0,60	-16,51	4,86	19,64
	27	3	-0,74	-16,58	6,26	24,41
	31	3	-0,76	-16,74	4,01	18,76
	19	4	-0,69	-16,92	5,13	22,41
Moyenne \pm Ecart-type			-0,68 \pm 0,07	-16,56 \pm 0,30	4,90 \pm 0,83	20,21 \pm 2,89

Ensuite, nous avons mesuré régulièrement les teneurs isotopiques en carbone et en azote des milieux nutritifs permettant la croissance des cellules : ces teneurs sont identiques pour les milieux des lignées cancéreuses, avec $\delta^{15}\text{N} = 3,98 \pm 0,16$ ‰ et $\delta^{13}\text{C} = -12,91 \pm 0,18$ ‰ pour le milieu sans insuline et $\delta^{15}\text{N} = 3,98 \pm 0,30$ ‰ et $\delta^{13}\text{C} = -12,90 \pm 0,02$ ‰ pour celui avec insuline. Quant au milieu utilisé par les cellules saines MCF-10A, les teneurs isotopiques diffèrent de celles obtenues pour les autres milieux : les mesures donnent $\delta^{15}\text{N} = 2,39 \pm 0,10$ ‰ et $\delta^{13}\text{C} = -19,39 \pm 0,01$ ‰. Ces résultats permettent de montrer que les milieux de culture n'induisent pas de fractionnement isotopique.

Après avoir effectué ces vérifications sur les conditions de culture cellulaire et sur les milieux servant à la croissance cellulaire, les teneurs isotopiques des sept lignées ainsi que les

pourcentages de carbone et d'azote sont mesurés afin de montrer ou non une éventuelle discrimination entre celles-ci. Pour chaque lignée, les cellules ont été cultivées avec différents temps de croissance et différents passages cellulaires. Les valeurs obtenues sont répertoriées dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : Moyennes et écart-types calculés sur les déviations isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$) et sur les pourcentages d'azote et de carbone mesurés pour sept lignées cellulaires (n = nombre d'échantillons).

Lignées cellulaires		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	%N	%C
MDA-MB-468	Moyenne	-2,10	-15,33	7,98	32,07
	(n = 6)	Ecart-type	0,12	0,16	0,45
MDA-MB-231	Moyenne	-1,17	-16,72	5,38	22,95
	(n = 4)	Ecart-type	0,15	0,27	0,20
SKBR3	Moyenne	-0,68	-16,56	4,90	20,21
	(n = 6)	Ecart-type	0,07	0,30	0,83
Cal51	Moyenne	-1,14	-15,19	7,01	29,01
	(n = 5)	Ecart-type	0,17	0,17	0,55
ZR75-1	Moyenne	0,70	-18,79	2,03	12,22
	(n = 3)	Ecart-type	0,27	0,15	0,30
MCF-7	Moyenne	-1,26	-15,37	7,36	28,50
	(n = 5)	Ecart-type	0,17	0,11	0,86
MCF-10A	Moyenne	-0,71	-19,89	3,58	20,57
	(n = 2)	Ecart-type	0,06	0,08	0,11

Dans ces conditions de culture, les valeurs obtenues pour les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ sont respectivement comprises entre -2,10 et 0,70 ‰ et entre -19,89 et -15,19 ‰, alors que celles pour les pourcentages sont comprises entre 2,03 et 7,98 % pour l'azote et entre 12,22 et 32,07 % pour le carbone. La mesure des écart-types montre que les variations enregistrées sur sept lignées cellulaires, cultivées et prélevées à des périodes différentes, sont faibles que ce soit pour les teneurs isotopiques ou pour les pourcentages : elles ne dépassent pas 0,30 ‰ pour les premières et 3 % pour les seconds. Cependant, les teneurs isotopiques semblent plus représentatives des lignées que les pourcentages en azote et en carbone, ce qui est visible sur la Figure 40 : en effet, une plus grande discrimination est possible grâce aux teneurs isotopiques, avec des lignées bien séparées les unes des autres en fonction des $\delta^{15}\text{N}$ et des $\delta^{13}\text{C}$, alors que les lignées sont plus regroupées sur la représentation des pourcentages de carbone en fonction des pourcentages d'azote.

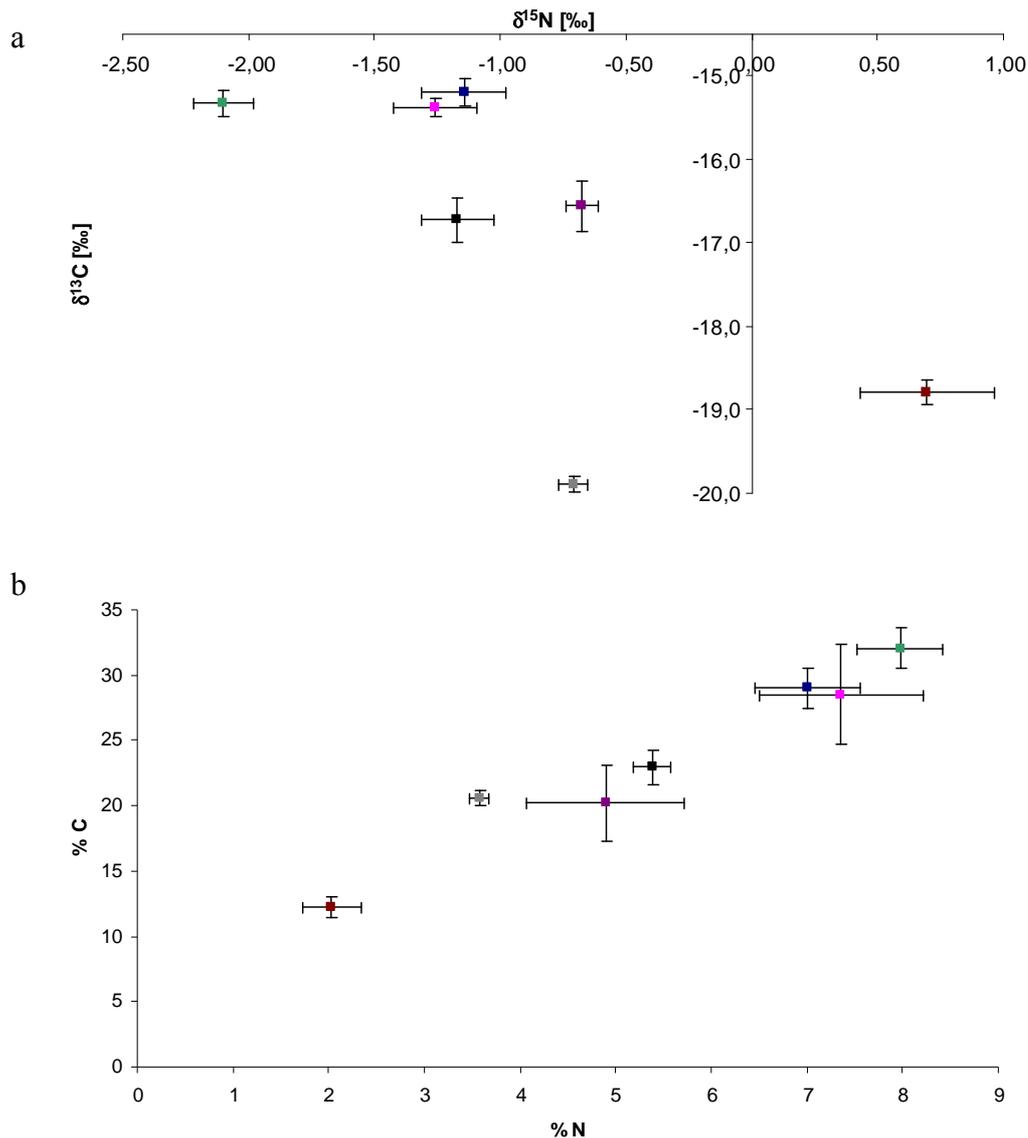


Figure 40 : Représentation des déviations isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ et des pourcentages en azote et en carbone pour six lignées cancéreuses et une lignée saine (a) discrimination des lignées en fonction des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ et de $\delta^{13}\text{C}$ (b) séparation des lignées selon les valeurs des pourcentages de C et de N. ■ ZR75-1, ■ MCF-7, ■ MCF-10A, ■ MDA-MB-231, ■ Cal51, ■ MDA-MB-468, ■ SKBR3.

L'analyse isotopique simultanée du ^{15}N et du ^{13}C réalisée sur chaque lignée constitue donc une signature caractéristique du type de cancer du sein, permettant d'établir une carte isotopique qui discrimine plusieurs types de cancer à partir des rapports isotopiques $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Cette méthode de récupération des cellules associée à la mesure du fractionnement isotopique par AE-SMRI constitue donc un outil d'analyse rapide et complémentaire aux techniques existantes dans le cadre du diagnostic du cancer du sein.

Cette étude a été approfondie par la recherche de la provenance du fractionnement isotopique au sein des cellules cancéreuses et non cancéreuses.

3.2 D'où pourrait provenir le fractionnement isotopique des cellules ?

Pour essayer d'expliquer la provenance du fractionnement isotopique, différents constituants des cellules ont été extraits suivant la procédure décrite au paragraphe 2.1.4 : les lipides, les métabolites solubles, les protéines et l'ADN. Pour tester la répétabilité des extractions, chacune d'entre elles a été répétée trois fois sur une même lignée cellulaire. Ensuite, ces différents constituants, ainsi que les cellules entières correspondantes, ont été analysés par AE-SMRI. En parallèle, les teneurs isotopiques des milieux nutritifs ayant servi pour la croissance cellulaire ont également été mesurées. Une différence de teneurs a pu être observée, que ce soit sur les milieux de culture ou sur les cellules entières, par rapport aux valeurs définies dans la partie 3.1 : nous avons donc effectué une correction sur les teneurs en ^{13}C et en ^{15}N mesurées par rapport aux valeurs définies dans le paragraphe précédent. Les écart-types ont été calculés à partir des expériences répétées trois fois pour l'étude en termes de répétabilité : les valeurs obtenues sont inférieures à 0,3 ‰ et correspondent à des écart-types dus aux erreurs analytiques.

Les résultats obtenus par AE-SMRI à partir des différentes lignées cellulaires sont regroupés sur la Figure 41 et sur la Figure 42. Les lipides n'apparaissent pas sur la Figure 41 car ils ne contiennent pas d'atome d'azote. Le profil isotopique obtenu en ^{15}N semble plus discriminant que celui obtenu en ^{13}C : en effet, sur la Figure 42, en fonction du constituant cellulaire et des lignées observés, il existe toujours au minimum deux valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ qui sont proches ou identiques, empêchant de différencier les lignées entre elles. En revanche, le profil isotopique présenté sur la Figure 41 montre une plus grande possibilité de discrimination, notamment lorsque l'on regarde les métabolites solubles ou les protéines : même si deux valeurs pour deux lignées différentes sont toujours proches ou identiques, les autres sont assez différentes pour envisager une discrimination.

