UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

UMR 1253 – iBraiN, Equipe 3 IDeALS

THÈSE présentée par :

Jérémy MONTEIRO

soutenue le : **11 décembre 2024**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

Développement de méthode de quantification pour la métabolomique clinique

THÈSE dirigée par :

Mme. NADAL-DESBARATS Lydie	MCU, INSERM 1253, Université de Tours
M. EMOND Patrick	PU-PH, INSERM 1253, CHRU Tours, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme. PUJOS-GUILLOT Estelle	IR-HDR, INRAE 1019, Université Clermont-Auvergne
M. MARTIN Jean-Charles	DR, INSERM 1263, INRAE 1260, Université Aix-Marseille

---

JURY :

Mme. NADAL-DESBARATS Lydie	MCU, INSERM 1253, Université de Tours
M. EMOND Patrick	PU-PH, INSERM 1253, CHRU Tours, Université de Tours
Mme. PUJOS-GUILLOT Estelle	IR-HDR, INRAE 1019, Université Clermont-Auvergne
M. MARTIN Jean-Charles	DR, INSERM 1263, INRAE 1260, Université Aix-Marseille
M. THIBONNET Jérôme	PU, UR 7502, Université de Tours, président
Mme. DAMONT Annelaure	IR, CEA-INRAE, Université Paris-Saclay
Mme. LETERTRE Marine	MCU, CNRS 6230, Université de Nantes

Parce que savoir
qu'on n'est jamais
seul est rassurant ...



Remerciements

Je tiens à remercier les établissements qui ont permis la réalisation de cette thèse,

Merci à l'université de Tours, à l'UMR 1253 iBraiN, à sa directrice Mme Belzung, et plus spécialement à l'équipe 3 (passée & présente) et à la PST-ASB, devenu UMS-61. Sans eux, je n'aurai pas pu réaliser mes travaux de thèse dans d'aussi bonnes conditions.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail,

Merci à Estelle PUJOS-GUILLOT, directrice scientifique de la PFEM (Plateforme d'Exploration du Metabolisme) de l'INRAe de Clermont-Ferrand ; à Jean-Charles MARTIN, directeur de recherche au sein de l'université Aix-Marseille et responsable scientifique des plateformes CriBiom et BIOMET ; à Annelaure DAMONT, ingénieure de recherche du CEA de Saclay, au sein de la plateforme SPI (Pharmacology and Immunoanalysis unit) ; à Marine LETERTRE, maître de conférences de l'université de Nantes , au sein de l'équipe MIMM du laboratoire CEISAM ; à Jérôme Thibonnet, professeur de chimie à l'université de Tours, au sein des UFR « Sciences et Techniques » et « Sciences Pharmaceutiques » .

J'ai la chance de croiser la plupart d'entre vous au RFMF ou à MTH et j'espère continuer à vous y croiser, à collaborer avec vous et je compte sur vous pour continuer à me corriger (si nécessaire).

Ce travail n'aurait évidemment pas été possible sans mes encadrants, Patrick EMOND et Lydie Nadal-DESBARATS.

Patrick je vous remercie de m'avoir transmis votre passion pour les sciences et surtout, la métabolomique. « L'intention est primordiale » et « elle n'est pas belle l'histoire ? », durant nos réunions resteront gravés. J'espère que votre « petit padawan » est au moins devenu, si ce n'est un Jedi, un « grand padawan » !

Lydie, je n'ai pas assez de mots pour te dire remercier… J'ai cherché une expression de derrière les fagots pour te remercier mais je n'ai pas trouvé… alors je souhaite te dire merci, merci du fond du cœur pour TOUT. Il y aura eu des hauts et des bas de chaque côté et je suis heureux que l'on ait pu compter l'un sur l'autre. J'espère que notre collaboration n'en est qu'à ses débuts et que je pourrais continuer à apprendre avec toi.

Je remercie l'ensemble de l'étage n°4,

Merci pour l'accueil ! Nous ne sommes plus dans la même équipe et j'ai vite déménager au -1 mais je n'oublie pas les moments passés ensemble ! Merci à La Boboooooo (Sylvie B.) & à la Zuzu (Zuhal G.) pour votre aide, pour vos rires et pour avoir pris le temps de relire ma thèse. Merci à Julie T. pour ton aide avec l'expérimentation animale et les saisines. Merci à Laurent G. pour ton franc-parler, tes discussions et tes connaissances. Merci à Clovis T. et Sophie. S. de m'avoir montré à quel j'étais nul aux mots croisés… tout en rendant les pauses du midi plus vivantes !

Antoine d.M., merci d'avoir le deuxième « hurluberlu » au milieu de ces biologistes. Après 3 ans et quelques mois, on arrive à la fin du chemin ! Je suis content d'avoir pu changer le bureau des doctorants d'iBraiN avec ton aide. Finalement, la thèse n'est qu'un *escape game* parmi tant d'autres… et nous les avons tous gagné jusqu'ici !

Je remercie l'équipe métabo.,

Merci Frédéric M. tu toujours nous rappeler à l'ordre pour la pause-café matinale, qui nous permettait à tous de souffler. Merci Gabrielle C. de m'avoir aidé sur le traitement de données. Merci

à PrisCHilaaa V.C. pour ta collaboration sur les projets (même si tous n'ont pas abouti) et surtout, pour ta bonne humeur, qui nous ramenait le soleil *dou brasil* dans notre sous-sol obscur. Merci à Hélène B. d'avoir pris le temps de relire mon travail et de m'aiguiller, malgré un emploi du temps très serré et à Diane D.R. pour ta gentillesse et pour ton aide, là aussi malgré un emploi du temps chargé. Merci Antoine L. de m'avoir laissé tes bébés et aidé sur mes projets de recherche. Sans toi, cette thèse n'aurait pas été la même. Chef Antoine, tu es mon 3ième encadrant. Merci à Adeline O. & au Dr. Camille D., plus que des collègues, vous êtes mes amies. Malgré ce sobriquet de « fœtus thésard » … Votre soutien, professionnel comme personnel, nos blagues (qui exaspèrent chef Antoine) et notre « coopération » a fait que je ne suis jamais rentré (TITRE) à reculons dans notre bureau.

Je remercie mes ami.e.s, que ce soit du basket d'Artix, du lycée Jacques Monot, de l'école d'ingé ENSIACET, de l'ENSIIL, de Rouen et de Tours,

Je ne peux pas citer tous vos noms mais vous vous reconnaitrez. Merci d'avoir été là, que ce soit pour me soutenir, vous inquiétez ou me faire garder les pieds sur terre. Tous ces bons moments passés ensemble ont été primordiaux pour moi, pour tenir malgré les coups durs. Je conseille à tout le monde de faire des weekends loin de tout ou un road trip de 3 semaines entre copains à l'autre bout du monde, ça permet de remettre énormément de chose en perspective.

Merci à Florian M. et Emilie R. pour les bons moments ! Que ce soit en bar en pleine semaine ou en mode daron un dimanche midi, vous avez été un bol d'air frais.

Merci aux docteur(e)s Teo N., Camille D. et Tony B., avoir des amis qui soient déjà passés par une thèse et qui comprennent la situation a été rassurant mais aussi une inspiration.

Merci à Olivier F., Raphaëlle F.-B., Romain B. et Chloé B., j'ai toujours pu compter sur vous, peu importe la raison ou le moment. Vous avoir à mes côtés a été une chance... qui continuera encore longtemps !

Je remercie ma famille,

Je remercie mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines pour toujours avoir pris de mes nouvelles, pour s'être inquiéter de mon état et pour m'avoir encouragé. J'ai toujours su que je pouvais compter sur vous et que je pourrais continuer à le faire. Je remercie aussi ma belle-famille qui s'est comporté comme une famille lors de ces 3 années.

Sybille, tu as démissionné et déménagé pour me suivre à Tours, dans ce projet de thèse. Tu m'as toujours soutenu, encouragé et rassuré. Sans toi, ma thèse ne se serait pas aussi bien passée et elle n'aurait pas aussi facile à vivre. Tu me forçais à sortir de l'appartement et tu m'obligeais à prendre des pauses avec le travail pour m'empêcher de saturer. Sans toi, je n'aurais pas non plus Tapas. Avoir un chat roux qui *zoomies* sans raison ou qui demande des caresses durant les moments difficiles permet de rendre la déprime plus légère. Je compte sur toi pour continuer à jouer le garde-fou. Pour résumer : merci & je t'aime. On se donne RDV au Japon pour fêter ça ?! (PS : tu as promis de m'appeler Dr. Monteiro au moins 1 fois)

Je remercie mon frère Kévin et ma belle-sœur Laurine. Que ce soit pour la thèse et même avant, je vous dois beaucoup. Merci de votre soutien. Kevin, sur beaucoup de points tu as été un exemple, ce qui m'a donné une direction à suivre. Depuis que l'on a quitté Denguin tous les deux, pour se retrouver parfois très éloigné, tu es resté disponible quand j'en ai eu besoin. Merci d'avoir été présent. Et sans oublier, je remercie aussi mon neveu, Alban. Tes dessins me suivent à la maison mais aussi au travail !

Maman, Papa, cet aboutissement et cette réussite sont aussi la vôtre. Sans vous, votre présence et votre éducation, rien de tout cela n'aurait été possible. Vous m'avez montré le chemin tout en me laissant tracer le mien. Je n'ai pas à espérer que vous soyez fiers de moi car vous me l'avez toujours fait comprendre. (Faudra quand même m'appeler docteur Monteiro à la maison !)

