



*Métabolomique*  
*et biomarqueurs*

## Quantification d'histamine et de son métabolite majeur la 1-méthylhistamine par dérivation pré colonne suivi d'une analyse HILIC-MS/MS. Application à une étude non clinique de microdialyse cérébrale chez le rat.

E. Bourgogne(1,2) • E.-X. Matby(1) • D. Boucaut (1) • H. Boekens(1) • O. Laprèvote(2) • S. Smith(1)

(1)Service DMPK, département de développement non clinique, UCB, Braine l'Alleud, Belgique • (2)Labo. de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire - EA 4461, Fac. de Pharmacie, Paris

### Introduction :

Lors du développement de médicaments du système nerveux central, il est important de mesurer la concentration de neurotransmetteurs comme l'histamine dans le liquide cérébral extracellulaire. La microdialyse est actuellement une méthode couramment utilisée pour l'échantillonnage des niveaux extracellulaires de neurotransmetteurs sur les animaux de laboratoire. L'objectif de notre étude a été de mettre au point une méthode HILIC-MS/MS sensible permettant la quantification d'histamine et de son métabolite majeur la 1-méthylhistamine dans des échantillons de microdialyse. Une simple étape de dérivation pré-colonne utilisant l'anhydride propionique est proposée comme procédure de préparation d'échantillons. Malgré les fortes concentrations en sel (> 150 mM) des microdialysats, la méthode proposée de dérivation pré colonne couplée à la séparation HILIC a permis le dosage de l'histamine et de son métabolite à des concentrations de l'ordre du pg/mL.

### Méthodes :

Suite à l'implantation de la sonde de microdialyse dans le cortex préfrontal du rat, les fractions de microdialyse ont été prélevées toutes les 15 min pendant 8 heures et congelées à -20 ° C dans l'attente de leur analyse par HILIC-MS/MS. La dérivation des amines primaires des neurotransmetteurs a été obtenue à l'aide d'anhydride propionique (50 mM) dissous dans l'acétonitrile. Après 2 heures à 4°C, les échantillons dérivés ont été directement injectés sur une colonne analytique Atlantis HILIC (150 x 2,1 mm, 3,5-μm) en utilisant un gradient haute pression. Les phases mobiles étaient composées d'acétonitrile et formate d'ammonium 20 mM en milieu aqueux. La détection par spectrométrie de masse a été réalisée par SRM sur un triple quadripôle API-5000 (AB/Sciex, Concord, Canada) en mode électrospray positif.

### Résultats :

Les molécules présentant des groupes amines sont facilement protonés en milieu acide et sont dès lors adaptés à une analyse par électrospray-MS. Toutefois, la bonne séparation de l'histamine et de ses métabolites, composés polaires et basiques, par chromatographie en phase inverse est difficile. Nous avons supposé que l'association dérivation pré-colonne suivi d'une

chromatographie HILIC améliorerait la quantification de l'histamine par LC-MS/MS. Cette association permet, sur des colonnes HILIC, une séparation des neurotransmetteurs dérivés des grandes quantités de sels inorganiques des microdialysats suite à l'augmentation du poids moléculaire et de leur lipophilicité. La dérivation des amines primaires par l'anhydride propionique dissous dans un solvant organique combinée à l'approche HILIC présente l'avantage d'éliminer trois étapes longues et laborieuses en chromatographie en phase inverse, le transfert de la phase organique, l'évaporation et la reconstitution des échantillons. La formation d'amides propionique a été réalisée dans des conditions douces et n'exigent aucun autre prétraitement supplémentaire de l'échantillon. La réaction de dérivation est stoechiométrique. La méthode a été validée, en utilisant un aliquot de 10 μL. Elle est linéaire sur plus de 2,5 ordres de grandeur et permet d'atteindre une limite de quantification de 60 et 80 pg / mL respectivement pour l'histamine et 1-méthylhistamine. Ces limites de quantification permettent d'évaluer la cinétique de libération d'histamine et est compatible avec un échantillonnage de microdialysat toutes les 15 min (débit de 2 μL/min). La méthode a été utilisée avec succès au cours d'une étude non clinique. Au cours de cette étude, précision et exactitude de l'histamine, calculées à partir de contrôles qualités sur 3 niveaux (0,167, 1,04 et 15,6 ng /ml n = 14) ont été retrouvés à 8,47 et 108% respectivement. Pour la 1-méthylhistamine, la précision et l'exactitude ont été mesurés à 7,33 et 108% respectivement. Cette méthode avait la sélectivité, la sensibilité, l'exactitude et la précision requise pour évaluer la cinétique de libération d'histamine et de 1-méthylhistamine sur plusieurs centaines de microdialysats de cerveau de rat après perfusion intra veineuse de composés de recherche du système nerveux central.

## Etude de la résistance de la vigne au mildiou (*Plasmopara viticola*) par une approche métabolomique

L. Becker • G. Hamm • V. Carré • J.-F. Muller • P. Chaintbault • LSMCL - Institut Jean Barriol, Metz  
A. Pontaraud • D. Merdinoglu • LGAV - UMR 1131 INRA-ULP, Colmar

La viticulture représente un intérêt économique, gastronomique et culturel en France. Sa préservation est un souci majeur face aux différentes agressions auxquelles elle est soumise. Actuellement, les solutions apportées pour combattre les attaques biotiques ne sont pas sans effets sur l'environnement, le terroir et le développement de nouvelles souches plus agressives. Cependant, tous les cépages ne présentent pas la même sensibilité au pathogène et par conséquent, la sélection par croisement de nouvelles variétés peut constituer une piste alternative au traitement abondant par des produits phytosanitaires. Dans ce contexte, afin de mieux comprendre les mécanismes de défense de la vigne mis en jeu lors de l'infection par le mildiou (*Plasmopara viticola*), nous avons entrepris l'étude métabolique par spectrométrie de masse à très haute résolution d'une population d'hybrides présentant des degrés de résistance variés.