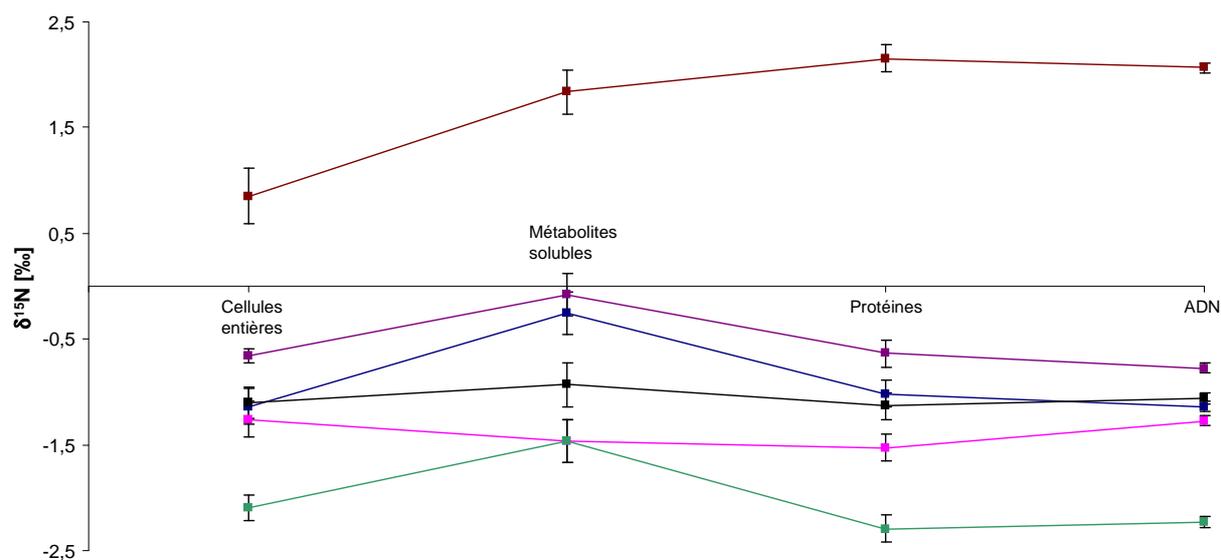


Figure 41 : Valeurs des teneurs isotopiques pour les différents constituants cellulaires en ^{15}N . ■ ZR75-1, ■ MCF-7, ■ MDA-MB-231, ■ Cal51, ■ MDA-MB-468, ■ SKBR3.

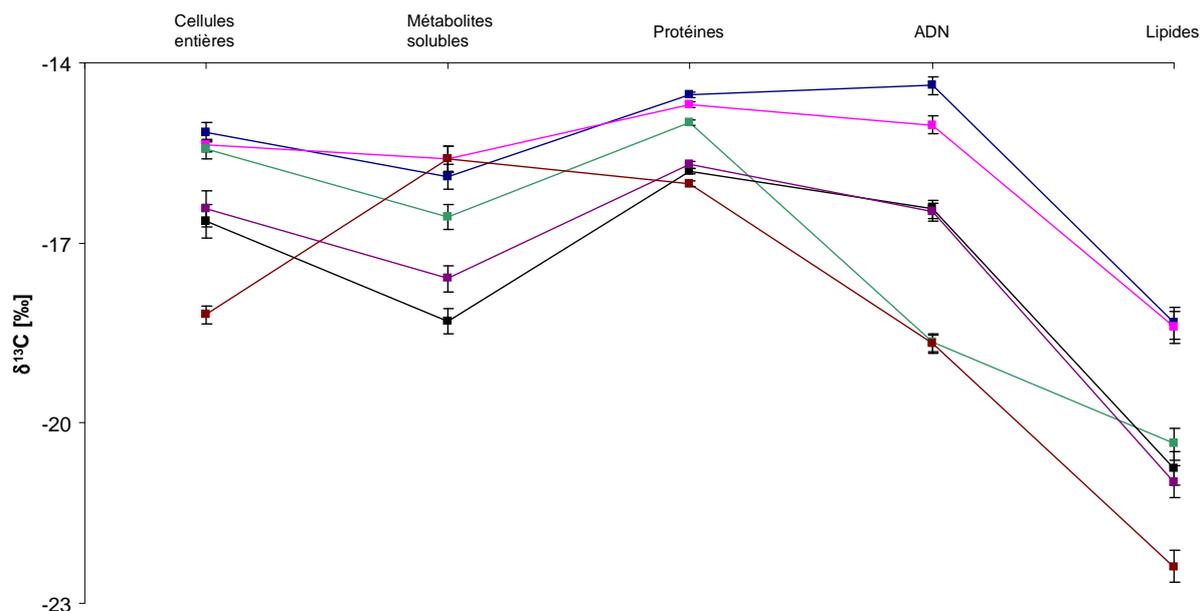


Figure 42 : Valeurs des teneurs isotopiques pour les différents constituants cellulaires en ^{13}C . ■ ZR75-1, ■ MCF-7, ■ MDA-MB-231, ■ Cal51, ■ MDA-MB-468, ■ SKBR3.

Cependant, une plus grande discrimination des lignées est observée lorsque les déviations isotopiques sont représentées l'une en fonction de l'autre, comme sur la Figure 43.

Sur chacune des figures, il est clairement possible de différencier les lignées les unes par rapport aux autres. En regardant de plus près, nous pouvons voir que les Figure 43a et Figure 43b ont des allures très ressemblantes, contrairement à ce qui peut être observé sur les Figure 43c et Figure 43d. En effet, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ varient peu de la Figure 43a à la Figure 43b, chaque point ayant à peu près la même position sur chacun des deux graphiques. Ceci laisse alors envisager l'existence d'une relation entre les fractionnements isotopiques des cellules entières et des protéines. Une hypothèse liée à la composition des cellules peut être avancée pour tenter de justifier cette observation : les protéines représentent environ 15% des composants des cellules eucaryotes alors que les métabolites solubles et l'ADN ne représentent à eux deux guère plus de 3% des composants cellulaires. Les protéines constituent donc une des principales sources d'azote et de carbone des cellules contrairement aux autres composants cellulaires, ce qui pourrait expliquer l'étroite corrélation existant entre le fractionnement isotopique des cellules entières et celui des protéines.

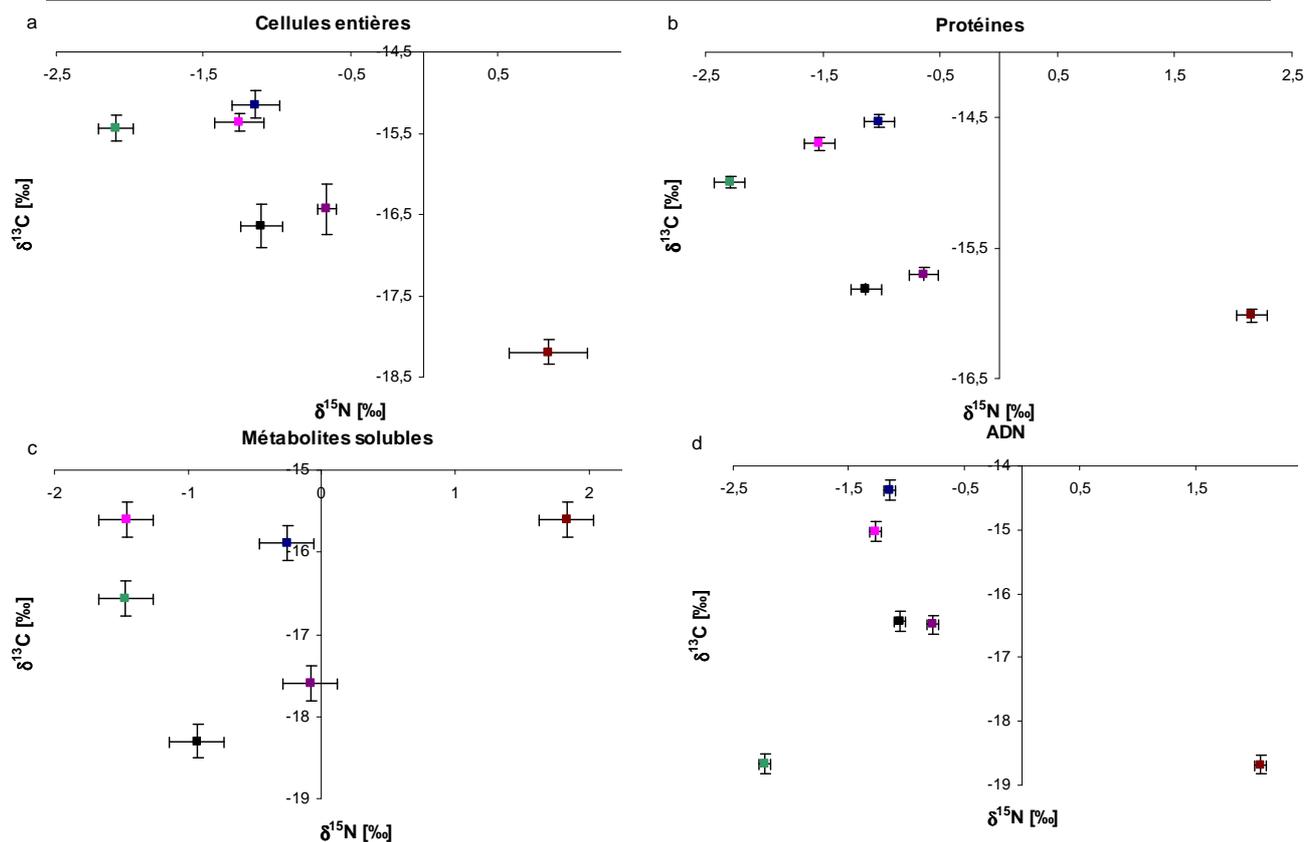


Figure 43 : Représentation des déviations isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ de six lignées cancéreuses en fonction du constituant cellulaire observé (a) cellules entières (b) protéines (c) métabolites solubles (d) ADN. ■ ZR75-1, ■ MCF-7, ■ MDA-MB-231, ■ Cal51, ■ MDA-MB-468, ■ SKBR3.