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : ETAT DE L'ART

CHAPITRE I : CONTEXTE GENERAL 1

CHAPITRE II : LA METABOLOMIQUE 6

II.1. HISTORIQUE 6
II.2. LES APPLICATIONS DE LA METABOLOMIQUE 8
II.3. LES APPROCHES EN METABOLOMIQUE 10
II.3.1. Approche Non-Ciblée 10
II.3.2. Approche Ciblée 11
II.3.3. Lipidomique 13
II.3.4. Exposomique 14
II.4. LES ECHANTILLONS 15
II.4.1. Généralités 15
II.4.2. Les Fluides 17
II.4.3. Fèces 20
II.4.4. Complémentarité des échantillons pour la couverture du métabolome 22
II.5. LES TECHNIQUES ANALYTIQUES 25
II.5.1. RMN 25
II.5.2. Séparation 30
II.5.3. Spectrométrie de Masse 37
II.5.3.1. Acquisition 38
II.5.3.2. Chambre d'Ionisation 40
II.5.3.3. Analyseurs 50
II.5.3.4. Les détecteurs 61
II.6. TRAITEMENT DE DONNEES 65
II.6.1. Introduction 65
II.6.2. Détection des Features 65
II.6.3. Chimiométrie 66
II.6.4. Identification Certaine ou Putative de Composés 67
II.6.5. Réseaux Moléculaires 68
II.6.6. Cartes Métaboliques 70
II.6.7. Bases de Données du Métabolome Humain 70
II.7. QUANTIFICATION 71
II.7.1. Quantification relative 71
II.7.2. Quantification Absolue 72
II.7.3. Kit de dosage 74
II.7.4. Utilisation d'étiquette chimique 75
II.8. *WORKFLOW* DE TRAVAIL 80

CHAPITRE III : OBJECTIFS DE LA THESE 82

PARTIE II : APPORT DES ANALYSES METABOLOMIQUES A PARTIR DE NOUVEAUX SUPPORTS POUR COMPLETER L'INFORMATION BIOLOGIQUE CLINIQUE

CHAPITRE I : INTRODUCTION 85

CHAPITRE II : *PUBLICATION* 87

1. ARTICLE SCIENTIFIQUE 87
2. DONNEES COMPLEMENTAIRES 110

CHAPITRE III : CONCLUSION 113

PARTIE III : QUANTIFICATION DE L'INFORMATION METABOLIQUE

CHAPITRE I : ANALYSE CIBLEE QUANTITATIVE DES SCFA 119

II.1. INTRODUCTION 119
II.2. PUBLICATION 121
II.3. CONCLUSION 139

CHAPITRE II : ANALYSE SEMI-CIBLEE 140

II.1. INTRODUCTION 140
II.2. LA DERIVATION 140
II.3. PUBLICATION 143
II.4. CONCLUSION 164

CHAPITRE III : CONCLUSION & PERSPECTIVES 164

PARTIE IV : CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES 169

BIBLIOGRAPHIE.....173

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Exemple de parcours d'un diagnostic 1
Figure 2 : Cascade Omique 2
Figure 3 : Etapes d'une analyse métabolomique jusqu'à son interprétation biologique 4
Figure 4 : Positionnement des projets de thèse au sein des thématiques de la métabolomique 5
Figure 5 : Exemples de domaine d'application de la métabolomique 8
Figure 6 : Domaine d'applications de la métabolomique dans le domaine de la santé 9
Figure 7 : Workflow général des analyses métabolomiques 10
Figure 8: Approche ciblée (*targeted*) *vs.* non-ciblée (*untargeted*) 12
Figure 9 : Complémentarité de l'approche ciblée et non ciblée, avec l'exemple de la détection préventive du cancer du sein 13
Figure 10 : Echantillons cliniques les plus utilisés dans un contexte biologique 16
Figure 11 : Sources de dégradations des échantillons et les conditions de stockage usuelles des échantillons biologiques 17
Figure 12 : Graphique tridimensionnel des scores de l'analyse en composantes principales pour 3 protocoles de préparation du plasma 18
Figure 13 : Flux de travail simplifié pour la préparation des échantillons fécaux avant leurs analyses par différentes plateformes. Les étapes facultatives sont indiquées sur fond gris 22
Figure 14 : Exemple de diagramme de complémentarité d'échantillons humains pour une couverture métabolique 24
Figure 15 : Schéma d'un appareil RMN 26
Figure 16 : Schéma explicatif de l'impact du champ B_0 sur l'aimantation à l'échelle macroscopique et à l'échelle des niveaux énergétiques de spin 27
Figure 17 : Principe de la relaxation macroscopique et de son acquisition, de la relaxation du spin après une perturbation par le champ magnétique B_e et enregistrement du signal 28
Figure 18 : Points forts de la RMN 29
Figure 19 : Schéma du montage d'un spectromètre RMN équipée de DNP 30
Figure 20 : Schéma d'un appareil à chromatographie à phase gazeuse 31
Figure 21 : Schéma d'un prélèvement headspace-GC et de sa variante SPME-HS-GC 32
Figure 22 : Schéma des colonnes à chromatographie liquide 33
Figure 23 : Schéma du fonctionnement d'une électrophorèse capillaire 34
Figure 24 : Schéma de la mobilité ionique 35
Figure 25 : Les différentes technologiques de mobilité ionique 36
Figure 26 : Schéma de l'analyse et l'identification d'un composé en MS 37
Figure 27 : Schéma de la structure d'un spectromètre de masse 38
Figure 28 : Différence entre l'utilisation d'un spectromètre en MS ou MS^2 et les spectres associés 38
Figure 29 : Schéma du fonctionnement des trois modes d'acquisition en spectrométrie de masse en MS1 et MS2 40
Figure 30 : Résumé des capacités des modes d'acquisition full-scan, DDA et DIA 40
Figure 31 : Schéma d'une ionisation par impact électronique 41
Figure 32 : Schéma d'une ionisation CI 42
Figure 33 : Schéma d'une ionisation ESI 43
Figure 34 : Schéma d'une ionisation APCI 43
Figure 35 : Schéma d'une ionisation APPI 44
Figure 36 : Champ d'application en masse et en polarité de l'ESI, de l'APCI et de l'APPI 45
Figure 37 : Schéma explicatif du dispositif UniSpray 46
Figure 38 : Schéma d'une ionisation FAB 47

Figure 39 : Schéma d'une ionisation MALDI 48
Figure 40 : Schéma de l'ionisation par DESI 49
Figure 41 : REIMS, une source d'ionisation adaptée à la chirurgie 50
Figure 42 : Schéma d'un quadripôle 51
Figure 43 : Schéma d'un triple quadripôle 52
Figure 44 : Schéma d'un secteur magnétique 52
Figure 45 : Schéma d'un FT-ICR 53
Figure 46 : Schéma d'une trappe ionique 54
Figure 47 : Schéma d'un analyseur à temps de vol linéaireet à réflectron 55
Figure 48 : Schéma de la plateforme Q-TOF 56
Figure 49 : Schéma du Q-TOF MRT 57
Figure 50 : Schéma d'un Orbitrap 58
Figure 51 : Schéma d'une plateforme Q-Orbitrap 58
Figure 52 : Schéma du montage Orbitrap Fusion 59
Figure 53 : Schéma d'un appareil MS de type LTQ 60
Figure 54 : Schéma du détecteur à multiplicateurs d'électrons discret et continu 62
Figure 55 : Schéma du détecteur Coupe de Faraday 63
Figure 56 : Schéma d'un détecteur à canaux d'électrons 63
Figure 57 : Schéma du fonctionnement d'un détecteur de plaque à micro-canaux 64
Figure 58 : Schéma d'un convertisseur ion-photon 64
Figure 59 : Présentation des étapes de chimiométrie au cours d'un workflow d'analyse en pour la chimiométrie : caractérisation de données de métabolomique 67
Figure 60 : Workflow permettant d'identifier des composés à l'aide de réseau moléculaire 69
Figure 61 : Courbes de calibrations des acides organiques du cycle de Krebs obtenues par LC-MS 73
Figure 62: Exemple de workflow disponible avec un kit, tel que le kit AbsoluteIDQ® p400 HR Kit 75
Figure 63: Différentes approches de la dérivation : dérivation spécifique, exemple des acides gras à courte chaîne par une piperazine (SCFAs) et dérivation exploratoire, avec le DmPA-Br 76
Figure 64: Workflow pour une quantification ICD, exemple du ^{12}C-/^{13}C-dansyl 77
Figure 65: Workflow pour une analyse quantitative des acides gras avec comme NIPL (*Non-Isotopically Paire Labeling*) avec le couple « DMED (2-dimethylaminoethylamine)/DEEA (N,N-diethyl ethylene diamine) » et le couple « Dns-HZ/Dens-HZ » 79
Figure 66: Chromatogramme obtenu par LC-MS/MS des monosaccharides marqués par NIPL (MPMP (1-(4-methylphenyl)-3-methyl-5-pyrazolone)/PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)) 79
Figure 67 : Protocole général de l'étude métabolomique et lipidomique des DBS en comparaison de celle du sérum 87
Figure 68 : Diagramme de Venn comparant les métabolites identifiés en analyse non-ciblée (C18 +/-, HILIC +) entre les DBS et le support vierge (Whatman 903). 111
Figure 69 : Comparaison préliminaires des concentrations en SCFA dans 1 punch de 3 mm de diamètre (n=10), extrait au méthanol froid dans trois types de support solide vierge : NeoNat, Control et AdultTracking puis entre les DBS et le support vierge AdultTracking 112
Figure 70 : Schéma simplifié des analyses en cours sur les *Dried Liquid Spot*, où le liquide est de l'urine, de la salive ou de l'eau fécale 117
Figure 71 : Graphical Abstract de la quantification multimatrices des SCFA par dérivation au 3NPH 121
Figure 72 : Principe de l'ICD (*Isotope Coded Derivatization*) 141
Figure 73: Application de l'ICD pour l'imagerie en MALDI-MS 141
Figure 74 : Protocol pour l'étude du BASA avec une première partie de caractérisation individuelle puis une comparaison aux "gold standards" 143
Figure 75 : Analyse multiplateformes et ICD pour atteindre les analyses non-ciblées quantitatives 166

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre d'articles présents dans le répertoire PubMed avec le terme « metabolomics » . 7
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des métabolites quantifiés dans des systèmes biologique 7
Tableau 3 : Métabolites (endogènes et exogènes) et caractère invasif de l'échantillonnage des différents compartiments biologiques humains en octobre 2024..... 24
Tableau 4 : Valeurs de différents paramètres physicochimiques de quelques noyaux impactant le signal en RMN ici pour un aimant à 7 Tesla soit 300 MHz 29
Tableau 5 : Valeurs des caractéristiques attribuées aux différents types d'analyseurs MS1 61
Tableau 6 : Caractéristiques numériques des appareils pour la MS2 61
Tableau 7 : Métabolites présents à la fois dans les DBS et le support solide ou uniquement dans le support solide..... 111
Tableau 8 : Enrichissement des voies métaboliques pour le DBS et le sérum – Top « p-value < 0,05 », par MetaboAnalyst..... 115