La population étudiée a été obtenue par croisement variétal entre des cépages très sensibles (Cabernet sauvignon) et des espèces très résistantes au pathogène (*Muscadinia rotundifolia*). L'analyse d'extraits méthanoliques de feuilles issues de ces 97 hybrides a été réalisée par électrospray (ESI en mode négatif) couplée à la spectrométrie de masse à très haute résolution (FTICRMS 9,4T). En parallèle, des feuilles issues de la population ont été mises en contact avec le pathogène puis analysées suivant le même protocole que celui appliqué aux feuilles témoin.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à identifier la plupart des espèces détectées au moyen de la spectrométrie de masse en tandem par la méthode SORI-CID. Différentes familles de molécules susceptibles d'être impliquées dans la réponse de la vigne ont ainsi pu être identifiées comme des dérivés d'acides hydroxycinnamiques, des sucres et des flavonoïdes. L'évolution de l'abondance de 23 ions a ainsi été suivie sur l'ensemble de la population en présence ou non du pathogène. Par comparaison des spectres de masse, des différences ont pu être mises en évidence. Compte tenu du grand nombre d'échantillons à comparer, nous avons opté pour une analyse de données par la méthode d'Analyse en Composante Principale (ACP). Celle-ci nous a permis d'observer une ségrégation des échantillons

en fonction de la présence du pathogène. Cependant, cette étude n'a pas permis pour l'instant de dégager une tendance nette entre les degrés de résistances des différentes variétés. Les composés retenus lors de cette étude devront être par conséquent associés à d'autres métabolites et corrélés aux études génétiques de la population.

## Protéomique quantitative ciblée en haute résolution : identification de biomarqueurs dans un modèle murin transgénique de myopathie

C. Dailly(1) • M. Frévet(2) • L. Drouot(2) • S. Ahmed Lecheheb(3) • P. Cosette(3) • O. Boyer(2)

(1)Thermo Fisher Scientific, Courtabouef • (2)Inserm, U905, Univ. de Rouen, Fac. de médecine et de pharmacie • (3)UMR6270 CNRS, Plateforme protéomique de l'IERMP Mont-Saint-Aignan

Ce travail apporte la preuve de principe que la mesure de masse à haute résolution permet l'identification de candidats biomarqueurs mais aussi une analyse quantitative ciblée. La mesure précise du m/z, le temps de rétention du peptide et les informations relatives à plusieurs isotopes et états de charge sont utilisés pour la quantification ciblée et la validation de l'identité du peptide mesuré. En parallèle, les spectres MS/MS acquis en mode « data dépendant » permettent également une identification des peptides par les algorithmes classiques de recherche en banques de données (Sequest, Mascot...) ou par corrélation avec des bibliothèques de spectres MS/MS. La même plateforme analytique est ainsi utilisée pour les approches de recherche et de quantification ciblée de biomarqueurs.

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle murin transgénique (IMHC) d'expression inducible (tet-off) de la protéine H-2Kb du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MCH-I) dans le muscle, induction qui entraîne dans ce modèle le développement d'une myopathie grave. Deux échantillons témoins et trois échantillons IMHC ont été analysés par LC-MS/MS sur un LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Une recherche en banque de données avec Sequest a permis d'identifier 1471 protéines avec un taux de faux positifs <1%. Parmi celles-ci, 415 protéines identifiées avec au moins 5 peptides uniques ont alors été sélectionnées pour une analyse quantitative ciblée à l'aide du logiciel Pinpoint (Thermo Fisher Scientific). Ce travail a permis d'établir une liste finale de protéines candidat biomarqueur parmi lesquelles on identifie des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique témoignant de la physiopathologie de la myopathie induite.

P5-004

## Analyse de la tétrahydrobioptérine et de ses produits d'oxydation par LC-MS

*Nathalie Lévêque • Marine de Person • Fatbi Moussa*

*Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, EA 4041, LETIAM, IUT d'Orsay (Université Paris Sud), France*

La tétrahydrobioptérine (BH4) est synthétisée in vivo à partir de la guanosine triphosphate. La BH4 est le cofacteur de plusieurs hydroxylases intervenant dans la biosynthèse des médiateurs chimiques et des neurotransmetteurs, notamment la phénylalanine-hydroxylase, la tyrosine-hydroxylase et la tryptophane-hydroxylase. Pendant l'hydroxylation de la phénylalanine, par exemple, la forme active BH4 est oxydée en un dérivé quinonoïde instable, la dihydrobioptérine (BH2), qui est immédiatement réduit par des réductases spécifiques en BH4 pour lui permettre de retrouver son activité biologique. Les déficits en BH4 entraînent des troubles neurologiques très graves, mais qui peuvent être dans la plupart des cas corrigés par supplémentation. Les défauts de synthèse en BH4 sont plus fréquents que les défauts de régénération. Le dépistage des déficits en BH4 est actuellement réalisé par HPLC couplée à la détection fluorimétrique, après oxydation chimique différentielle des deux formes réduites circulantes. En effet, seule la forme oxydée est fluorescente. De ce fait, les méthodes actuelles ne peuvent doser que les ptérides « totales ». Or, le dosage différentiel des deux formes réduites, BH2 et BH4 est essentiel au diagnostic différentiel des défauts de synthèse des neurotransmetteurs.