4 Conclusion et perspectives

Dans cette partie, l'étude sur les isotopes stables nous a permis de mettre au point une méthode rapide « d'identification d'un cancer du sein » par AE-SMRI. En effet, nous avons proposé un procédé analytique permettant de différencier des lignées cellulaires avec précision tout en obtenant des analyses peu coûteuses et faciles à mettre en œuvre. L'analyse des isotopes stables de l'azote et du carbone a conduit à l'élaboration d'une carte isotopique discriminante de plusieurs types de cancer du sein : les rapports isotopiques $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ donnent une signature caractéristique de la lignée cellulaire étudiée (cancéreuse ou non cancéreuse). De plus, nous avons également tenté d'identifier l'origine du fractionnement isotopique des cellules entières et émis l'hypothèse qu'il pourrait en grande partie provenir des protéines. L'ensemble de ces données devra être confrontée aux facteurs bio-médicaux afin de relier ces facteurs au fractionnement isotopique des lignées cellulaires.

L'origine du fractionnement isotopique reste cependant très complexe à déterminer : celui-ci dépend de plusieurs facteurs oncogéniques, qui dépendent eux-mêmes du métabolisme cellulaire. Par conséquent, le lien entre les données isotopiques obtenues en SMRI, les données quantitatives obtenues en RMN et les données oncogéniques devra être approfondi

afin de confronter l'ensemble de ces résultats. En particulier, il sera important de déterminer la teneur isotopique des acides aminés présents dans les cellules de cancer du sein. Ainsi, une étude devra concerner l'optimisation et la détermination de la teneur isotopique en azote et en carbone de chaque acide aminé par chromatographie gazeuse couplée à la SMRI. Ces expériences seront réalisées sur des cellules et sur des tissus cancéreux. Les premiers essais effectués trois fois sur une même lignée cellulaire sont pour l'instant très encourageants puisqu'ils ont montré qu'il était possible de séparer, d'identifier et de mesurer les teneurs isotopiques des acides aminés de façon répétable. L'optimisation de l'extraction et de la purification de ces acides aminés sera également envisagée afin de rendre la méthode applicable pour tout type de cellules ou de tissus cancéreux. La recherche de ces marqueurs permettra d'améliorer la compréhension de certains mécanismes des voies métaboliques en situation pathologique.

Afin de poursuivre ces travaux, plusieurs études sont envisagées. La première consiste à poursuivre la caractérisation des cellules cancéreuses par la mesure des déviations isotopiques de l'oxygène et de l'hydrogène, dont les teneurs pourraient être susceptibles de varier en situation pathologique. La seconde étude sera centrée sur l'analyse des teneurs isotopiques globales du milieu de culture surnageant dans les flasques. Cette analyse présente un intérêt du fait que le milieu de culture contient des acides aminés qui vont être utilisés par les cellules pour leur croissance. Celles-ci vont également rejeter des métabolites. Par conséquent, l'analyse du surnageant avant repiquage des cellules permettra de comparer les teneurs isotopiques des milieux pour les différentes lignées cellulaires et peut-être d'établir un outil de diagnostic à partir de ces résultats. Une troisième étude concernera l'analyse de tissus sains et tumoraux (provenant de fragments de pièces opératoires et/ou de tissus sains adjacents de la patiente opérée pour sa tumeur et/ou de tissus mammaires sains provenant d'intervention chirurgicale de réduction mammaire). L'objectif sera de comparer les mesures isotopiques de ces différents tissus afin d'établir une signature isotopique selon le même procédé que celui réalisé pour les cellules et d'établir une corrélation entre ces deux signatures. Ces expériences nécessiteront un consentement éclairé des patientes et d'avoir un maximum d'informations concernant la patiente et sa tumeur. Ce procédé pourra être utilisé dans le domaine de la santé si les résultats comparatifs sur les tissus sont concluants.

L'ensemble de ces résultats permettra d'aboutir à un outil de dépistage, complémentaire des outils déjà existants, et qui pourra également servir comme outil de suivi thérapeutique. En effet, l'objectif sera d'essayer de déterminer si un traitement peut ou non modifier les teneurs isotopiques initiales des cellules cancéreuses et ainsi évaluer par la mesure des rapports isotopiques l'effet qu'il pourrait avoir sur celles-ci. Ce procédé est actuellement en cours d'application sur des cellules ayant subi un traitement thérapeutique. Ce résultat permettrait d'envisager l'utilisation de notre procédé comme un moyen pour évaluer l'effet thérapeutique dans le cadre d'essais pré-cliniques.

Conclusion générale

Au cours de cette étude, la SMRI et la RMN bidimensionnelle se sont avérées être des outils permettant d'établir des profils métaboliques et isotopiques de cellules de cancer du sein. Les données obtenues en RMN 2D quantitative sur des métabolites ciblées, montrent que le fonctionnement des voies métaboliques diffère en fonction des lignées cellulaires, ce qui engendrerait un fractionnement isotopique. Ce fractionnement isotopique a pu être mis en évidence par SMRI.

L'optimisation de séquences de RMN 2D a abouti à la sélection de la séquence INADEQUATE-¹H symétrisée afin de réaliser des analyses rapides et quantitatives. En effet, la réduction du nombre d'accumulations et du nombre d'incrémentes dans la première dimension a permis de réduire considérablement le temps d'expérience : les spectres INADEQUATE-¹H sont obtenus en sept minutes avec une excellente linéarité. De plus, les mesures sont effectuées avec une répétabilité inférieure ou égale à 2% et ce pour des métabolites ayant des concentrations allant jusqu'à 0,1 mmol/L. Avant l'application sur des milieux réels, nous avons développé une stratégie dans le but de choisir une méthode d'extraction des métabolites intracellulaires qui soit répétable et robuste pour l'analyse métabolomique de cellules de cancer du sein. Pour cela, plusieurs protocoles d'extraction ont été utilisés sur une même lignée cancéreuse et leur efficacité a été comparée : l'acquisition de spectres à une dimension couplée à une analyse statistique des résultats obtenus a conduit à la sélection de la méthode méthanol/chloroforme/eau en une seule étape. Celle-ci a en effet permis de récupérer un maximum de métabolites en quantité suffisante. Ce choix a été confirmé grâce à l'application du protocole d'extraction sur plusieurs lignées cellulaires : une discrimination biologique de ces lignées a pu être observée et des biomarqueurs caractéristiques de celles-ci ont été déterminés. Après le développement de cette stratégie, l'application de l'INADEQUATE-¹H symétrisée, réalisée sur quelques lignées de cancer du sein, a montré l'intérêt de celle-ci pour effectuer des études métabonomiques : une quinzaine de métabolites a pu être quantifiée et une discrimination de ces trois lignées a été obtenue. Par conséquent, la séquence INADEQUATE-¹H symétrisée est un bon outil de quantification rapide et précise de métabolites intracellulaires.

La discrimination des lignées cellulaires s'est confirmée par l'établissement d'un profil isotopique des cellules de cancer du sein et d'une lignée cellulaire saine. Pour cela, nous avons mis au point un outil de différenciation cellulaire par Spectrométrie de Masse de Rapports Isotopiques couplée à un analyseur élémentaire. La mesure des rapports isotopiques ¹⁵N/¹⁴N et ¹³C/¹²C a permis d'établir une signature isotopique caractéristique de chaque lignée cellulaire (cancéreuse ou non) et donc d'élaborer une carte isotopique discriminante de différents types de cancer du sein. Pour compléter cette étude, nous avons cherché l'origine du fractionnement isotopique et envisagé l'hypothèse que celui-ci pourrait provenir des protéines.

Afin de poursuivre les travaux débutés par AE-SMRI, plusieurs perspectives sont envisagées, notamment la mesure des déviations isotopiques de l'oxygène et de l'hydrogène sur les cellules cancéreuses et non cancéreuses déjà étudiées, mais également une extension à d'autres lignées de cancer du sein. De plus, il serait également intéressant de réaliser le même type d'étude sur des tissus sains et tumoraux afin d'aboutir à une signature isotopique de ces tissus et d'essayer de la corrélérer à celle obtenue sur les cellules cancéreuses et non cancéreuses. Enfin, l'application de traitements sur les cellules cancéreuses pourra être étudiée par la mesure des déviations isotopiques afin de déterminer les effets que les traitements pourraient induire sur les teneurs isotopiques initiales des cellules cancéreuses. Si tous ces travaux mènent à des résultats concluants, notre procédé pourra alors être utilisé dans le domaine de la santé.

Des perspectives à ces travaux sont également envisagées en RMN, dont une première découlant directement de ce qui a été fait jusqu'à maintenant : augmenter le nombre de lignées cellulaires à étudier afin de poursuivre la différenciation cellulaire et la quantification par RMN 2D. D'autres perspectives concerneront la quantification des métabolites intracellulaires et la réduction du temps d'expérience en RMN bidimensionnelle. Pour l'instant, les composés ont été quantifiés de façon absolue par l'ajout d'un mélange modèle : l'implémentation de la méthode ERETICTM permettrait également de les quantifier de façon absolue tout en s'affranchissant de l'ajout d'un mélange modèle ou des contraintes engendrées par l'addition d'une référence interne. En ce qui concerne la diminution de la durée d'expérience, la RMN ultrarapide [140] sera envisagée afin de poursuivre cet objectif : en effet, cette technique permet d'obtenir des spectres 2D en moins d'une seconde. Quelques séquences de RMN 2D ont été testées par Giraudeau *et al.* [133, 176] afin de vérifier leur potentialité sur des mélanges de métabolites : des mesures répétables et une excellente linéarité ont été obtenues pour les séquences J-résolue et TOCSY. Cependant, du fait de la faible sensibilité de la RMN ultrarapide, les échantillons étudiés doivent être fortement concentrés. Pour pallier cette faible sensibilité, l'utilisation de la DNP (Dynamic Nuclear Polarization) [177, 178] pourra être envisagée : celle-ci permet d'augmenter considérablement le rapport signal-sur-bruit grâce à une hyperpolarisation des noyaux étudiés. Le couplage de la DNP à la RMN ultrarapide a d'ores et déjà permis d'obtenir en un seul scan des spectres 2D à de très faibles concentrations [179, 180], offrant ainsi des perspectives prometteuses pour l'analyse quantitative d'échantillons biologiques.

L'analyse quantitative et isotopique d'échantillons biologiques pourra permettre la découverte de biomarqueurs pour différencier les pathologies ou suivre l'effet d'un traitement. Ces données métaboliques et isotopiques pourront également être corrélées à d'autres données biologiques, afin d'aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la pathologie.