ABBREVIATIONS

- AIF : All Ion Fragmentation
- APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization
- CE : Capillary Electrophoresis (électrophorèse capillaire)
- CI : Chemical Ionization
- CID : Collision Induced Dissociation
- CCS : Cross Collision Section
- DDA : Data Dependant Acquisition
- d-DNP : dissolution Dynamic Nuclear Polarization
- DESI : Desorption ElectroSpray Ionisation
- DIA : Data Independant Acquisition
- EI : Electron ionization
- ESI : ElectroSpray Ionization
- FAB : Fast Atom Bombardment
- FT-ICR : Fourier Transformation Ion Cyclotron Resonance
- GC : Gaz Chromatography
- HCD : Higher-Energy Collision Dissociation
- HILIC : Hydrophilic Interaction Chromatography / Chromatographie d'interaction hydrophile
- HMDB : Human Metabolome DataBase
- HRMS : High Resolution Mass Spectrometry
- KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- LC : Liquid Chromatography
- MALDI : Matrix Assited LASER Desorption & Ionization
- *m/z* : rapport masse sur charge de l'ion
- MRM : Multiple Reaction Monitoring
- MS : Mass Spectrometry
- MS/MS ou MS^2 : Spectrométrie de masse en tandem
- Q : Quadripôle
- QqQ : Triple Quadripôle
- RP : Reversed Phase
- RP-LC : Reversed Phase Liquid Chromatography
- RT : Retention Time
- SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry
- SWATH : Sequential Window Acquisition of All Theoritical Fragment-Ion Spectra
- TOF : Time of Flight / Analyseur à temps de vol
- W4M : Workflow4Metabolomics
- XCMS : Various forms (X) of Chromatography Mass Spectrometry

PARTIE I :

ETAT DE L'ART

CHAPITRE I : Contexte général

La médecine s'appuie actuellement sur des critères cliniques, la biologie clinique et l'imagerie pour fournir un diagnostic et des soins complets aux patients. Ces critères reposent sur une analyse détaillée au cours de laquelle le médecin retrace les antécédents médicaux du patient, le questionne (anamnèse), réalise un examen physique et peut demander des analyses biologiques complémentaires [1]. L'objectif est de proposer un diagnostic fiable de la pathologie au regard de toutes les informations à disposition, qu'elles soient subjectives (ressenti du patient par exemple), ou qu'elles proviennent de paramètres mesurés de façon relative ou quantitative. La biologie clinique repose sur des analyses et des tests en laboratoire. Les procédures d'analyse des échantillons biologiques sont standardisées et robustes afin de détecter des biomarqueurs de pathologie. Par exemple, un patient souffrant de fatigue peut être soumis à un entretien médical afin d'explorer les facteurs liés au mode de vie et les symptômes, tandis que les tests de biologie clinique peuvent inclure une numération sanguine complète (NFS) pour vérifier l'anémie ou des tests de la fonction thyroïdienne pour évaluer l'hypothyroïdie. Un exemple graphique est proposé par l'institut hospitalo-universitaire (IHU) de Strasbourg pour le dépistage de pathologie du foie et/ou pancréas (**Figure 1**) :



Figure 1: Exemple de parcours d'un diagnostic [2]

L'établissement d'un diagnostic précis, fiable et complet permet de concevoir un plan de traitement efficace, garantissant ainsi que les soins prodigués aux patients sont à la fois fondés sur des données probantes et individualisées : l'approche thérapeutique devient de plus en plus personnalisée [3]. Cette médecine personnalisée, ou médecine de précision, est une

approche des soins de santé qui adapte le traitement médical aux caractéristiques individuelles de chaque patient [4].

La prise de décision thérapeutique est guidée par le diagnostic et le contexte clinique mais aussi par des facteurs propres à chaque individu comme la génétique, son mode de vie (ex : nutrition, activité sportive) et son environnement. Cette approche de la médecine [5–7] vise à optimiser l'efficacité thérapeutique, à renforcer la sécurité des patients et à améliorer les réponses aux traitements. Bien que cette personnalisation existe déjà, toutes les pathologies ne sont pour l'instant pas concernées par manque de connaissances et de données sur ces pathologies [8,9].

Pour pouvoir élargir l'utilisation la médecine personnalisée, il est nécessaire d'augmenter la quantité de l'information biologique afin d'enrichir les paramètres de biologie clinique pour mieux décrire un individu. Le phénotype d'un individu désigne les caractéristiques résultantes de l'interaction entre son patrimoine génétique, son mode de vie et l'environnement dans lequel il évolue. La description d'un système biologique peut se définir selon plusieurs échelles. La cascade omique (**Figure 2**) permet de schématiser ces différentes échelles d'observation d'un système biologique. A chaque échelle, se trouve une entité biologique (ls gênes, les ARN messagers, les protéines, les métabolites et les lipides) et la science correspondante (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, lipidomique et la fluxomique), avec leurs propres techniques d'analyse. L'expression de cette cascade omique permet d'établir le phénotype métabolique à l'échelle de l'organisme.

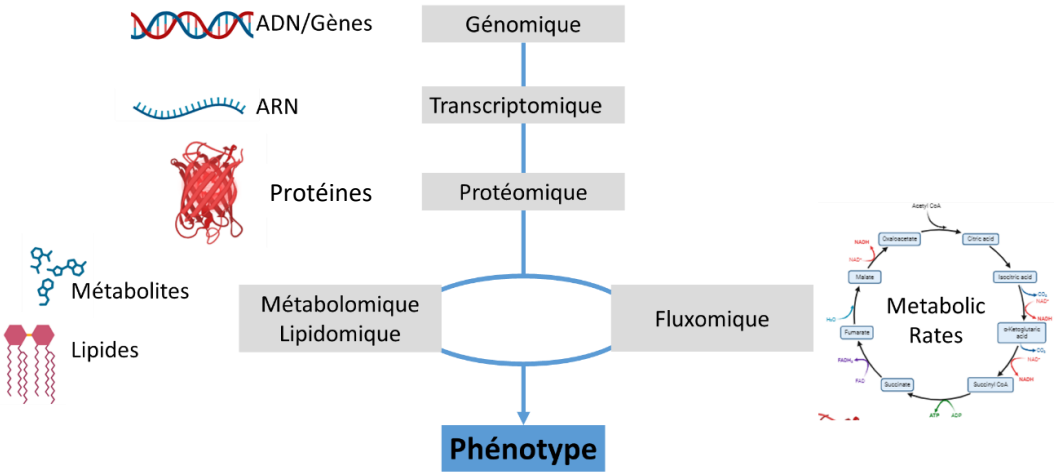


Figure 2 : Cascade Omique (adapté de N. Cariot, 2022 [10])

Les sciences omiques sont des domaines d'étude en biologie qui se concentrent sur les données à grande échelle. Les technologies omiques permettent aux scientifiques d'analyser les interactions complexes au sein des systèmes biologiques et de comprendre comment ces interactions influencent le phénotype :

- La génomique étudie l'ensemble de l'ADN d'un organisme, y compris le séquençage des gènes, des mutations et les variations structurelles. Elle permet d'identifier les prédispositions génétiques aux maladies et de comprendre les pathologies héréditaires [11–13].
- La transcriptomique s'intéresse aux molécules d'ARN, transcrites à partir de l'ADN, ce qui permet de mieux comprendre les schémas d'expression des gènes et leurs évolutions dans différentes conditions [14–16].
- La protéomique analyse l'ensemble des protéines produites par une cellule ou un organisme, qui sont essentielles pour comprendre les fonctions cellulaires et les mécanismes des maladies [17,18].
- La métabolomique étudie les petites molécules (métabolites, poids moléculaire < 1500 Da) dans les cellules, les tissus ou les organismes, offrant un aperçu des processus métaboliques et de la manière dont ils sont altérés dans les maladies. La lipidomique étudie, elle, les grandes molécules (lipides, poids moléculaire > 1500 Da) [19–21].
- La fluxomique peut être considérée comme la branche de l'étude dynamique de la métabolomique. Elle se concentre sur l'analyse quantitative des flux métaboliques au sein d'un système biologique. Les flux métaboliques désignent les taux auxquels les métabolites sont produits, transformés et consommés dans les voies métaboliques [22].

La métabolomique s'attache à identifier et à quantifier de façon exhaustive, et non sélective, les métabolites d'un système biologique [23]. Dans la pratique, il s'agit de caractériser et quantifier les petites molécules dans des échantillons biologiques, par différentes techniques de chimie analytique. La métabolomique couplée à des outils de chimiométrie permet la comparaison de profils métaboliques provenant de situations différentes (état contrôle *vs.* état perturbé) et permet de décrire et d'explorer les modifications et les différences engendrées (**Figure 3**).



Figure 3 : Etapes d'une analyse métabolomique jusqu'à son interprétation biologique

La métabolomique apporte une information métabolique riche et diversifiée, en termes de classes chimiques des molécules visualisables, à la biologie étudiée dans un contexte clinique. Elle permet notamment la recherche de biomarqueurs, l'exploration physiopathologique et l'évaluation des thérapies mises en place. Dans un contexte clinique, elle permet de décrire l'état métabolique d'un individu de la façon la plus exhaustive et fiable pour compléter la biologie clinique afin de personnaliser le diagnostic. Pour pouvoir intégrer les données métabolomiques en tant que données biomédicales FAIR (*Findable, Accessible, Interoperable, Reusable*), la métabolomique doit être quantitative. Les doivent être trouvables, accessibles, interopérables (comparables entre différents sites), réutilisables mais aussi précises et fiables pour une utilisation en diagnostic clinique de routine. Mesurer avec précision les concentrations facilite les comparaisons entre différentes études, conditions et patients. En adoptant des approches quantitatives normalisées, il est possible de partager et d'utiliser efficacement les données métabolomiques, menant vers une amélioration de la compréhension des systèmes biologiques complexes et ouvrant la voie à de nouvelles applications concrètes en médecine personnalisée.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse, intitulée « Développement de méthodes de quantification pour la métabolomique à visée clinique », ont pour objectifs de tendre vers une description la plus exhaustive possible du métabolome et vers une description large qui soit quantitative. Pour atteindre ces objectifs, différentes approches ont été explorées telles que l'apport de nouvelles matrices/nouveaux types d'échantillons, ou l'utilisation de la dérivation, pour compléter la couverture du métabolome et l'exploration quantitative et multimatrcies du métabolome. Globalement, les travaux de cette thèse avaient pour but de développer de nouvelles approches d'analyse en spectrométrie de masse pour la métabolomique à visée clinique.