Selon la littérature, l'oxydation par l'iode en milieu acide transforme les deux formes réduites en bioptérine. En milieu basique la BH4 serait transformée en ptéride et la BH2 en bioptérine. Par ailleurs, de nombreuses publications mettent en évidence des résultats contradictoires quant à l'efficacité de l'administration de la BH4 chez les patients atteints d'un déficit congénital. C'est pourquoi nous avons décidé, dans un premier temps, de vérifier les méthodes de dosage de la BH4 par oxydation chimique.

Les résultats que nous avons obtenus, par LC-MS, confirment que l'oxydation de la BH4 et de la BH2 par l'iode en milieu acide conduit à la bioptérine, en moins de 30 minutes. En milieu basique, cependant, les résultats restent ambigus.

## Peptide choice for MRM3 quantification in clinical evaluation of biomarkers

T. Fortin • J.P. Charrier • G. Choquet-Kastylevsky • R&D Immunoprotéomique, bioMerieux SA, Marcy l'Etoile  
A. Salvador • J. Lemoine • UMR 5180 Sciences Analytiques, Université de Lyon

Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry (MRM-MS) coupled to Stable Isotope Dilution (SID) carried out in a triple quadrupole instrument has emerged as a possible core technology for targeted quantification of proteins in complex biological media. Wide multiplexed assays are of great interest for the deciphering of regulation nodes within biological systems and for clinical evaluation of putative biomarkers. We recently documented a new method, namely MRM3, dedicated to the evaluation of putative protein biomarkers of very weak abundance in non-depleted serum. In the present work, we describe the influence of the choice of the peptide on the overall signal-to-noise ratio of MRM3 chromatograms and provide some rules for the optimized selection of highly sensitive MRM3 proteotypic peptides.

Developed on the last generation of hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer, the method consists of: i) Q1 selection at unit resolution of a proteotypic peptide ion; ii) Q2 CID activation of the selected proteotypic peptide ion; iii) Q3 trapping at unit resolution of the most intense fragment ion that defines the SRM transition; iv) activation of this species to generate fragment ions of the second generation; v) mass selective scan of the second generation fragment ions; vi) extraction of specifically defined second generation fragment ions to reconstruct a chromatogram.

Recombinant bacterial, viral and human proteins were spiked into human plasma at concentrations ranging from low nanograms to low micrograms/mL. MRM3 calibration curves were generated from MS3 reconstructed chromatograms selecting, either the most intense fragment ion that defines the optimal SRM channel, or a priori non-optimal transitions for a given proteotypic peptide. MRM3 calibration curves were similarly drawn for other peptides that were not identified as the best responding proteotypic peptide candidates.

The comparison between the limits of quantification/detection (LOQ/LOD) calculated for each MRM3

curve shows that: i) the most sensitive SRM fragment ion trapped in Q3 for MS3 experiment does not systematically provide the optimal s/n ratio for MRM3 quantification; ii) the most sensitive and specific proteotypic peptides for MRM3 experiments may differ from those identified as the best candidates during the development of an MRM assay.

P5-006

## **Characterization of N-linked glycans from human serum by Ion Mobility Time-of-Flight Mass Spectrometry (IMS-TOFMS)**

*Maissa Gaye • Stephen J. Valentine • David E. Clemmer • Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, IN 47405*

Studies of serum glycans using IMS-MS instrumentation have shown that control and diseased samples can be distinguished on the basis of the drift time distribution of a single glycan. Such results are intriguing because diagnosis of cancer at an earlier (asymptotic) stage is vital to ensure the best survival rate. In this study, a glycomic approach for the discovery of cancer biomarkers is adopted. Serum glycans from pooled human male AB plasma have been characterized. N-linked glycans released from a pooled 10  $\mu$ l aliquot of human serum have been analyzed using multi-dimensional ion mobility time-of-flight mass spectrometry (IMS-TOF-MS) techniques. Mobility selection of specific ions by ion activation allows the distinguishing of gas-phase conformers and separate isomers in drift time distributions. High-throughput IMS-MS is currently being used to resolve a greater number of glycans in human serum samples. A goal in characterizing a complete set of N-linked glycans from blood serum samples from population studies is the discovery of disease-specific glycan isomers.

P5-007

## **Essai de mise au point pour la séparation des cofacteurs et des nucléotides dans les plantes**

*Florence Guérard • Guillaume Tcherkez*

*Plateforme Métabolisme Métabolome, IFR87 La Plante et son Environnement, Institut de Biologie des Plantes, Univ. Paris Sud 11, Orsay, France*

L'optique du présent travail est de mettre au point le protocole d'extraction et de quantification des cofacteurs et des pyridines-nucléotides des plantes, par le biais d'une séparation par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à temps de vol. Cette mise au point technique a pour objectif biologique de pouvoir réaliser des profils métaboliques (teneurs relatives en cofacteurs) et ainsi de comparer des groupes d'échantillons ou des lignées de plantes (sauvage et mutants par exemple). La préparation des échantillons met tout d'abord en jeu une extraction perchlorique, puis la purification sur des colonnes SPE afin de séparer les cofacteurs des sucres, présents en quantité importante dans les échantillons végétaux. Cette étape vise certes à prépurifier les cofacteurs mais aussi à éliminer les sucres de l'extrait, qui pourraient altérer la source du spectromètre de masse. Les cofacteurs sont séparés par chromatographie liquide, sur une colonne Acquity UPLC suivant un gradient acétate d'ammonium/méthanol, couplée à un spectromètre de masse microTOF II (Bruker Daltonics). Bien que présentant un avantage évident (un seul appareillage de détection et de quantification pour tous les cofacteurs : le spectromètre à temps de vol), les difficultés inhérentes au couplage LC-TOF sont nombreuses : génération d'adduits, fragmentations, ionisation plus ou moins difficile, etc. Ces difficultés ainsi que les limites de cette technologie sont succinctement exposées.