Références bibliographiques

1. *Rapport de la commission III (cancérologie) : Cancers du sein, incidence et prévention.* Bull. Acad. Natle Méd, 2008. **192**(1): p. 161-180.
2. Willard, H.F., M. Angrist, and G.S. Ginsburg, *Genomic medicine: genetic variation and its impact on the future of health care.* Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005. **360**(1460): p. 1543-1550.
3. Cho, W.C.S., *Proteomics Technologies and Challenges.* Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2007. **5**(2): p. 77-85.
4. Lindon, J.C., et al., *Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids.* Concepts in Magnetic Resonance, 2000. **12**(5): p. 289-320.
5. Aboagye, E.O. and Z.M. Bhujwalla, *Malignant Transformation Alters Membrane Choline Phospholipid Metabolism of Human Mammary Epithelial Cells.* Cancer Research, 1999. **59**(1): p. 80-84.
6. Teng, Q., et al., *A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics.* Metabolomics, **2009**. **5**: p. 199-208.
7. Gronwald, W., et al., *Urinary Metabolite Quantification Employing 2D NMR Spectroscopy.* Analytical Chemistry, 2008. **80**(23): p. 9288-9297.
8. Lane, A.N., T.W.M. Fan, and R.M. Higashi, *Stable isotope-assisted metabolomics in cancer research.* IUBMB Life, 2008. **60**(2): p. 124-129.
9. Tea, I., et al., *Determination of ^{13}C isotopic enrichment of glutathione and glycine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry after formation of the N- or N,S-ethoxycarbonyl methyl ester derivatives.* Rapid communications in mass spectrometry, 2007. **21**(20): p. 3245-3252.
10. Wang, X., et al., *On-line measurements of $\delta^{15}\text{N}$ in biological fluids by a modified continuous-flow elemental analyzer with an isotope-ratio mass spectrometer.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(8): p. 1196-1202.
11. Madsen, R., T. Lundstedt, and J. Trygg, *Chemometrics in metabolomics--A review in human disease diagnosis.* Analytica Chimica Acta, 2010. **659**(1-2): p. 23-33.
12. Lindon, J.C. and J.K. Nicholson, *Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(3): p. 194-204.
13. Jeener, J., Lecture presented at Ampere International Summer School II, Basko Polje, Yugoslavia, 1971.
14. Aue, W.P., E. Bartholdi, and R.R. Ernst, *Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance.* The Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(5): p. 2229-2246.
15. Muller, L., A. Kumar, and R.R. Ernst, *Two-dimensional carbon-13 NMR spectroscopy.* The Journal of Chemical Physics, 1975. **63**(12): p. 5490-5491.

16. Giraudeau, P., *Développement de la RMN quantitative multi-dimensionnelle*. 2008, Université de Nantes: Nantes.
17. Harrigan, G.G. and R. Goodacre, *Metabolic Profiling : Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. 2003: Kluwer Academic Publishers Boston/Dordrecht/London.
18. Blanchet, L., et al., *Fusion of metabolomics and proteomics data for biomarkers discovery: case study on the experimental autoimmune encephalomyelitis*. BMC Bioinformatics, 2011. **12**(1): p. 254.
19. Horgan, R.P., et al., *An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2009. **116**(2): p. 173-181.
20. Drider, D. and H. Prévost, *Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*. Economica ed. 2009.
21. Gaudriault, S. and R. Vincent, *Génomique*. de boeck ed. 2009.
22. Hoshino, T., et al., *RNA microarray for estimating relative abundance of 16S rRNA in microbial communities*. Journal of Microbiological Methods, 2007. **69**(2): p. 406-410.
23. Gygi, S.P., et al., *Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast*. Mol. Cell. Biol., 1999. **19**(3): p. 1720-1730.
24. Hondermarck, H., *Protéomique du cancer du sein : des potentialités aux difficultés*. Pathologie Biologie, 2006. **54**(4): p. 194-198.
25. Sakanyan, V., *Puces à protéines : nouvelle approche du diagnostic des maladies infectieuses*. Antibiotiques, 2004. **6**(3): p. 185-192.
26. Cahill, D.J., *Protein and antibody arrays and their medical applications*. Journal of Immunological Methods, 2001. **250**(1-2): p. 81-91.
27. Zhang, X., et al., *Mass spectrometry-based "omics" technologies in cancer diagnostics*. Mass Spectrometry Reviews, 2007. **26**(3): p. 403-431.
28. Nicholson, J.K., et al., *Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(2): p. 153-161.
29. Bourdonneau, M. and B. Ancian, *Rapid-Pulsing Artifact-Free Double-Quantum-Filtered Homonuclear Spectroscopy: The 2D-INADEQUATE Experiment Revisited*. Journal of Magnetic Resonance, 1998. **132**(2): p. 316-327.
30. Le Belle, J.E., et al., *A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy*. NMR in Biomedicine, 2002. **15**(1): p. 37-44.
31. Kaiser, K.A., G.A. Barding, and C.K. Larive, *A comparison of metabolite extraction strategies for ¹H-NMR-based metabolic profiling using mature leaf tissue from the model plant Arabidopsis thaliana*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2009. **47**(S1): p. S147-S156.
32. Winder, C.L., et al., *Global Metabolic Profiling of Escherichia coli Cultures: an Evaluation of Methods for Quenching and Extraction of Intracellular Metabolites*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(8): p. 2939-2948.

33. Danielsson, A.P.H., et al., *Development and optimization of a metabolomic method for analysis of adherent cell cultures*. Analytical Biochemistry, 2010. **404**(1): p. 30-39.
34. Trygg, J., E. Holmes, and T.r. Lundstedt, *Chemometrics in Metabonomics*. Journal of Proteome Research, 2006. **6**(2): p. 469-479.
35. Courant, F., et al., *Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves*. Analyst, 2009. **134**(8): p. 1637-1646.
36. Wold, S., K. Esbensen, and P. Geladi, *Principal component analysis*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1987. **2**(1-3): p. 37-52.
37. Dixon, S.J., et al., *Pattern recognition of gas chromatography mass spectrometry of human volatiles in sweat to distinguish the sex of subjects and determine potential discriminatory marker peaks*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2007. **87**(2): p. 161-172.
38. Ducruix, C., et al., *Metabolomic investigation of the response of the model plant Arabidopsis thaliana to cadmium exposure: Evaluation of data pretreatment methods for further statistical analyses*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2008. **91**(1): p. 67-77.
39. Tian, J., et al., *Optimization of a GC-MS metabolic fingerprint method and its application in characterizing engineered bacterial metabolic shift*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(13): p. 2281-2288.
40. Boros, L.G., M. Cascante, and W.-N. Paul Lee, *Metabolic profiling of cell growth and death in cancer: applications in drug discovery*. Drug Discovery Today, 2002. **7**(6): p. 364-372.
41. Fan, T., et al., *Metabolomics-edited transcriptomics analysis of Se anticancer action in human lung cancer cells*. Metabolomics, 2005. **1**(4): p. 325-339.
42. Metallo, C.M., J.L. Walther, and G. Stephanopoulos, *Evaluation of ¹³C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells*. Journal of Biotechnology, 2009. **144**(3): p. 167-174.
43. Kiefer, P., J.-C. Portais, and J.A. Vorholt, *Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 2008. **382**(2): p. 94-100.
44. Sana, T.R., K. Waddell, and S.M. Fischer, *A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome*. Journal of Chromatography B, 2008. **871**(2): p. 314-321.
45. Yuan, J., B.D. Bennett, and J.D. Rabinowitz, *Kinetic flux profiling for quantitation of cellular metabolic fluxes*. Nat. Protocols, 2008. **3**(8): p. 1328-1340.
46. Lorenz, M.A., C.F. Burant, and R.T. Kennedy, *Reducing Time and Increasing Sensitivity in Sample Preparation for Adherent Mammalian Cell Metabolomics*. Analytical Chemistry, 2011: p. null-null.
47. Guéron, M., P. Plateau, and M. Decorps, *Solvent signal suppression in NMR*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1991. **23**(2): p. 135-209.

48. Stonehouse, J., et al., *Ultra-high-Quality NOE Spectra*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(13): p. 6037-6038.
49. Meiboom, S. and D. Gill, *Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times*. Rev. Sci. Instrum., 1958. **29**: p. 688-691.
50. Ellis, D.I., et al., *Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(9): p. 1243-1266.
51. Wishart, D.S., *Metabolomics: The Principles and Potential Applications to Transplantation*. American Journal of Transplantation, 2005. **5**(12): p. 2814-2820.
52. Moreno, A., et al., *¹H MRS markers of tumour growth in intrasplenic tumours and liver metastasis induced by injection of HT-29 cells in nude mice spleen*. NMR in Biomedicine, 1998. **11**(3): p. 93-106.
53. Bollard, M.E., et al., *Comparative metabolomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005. **204**(2): p. 135-151.
54. Griffin, J.L., et al., *Metabolic Profiling of Genetic Disorders: A Multitissue ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic and Pattern Recognition Study into Dystrophic Tissue*. Analytical Biochemistry, 2001. **293**(1): p. 16-21.
55. Desmoulin, F., et al., *Étude critique de l'utilisation de la RMN HR-MAS pour l'analyse des tissus biologiques*. Comptes Rendus Chimie, 2008. **11**(4-5): p. 423-433.
56. Griffin, J.L., et al., *Spectral profiles of cultured neuronal and glial cells derived from HRMAS ¹H NMR spectroscopy*. NMR in Biomedicine, 2002. **15**(6): p. 375-384.
57. Duarte, I.F., et al., *Analytical Approaches toward Successful Human Cell Metabolome Studies by NMR Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(12): p. 5023-5032.
58. Lin, C., et al., *Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics*. Metabolomics, 2007. **3**(1): p. 55-67.
59. Tyagi, R.K., et al., *Simultaneous extraction of cellular lipids and water-soluble metabolites: Evaluation by NMR spectroscopy*. Magnetic Resonance in Medicine, 1996. **35**(2): p. 194-200.
60. Wu, H., et al., *High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics*. Analytical Biochemistry, 2008. **372**(2): p. 204-212.
61. Woo, D.-C., et al., *Regional Absolute Quantification of the Neurochemical Profile of the Canine Brain: Investigation by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Tissue Extraction*. Applied Magnetic Resonance, 2010. **38**(1): p. 65-74.
62. Miccheli, A., et al., *Metabolic profiling by ¹³C-NMR spectroscopy: [1,2-¹³C]glucose reveals a heterogeneous metabolism in human leukemia T cells*. Biochimie, 2006. **88**(5): p. 437-448.
63. Akhtar, S.N., et al., *In vitro ¹H NMR studies of RD human cell infection with echovirus 11*. NMR in Biomedicine, 2007. **20**(4): p. 422-428.
64. Gottschalk, M., et al., *Metabolomic studies of human lung carcinoma cell lines using in vitro ¹H NMR of whole cells and cellular extracts*. NMR in Biomedicine, 2008. **21**(8): p. 809-819.