Dans un premier temps nous avons analysé l'information métabolique et lipidique à partir de sang séché sur buvard (DBS, *Dried Blood Spot*) pour explorer l'intérêt de nouveau support afin de compléter l'information biologique actuelle et d'évaluer son intérêt par rapport au prélèvement sanguin fait en milieu médical. Dans un second temps nous nous sommes

intéressés à la quantification de l'information métabolique qu'elle soit ciblée ou ciblée large. La **Figure 4** ci-dessous permet de positionner, de manière schématique, chaque projet en fonction de la description du métabolome visée et du développement technologique nécessaire à sa réalisation. Chaque projet sera développé dans des chapitres dédiés.

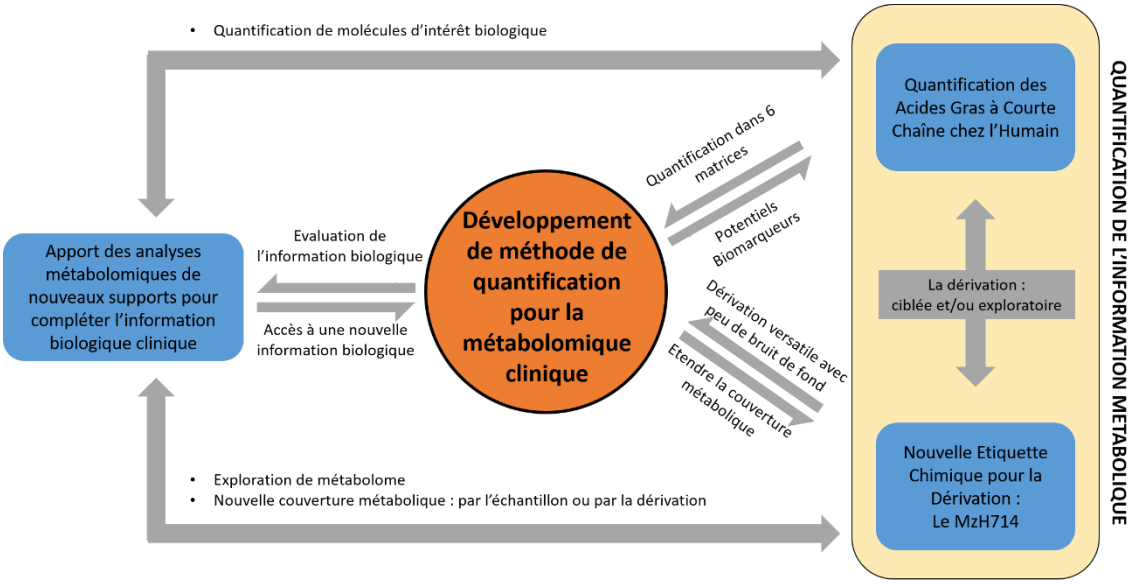


Figure 4 : Positionnement des projets de thèse au sein des thématiques de la métabolomique

CHAPITRE II : La Métabolomique

II.1. Historique

La métabolomique est une science jeune. A partir des 1980-1990, les analyses descriptives de système biologique prennent de l'ampleur grâce à deux technologies : la Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (MS) utilisées jusqu'alors majoritairement dans le domaine de la chimie. De par leurs propriétés, ces deux techniques permettent une visualisation des molécules contenues dans un milieu biologique. Mais avant que le terme métabolomique au sens actuel n'émerge, des analyses métabolomiques existaient déjà rétrospectivement parlant [24]. Dans les années 1957, Williams [25] emploie le terme de « profil métabolique », pour décrire les différents niveaux de métabolites rencontrés entre les individus qu'il a observé avec une chromatographie sur papier. Puis en 1971, Pauling va quantifier 250 composés dans le souffle humain et 280 dans l'urine par GC-MS [26]. Nicholson obtiendra en 1984 le profil métabolique sanguin et urinaire de patients atteints de diabète [27] en utilisant la technologie RMN. Enfin, en 1988, Oliver standardise les termes « métabolome » et « métabolomique » [28] :

- Un métabolome [29] regroupe les métabolites présents dans un système biologique ou selon certaines caractéristiques chimiques.
- La métabolomique est la science de l'identification et de la quantification des métabolites [30–32]. Les métabolites sont les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 1500 Da, qui participent au fonctionnement du métabolisme.

Depuis les années 2000, la métabolomique a connu une croissance rapide (**Tableau 1**), facilitant la compréhension de divers processus biologiques, de mécanismes pathologiques et le développement de la médecine personnalisée. Ces applications couvrent des domaines tels que la médecine [33], l'agriculture [34], les sciences de l'environnement [35] ou la nutrition [36], offrant des outils précieux pour comprendre des phénomènes biologiques complexes au niveau moléculaire.

Tableau 1 : Evolution du nombre d'articles présents dans le répertoire PubMed, en lien avec le terme « metabolomics »

Période	2000-2010	2011-2020	2021-07/2024
Articles contenant le terme « Metabolomics » dans le titre ou le résumé	1 884	24 898	27 225

L'identification et l'annotation des métabolites à partir des spectres MS ou RMN peuvent s'avérer difficiles en raison de la grande diversité chimique et du manque de bases de données de référence complètes. En 2021, Alseekh *et al.* [37] dressaient un bilan des « métabolites quantifiés/métabolites estimés » présents dans divers échantillons (**Tableau 2**). De plus, de nombreux travaux mettent en avant que sur les 250 000 métabolites humains estimés, seule une faible fraction est parfaitement caractérisée dans les bases de données [38,39]. Par exemple, dans HMDB (*Human Metabolome DataBase*) [40], seuls 20 600 métabolites sont détectés dont 3 400 sont quantifiés. La possibilité de croiser les informations provenant de deux techniques [41–43] a déjà été explorée et appliquée mais cela fait appel à des techniques statistiques et bio-informatiques complexes, nécessitant une expertise particulière et des ressources informatiques importantes [44–46]. Une autre difficulté concerne la superposition ou la possibilité de relier les informations issues de différentes analyses omiques. Cette problématique est un des enjeux futurs du domaine omique [47,48].

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des métabolites quantifiés et estimés dans des systèmes biologique [37,40]

Espèce	Métabolites quantifiés	Métabolites estimés
E. Coli	700	3.700
Levure	500	2.680
Humain	3.400	250.000
Plante	14.000	400.000

Les besoins croissants en métabolomique en termes de capacité d'analyse (sensibilité, résolution et efficacité d'ionisation) ont abouti à des ruptures technologiques. La métabolomique est donc un domaine riche en innovation, en témoigne le nombre toujours croissant d'articles ou la taille des réseaux scientifiques de métabolomique tel que le Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), la *Metabolomic Society* ou l'infrastructure nationale de métabolomique et fluxomique, MetaboHub (MTH) qui est un regroupement de plateformes analytiques à la disposition de la communauté scientifique académique et industrielle.

II.2. Les applications de la métabolomique

La métabolomique est un outil de choix dans le domaine clinique [49], mais elle peut être également utilisée pour décrire n'importe quel système biologique ou encore pour étudier les variations/évolutions de ces systèmes (**Figure 5**). La métabolomique est notamment employée pour étudier le monde des plantes [50,51], avec par exemple la recherche de principes actifs dans le monde végétal [52]. D'autres exemples sont l'étude de la physiologie animale [53], de la physiologie des insectes [54–56]. Elle est aussi utilisée dans le domaine agricole [34], pour mesurer l'impact des polluants sur l'environnement [57], pour l'étude des microorganismes dans les nuages [58] ou encore comme outil de traçabilité, dans les vins par exemple [59].

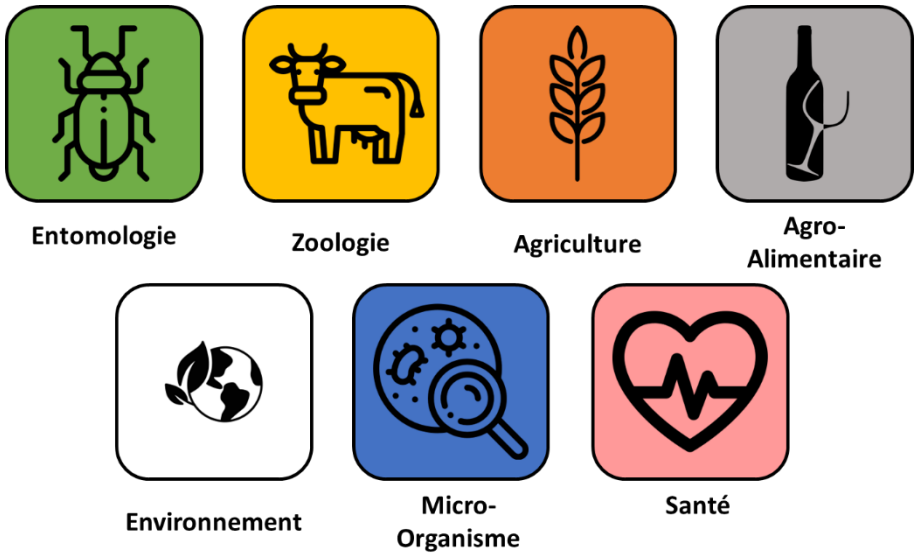


Figure 5 : Exemples de domaine d'application de la métabolomique

En comparant des profils métaboliques entre patients sains et malades, il est possible de proposer des biomarqueurs de pathologies telles que le cancer [60–62], le diabète [63–65] ou les pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson [66–68], la maladie d'Alzheimer [69–71] ou encore la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) [72–74]. Ces biomarqueurs pourraient aussi permettre un diagnostic plus précoce (s'ils sont prédictifs), un diagnostic plus précis et un éventuellement un meilleur suivi [75,76]. Ils peuvent permettre de mieux cibler les traitements [77,78]. La métabolomique peut être utilisée afin d'étudier l'impact du traitement chez les patients : la métabolomique est essentielle pour comprendre les effets désirés et secondaires des médicaments au niveau moléculaire [79–82]. Plus largement, la métabolomique est aussi utilisée en toxicologie pour étudier l'impact des

polluants sur la santé humaine [83–85]. La nutrition est un aspect important des schémas de traitement : l'alimentation a un fort impact sur le métabolisme humain, notamment dans les maladies inflammatoires du système digestif [86], et a permis de mettre en avant le rôle primordial du système digestif et de sa flore [87,88].