## Comparaison des sources APPI, ESI et APCI en couplage LC-MS en vue de réaliser une étude lipidomique sur des promastigotes de *Leishmania donovani*

L. Imbert(1) • D. Libong(1) • M. Gaudin(3,4,5) • D. Touboul(3) • P.M. Loiseau(2) • O. Laprèvote(3,4)  
P. Chaminade(1)

(1)IEA404 Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, Fac. de Pharmacie, Châtenay-Malabry • (2)UMR 8076 «Biomolécules Conception, Isolement et Synthèse», Fac. de Pharmacie, Univ. Paris-Sud XI, Châtenay-Malabry • (3)Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette • (4)SEA 4463 Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, Fac. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Univ. Paris Descartes, Paris • (5)Division Métabolisme, Technologie Services, Orléans

Les lipides sont des molécules de grande importance dans le fonctionnement cellulaire. La majorité des lipides constitue la membrane cellulaire dont l'intégrité est vitale pour la cellule, mais interagit également avec des protéines, en plus d'être une réserve d'énergie rapidement accessible. L'analyse des lipides peut se faire de deux principales manières : soit en chromatographie en phase inverse, où les espèces moléculaires appartenant à différentes classes de lipides sont analysées par interactions avec leurs chaînes hydrophobes ; soit en chromatographie en phase normale, où les lipides sont séparés par classe par interactions avec leurs têtes polaires. Cette dernière, couplée à la spectrométrie de masse, permet une exploration approfondie du lipidome. Nous présentons ici le couplage d'une séparation en phase normale, faisant intervenir une phase stationnaire en silice monolithique, avec un spectromètre de masse, afin d'analyser finement les espèces moléculaires de chaque classe. Notre objectif final est d'étudier la distribution des lipides membranaires de promastigotes de *Leishmania donovani* soumis à un traitement par la miltefosine. Ce médicament constitue le premier traitement oral des leishmanioses, il est également actif contre les souches résistantes aux antimonies. Son mécanisme d'action reste encore peu connu, et des études ont précédemment montré l'influence de la miltefosine sur les lipides, notamment les phospholipides. Le spectromètre de masse à notre disposition est un triple quadripôle muni des trois sources, électrospray (ESI), ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). La première étape de nos travaux constitue une comparaison de ces sources en terme d'ionisation et de sensibilité sur les classes lipidiques que nous séparons en chromatographie, afin de choisir idéalement la meilleure source pour l'analyse des lipides de parasites, en effectuant un traitement statistique des données à l'aide d'outils chimiométriques. Ces travaux sont réalisés sur un mélange de standards : squalène, cholestérol, triacylglycérol, acides gras libres, cerebrosides, phosphatidylglycerol, -ethanolamine, -inositol, -serine, -choline, lysophosphatidyl-ethanolamine, -choline, cardiolipide et

sphingomyéline. L'analyse fait intervenir deux colonnes monolithiques, avec un gradient de solvants ternaire, constitué d'un mélange d'heptane, acétate d'éthyle, acétone, isopropanol et eau ultrapure supplémentées de faibles quantités d'acide acétique et d'éthanolamine. Cette technique permet la séparation de l'ensemble des classes lipidiques précédemment décrites en 38 minutes. Les paramètres de chaque source ont été optimisés en polarité positive et négative, et une moyenne a été réalisée, sur plusieurs segments si nécessaire. Puis nous avons analysé une gamme allant de 0,05 à 100µg/mL pour chaque lipide sur les trois sources. Nous avons ainsi pu déterminer l'adéquation d'un modèle linéaire pour décrire la réponse du spectromètre, la sensibilité, les limites de détection et de quantification (LOD et LOQ), la répétabilité et reproductibilité intermédiaire pour chaque lipide sur chaque source. Les trois sources présentent une réponse linéaire pour toutes les classes de lipides. L'APPI est le mode d'ionisation le plus sensible sauf pour les lipides les plus polaires. Les spectres source obtenus en APPI présentent pour certaines classes de lipides des fragmentations importantes, rendant difficile la quantification et le traitement de données par chimiométrie. L'ESI est le mode d'ionisation le moins sensible excepté pour les lipides polaires. L'APCI, quant à elle, offre des performances moyennes pour tous les lipides. En ESI et APCI les ions majoritaires sont principalement des ions  $[M+H]^+$  et  $[M-H]^-$ . Les trois sources ont une répétabilité ainsi qu'une reproductibilité intermédiaire satisfaisantes (inférieures à 20%) sur l'ensemble des lipides.

L'APCI peut donc être utilisée pour une première approche lors d'une étude lipidomique, afin d'explorer un échantillon pas ou peu connu. Dans notre cas, de précédents travaux au sein du laboratoire ont montré une forte influence de la miltefosine sur la distribution des espèces moléculaires de lipides polaires, et de certains lipides apolaires. La complémentarité entre les sources ESI et APPI augmente le volume de données et permet une évaluation plus pertinente des profils lipidiques lors de l'analyse chimiométrique des données LC/MS.