65. Beckonert, O., et al., *Visualizing metabolic changes in breast-cancer tissue using ^1H -NMR spectroscopy and self-organizing maps*. *NMR in Biomedicine*, 2003. **16**(1): p. 1-11.
66. Bon, D., *Evaluation de deux nouveaux outils pour l'étude d'échantillons biologiques par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire*:
 - *La RMN HR-MAS (High-Resolution Magic Angle Spinning) : une technique d'analyse d'échantillons bruts*;
 - *La Métabolomique : une méthode d'analyse statistique des spectres pour la recherche de signatures métaboliques*. 2007, Université Toulouse III-Paul Sabatier: Toulouse.
67. Lindon, J., E. Holmes, and J. Nicholson, *Metabonomics Techniques and Applications to Pharmaceutical Research & Development*. *Pharmaceutical Research*, 2006. **23**(6): p. 1075-1088.
68. Nicholson, J.K., J.C. Lindon, and E. Holmes, '*Metabonomics*': *understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data*. *Xenobiotica*, 1999. **29**: p. 1181-1189.
69. Price, K.E., C.E. Lunte, and C.K. Larive, *Development of tissue-targeted metabonomics. Part 1. Analytical considerations*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008. **46**(4): p. 737-747.
70. Roth, E., *Critical evaluation of the use and analysis of stable isotopes*. *Pure and Applied Chemistry*, 1997. **69**(8): p. 1753-1828.
71. Martin, G., *L'analyse isotopique par résonance magnétique nucléaire*. *Annales des falsifications et de l'expertise chimique*, 1992. **909**(85): p. 249-270.
72. Tcherkez, G., *Isotopie biologique*. Tec & Doc (Editions) ed. 2010: Lavoisier.
73. Kelleher, J.K., *Flux Estimation Using Isotopic Tracers: Common Ground for Metabolic Physiology and Metabolic Engineering*. *Metabolic Engineering*, 2001. **3**(2): p. 100-110.
74. Massou, S., et al., *NMR-based fluxomics: Quantitative 2D NMR methods for isotopomers analysis*. *Phytochemistry*, 2007. **68**(16-18): p. 2330-2340.
75. Portais, J.-C. and A.-M. Delort, *Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can ^{13}C -NMR tell us?* *FEMS Microbiology Reviews*, 2002. **26**(4): p. 375-402.
76. Nicolas, C., et al., *Measurement of isotopic enrichments in ^{13}C -labelled molecules by 1D selective Zero-Quantum Filtered TOCSY NMR experiments*. *Comptes Rendus Chimie*, 2008. **11**(4-5): p. 480-485.
77. Massou, S., et al., *Application of 2D-TOCSY NMR to the measurement of specific ^{13}C -enrichments in complex mixtures of ^{13}C -labeled metabolites*. *Metabolic Engineering*, 2007. **9**(3): p. 252-257.
78. Martin, G.J. and M.L. Martin, *Détermination par résonance magnétique nucléaire du deutérium du fractionnement isotopique spécifique naturel. Application à la détection de la chaptalisation des vins*. *Journal de chimie physique*, 1983. **80**(3): p. 293-297.

79. Tenailleau, E., et al., *NMR Approach to the Quantification of Nonstatistical ^{13}C Distribution in Natural Products: Vanillin*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(13): p. 3818-3825.
80. Tenailleau, E., et al., *Authentication of the origin of vanillin using quantitative natural abundance ^{13}C NMR*. J. Agric. Food Chem., 2004. **52**: p. 7782-7787.
81. Brazier, J.L. and W. Elbast, *Que peut apporter l'analyse isotopique en flux continu à la recherche et aux utilisations biomédicales ?* Analisis, 1999. **27**(3): p. 218-223.
82. Ambrose, S.H. and M.J. DeNiro, *Reconstruction of African human diet using bone collagen carbon and nitrogen isotope ratios*. Nature, 1986. **319**(6051): p. 321-324.
83. Schidlowski, M., *A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks*. Nature, 1988. **333**(6171): p. 313-318.
84. Epstein, S., et al., *Unusual stable isotope ratios in amino acid and carboxylic acid extracts from the Murchison meteorite*. Nature, 1987. **326**(6112): p. 477-479.
85. Styring, A.K., J.C. Sealy, and R.P. Evershed, *Resolving the bulk $\delta^{15}\text{N}$ values of ancient human and animal bone collagen via compound-specific nitrogen isotope analysis of constituent amino acids*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2010. **74**(1): p. 241-251.
86. Bloomfield, A.L., et al., *Temperature and diet affect carbon and nitrogen isotopes of fish muscle: can amino acid nitrogen isotopes explain effects?* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2011. **399**(1): p. 48-59.
87. Chikaraishi, Y., et al., *Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids*. Limnology and Oceanography : methods, 2009. **7**: p. 740-750.
88. Schmidt, T., et al., *Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **378**(2): p. 283-300.
89. Remaud, G.S., et al., *Detection of Sophisticated Adulterations of Natural Vanilla Flavors and Extracts: Application of the SNIF-NMR Method to Vanillin and p-Hydroxybenzaldehyde*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(3): p. 859-866.
90. Rossmann, A., *Determination of stable isotope ratios in food analysis*. Food reviews international, 2001. **17**(3): p. 347-381.
91. Horita, J. and A.A. Vass, *Stable-isotope fingerprints of biological agents as forensic tools*. Journal of Forensic Sciences, 2003. **48**(122-126).
92. Sharp, Z.D., et al., *Hydrogen isotope systematics of hair: archeological and forensic applications*. Journal of Archaeological Science, 2003. **30**(12): p. 1709-1716.
93. Silvestre, V., et al., *Isotopic ^{13}C NMR spectrometry to assess counterfeiting of active pharmaceutical ingredients: Site-specific ^{13}C content of aspirin and paracetamol*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **50**(3): p. 336-341.
94. Jasper, J.P., et al., *Stable isotopic characterization of active pharmaceutical ingredients*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. **35**(1): p. 21-30.

95. Rittler, P., et al., *Effect of tumor removal on mucosal protein synthesis in patients with colorectal cancer*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(5): p. E1018-1021.
96. Ferchaud-Roucher, V., et al., *Solid-phase microextraction method for carbon isotopic analysis of volatile carboxylic acids in human plasma by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(23): p. 3573-3578.
97. Darmaun, D., et al., *Evidence for Accelerated Rates of Glutathione Utilization and Glutathione Depletion in Adolescents With Poorly Controlled Type 1 Diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 190-196.
98. Vetter, W., et al., *Stable carbon isotope ratios of methyl-branched fatty acids are different to those of straight-chain fatty acids in dairy products*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **389**(2): p. 597-604.
99. Mauro, M., et al., *¹³C urea breath test for Helicobacter pylori: Evaluation of 10-minute breath collection*. The Canadian Journal of Gastroenterology, 2006. **20**(12): p. 775-778.
100. Likura, Y., et al., *Study of Liver Function in Infants with Atopic Dermatitis Using the ¹³C-Methacetin Breath Test*. International Archives of Allergy and Immunology, 1995. **107**(1-3): p. 189-193.
101. Parker, A.C., et al., *Enhanced drug metabolism in young children with cystic fibrosis*. Archives of Disease in Childhood, 1997. **77**(3): p. 239-241.
102. Rost, K.L., et al., *Increase of cytochrome P450IA2 activity by omeprazole: Evidence by the ¹³C-[N-3-methyl]-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin*. Clin. Pharm. Ther., 1992. **52**(2): p. 170-180.
103. Pons, G., et al., *Maturation of Caffeine N-Demethylation in Infancy: A Study Using the ¹³CO₂ Breath Test*. Pediatric Research, 1988. **23**(6): p. 632-636.
104. Levitt, M.H., *Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. Wiley ed. 2001, Chichester.
105. Aue, W.P., J. Karhan, and R.R. Ernst, *Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy*. The Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(10): p. 4226-4227.
106. Canet, D., J.-C. Boubel, and E. Canet Soulas, *La RMN, Concepts, méthodes et applications*. Dunod ed. 2002, Paris.
107. Piantini, U., O.W. Sorensen, and R.R. Ernst, *Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks*. Journal of the American Chemical Society, 1982. **104**(24): p. 6800-6801.
108. Braunschweiler, L. and R.R. Ernst, *Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy*. J. Magn. Reson, 1983. **53**: p. 521-528.
109. Thrippleton, M.J. and J. Keeler, *Elimination of Zero-Quantum Interference in Two-Dimensional NMR Spectra*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(33): p. 3938-3941.

110. Bax, A., R. Freeman, and S.P. Kempell, *Natural abundance carbon-13-carbon-13 coupling observed via double-quantum coherence*. Journal of the American Chemical Society, 1980. **102**(14): p. 4849-4851.
111. Turner, D.L., *Carbon-13 autocorrelation NMR using double-quantum coherence*. Journal of Magnetic Resonance (1969), 1982. **49**(1): p. 175-178.
112. Buddrus, J. and J. Lambert, *Connectivities in molecules by INADEQUATE: recent developments*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2002. **40**(1): p. 3-23.
113. Lambert, J., *Enhancement of 2D INADEQUATE Spectra by Means of Singular-Value Decomposition*. Journal of Magnetic Resonance, Series A, 1996. **123**(2): p. 211-214.
114. Lown, J.W. and C.C. Hanstock, *High Field ¹H-NMR Analysis of the 1:1 Intercalation Complex of the Antitumor Agent Mitoxantrone and the DNA Duplex [d(CpGpCpG)]₂*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1985. **2**(6): p. 1097-1106.
115. Bodenhausen, G. and D.J. Ruben, *Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy*. Chemical Physics Letters, 1980. **69**(1): p. 185-189.
116. Morris, G.A. and R. Freeman, *Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer*. Journal of the American Chemical Society, 1979. **101**(3): p. 760-762.
117. Lewis, I.A., et al., *Method for Determining Molar Concentrations of Metabolites in Complex Solutions from Two-dimensional ¹H-¹³C NMR Spectra*. Analytical Chemistry, **2007**. **79**: p. 9385-9390.
118. Koskela, H., I. Kilpeläinen, and S. Heikkinen, *Some aspects of quantitative 2D NMR*. Journal of Magnetic Resonance, 2005. **174**(2): p. 237-244.
119. Lin, M. and M.J. Shapiro, *Mixture Analysis by NMR Spectroscopy*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(22): p. 4731-4733.
120. Koskela, H. and A.W. Graham, *Chapter 1 Quantitative 2D NMR Studies*, in *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. 2009, Academic Press. p. 1-31.
121. Rai, R.K., P. Tripathi, and N. Sinha, *Quantification of Metabolites from Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Application to Human Urine Samples*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(24): p. 10232-10238.
122. Karabulut, N., *Optimisation de la séquence DEPT pour la RMN quantitative*. 2002, Thèse de doctorat, Université de Nantes: Nantes.
123. Bayet-Robert, M., et al., *Quantitative two-dimensional HRMAS ¹H-NMR spectroscopy-based metabolite profiling of human cancer cell lines and response to chemotherapy*. Magnetic Resonance in Medicine, 2010. **63**(5): p. 1172-1183.
124. Morvan, D. and A. Demidem, *Metabolomics by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of the Response to Chloroethylnitrosourea Reveals Drug Efficacy and Tumor Adaptive Metabolic Pathways*. Cancer Research, 2007. **67**(5): p. 2150-2159.
125. Gowda, G.A.N., et al., *Quantitative Analysis of Blood Plasma Metabolites Using Isotope Enhanced NMR Methods*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(21): p. 8983-8990.