La métabolomique est un outil polyvalent et incontournable pour tendre vers une médecine personnalisée plus répandue [89–91] (**Figure 6**). Son intégration et son implémentation dans les pratiques cliniques sont des atouts pour tendre vers l'objectif d'une approche des soins plus personnalisée.

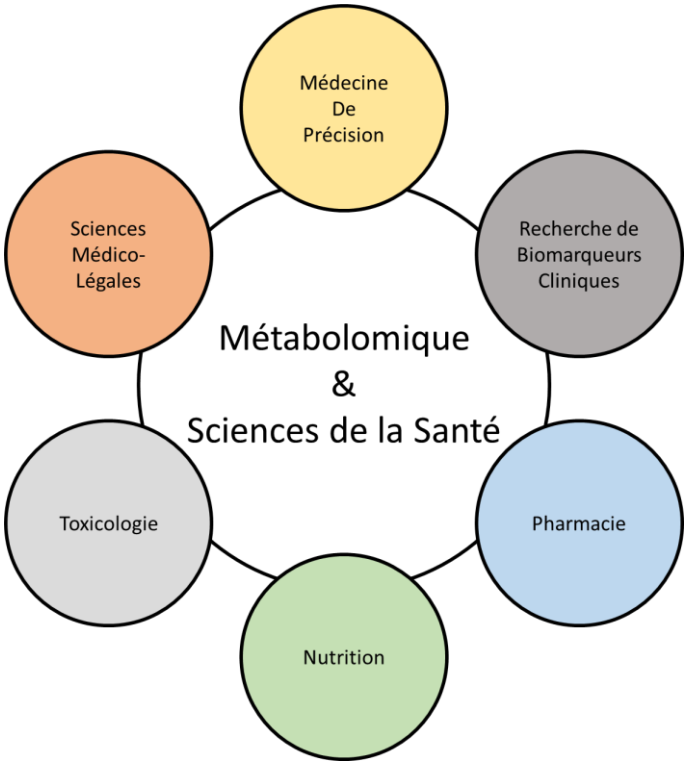


Figure 6 : Domaine d'applications de la métabolomique dans le domaine de la santé (inspirée de Zhang *et al.* [92])

Une étude métabolomique se divise en 3 grands blocs : pré-analytique, analytique et l'analyse/interprétation des données [93]. Chacun de ces blocs peut être divisés en plusieurs étapes. Le bloc pré-analytique correspond au travail relatif aux échantillons, qui va de leur échantillonnage [94] à leur stockage [95,96]. Le bloc analytique concerne les différentes étapes d'extraction appliquées à l'échantillon [97,98] jusqu'à son injection et son analyse : 1D ou 2D en ^{1}H-RMN ou ^{13}C-RMN d'une part ou en ciblée ou non-ciblée en MS, d'autre part . Le dernier bloc est celui de l'analyse des données : il faut aligner tous les spectres d'une même analyse, pour pouvoir étudier les différents signaux (et le composé associé) parmi les

échantillons. Après une étape de normalisation des données [99,100], les outils statistiques vont permettre de mettre en avant les différences significatives présentes entre certains échantillons, typiquement dans le cas de l'étude de pathologie, entre les patients malades et les patients sains. La **Figure 7** résume les différentes étapes d'une analyse métabolomique complète.

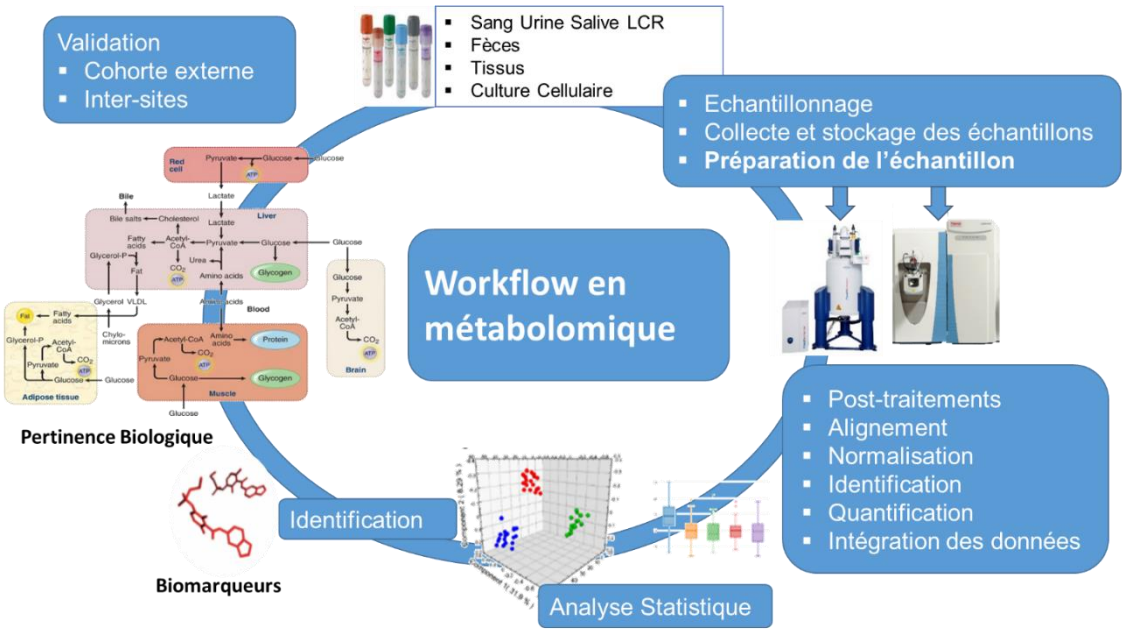


Figure 7 : Workflow général des analyses métabolomiques

II.3. Les approches en métabolomique

II.3.1. Approche Non-Ciblée

L'analyse non ciblée [101] (*untargeted)* vise à identifier le plus grand nombre possible de métabolites dans un échantillon, sans connaissance *a priori* de leurs identités ou de leurs concentrations. Les données obtenues par l'analyse non ciblée sont ensuite traitées à l'aide d'outils statistiques et bio-informatiques afin d'identifier des modèles de séparation des échantillons permettant d'identifier des biomarqueurs potentiels.

Cette analyse non ciblée permet d'obtenir une empreinte métabolomique (profil spectral), sans nécessairement avoir connaissance du type de molécules présentes dans l'échantillon biologique, qui peut être différente pour des patients sains ou malades [102]. En les comparant, il est possible de mettre en évidence des signaux/molécules non-identifié(e)s qui peuvent être présent(e)s ou absent(e)s.

Le problème reste que sans identification, il est difficile, voire impossible, de lier ce type de résultat à une dérégulation métabolique. *The Metabolomics Standards Initiative* (MSI) [103] propose d'ailleurs de classifier la confiance en l'identifications en quatre niveaux : 1) métabolite identifié ; 2) composés annotés de manière putative, 3) classe(s) du composé annoté, de manière putative ; 4) composé inconnu/non défini [104]. Dans une étude clinique, seuls les niveaux 1 et 2 sont exploitables. Sans identification de niveau 1, il n'y a pas d'hypothèse physiopathologique claire, ce qui empêche d'aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et de développer des stratégies thérapeutiques. Les identifications de niveaux 2 vont demander de nouvelles études pour les vérifier ou infirmer. L'analyse non-ciblée est puissante pour la découverte de nouveaux biomarqueurs, elle reste insuffisante [105].

Les analyses non-ciblées sont des analyses préliminaires qui vont permettre de focaliser, de cibler de manière plus précise des composés, qui semblent fluctuer en fonction d'une pathologie, avec des analyses complémentaires [106].

II.3.2. Approche Ciblée

L'analyse ciblée [107] se concentre sur un ensemble prédéfini de métabolites connus (niveau 1). L'analyse ciblée offre une sensibilité accrue, une précision élevée et une reproductibilité améliorée. Elle est couramment utilisée pour la recherche fondée sur des hypothèses, la validation de biomarqueurs et les diagnostics cliniques. Cajka *et al.* [108] ont proposé une figure descriptive des différentes approches, en prenant en compte le nombre de métabolites *versus* la fiabilité de la quantification dans les approches ciblées et non-ciblées. Plus le nombre de métabolites est important (approche non-ciblée ou ciblée large) moins la quantification est fiable. A l'inverse, cibler peu de métabolites au détriment d'une couverture métabolique importante permet une mesure fiable faite à partir de courbe de calibration multi-points (**Figure 8**) :

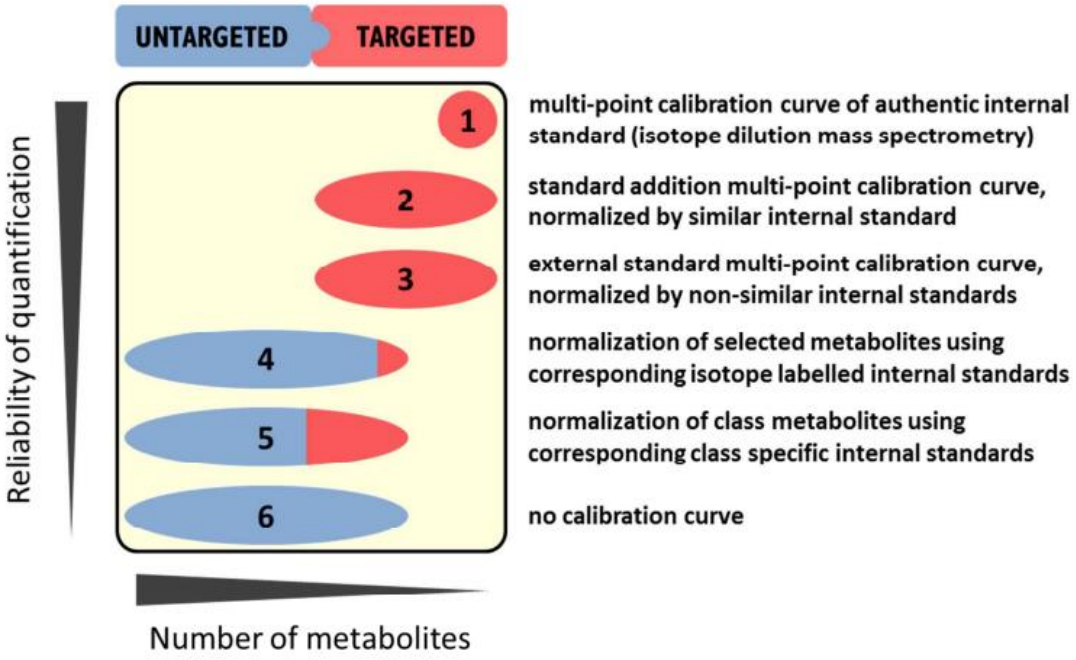


Figure 8: Approche ciblée (*targeted*) *vs.* non-ciblée (*untargeted*) [101]