## Approche métabonomique pour l'obtention des signatures urinaires des différents xenobiotiques par LC-MS

Agneta Kiss(1) • Marie-Magdeleine Flament-Waton(1) • Jacques de Ceaurriz(2) • Cécile Cren-Olivé(1)

(1)Service Central d'Analyse (SCA), UMR 59 CNRS, Solaise, France • (2)Agence Française de Lutte contre le Dopage (AFLD), Département des analyses, Châtouay-Malalrey

Le dopage est un phénomène généralisé à toutes les disciplines et tous les niveaux. Il est aujourd'hui reconnu comme un danger pour la société et la santé des athlètes. L'amplitude et l'évolution de ce phénomène demande le développement urgent des techniques de détection plus rapides et plus fiables. Une des principales difficultés des laboratoires de contrôle est l'émergence continue des substances et des méthodes dopantes. Les nouveaux composés présentent les mêmes propriétés dopantes, mais leur structure est légèrement modifiée et, par conséquent, ils ne peuvent pas être détectés par les moyens traditionnels.

Afin de relever ce défi, nous avons choisi une approche métabonomique. Contrairement aux méthodes utilisées à l'heure actuelle, cette approche n'est pas axée sur la détection des substances illicites, mais sur leurs effets sur le métabolisme de l'athlète. Les empreintes moléculaires des échantillons d'urine ont été obtenues par UPLC-TOF en mode positif et négatif. Avant l'analyse, les paramètres de détection (températures de désolvatation, tension capillaire et tension de cône) et les conditions chromatographiques (la pente du gradient, la température et la taille des particules) ont été optimisés pour obtenir les signatures moléculaires les plus riches en informations. Les effets des modificateurs de phase (formate d'ammonium, acétate d'ammonium, acide trifluoroacétique et ammoniac) sur l'efficacité de l'ionisation positive ont été également testés. Ensuite, quatre techniques de préparation de l'échantillon ont été évaluées: la précipitation des protéines, l'infusion directe, la centrifugation et la filtration. Une fois que les conditions ont été optimisées, 45 échantillons dont 20 provenant d'athlètes testés positifs par l'AFLD ont été analysés dans une même série. Les empreintes moléculaires obtenues ont ensuite été traitées par analyse multivariée (APC et OPLS-DA) en utilisant le logiciel MarkerLynx (Waters) afin de sélectionner des biomarqueurs potentiels. Un système de contrôle de la qualité a été mis en œuvre afin de traquer toute dérive due aux instruments. Les résultats ont montré que l'utilisation de l'acide formique et un long gradient sont favorables à l'obtention des empreintes moléculaires et que la filtration des échantillons avant l'injection est cruciale afin d'éviter la dégradation de la colonne.

La comparaison des signatures urinaires a montré que la métabonomique pourrait être un outil complémentaire pour obtenir des informations et des profils riches à partir de l'urine. Les biomarqueurs potentiels sont actuellement à l'étude. Cette méthode pourrait être, à l'avenir, adaptée aux questions de dopage ...

## Development and evaluation of an accurate mass LC/MS/MS spectral library for metabolomics

Steve Fischer • Theodore Sana • Cindy Lai • Stefan Jenkins • Frederic Metral

Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA

### Introduction

The determination of compound identities is a crucial analytical problem for metabolomics scientists using LC/MS detection. Without compound identities it is impossible to make biological sense of study results. Many compounds observed to be differentially expressed in metabolomics studies are known primary metabolites. Easily identifying these known metabolites would facilitate metabolomics analysis. One accepted way to identify compounds is to compare observed MS/MS spectra of the unknown to a library of MS/MS spectra of metabolite standards. In this poster we present the creation of an accurate mass MS/MS library of common metabolites using three different collision energies and test the library's utility by analyzing MS/MS spectra of unknown metabolites in plasma, urine and yeast sample extracts.

### Method

The MS/MS spectral library was created by analyzing metabolite standards on a Q-TOF by either flow injection analysis or chromatography. An electrospray source was used and data was collected on all molecules in positive and negative ion mode. Only the [M+H]<sup>+</sup> or [M-H]<sup>-</sup> ion was used to produce MS/MS spectra. Targeted MS/MS analysis was performed on each ion at three collision energies; 10, 20 and 40 eV. Collected spectra were filtered; only ions in the spectrum that meet both a minimum required absolute count threshold and a minimum percentage of the strongest ion signal threshold were included in the spectral library entry. Ion values entered into the library were set to the calculated accurate mass value based on empirical formula.

### Preliminary data

An initial MS/MS library has been built following the above described method. Data for the library was acquired with the quadrupole filter set to transmit a peak width of 1 amu; only the isotope selected is transmitted and not the adjacent naturally occurring isotopes. As one would expect not all compounds ionize in positive and negative ion mode. In addition, some compounds ionize by APCI but not electrospray. Only spectra acquired from ESI are included in this library. The use of three collision energies is due to the reality that no single collision energy will fragment all metabolites and

yield a useful ion pattern.

For example, dihydrosphingosine (302.30539) in positive mode, 10 eV yields six observable ions (302.30526, 284.29453, 266.28392, 254.28393, 60.04525). At 40 eV the six largest ions are (81.07021, 69.07039, 67.05468, 60.04504, 55.05486, 43.05446). Clearly these two spectra have dramatically different fragmentation patterns, and in the case of 40 eV there is relatively little useful information for compound structure. A negative ion example is 4-Chloro-3-sulfamoylbenzoic acid (223.96280). The 20 eV collision energy setting produces two major ions (112.18359, 68.99535). At 40 eV, the major ions are (69.99479, 79.98068). The two collision energies both give useful but different information. Clearly there is no single energy for all molecules.

The companion MS/MS library search routine is capable of forward (match all ions in unknown spectra) and reverse (match only ions in library spectra) searches. We have found that even on standards the reverse search gives a better match score because background ions in the unknown spectra lower the forward match score. Setting proper spectral filter thresholds can help with this issue. This problem is made worse when MS/MS spectra from complex matrices are searched. We will show this effect by searching data from plasma, urine and yeast sample extracts.