126. Ludwig, C. and M.R. Viant, *Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox*. *Phytochemical Analysis*, 2010. **21**(1): p. 22-32.
127. Alonso, J., et al., *Two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) of intact frog muscle: Spectral pattern characterization and lactate quantitation*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 1989. **11**(3): p. 316-330.
128. Richardson, A., et al., *Central carbon metabolism in the progression of mammary carcinoma*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2008. **110**(2): p. 297-307.
129. Hu, F., et al., *Nondestructive Quantification of Organic Compounds in Whole Milk without Pretreatment by Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(11): p. 4307-4311.
130. Xi, Y., et al., *Improved identification of metabolites in complex mixtures using HSQC NMR spectroscopy*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **614**(2): p. 127-133.
131. Heikkinen, S., et al., *Quantitative 2D HSQC (Q-HSQC) via Suppression of J-Dependence of Polarization Transfer in NMR Spectroscopy: Application to Wood Lignin*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(14): p. 4362-4367.
132. Giraudeau, P., et al., *Optimization of homonuclear 2D NMR for fast quantitative analysis: Application to tropine-nortropine mixtures*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007. **43**(4): p. 1243-1248.
133. Giraudeau, P., G.S. Remaud, and S. Akoka, *Evaluation of Ultrafast 2D NMR for Quantitative Analysis*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(1): p. 479-484.
134. Kovacs, H., D. Moskau, and M. Spraul, *Cryogenically cooled probes--a leap in NMR technology*. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2005. **46**(2-3): p. 131-155.
135. Morris, G.A., *Systematic sources of signal irreproducibility and t1 noise in high-field NMR spectrometers*. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 1992. **100**(2): p. 316-328.
136. ICH-Q2A, *Guideline for industry : Text on validation of analytical procedures*. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>, 1995.
137. Lafon, O., et al., *Fast and High-Resolution Stereochemical Analysis by Nonuniform Sampling and Covariance Processing of Anisotropic Natural Abundance 2D 2H NMR Datasets*. *Chemistry – A European Journal*. **17**(24): p. 6716-6724.
138. Kazimierczuk, K., A. Zawadzka, and W. Kozminski, *Optimization of random time domain sampling in multidimensional NMR*. *Journal of Magnetic Resonance*, 2008. **192**(1): p. 123-130.
139. Bretthorst, G.L., *Nonuniform sampling: Bandwidth and aliasing*. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 2008. **32A**(6): p. 417-435.
140. Frydman, L., T. Scherf, and A. Lupulescu, *The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(25): p. 15858-15862.
141. Michel, N. and S. Akoka, *The application of the ERETIC method to 2D-NMR*. *Journal of Magnetic Resonance*, 2004. **168**(1): p. 118-123.

142. Sekiyama, Y., E. Chikayama, and J. Kikuchi, *Evaluation of a Semipolar Solvent System as a Step toward Heteronuclear Multidimensional NMR-Based Metabolomics for ¹³C-Labeled Bacteria, Plants, and Animals*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(3): p. 719-726.
143. Lane, A. and T. Fan, *Quantification and identification of isotopomer distributions of metabolites in crude cell extracts using ¹H TOCSY*. Metabolomics, 2007. **3**(2): p. 79-86.
144. Santini, M.T., et al., *MG-63 human osteosarcoma cells grown in monolayer and as three-dimensional tumor spheroids present a different metabolic profile: a ¹H NMR study*. FEBS Letters, 2004. **557**(1-3): p. 148-154.
145. Harrison, C.J. and T.D. Allen, *Cell Surface Morphology After Trypsinisation Depends on Initial Cell Shape*. Differentiation, 1979. **15**(1-3): p. 61-66.
146. Behrens, D., J.H. Gill, and I. Fichtner, *Loss of tumorigenicity of stably ER β -transfected MCF-7 breast cancer cells*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2007. **274**(1-2): p. 19-29.
147. Woo, H.M., et al., *Mass spectrometry based metabolomic approaches in urinary biomarker study of women's cancers*. Clinica Chimica Acta, 2009. **400**(1-2): p. 63-69.
148. Jambu, M., *Méthodes de base de l'analyse de données*. Eyrolles ed. 1999.
149. Nicholson, J.K., et al., *750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR Spectroscopy of Human Blood Plasma*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(5): p. 793-811.
150. *MMCD : Madison Metabolomics Consortium Database*. Base de données métabolomiques pour la RMN et la SM, <http://mmcd.nmrfam.wisc.edu/>.
151. Cui, Q., et al., *Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database*. Nat Biotech, 2008. **26**(2): p. 162-164.
152. *HMDB : Human Metabolome DataBase*. Base de données métabolomiques pour la RMN, <http://www.hmdb.ca/>.
153. Wishart, D.S., et al., *HMDB: a knowledgebase for the human metabolome*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**(suppl 1): p. D603-D610.
154. Akoka, S., L. Barantin, and M. Trierweiler, *Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method*. Anal. Chem., 1999. **71**: p. 2554-2557.
155. Silverman, S., *Carbon isotopic evidence for the role of lipids in petroleum formation*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1967. **44**(12): p. 691-695.
156. Ranen, M.C. and S.B. Jacobsen, *Barium Isotopes in Chondritic Meteorites: Implications for Planetary Reservoir Models*. Science, 2006. **314**(5800): p. 809-812.
157. Paquay, F.o.S., et al., *Determining Chondritic Impactor Size from the Marine Osmium Isotope Record*. Science, 2008. **320**(5873): p. 214-218.
158. Teng, F.-Z., N. Dauphas, and R.T. Helz, *Iron Isotope Fractionation During Magmatic Differentiation in Kilauea Iki Lava Lake*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1620-1622.
159. Bonifacie, M., et al., *The Chlorine Isotope Composition of Earth's Mantle*. Science, 2008. **319**(5869): p. 1518-1520.

160. Sharp, Z.D., et al., *The Chlorine Isotope Composition of the Moon and Implications for an Anhydrous Mantle*. Science, 2010. **329**(5995): p. 1050-1053.
161. Zhu, X.-K., et al., *Secular Variation of Iron Isotopes in North Atlantic Deep Water*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2000-2002.
162. Hayes, J.M., et al., *Compound-specific isotopic analyses: A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes*. Organic Geochemistry, 1990. **16**(4-6): p. 1115-1128.
163. Jasper, J.P., *The increasing use of stable isotopes in the pharmaceutical industry*. Pharmaceutical Technology, 1999. **23**(10): p. 106-114.
164. Martinelli, L.A., et al., *Worldwide stable carbon and nitrogen isotopes of Big Mac® patties: An example of a truly "glocal" food*. Food Chemistry, 2011. **127**(4): p. 1712-1718.
165. Rodrigues, C.I., et al., *Stable isotope analysis for green coffee bean: A possible method for geographic origin discrimination*. Journal of Food Composition and Analysis, 2009. **22**(5): p. 463-471.
166. Zhang, B.-L., et al., *Characterization of glycerol from different origins by ²H- and ¹³C-NMR studies of site-specific natural isotope fractionation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(4): p. 1374-1380.
167. Mosandl, A., et al., *Chiroselective flavor analysis by means of enantioselective gas chromatography, coupled on-line with isotope ratio mass spectrometry*. Journal of High Resolution Chromatography, 1990. **13**(7): p. 528-531.
168. Meier-Augenstein, W., *Use of gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry in nutrition and metabolic research*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 1999. **2**(6): p. 465-470.
169. Tissot, S., et al., *Use of a new gas chromatograph isotope ratio mass spectrometer to trace exogenous ¹³C labelled glucose at a very low level of enrichment in man*. Diabetologia, 1990. **33**(8): p. 449-456.
170. Schena, M., et al., *Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray*. Science, 1995. **270**(5235): p. 467-470.
171. Zhu, H., et al., *Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2101-2105.
172. Elmore, J.G., et al., *Ten-Year Risk of False Positive Screening Mammograms and Clinical Breast Examinations*. New England Journal of Medicine, 1998. **338**(16): p. 1089-1096.
173. Thor, A.D., et al., *Activation (Tyrosine Phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): A Study of Incidence and Correlation With Outcome in Breast Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2000. **18**(18): p. 3230-3239.
174. ATCC : American Type Culture Collection. Base de données sur les lignées cellulaires, www.atcc.org.
175. May, P. and E. May, *Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer*. Revue Française des Laboratoires, 1999. **1999**(311): p. 35-42.

176. Pathan, M., et al., *"Multi-scan single shot" quantitative 2D NMR: a valuable alternative to fast conventional quantitative 2D NMR*. *Analyst*, 2011. **136**(15): p. 3157-3163.
177. Ardenkjaer-Larsen, J.H., et al., *Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(18): p. 10158-10163.
178. Wolber, J., et al., *Generating highly polarized nuclear spins in solution using dynamic nuclear polarization*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 2004. **526**(1-2): p. 173-181.
179. Frydman, L. and D. Blazina, *Ultrafast two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized solutions*. *Nat. Phys.*, 2007. **3**: p. 415-419.
180. Giraudeau, P., Y. Shrot, and L. Frydman, *Multiple Ultrafast, Broadband 2D NMR Spectra of Hyperpolarized Natural Products*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009. **131**(39): p. 13902-13903.