Les approches citées précédemment sont complémentaires. Une molécule candidate en tant que biomarqueur et détectée en analyse non-ciblée nécessitera une analyse plus approfondie pour l'identifier et la quantifier. Wei *et al.* [109] ont illustré cette complémentarité par l'étude d'échantillons sanguins de femmes atteintes de cancer du sein. En croisant les métabolites détectés à l'aide d'une analyse non-ciblée, identifiés grâce à une chimiothèque commerciale d'Agilent (MPP, version B.13.00), avec les données quantitatives produites par plusieurs métabolismes, 8 voies métaboliques ressortent comme altérées. En se focalisant sur ces voies, il serait possible de détecter les patientes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce (**Figure 9**) :

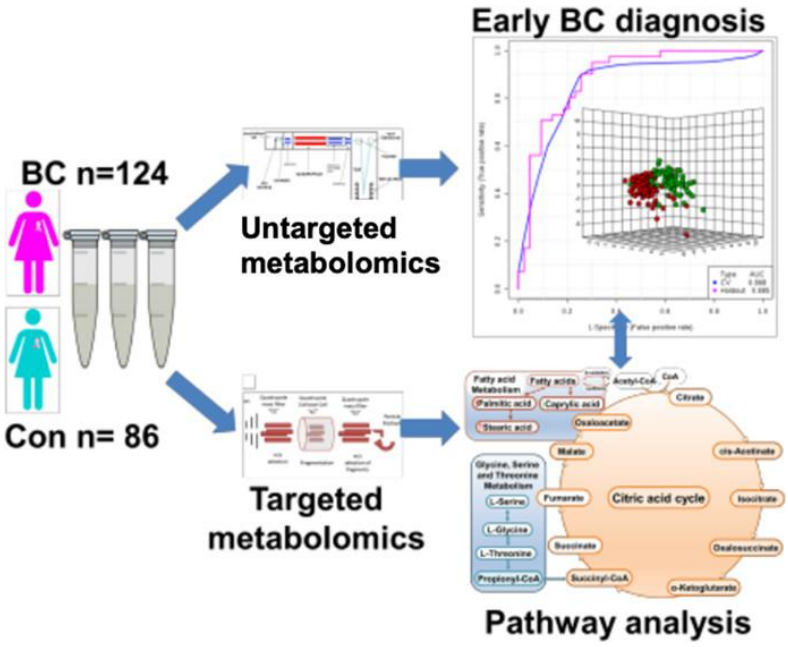


Figure 9 : Complémentarité de l'approche ciblée et non ciblée, avec l'exemple de la détection préventive du cancer du sein [57] (BC = Cancers mammaires ; Con = Contrôles)

II.3.3. Lipidomique

La métabolomique se concentre sur les petites molécules d'un système biologique. La lipidomique se concentre sur l'analyse des lipides dans les systèmes biologiques [110,111]. Les lipides constituent un groupe diversifié de molécules qui jouent un rôle crucial dans la structure cellulaire, le stockage de l'énergie et les voies de signalisation [112]. En examinant la composition lipidique des cellules ou des tissus dans différentes conditions, ou dans divers états physiopathologiques, la lipidomique peut fournir des informations précieuses sur le métabolisme cellulaire, les voies de signalisation et leurs rôles au sein d'une pathologie [113]. Comme pour la métabolomique, la lipidomique permet de mieux comprendre les rôles complexes que jouent les lipides dans les systèmes biologiques, ouvrant la voie à l'identification de biomarqueurs et au développement de médicaments [114].

Deux problèmes majeurs se posent en lipidomique : l'oxydation des liaisons insaturées et le niveau de confiance en l'identification. Les lipides sont sensibles aux conditions environnementales (ils peuvent facilement s'oxyder par exemple [115,116]), aux solvants d'extraction utilisés et aux solvants utilisés pour les phases mobiles en LC-MS [108]. La problématique est de pouvoir différencier un produit de dégradation d'un lipide issu de l'organisme car ces derniers sont aussi de potentiels biomarqueurs [117]. Concernant le niveau d'identification [118,119], les lipides ont une structure plus complexe que les

métabolites : plusieurs chaînes carbonées, avec de possibles insaturations (et donc d'isomérie) et avec des tailles différentes, sont rattachées à une tête polaire. Avec les techniques analytiques disponibles, tels que la LC-MS, il est complexe de réussir à identifier le nombre de carbones de chaque chaîne latérale. Le plus souvent, l'information obtenue concerne l'identification de la tête polaire et le nombre total de carbones et d'insaturations présentes sur le lipide : l'identification est en générale plus prédictive qu'absolue (niveaux 3 et 4). Pour outrepasser cette problématique, il faudrait bâtir des bases de données à partir de composés lipidiques standards. Mais le nombre de molécules concernées (nombre et répartition des carbones et des insaturations) rend un tel projet presque impossible.

Cependant, les lipides sont ubiquitaires et de nombreux désordres lipidiques sont actuellement reliés à des pathologies [120], ils sont donc largement étudiés afin de trouver des biomarqueurs parmi eux. Par exemple, les concentrations de glycérophospholipides et sphingolipides sont diminuées chez les patients atteints d'Alzheimer [121]. D'autres études montrent le lien entre maladie cardiovasculaire et un désordre lipoprotéique [122]. Les évolutions dans l'analyse des lipides sont encourageantes pour la détection et le suivi de certaines pathologies comme les maladies rénales. En effet il a été montré que les acides 20-hydroxyeicosatétraénoïque et époxyeicosatriénoïque sont reliés aux lésions rénales ou encore les céramides qui sont impliqués dans la pathogenèse de ces lésions [123].

II.3.4. Exposomique

L'exposomique est un concept récent, dont la conceptualisation est attribuée à Chris Wild [124]. L'exposomique consiste à étudier l'exposome soit l'ensemble des facteurs extérieurs au métabolisme auquel un individu va être exposé [125]. Ces expositions peuvent être moléculaire (pesticide, produits agro-alimentaire), biologique (bactérie, virus), environnementale (particule fine de l'air) et va jusqu'à prendre en compte des facteurs sociétaux (accès au soin, niveau de vie) [126].

De nombreuses pathologies ont une origine génétique mais l'exposome peut jouer un rôle délétère supplémentaire, comme pour les maladies cardiovasculaires [126], les maladies du foie [127] ou encore certaines maladies neurodégénératives [128]. L'exposomique peut être étudiée avec l'ensemble du spectre omique mais seules la métabolomiques et la lipidomique permettent d'avoir une visualisation moléculaire de l'impact de ces expositions

sur la santé humaine [129,130]. Par exemple, une étude métabolomique menée sur deux populations, l'une considérée comme faiblement exposée et une seconde hautement exposée à des contaminants a permis de mettre en avant que les composés détectés sont similaires mais dans des proportions différentes [131].

Toutes les expositions ne sont pas forcements néfastes. Le corps humain est constamment en contact et échange avec des microbiotes, notamment le microbiote intestinal qui est étroitement lié à l'état de santé général d'un individu [132]. Cette relation exposomique « hôte-microbiote » est complexe à étudier d'autant que la population microbienne va dépendre de nombreux facteurs, comme la nutrition. La relation avec le microbiote intestinal est d'autant complexe que, pour le microbiote, l'individu « hôte » est une source d'exposition, engendrant des régulations interconnectées [133,134].

L'analyse de l'exposome est donc un grand défi. Mais dans un contexte de santé publique, la métabolomique va permettre d'identifier les contaminants environnementaux, ainsi que leurs rôles dans l'évolution de certaines pathologies, et elle va permettre de mieux comprendre les interactions entre un individu et son microbiote. L'objectif étant de comprendre l'impact des « cocktails » de contaminants sur la santé humaine et de mettre à jour des cibles thérapeutiques [135–137].

II.4. Les Echantillons

II.4.1. Généralités

*****Echantillonnage*****

Les conditions de prélèvement des échantillons, leurs manipulations et leurs stockages sont des aspects cruciaux de l'analyse omique : ils ont un impact direct sur la qualité et la fiabilité des résultats obtenus. Si aucune mesure n'est mise en place, un échantillon biologique prélevé va continuer à évoluer car les processus biologiques n'auront pas été stoppés (oxydations, réactions anaérobiques, réactions enzymatiques, développement bactériologique). De plus, les métabolites et les lipides sont sensibles à divers facteurs, notamment le pH, la température, l'oxydation, la lumière ou l'activité enzymatique. De mauvaises conditions d'échantillonnage et de stockage peuvent conduire à la dégradation et à l'altération de ces molécules (exemple : oxydation des lipides sous rayons UV).

Les échantillons biologiques (**Figure 10**) présentent souvent une variabilité dues aux différences génétiques, à la régulation du métabolisme, aux expositions environnementales et aux conditions physiologiques. Des procédures d'échantillonnage et de stockage adaptées permettent de conserver cette variabilité. Cela est essentiel pour tirer des conclusions significatives et identifier des biomarqueurs ou des voies métaboliques pertinents. Par conséquent la préparation des échantillons biologiques doit suivre des protocoles pré-analytiques standardisés pour garantir la reproductibilité et la robustesse des analyses métabolomiques.

La variabilité peut aussi venir de contamination de l'échantillon par des sources externes, et introduire une variabilité indésirable, conduisant à des résultats inexacts. Des techniques d'échantillonnage appropriées, telles que l'utilisation d'équipements stériles et la manipulation d'échantillons dans des environnements contrôlés, contribuent à minimiser le risque de contamination.



Figure 10 : Echantillons cliniques les plus utilisés dans un contexte biologique (crée avec BioRender)

*****Lien entre études précliniques et cliniques*****

Les études précliniques permettent aux chercheurs d'étudier les mécanismes biologiques et de tester des hypothèses dans des environnements expérimentaux. Les résultats des études précliniques peuvent fournir des indications sur la biologie et guider la conception des études cliniques. Inversement, les études cliniques permettent de valider les résultats des modèles précliniques dans des populations humaines, facilitant ainsi la traduction de la recherche fondamentale en applications cliniques.