### Novel Aspect

A three collision energy, accurate mass LC/MS/MS spectral library for metabolite identification for metabolomics is developed and evaluated.

## Caractérisation des lipides cutanés de surface par HT-GC/MS

R. Michael-Jubeli(1) • J. Bleton(2) • D. Libong(1) • A. Baillet-Guffroy(1)

(1)Laboratoire de chimie analytique, Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud 11, EA4041, Faculté de pharmacie, Université Paris-Sud 11, Chatenay-Malabry, France • (2)LETIAM, Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud 11, EA4041, IUT d'Orsay, France.

Les lipides cutanés de surface (LCS) résultent de l'activité des glandes sébacées et de la desquamation de l'épiderme. D'une part, les glandes sébacées produisent du sébum composé de trois classes lipidiques : squalène, cires et triglycérides. D'autre part, l'élimination continue des cellules cornées de l'épiderme libère, à la surface de la peau, des stérols libres ou estérifiés, et des triglycérides qui subissent ensuite l'action des lipases de la flore de surface ou des estérases libérées par la kératinisation. Les LCS participent au maintien du bon fonctionnement de la barrière cutanée et à la protection de la peau contre le vieillissement.

Notre objectif est d'obtenir une empreinte de la composition du film hydrolipidique afin d'établir des comparaisons inter zones corporelles ou inter individuelles. La première étape consiste à caractériser précisément les LCS, et donc développer un protocole analytique permettant d'identifier individuellement le maximum de composés en préservant leur structure initiale.

La technique analytique choisie est la chromatographie en phase gazeuse, à haute température, couplée à la spectrométrie de masse.

Les LCS sont recueillis sur le front des volontaires par absorption sur des papiers filtres. Après extraction à l'éther, ils sont silylés à froid puis repris dans le solvant d'injection. L'échantillon est injecté en mode « On-column », et les composés sont séparés dans une colonne à phase stationnaire peu polaire.

La plupart des composés ont pu être identifiés précisément en utilisant la spectrométrie de masse en impact électronique. Pour deux classes de molécules, les esters de cholestérol et les triglycérides, l'ionisation chimique à l'ammoniac s'est avérée nécessaire pour déterminer la masse moléculaire.

Les composés identifiés appartiennent à cinq classes lipidiques:

- Les acides gras libres: saturés et insaturés de C10 jusqu'à C20.
- Les hydrocarbures: le squalène (marqueur de l'activité sébacée) et ses produits d'oxydation.
- Les stérols: le cholestérol (marqueur de l'épiderme) et les esters de cholestérol présentant des chaînes d'acides gras saturés et insaturés de C14 à C20.

- Les cires : saturées et insaturées (dans lesquelles l'insaturation peut être portée par la chaîne acide, la chaîne alcool ou les deux) de C28H56O2 jusqu'à C40H80O2.

- Les glycérides, répartis en trois sous-classes :

- a) monoglycérides: monomyristine, monopalmitine, monooléine, monostéarine
- b) diglycérides: saturés et insaturés, de C34H66O5 jusqu'à C39H76O5
- c) triglycérides: saturés et insaturés, de C45H70O6 jusqu'à C54H104O6, généralement mixtes.

Les acides gras dominants dans les différentes classes lipidiques identifiées sont l'acide palmitique (C16:0) et l'acide sapiénique (C16:1Δ6) qui présente une activité antibactérienne importante dans l'équilibre du film physiologique de la peau.

Dans un deuxième temps, une étude quantitative des LCS en utilisant la normalisation interne a été effectuée. Les LCS ont été prélevés à partir de six zones corporelles du même volontaire. Le pourcentage de chaque classe lipidique dans le film hydrolipidique a été déterminé pour chaque zone corporelle étudiée. La réponse de chaque classe a été appréhendée par des facteurs de réponse obtenus à l'aide de standards représentatifs.

La méthode mise au point permet de comparer les profils de LCS et de déterminer les classes lipidiques qui présentent des différences marquées. Les informations obtenues pourraient être utiles dans la prévention et le traitement de certaines maladies cutanées.

## Quantitative IC-MS/MS analysis of nitrogen mustard hydrolysis products as ethanolamines in water samples

Leo Wang • Bill Schmutz • Dionex Corporation, Sunnyvale, CA

Charles Yang • Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA

Claude Netter • Dionex France, Vieux-la-Bretagne

### Introduction:

Ethanolamines have been used as biological and environmental markers for nitrogen mustards (HN1, HN2 and HN3) to measure potential exposures. Nitrogen mustards readily react with biomolecules such as DNA and proteins and are found in urine as hydrolysis products: N methyldiethanolamine (MDEA), N ethyldiethanolamine, and triethanolamine.

Reported methods for ethanolamines analysis include GC or LC separation and MS detection. GC-MS methods involve labor intensive derivatization which limits throughput, and reported LC methods suffer from poor retention with reverse phase (RP) columns.

This study describes an IC-MS/MS method for quantitative analysis of ethanolamines in water samples. Ion exchange columns overcome the poor retention of RP columns and tandem mass spectrometry was used to provide sensitive and selective detection. Isotope labeled internal standards were employed to ensure quantification accuracy.

### Method:

A cation exchange column was used for this analysis providing sufficient retention for all target analytes and adequate separation of analytes from interferences. Chromatographic separation was achieved by applying a multi step methansulfonic acid (MSA) gradient. The MSA mobile phase was electrolytically suppressed and converted to water before entering the mass spectrometer. Matrix components, such as sodium and potassium, were diverted to waste to maintain MS interface cleanliness. Selected reaction monitoring (SRM) was used for selective and sensitive detection. Each analyte SRM was tuned and evaluated for specificity of quantification. A stable-labeled ethanolamine standard, diethanolamine-d8, was added to all water samples to serve both as a surrogate for recovery and as an internal standard for quantification.