Liste des figures

- Figure 1 : Techniques de la famille des « omiques » [17]. 13
- Figure 2 : Principe de fonctionnement d'une puce à ADN a) marquage des brins d'ADN par une molécule fluorescente b) dépôt sur la sonde constituée de brins d'ADN connus c) apparition de spots fluorescents quand les brins s'apparient d) reconstitution des séquences d'ADN par traitement informatique. 14
- Figure 3 : Schéma descriptif représentant les différentes étapes d'une étude métabolomique par RMN ou spectrométrie de masse [11]. 18
- Figure 4 : Principales étapes d'une analyse métabolomique par RMN (a) acquisition de spectre par RMN 1D et identification des métabolites (b) sélection des buckets pour l'analyse statistique (c) analyse multifactorielle d'un ensemble d'échantillons pour l'identification de biomarqueurs permettant la séparation des groupes. 21
- Figure 5 : Etapes permettant l'acquisition d'une expérience de RMN 2D. 32
- Figure 6 : Données d'une expérience de RMN 2D (a) FID d'une expérience RMN 2D (b) spectre correspondant après transformation de Fourier dans les deux dimensions (c) coupe horizontale du spectre 2D[104]. 33
- Figure 7 : J-résolue (a) Séquence d'impulsions (b) spectre J-résolu ^1H du 3-bromopropionate d'éthyle. 33
- Figure 8 : COSY et COSY-DQF (a) séquence d'impulsions de la COSY (b) séquence d'impulsions de la COSY-DQF (c) spectre COSY-DQF ^1H de la L-isoleucine. ϕ : cycle de phase (x,y,-x,-y)[106]. 34
- Figure 9 : TOCSY (a) séquence d'impulsions (b) spectre TOCSY ^1H du 2-chlorobutane. 35
- Figure 10 : Schéma d'impulsions de la séquence INADEQUATE. 36
- Figure 11 : HSQC (a) séquence d'impulsions (b) spectre HSQC ^1H - ^{13}C de 2-chloro-butane. 36
- Figure 12 : Spectres RMN d'un mélange de métabolites en RMN- ^1H 1D (a) et en 2D (b). La superposition des signaux de certains métabolites en 1D disparaît lorsque le même mélange est analysé en 2D (dans l'exemple ci-dessus, avec une séquence TOCSY). 37
- Figure 13 : Séquence d'impulsions de l'INADEQUATE symétrisée proton ($\Delta = 1/4J_{\text{HH}}$). 42
- Figure 14 : Spectres du mélange modèle en haut réalisés avec un temps d'expérience long et en bas avec un temps d'expérience court. (a) et (d) J-résolu (3h23min et 4min), (b) et (e) TOCSY (1h44min et 26 min), (c) et (f) HSQC (3h30min et 30min). 44
- Figure 15 : Spectres du mélange modèle obtenus avec des temps d'acquisition long (spectres du haut) et court (spectres du bas). (a) et (d) COSY-DQF (6h02 et 22 min), (b) et (e) COSY-45 (6h02 et 24 min), (c) et (f) INADEQUATE symétrisée proton (6h05 et 25 min). 45
- Figure 16 : Séquence INADEQUATE symétrisée proton avec $\Delta = 1/(4J_{\text{HH}}) = 35,7$ ms, $G_1 = 40\%$ et $G_2 = 80\%$ appliqués pendant 2 ms. 48
- Figure 17 : Répétabilité des trois séquences INADEQUATE- ^1H : représentation du coefficient de variation du rapport des volumes en fonction de la séquence utilisée. (—◆—) Alanine/Acide Lactique, (—■—) Proline/Acide Lactique, (—▲—) Myo Inositol/Acide Lactique, (—×—) Taurine/Acide Lactique, (—*—) GSH/Acide Lactique. 50
- Figure 18 : Moyenne des S/B calculés sur les cinq expériences répétées en fonction de la séquence utilisée. —◆— Acide Lactique, —◆— Alanine, —■— Proline, —▲— Myo inositol, —×— Taurine, —*— GSH. 50
- Figure 19 : Séquences d'impulsions (a) de la COSY-DQF, avec $G_1 = 40\%$ et $G_2 = 80\%$ appliqués pendant 2 ms et (b) de la ZQF-TOCSY avec le premier gradient appliqué pendant 50 ms et le second pendant 30 ms. 51

- Figure 20 : Evolution du coefficient de variation en fonction du nombre de scans pour les séquences COSY-DQF, ZQF-TOCSY et INADEQUATE symétrisée proton. Les valeurs représentées sont celles obtenues à partir de la mesure du rapport des volumes des pics acide lactique/alanine. Pour $n_s = 4$, $T_{exp} = 48$ min et pour $n_s = 2$, $T_{exp} = 24$ min. Des courbes similaires ont été obtenues pour les autres rapports de volumes. 52
- Figure 21 : Comparaison des spectres INADEQUATE- 1H symétrisée (a), ZQF-TOCSY (b) et COSY-DQF (c) réalisé sur un mélange modèle à 50 mmol/L. 53
- Figure 22 : Influence du nombre d'incrémentations dans la dimension F_1 sur le coefficient de variation (a) et sur le rapport signal-sur-bruit (b), avec \blacklozenge TD1 = 128 et \blacksquare TD1 = 64. Les valeurs représentées sur (a) sont celles obtenues à partir de la mesure du rapport des volumes des pics acide lactique/alanine, alors que celles sur (b) ont été mesurées pour l'acide lactique. Des courbes similaires ont été obtenues pour les autres métabolites. 54
- Figure 23 : Spectre INADEQUATE- 1H obtenu en 7 min. Les raies choisies pour l'intégration sont indiquées pour chaque métabolite. Ala : alanine ; Lac : acide lactique ; Pro : proline ; Tau : taurine ; Ino : myo inositol ; GSH : glutathion. 54
- Figure 24 : Représentation du rapport r_v du volume du pic de l'acide lactique sur celui de l'alanine en fonction du rapport des concentrations r_c pour la séquence INADEQUATE symétrisée proton. Des courbes similaires sont obtenues pour les autres métabolites. Les paramètres de la corrélation sont regroupés dans le Tableau IX. 58
- Figure 25 : Spectre INADEQUATE- 1H d'extraits cellulaires obtenus à partir des cellules MDA-MB-468. L'acquisition a été effectuée sur un spectromètre 500 MHz équipé d'une sonde cryogénique double accord ($^1H/^{13}C$) 5 mm avec $n_s = 1$ et TD1 = 64, pour une durée d'expérience de sept minutes. Ala : alanine ; Lac : acide lactique ; Thr : thréonine ; Tau : taurine ; Ino : myo inositol ; GSH : glutathion. 60
- Figure 26 : Comparaison des spectres obtenus sur des échantillons ayant subi deux méthodes de « quenching » différentes : cellules récupérées avec de l'eau, puis congelées et lyophilisées (a) ou cellules récoltées avec du méthanol (b). 65
- Figure 27 : Spectre NOESY 1D d'extraits cellulaires obtenus par $CHCl_3/MeOH/H_2O$ (1). Identification des métabolites : 1, isoleucine; 2, leucine; 3, valine; 4, lactate; 5, thréonine; 6, alanine; 7, lysine; 8, arginine; 9, glutarate; 10, citruline; 11, acétate; 12, proline; 13, N-acetyl aspartate; 14, glutamate; 15, N-acetyl amino acide; 16, méthionine; 17, glutamine; 18, glutathion; 19, pyruvate; 20, succinate; 21, malate; 22, citrate; 23, aspartate; 24, diméthylamine; 25, asparagine; 26, oxalacetate; 27, créatine; 28, cystéine; 29, créatinine; 30, tyrosine; 31, histidine; 32, phénylalanine; 33, malonate; 34, choline; 35, glycérophospho-choline; 36, phosphocholine; 37, taurine; 38, bétaine; 39, triméthylamine N-oxyde; 40, myo inositol; 41, tryptophane; 42, glycine; 43, sérine; 44, AXP; 45, GXP; 46, NAD^+ ; 47, maléate; 48, UXP; 49, fumarate; 50, formate. 69
- Figure 28 : Découpage sous forme de « buckets » d'un spectre d'extraits cellulaires obtenus par la méthode $CHCl_3/MeOH/H_2O$ (1) (a) sur le spectre entier (b) sur un agrandissement du spectre. Les zones de tailles différentes sont clairement visibles sur ce zoom. Les barres verticales symbolisent le centre des « buckets ». 70
- Figure 29 : Analyse en composantes principales obtenue à partir de 38 spectres d'extraits cellulaires de la lignée MDA-MB-468. Les première et deuxième composantes représentent respectivement 25% et 17% de la variabilité totale. 70
- Figure 30 : Spectres NOESYPR1D des métabolites intracellulaires extraits à partir de cellules de cancer du sein MDA-MB-468 (a) avec la méthode acide perchlorique/eau (b) avec la méthode méthanol/chloroforme/eau. 71
- Figure 31 : Représentation géométrique des « buckets » en fonction de leur contribution pour les cinq méthodes d'extraction (acétonitrile/eau, méthanol, méthanol/eau, chloroforme/méthanol/eau (1) et chloroforme/méthanol/eau (2)) (a) pentagone entier (b) agrandissement de la zone d'intérêt. Le carré rouge symbolise le barycentre calculé sur l'ensemble des « buckets ». 73
- Figure 32 : Histogrammes représentant le nombre de « buckets » pour différentes valeurs de CV et pour chaque méthode d'extraction (a) répétabilité de la méthode d'extraction (b) répétabilité biologique ou de la croissance cellulaire. \blacksquare CV < 5%, \blacksquare 5% < CV < 10% et \square 10% < CV. 75

- Figure 33 : Analyse en composantes principales obtenue à partir de 19 spectres d'extraits cellulaires de quatre lignées de cellules de cancer du sein. Les première et deuxième composantes représentent respectivement 43% et 21% de la variabilité totale. 76
- Figure 34 : Courbe d'étalonnage représentant, pour un métabolite donné, le volume du pic 2D en fonction de la concentration ajoutée : détermination graphique de la concentration initiale du métabolite étudié. 80
- Figure 35 : Courbes d'étalonnage obtenues à partir des spectres INADEQUATE-¹H pour la thréonine extraite à partir de (a) MDA-MB-468, (b) MCF-7 et (c) SKBR3. Les équations des droites de régression linéaire ainsi que les coefficients de déterminations sont également indiqués. 82
- Figure 36 : Concentrations de quinze métabolites intracellulaires déterminées par ajouts dosés pour les lignées MCF-7 (—▲—), SKBR3 (—◆—) et MDA-MB-468 (—■—). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types calculés sur les trois concentrations d'un même métabolite pour une même lignée. 83
- Figure 37 : Analyse en composantes principales obtenue à partir de 9 spectres d'extraits cellulaires de trois lignées de cellules de cancer du sein. Les première et deuxième composantes représentent respectivement 59% et 27% de la variabilité totale. 84
- Figure 38 : Schéma représentant un Analyseur Élémentaire couplé à un Spectromètre de Masse de Rapports Isotopiques (AE-SMRI). 92
- Figure 39 : Chromatogramme des courants ioniques des isotopomères de N₂ et CO₂ obtenu à partir d'un échantillon d'extraits secs de cellules cancéreuses. Les trois pics en début et fin de spectre correspondant respectivement aux injections des gaz de référence N₂ et CO₂. 93
- Figure 40 : Représentation des déviations isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ et des pourcentages en azote et en carbone pour six lignées cancéreuses et une lignée saine (a) discrimination des lignées en fonction des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ et de $\delta^{13}\text{C}$ (b) séparation des lignées selon les valeurs des pourcentages de C et de N. ■ ZR75-1, ■ MCF-7, ■ MCF-10A, ■ MDA-MB-231, ■ Cal51, ■ MDA-MB-468, ■ SKBR3. 97
- Figure 41 : Valeurs des teneurs isotopiques pour les différents constituants cellulaires en ¹⁵N. ■ ZR75-1, ■ MCF-7, ■ MDA-MB-231, ■ Cal51, ■ MDA-MB-468, ■ SKBR3. 98
- Figure 42 : Valeurs des teneurs isotopiques pour les différents constituants cellulaires en ¹³C. ■ ZR75-1, ■ MCF-7, ■ MDA-MB-231, ■ Cal51, ■ MDA-MB-468, ■ SKBR3. 99
- Figure 43 : Représentation des déviations isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ de six lignées cancéreuses en fonction du constituant cellulaire observé (a) cellules entières (b) protéines (c) métabolites solubles (d) ADN. ■ ZR75-1, ■ MCF-7, ■ MDA-MB-231, ■ Cal51, ■ MDA-MB-468, ■ SKBR3. 100