L'utilisation des modèles animaux permet d'étudier un phénomène physiopathologique en diminuant la variabilité biologique inter-patients, élevée chez les humains, afin de comprendre quelles sont les mécanismes impliqués, comment la maladie progresse et d'identifier de potentiels biomarqueurs pour la détection précoce, le diagnostic et le pronostic [138–140]. Les études précliniques sont essentielles pour évaluer l'efficacité et la sécurité de nouveaux traitements avant qu'ils ne soient testés dans le cadre d'essais cliniques. Les analyses omiques peuvent être utilisées pour évaluer les effets métaboliques des médicaments, la pharmacocinétique des médicaments et pour évaluer la réponse et la toxicité des médicaments[141–143]. Les études cliniques évaluent permettent d'optimiser les schémas posologiques, d'identifier les effets indésirables et de prédire les réactions des patients [144,145].

L'approche préclinique permet de trouver des pistes de traitement, de valider ou infirmer des hypothèses concernant les disfonctionnements métaboliques liés à une pathologie. Le passage de l'animal à l'humain reste néanmoins une étape cruciale car les modèles animaux ne sont pas représentatifs de la diversité qui se retrouve dans une cohorte humaine.

*****Stockage*****

Un échantillon biologique est un échantillon « évolutif », s'il n'est pas stocké dans de bonnes conditions, les réactions enzymatiques vont rester fonctionnelles, faussant la réalité

de l'échantillon au moment de son prélèvement. Il est donc nécessaire de stopper les métabolismes en présence. Le stockage rapide d'échantillons biologiques à -80°C, diminuant fortement l'activité biologique, est très largement répandu. Cependant, les cycles de congélation/décongélation peuvent dégrader un échantillon [146,147]. De plus, ouvrir à plusieurs reprises un échantillon peut engendrer des pertes de composés volatils [148,149]. Enfin, en se décongelant et en absence de mesure visant à empêcher les métabolismes de se réactiver, un échantillon analysé à des cycles de congélation/décongélation différents vont produire des aliquots différents malgré leur même provenance d'origine [150–152]. En plus du stockage, il est donc nécessaire de prévoir l'utilisation des échantillons afin de pouvoir fournir des données répétables et produites dans les mêmes conditions [153] (**Figure 11**).

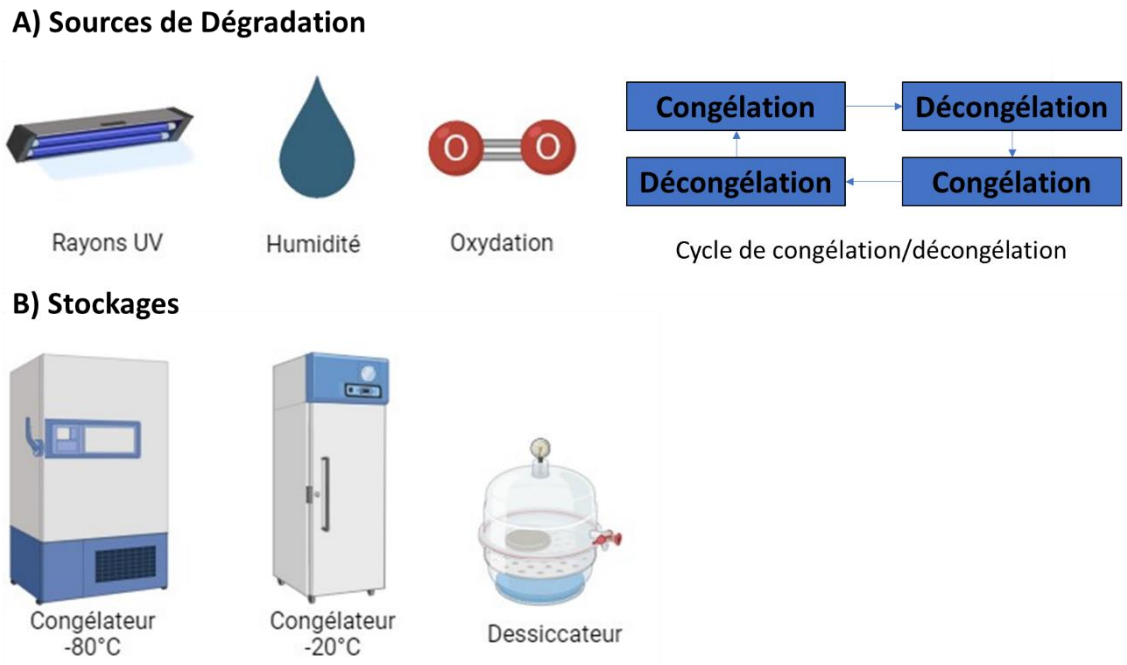


Figure 11 : Sources de dégradations des échantillons (A) et les conditions de stockage usuelles des échantillons biologiques (B) (crée avec BioRender)

II.4.2. Les Fluides

*****Sérum-Plasma*****

Le sérum est riche en termes de diversité et de concentration de métabolites, ce qui permet d'accéder à l'état systémique de l'organisme. Les méthodes de collecte de l'échantillon sont normalisées, cependant, une prise de sang est invasive et requiert du personnel habilité. Le sang est prélevé à l'aide d'une seringue ou d'un tube à vide. Le tube peut être recouvert d'anti-coagulant, pour obtenir du plasma, ou sans « additif » afin d'obtenir du sérum, après avoir centrifugé le sang coagulé. Le sérum contient de nombreuses

protéines, qu'il convient de séparer des métabolites et des lipides à l'aide de solvant organique avant analyse métabolique [153,154].

De nombreuses méthodes d'extraction existent, en métabolomique et en lipidomique, pour extraire les composés du sérum : monophasique, biphasique ou encore des extractions successives [98,155–158]. Le choix de la méthode d'extraction doit être adaptée en fonction de l'objectif : exploratoire ou ciblée. Au même titre que le sérum, peu importe l'échantillon, le solvant d'extraction a un fort impact sur les molécules extraites et donc identifiables. La **Figure 12** est un exemple de l'impact du solvant d'extraction en métabolomique avec la mise en évidence de profils métaboliques différents en fonction de la méthode d'extraction d'échantillons de plasma.

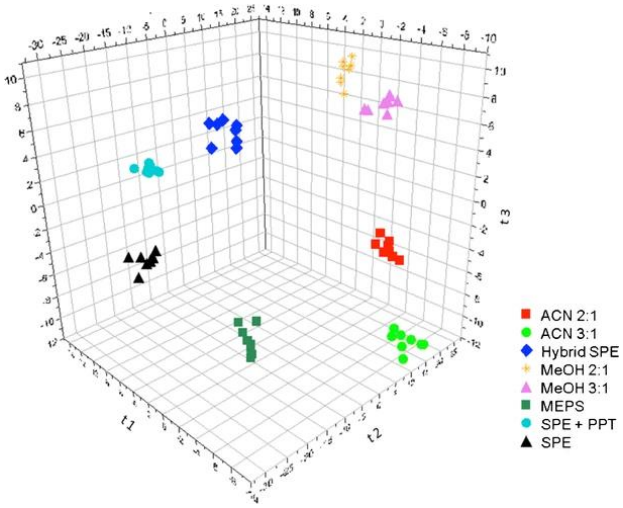


Figure 12 : Graphique tridimensionnel des scores de l'analyse en composantes principales pour tous les protocoles de préparation du plasma après élimination des artefacts de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse et des échantillons de contrôle [159]

*****Sang Séché sur Buvard (*Dried Blood Spot*, DBS)*****

Le sang sur buvard est un mode de recueil utilisé à la naissance d'un bébé pour le dépistage néonatal des pathologies suivantes : mucoviscidose, phénylcétonurie, drépanocytose, hypothyroïdie congénitale, hyperplasie congénitale des surrénales [160,161]. En France, le dépistage biologique de 7 nouvelles maladies métaboliques (appelées erreurs innées du métabolisme) a été rajouté à compter du 1er janvier 2023 (homocystinurie, leucinose, tyrosinémie de type 1, acidurie isovalérique, déficit en 3-hydroxyacyl-coenzyme A déshydrogénase des acides gras à chaîne longue, déficit en captation de carnitine [162]). Le test consiste à prélever quelques gouttes de sang d'un nouveau-né, en piquant le talon, sur

un papier buvard. Le papier buvard peut ensuite être aliquoté en « punch », soit des pastilles de taille définie (un disque de 3 mm de diamètre), qui contiennent environ 3 µL de sang [163,164].

Le dépistage de maladie néonatale reste la seule utilisation standardisée en contexte clinique des DBS mais d'autres utilisations ont été investiguées, comme les tests anti-dopage [165], le suivi de traitement [166–168], la recherche de biomarqueurs [169–171] ou mesurer l'exposition à des contaminants environnementaux [172].

*****Urine*****

L'urine est un échantillon récolté de façon non-invasive, accessible facilement et dans des quantités élevées. C'est un échantillon adapté aux suivis longitudinaux. Elle reflète le métabolisme systémique et excrète une vaste gamme de métabolites résultant de diverses voies métaboliques, y compris celles du foie, des reins, et des intestins. En général, le premier jet d'urine de la matinée est plus concentré en métabolites et est utilisé pour la détection d'infection des voies urinaires ou des infections sexuellement transmissibles [173] alors que l'analyse des urines de 24h sont utilisées, par exemple, en endocrinologie pour le dosage du cortisol [174]. Une fois collectée, l'urine est centrifugée pour éliminer les débris cellulaires et les particules solides [153,175,176]. Deux paramètres peuvent être très importants à contrôler et mesurer : le pH de l'urine [177,178] pour les analyses RMN et la concentration en créatinine, reliée au taux de clairance qui témoigne d'un fonctionnement rénal normal [179], qui permet de normaliser les données dans le contexte clinique. A cause de la variabilité inter-individuelle du pH urinaire, il est recommandé, en RMN, de tamponner les échantillons avant analyse. La concentration urinaire en créatinine va permettre de normaliser les données quantitatives pour prendre en compte l'état de la filtration du rein [153]. Fernández-Peralbo *et al.* ont réalisé une étude exhaustive sur les conditions d'extractions optimales pour l'urine [180].