### Preliminary Data:

Chromatographic separation of all analytes from matrix ions (6 common cations) was achieved within 18 minutes. Method performance was evaluated with respect to linearity, accuracy, precision and detection limits. Analysis of a simulated matrix containing 20 ppm sodium and potassium was used to evaluate

matrix effects and showed no significant alteration of retention time or detection sensitivity. Correlation of determination was achieved for all analytes from 5 ppb to 200 ppb with  $R^2 > 0.999$ . Precision measured by %RSD was within 3.64% to 6.1%. Method detection limits were statistically calculated and were less than 1 ppb (0.57 ppb to 0.96 ppb).

### Novel Aspects:

First IC-MS/MS method with improved separation and sensitivity for quantitative ethanolamines analysis.

P5-013

## **Metabolomic signature of the dietary exposure of poultry to a brominated flame retardant, hexabromocyclododecane (HBCD).**

*B. Sabbarb(1) • A. Fournier(2,4) • J. Ratel(1) • P. Berge(1) • P. Blinet(1) • C. Jondreville(2) • C. Feidt(2)*

*B. Le Bizec(3) • P. Marchand(3) • E. Engel(1)*

*(1)INRA, UR370 QuaPA, Saint Genès Champagnelle, France • (2)Nancy University, INRA, UR AFPA, Vandœuvre-lès-Nancy, France • (3)ONIRIS, LABERCA, Nantes, France • (4)ITAVI, INRA, URA, Nouzilly, France*

The aim of this work was to study in laying hens the feasibility of the detection of previous animal exposure to pollutants, particularly through feeding. An emergent pollutant, hexabromocyclododecane (HBCD), was selected for this study because this molecule has been increasingly used in recent years as a flame retardant as a substitute for other prohibited molecules (PCBs, PBDEs). The acute toxicity of HBCD is low and its chronic toxicity is poorly documented, hence the lack of toxicological reference value and thus of guide values for environment and foods. The fate and the toxicity of HBCD in the food chain should thus be studied. A target tissue (adipose tissue) from laying hens was analysed to identify volatile organic compounds (VOCs) which are generally produced by animal metabolism and to measure the variations of their concentration in the animal tissue in response to pollutant exposure. The potential of these variations to constitute a metabolomic signature of this exposure was evaluated. These VOCs have also been used to monitor the kinetics of tissue HBCD contamination and decontamination.

To test these hypotheses, 2 groups of laying hens were fed a similar feed either non contaminated (control group) or contaminated with HBCD. For this second group of layers, the protocol included a contamination phase with HBCD (21 days) followed by a decontamination phase without HBCD (18 days). Abdominal fat of animals sequentially slaughtered throughout the experiment was collected and analysed by SPME-GC-MS for VOCs and by LC-MS-MS for HBCD. The results show that VOC metabolic signatures could discriminate the non contaminated layers from the layers contaminated with HBCD. VOC biomarkers of the contamination were followed during the phases of contamination and decontamination. These results are discussed in view of the actual levels of HBCD found in the adipose tissue by the current reference analytical techniques. In the context of the regulatory control of meat products safety, the metabolomic signatures obtained by VOC analysis could be used to screen and to select the most relevant pollutants commonly found in animal production chains prior to their quantification by reference analytical methods.

This study was supported financially by the European

Commission through the BChain, research programme "Developing a Stakeholders' Guide on the vulnerability of food and feed chains to dangerous agents and substances" (contract no. FP6 - 518451, 2006; available at <http://www.sigmachain.eu>)

## Prélèvement, préparation et stockage des urines : impacts sur l'analyse métabolomique par spectrométrie de masse.

Roux A.(1) • Xu Y.(1) • Madalinski G.(1) • Heilier J.F.(1) • Ezan E.(1) • Tabet J.-C.(2) • Junot C. (1)

(1) Commissariat à l'Energie Atomique, DSV/IB/Tec-S/SPI, Laboratoire d'Etude du Métabolisme du Médicament, Gif-sur-Yvette, France

(2) Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique, CNRS UMR 7613, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

La métabolomique est une méthode d'exploration très générale des organismes vivants qui décrit de façon exhaustive les différents métabolites (molécules de faible poids moléculaire) présents dans les fluides biologiques ou dans les tissus. Utilisée dans différents contextes d'études physiologiques, elle permet de comprendre l'impact des perturbations étudiées, tant sur le plan génétique qu'environnemental (nutrition, toxicologie, pharmacologie...).

Pour des analyses toxicologiques ou pharmacologiques par exemple, l'urine est plus particulièrement utilisée car elle correspond à la fin de la chaîne de détoxification et d'élimination de l'organisme et son recueil est aisé et non invasif. On peut ainsi réaliser des prélèvements ponctuels ou sur un laps de temps déterminé pouvant aller jusqu'à 24h ou 48h. Cependant l'urine est un fluide biologique complexe dont les conditions de prélèvement et de stockage peuvent modifier la composition (contamination bactérienne, dégradation des métabolites...). Il a été ainsi démontré que les empreintes protéiques [1] et métaboliques [2, 3] (par RMN) des urines sont affectées par les conditions de préparation et/ou de stockage des urines, aboutissant ainsi à des recommandations pour ces étapes critiques de l'analyse du protéome [4] ou du métabolome [5] par RMN. Or actuellement, la spectrométrie de masse est une technique d'analyse de plus en plus utilisée en métabolomique, et l'impact de ces différents facteurs n'a pas été démontré sur des empreintes métaboliques obtenues par cette méthode.