Liste des tableaux

Tableau I : Abondances naturelles de différents isotopes stables [70, 71].	25
Tableau II : Principaux standards internationaux utilisés pour la normalisation des mesures de delta [72].	26
Tableau III : Rapports signal-sur-bruit selon les deux dimensions mesurés sur les raies de l'isoleucine (première ligne) et du glutathion (deuxième ligne) pour les séquences J-résolue, TOCSY et HSQC.	44
Tableau IV : Rapports signal-sur-bruit selon les deux dimensions mesurés sur les raies de l'isoleucine (première ligne) et du glutathion (deuxième ligne) pour les séquences COSY-DQF, COSY-45 et INADEQUATE symétrisée proton.	46
Tableau V : Comparaison des rapports S/B mesurés sur les signaux de l'alanine et de l'eau pour des séquences ayant différents cycles de phase. Les différents cycles de phase sont présentés en annexe 1.	49
Tableau VI : Valeurs des temps de relaxation longitudinaux T_1 de différents métabolites à pH = 2.	55
Tableau VII : Coefficients de variation mesurés à partir du rapport des volumes des pics obtenus par la séquence INADEQUATE symétrisée proton avec et sans saturation partielle.	55
Tableau VIII : Rapports signal-sur-bruit (S/B) minimal et maximal mesurés dans la dimension indirecte, ainsi que les coefficients de variation calculés à partir des spectres INADEQUATE- ^1H sur les six mélanges modèles (concentrations comprises entre 0.08 mM et 50 mM).	57
Tableau IX : Paramètres de corrélation entre chaque rapport r_v de volumes de pics et les rapports r_c de concentrations associées.	58
Tableau X : Protocoles de préparation d'échantillons de cellules adhérentes de culture humaine pour la RMN métabolomique.	63
Tableau XI : Comparaison des rapports signal-sur-bruit de quelques métabolites mesurés sur les spectres d'échantillons ayant subi deux méthodes de « quenching » différentes.	65
Tableau XII : Récapitulatif des solvants d'extraction utilisés et de leurs mises en œuvre.	67
Tableau XIII : Récapitulatif des métabolites extraits majoritairement en fonction du protocole utilisé.	74
Tableau XIV : Biomarqueurs caractéristiques de quatre lignées de cancer du sein.	77
Tableau XV : Taux de recouvrement α (%) calculé pour chaque ajout et pour chaque métabolite pour la lignée MDA-MB-468.	85
Tableau XVI : Caractéristiques des lignées de cancer du sein étudiées. Le nom et la numérotation de chaque lignée sont fournis par l'ATCC (American Type Culture Collection) [174]. La pathologie associée, ainsi que la présence (+) ou l'absence (-) de récepteurs à œstrogène (ER), à progestérone (PR), de certaines tyrosines kinases (Her2 ou ErbB2), de facteur de croissance épithélial (EGFR) sont également mentionnées. La mutation ou non du gène p53 est également précisée.	89
Tableau XVII : Déviations isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$) et pourcentages d'azote et de carbone dans trois lignées de cellules cancéreuses en fonction du nombre de jours de croissance (NJC) et du nombre de divisions cellulaires (NDC).	95
Tableau XVIII : Moyennes et écart-types calculés sur les déviations isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$) et sur les pourcentages d'azote et de carbone mesurés pour sept lignées cellulaires (n = nombre d'échantillons).	96
Tableau XIX : Taux de recouvrement α (%) calculé pour chaque ajout et pour chaque métabolite pour la lignée SKBR3.	122
Tableau XX : Taux de recouvrement α (%) calculé pour chaque ajout et pour chaque métabolite pour la lignée MCF-7.	123

Production scientifique

Publications

- Fast and precise quantitative analysis of metabolic mixtures by 2D ^1H INADEQUATE NMR, E. Martineau, P. Giraudeau, I. Tea, S. Akoka, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 54 (1): p.252-257.
- Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells, E. Martineau, I. Tea, G. Loaëc, P. Giraudeau, S. Akoka, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011 (DOI: 10.1007/s00216-011-5310-y).
- Quantitative analysis of metabolites in mammalian cells by using 2D ^1H INADEQUATE NMR, E. Martineau, I. Tea, S. Akoka, P. Giraudeau, en préparation
- Variation of carbon and nitrogen isotopes in cancer tumours: a diagnostic marker, E. Martineau, P. Giraudeau, S. Akoka, I. Tea, en préparation

Brevet

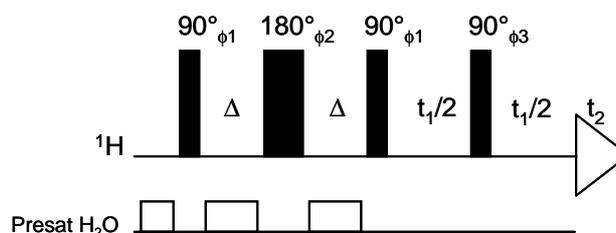
- Méthode pour caractériser l'origine et/ou l'état de cellules pathologiques ou saines et ses applications en biologie, brevet, I. Tea, E. Martineau, P. Giraudeau, S. Akoka, S. Nion, Demande de brevet FR 11/52047 déposée le 14 mars 2011 (brevet sélectionné par l'Université de Nantes pour une étude de marché).

Communications dans des congrès

- Poster : Développement d'une méthode de quantification de métabolites par RMN en milieu complexe, E. Martineau, I. Tea, S. Akoka, **JED 3MPL 2009** (Angers, France).
- Communication orale : Développement d'une méthode rapide de RMN 2D quantitative pour l'étude des cellules du cancer du sein, E. Martineau, I. Tea, P. Giraudeau, S. Akoka, **JED 3MPL 2010** (Nantes, France).
- Poster: Fast 2D ^1H INADEQUATE NMR: a tool for precise quantitative analysis of metabolic mixtures, E. Martineau, P. Giraudeau, I. Tea, S. Akoka, **EUROMAR 2010** (Florence, Italie).
- Poster: Metabonomic profiling of cancer cells by quantitative ^1H INADEQUATE 2D NMR, E. Martineau, I. Tea, P. Giraudeau, S. Akoka, **Metabomeeting 2011** (Helsinki, Finlande).
- Poster: Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells, E. Martineau, I. Tea, P. Giraudeau, S. Akoka, **Metabomeeting 2011** (Helsinki, Finlande).

Annexes

1 Cycles de phase complet et partiels de l'INADEQUATE-¹H symétrisée



Cycle de phase	$\phi 1$	$\phi 2$	$\phi 3$
Complet	(0° 180° 90° 270°)	(0° 180° 90° 270°)	(0° 0° 0° 0°)
	(135° 315° 45° 225°)	(135° 315° 45° 225°)	(0° 0° 0° 0°)
	(135° 315° 225° 45°)	(135° 315° 225° 45°)	(90° 90° 90° 90°)
	(270° 90° 180° 0°)	(270° 90° 180° 0°)	(90° 90° 90° 90°)
	(90° 270° 180° 0°)	(90° 270° 180° 0°)	(180° 180° 180° 180°)
	(225° 45° 135° 315°)	(225° 45° 135° 315°)	(180° 180° 180° 180°)
	(45° 225° 135° 315°)	(45° 225° 135° 315°)	(270° 270° 270° 270°)
	(180° 0° 90° 270°)	(180° 0° 90° 270°)	(270° 270° 270° 270°)
		(180° 0° 270° 90°)	
		(315° 135° 225° 45°)	
		(315° 135° 45° 225°)	
		(90° 270° 0° 180°)	
		(270° 90° 0° 180°)	
		(45° 225° 315° 135°)	
	(225° 45° 315° 135°)		
	(0° 180° 270° 90°)		
8 premiers pas	(0° 180° 90° 270°)	(0° 180° 90° 270°)	(0° 0° 0° 0°)
	(135° 315° 45° 225°)	(135° 315° 45° 225°)	(0° 0° 0° 0°)
8 pas (autres)	(0° 180° 90° 270°)	(0° 180° 90° 270°)	(0° 0° 0° 0°)
	(90° 270° 180° 0°)	(90° 270° 180° 0°)	(180° 180° 180° 180°)
4 premiers pas	(0° 180° 90° 270°)	(0° 180° 90° 270°)	(0° 0° 0° 0°)
4 pas (autres)	(0° 90° 90° 180°)	(0° 90° 90° 180°)	(0° 0° 90° 90°)

2 Taux de recouvrement pour la lignée SKBR3

Tableau XIX : Taux de recouvrement α (%) calculé pour chaque ajout et pour chaque métabolite pour la lignée SKBR3.

Métabolites	+ 0,5 mmol/L	+ 1 mmol/L	+ 1,5 mmol/L
Lactate	111,50	94,55	100,52
Alanine	95,03	95,89	100,40
Thréonine	93,22	95,74	100,23
Taurine	93,78	103,59	98,49
Glutathion	97,77	98,98	99,99
Glutamine	95,18	91,36	101,47
Valine	97,19	97,48	100,27
Isoleucine	95,74	97,99	99,99
Proline	94,87	97,79	99,94
Aspartate	92,42	96,19	100,03
Histidine	88,67	95,23	100,33
Sérine	91,55	102,99	98,36
Myo Inositol	103,16	98,53	100,70
Glutamate	98,67	97,90	100,34
Choline	98,01	97,52	100,35

3 Taux de recouvrement pour la lignée MCF-7

Tableau XX : Taux de recouvrement α (%) calculé pour chaque ajout et pour chaque métabolite pour la lignée MCF-7.

Métabolites	+ 0,5 mmol/L	+ 1 mmol/L	+ 1,5 mmol/L
Lactate	94,18	97,24	99,99
Alanine	100,21	99,07	100,24
Thréonine	97,86	98,73	100,06
Taurine	101,05	97,60	100,67
Glutathion	106,35	100,82	100,52
Glutamine	99,55	96,77	100,70
Valine	101,00	98,99	100,35
Isoleucine	100,56	99,31	100,22
Proline	91,63	97,41	99,66
Aspartate	99,67	98,83	100,24
Histidine	77,95	85,08	99,18
Sérine	96,45	96,27	100,54
Myo Inositol	104,50	99,57	100,61
Glutamate	103,84	101,10	100,18
Choline	102,62	99,65	100,37