Le but de cette étude est de déterminer les meilleures conditions de prélèvement, préparation et stockage pour les analyses métabolomiques par spectrométrie de masse, et de mesurer l'impact de la contamination bactérienne sur les concentrations de différents métabolites. Pour ce faire plusieurs aliquots ont été préparés à partir d'un pool d'urines humaines fraîches, afin de tester plusieurs concentrations en conservateurs (azide de sodium NaN<sub>3</sub> à 0,1, 1 et 10 mM et acide borique à 2, 20 et 200 mM) et plusieurs températures (température ambiante et 4°C). Des prélèvements ont été réalisés toutes les 4h pendant 24h puis analysés par UPLC/MS et spectrométrie UV à 620nm pour évaluer la contamination bactérienne et la mettre en corrélation

avec les variations des différents métabolites. Nous présenteront lors du congrès les résultats de cette étude.

## Analyse des Sphingolipides d'extraits d'*Arabidopsis thaliana* par LC-ESI-MS-MS

Frédérique Tellier • Alessandra Maia-Grondard • Diana Molino et Jean-Denis Faure

Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318, INRA-AgroParisTech, route de Saint-Cyr, Versailles, France

Les sphingolipides sont des composants structuraux essentiels des membranes. Ce sont des biorégulateurs de nombreux processus intra ou inter cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la signalisation et la mort cellulaire.

Leur squelette de base est un amide, appelé céramide, obtenu entre un amino-alcool à longue chaîne (18 atomes de carbone) et un acide gras à longue chaîne (16 à 26 carbones). Chez les plantes, les céramides subissent ensuite de nombreuses réactions enzymatiques (greffage de sucres et/ou de phosphates, hydroxylation, insaturation) pour conduire à une grande diversité de composés (plus de 160 identifiés actuellement) regroupés en 4 classes, les céramides, les hydroxycéramides, les glucosylcéramides et les glycosyl inositol phosphorylcéramides.

Les sphingolipides sont généralement analysés après hydrolyse, puis dérivation des chaînes, amine et acide, libérées. Depuis récemment, les biologistes de notre unité s'intéressent à leurs voies de biosynthèse, il était donc essentiel de développer au sein de notre plateforme de chimie du végétal, une analyse performante de ces composés dans leur intégrité. Elle est effectuée par LC-ESI-MS-MS [1,2]. Comme la plupart des sphingolipides sont présents en faible quantité, nous utilisons le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Leur identification repose sur la chaîne amine qui possède quatre structures différentes, chacune donnant un ion spécifique. La quantification est réalisée par un étalon interne différent pour chaque classe.

Nous vous montrerons nos premiers résultats obtenus sur l'étude d'une lignée sauvage d'*Arabidopsis thaliana* comparée à une lignée mutée dans une voie de biosynthèse des céramides.

[1] J. Markham, J. Li, E. Caboon and J. Jaworski, *J. Biol. Chem.*, 2006 :281 : 22684-22694.

[2] J. Markham and J. Jaworski, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007 :21 : 1304-1314.

## Application de la Source DESI sur PK Analysis Utilisé DBS

Batyi Xue(1) • Sandra Alvesa • Patrick Soubayrol(2) • Jean-Claude Tabet(1)

(1)Laboratoire de Chimie Biologique Organique et Structurale, UMR-CNRS 7201, UPMC Paris Université, Paris, France

(2)Sanofi-aventis recherche & développement, Metabolism and Pharmacokinetics, Chilly-Mazarin, France

L'application de la méthode dried blood spots (DBS, spots du sang séché) a déjà montré de nombreux avantages aux analyses en pharmacocinétique (PK, pharmacocinétique). Contrairement aux méthodes classiques utilisées, la méthode DBS exige un petit volume de sang prélevé qui est ensuite déposé sur un papier absorbant donc la variation de mesures d'animal à animal peut être évitée en prenant une série d'échantillons du même animal, et ainsi améliore les résultats de PK. De plus, la préparation, le stockage et le transport des échantillons sont largement facilités. Actuellement, le DBS est analysé par LC-MS après plusieurs étapes d'extraction. Pour augmenter la rapidité d'analyse et son débit, de nombreuses techniques permettant l'analyse directe de DBS se sont développés. Ici, nous allons présenter l'analyse directe de DBS par desorption electrospray ionisation (DESI). DESI est un mode d'ionisation ambiante qui permet d'analyser les échantillons solide ou liquide déposé sur la surface sans préparation des échantillons. Dans notre cas, nous pouvons analyser les échantillons de DBS avec comme surface le papier absorbant donc toutes étapes de préparation (punch, extraction, HPLC) sont évités. Les expériences sont conduites sur un support et source DESI (Prosolia) couplé avec LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher) en très haute résolution (HRMS). Notre étude préliminaire, menée sur un médicament courant et un médicament synthétisé par Sanofi, se focalise sur les préparations des échantillons DBS, l'optimisation des paramètres de DESI (choix du solvant et étalon interne (EI)), les différentes façons d'incorporer l'EI pour terminer des courbes d'étalonnage pour analyse semi-quantitative. Les résultats préliminaires de semi-quantifications ont montré que les facteurs limitants de quantification sont les problèmes de répétabilité dus aux variations dans la préparation des dépôts manuels, ou des conditions expérimentales de DESI. La courbe d'étalonnage est tracée pour la concentration de 1 ng/ $\mu$ l à 50 ng/ $\mu$ l.