*****Salive*****

Le prélèvement de la salive est non-invasif, facile à obtenir et peut être collecté en grands volumes. Cet échantillon permet d'avoir un aperçu de l'état systémique du patient [94,181,182]. Les concentrations de métabolites peuvent varier de manière significative en fonction de l'état d'hydratation, du temps qui sépare du dernier repas ou de l'heure de la

journée [183,184]. La salive peut être prélevée de nombreuses manières différentes [185] mais l'échantillonnage avec une salivette est préféré en clinique car il permet de normaliser les signaux [186]. La salive est encore peu utilisée dans un contexte clinique [187], ce qui a freiné l'apparition de procédure d'extraction standardisée. Mais l'intérêt croissant pour ce type d'échantillon, notamment pour la détection de cancers [188], risque de créer un nouvel engouement autour de son utilisation.

*****Liquide CéphaloRachidien (LCR)*****

Le LCR est au contact du cerveau (étudiable qu'en post-mortem), il reflète en partie le métabolisme du système nerveux central [189,190]. Cependant, le prélèvement de LCR est très invasif, via une ponction lombaire entrainant de passer à travers la dure-mère, et comporte de nombreux risques : céphalées, infection, fuite de LCR [191]. Ce prélèvement n'est réalisé que si une pathologie est soupçonnée, ce qui pose la question des LCR témoins [192–194]. Le LCR contient moins de protéines que le sang, ce qui facilite l'analyse mais les volumes prélevés sont faibles et de possibles contaminations sanguines, due à une ponction traumatique, sont possibles [195]. La rareté de cet échantillon pousse à rechercher des extractions permettant de réaliser plusieurs types d'analyses comme de la protéomique/métabolomique [196] et de la lipidomique/métabolomique [197] grâce aux extractions biphasiques..

II.4.3. Fèces

Les fèces reflètent l'état et la diversité du microbiome intestinal : cet échantillon est riche en métabolites, qui peuvent être produits par les bactéries intestinales. Son mode de collection est non-invasif [198,199] et est déjà au centre de dispositifs de dépistage comme celui du cancer colorectal. Lors des analyses bactériologiques réalisés sur fèces, le patient récolte l'échantillon lui-même et a 4h pour le ramener au laboratoire pour le stockage [200]. Une autre méthode pour stabiliser un échantillon est l'emploi d'un solvant tels que le méthanol (MeOH) ou l'éthanol (EtOH) qui va stopper le métabolisme [201,202]. Pour le dépistage du cancer colorectal, le patient ajoute un solvant visant à stopper le métabolisme directement sur son échantillon de selles [203]. L'échantillon peut donc être stocker au frigo.

Cependant les fèces sont très variables :

- Pour les études cliniques, chaque patient à son propre régime alimentaire, ce qui influence la production microbienne. La mise en place de régime spécifique et encadré est étudiée chez le rat mais aussi chez l'humain [204,205].
- Le taux d'humidité des fèces varie entre les patients. Déterminer le taux d'humidité ou de masse sèche de chaque échantillon est primordial pour pouvoir normaliser les données [206,207].
- Le prélèvement d'une petite quantité de fèces est sujet à de haute variabilité : les fèces sont des échantillons solides à 3 dimensions, avec par exemple, des parties exposées à l'air. Il convient donc de réaliser plusieurs prélèvements à différents endroits ou d'homogénéiser l'ensemble

Les échantillons sont prélevés dans des récipients stériles et doivent être traités rapidement pour éviter toute dégradation. Les fèces est un échantillon évolutif, avec la présence de nombreux microorganismes, dont les métabolismes vont continuer à fonctionner s'il n'est pas rapidement amené à -80°C ou si un solvant organique n'est pas ajouté pour arrêter les réactions organiques [208].

L'eau fécale est un autre type d'échantillon obtenu à partir des fèces. L'eau fécale est obtenue après homogénéisation et centrifugation pour séparer les composants solides du liquide [209]. Le surnageant, qui contient l'eau fécale, est filtré pour éliminer les particules solides restantes. L'eau fécale recueillie est conservée dans des conditions appropriées (généralement congelée) jusqu'à l'analyse.

De nombreuses méthodes d'extractions existent, sans réel consensus sur la méthodologie à adopter. Pour y voir plus clair et choisir la méthodologie la plus adaptée à l'objectif visé, Karu *et al.* [209] propose un récapitulatif des préparations possibles pour les échantillons de fèces (**Figure 13**).

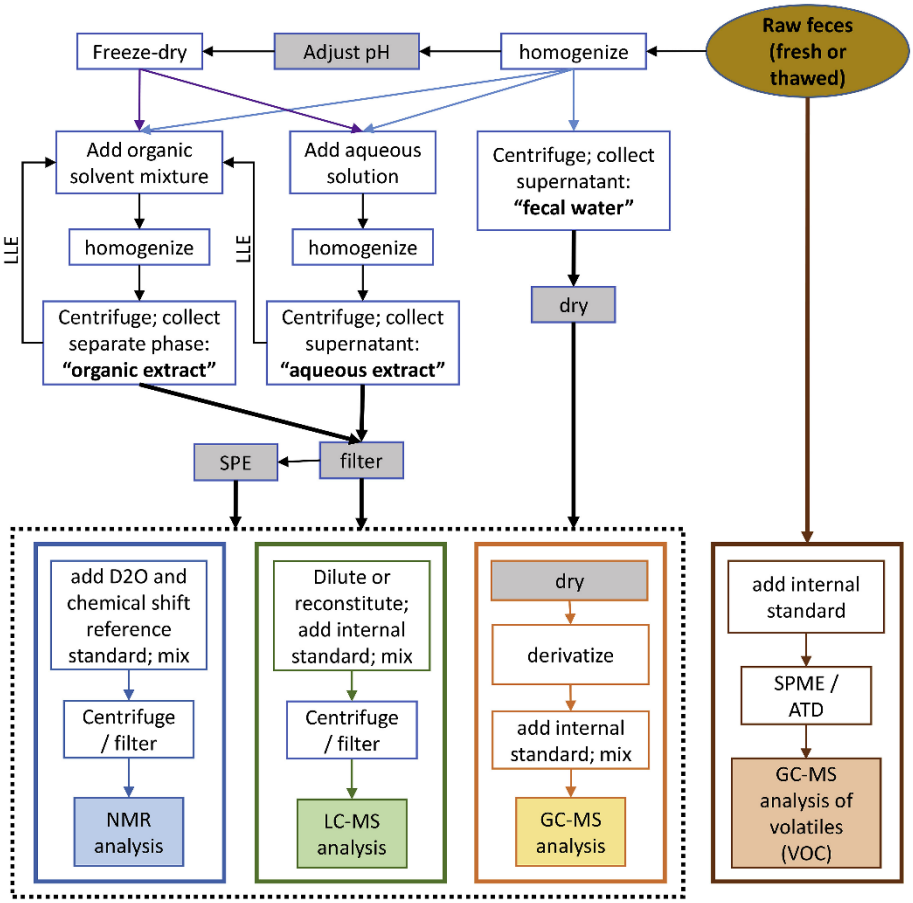


Figure 13 : Flux de travail simplifié pour la préparation des échantillons fécaux avant leurs analyses par différentes plateformes. Les étapes facultatives sont indiquées sur fond gris. [209]

II.4.4. Complémentarité des échantillons pour la couverture du métabolome

La plupart des études en métabolomique ont tendance à exploiter une seule matrice biologique pour mettre en évidence des biomarqueurs et proposer des voies métaboliques dérégulées. Cette tendance vient de la clinique et du fait que le sang et les urines par exemple sont facilement recueillis, avec un volume d'échantillon non limitant. Ce type d'approche est réductrice quant à l'information métabolique associée à un individu. En effet par des effets compensatoires, la dérégulation des voies métaboliques lors d'une pathologie peut être plus facilement détectable dans un compartiment biologique plutôt qu'un autre, ainsi l'analyse de l'un ou de l'autre peut induire un diagnostic erroné. De nombreux travaux [210–212] mettent en évidence sur les variabilité inter-patients et inter-jours, montrant que chaque compartiment biologique est impacté différemment par les facteurs « environnementaux ». La combinaison des données métabolomiques provenant de plusieurs matrices biologiques peut aider à comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'échelle d'un individu en apportant une information métabolique plus complète provenant de plusieurs compartiments

biologiques. Par exemple, Ganti *et al.* [213] ont trouvé des biomarqueurs des tumeurs rénales en analysant l'urine, le sang et du tissue (rein) de souris ; Zhang *et al.* [214] ont réussi à améliorer la précision de la détection entre le cancer colorectal et l' adénome en analysant les échantillons de sérum et de fèces des patients. Les réponses de Paepe *et al.* [215] et de Martias *et al.* [216] à ce besoin d'analyse multi-matrices a été de développer une méthode d'analyse simultanée de l'urine, du plasma et des fèces par LC-MS. Leur conclusion est que les analyses multi-matrices sont une aubaine pour la détection de biomarqueurs et qu'elles renforcent les capacités discriminatoires des modèles statistiques.

Ces échantillons fournissent également des informations spatiales sur les changements physiologiques et sur l'endroit où se déroulent des processus spécifiques dans l'organisme. Les informations spécifiques aux maladies constituent un autre aspect important, car certaines maladies affectent des organes spécifiques, ce qui rend les échantillons de tissus cruciaux pour obtenir des preuves directes de la pathologie. En métabolomique et lipidomique, chaque type d'échantillon biologique offre une pièce différente du puzzle métabolique (**Figure 14**). Pour comprendre une pathologie, il est préférable d'avoir une information intégrative à l'échelle de l'individu donc provenant d'un maximum de type d'échantillons

La combinaison de données provenant de plusieurs échantillons permet de reconstruire les voies métaboliques et de mieux comprendre le flux de métabolites dans les différents compartiments biologiques [217]. Cette approche intégrative permet d'identifier des points de régulation clés et des cibles thérapeutiques potentielles. Différents échantillons peuvent fournir des biomarqueurs complémentaires pour le diagnostic et le pronostic de la maladie, améliorant ainsi la précision du diagnostic lorsqu'ils sont combinés.

La complémentarité des différents échantillons biologiques réside dans leur capacité à fournir une vision multidimensionnelle des processus biologiques et métaboliques (**Figure 14**, **Tableau 3**). Mais la complémentarité peut aussi venir de l'analyse multiplateformes sur un même échantillon [216]. Les tissus, le sang, l'urine et les fèces offrent chacun des informations uniques qui se recoupent, ce qui permet une compréhension globale de la santé et de la maladie. En intégrant les données provenant de ces différentes sources, les chercheurs peuvent mieux comprendre les interactions complexes au sein de l'organisme et développer des stratégies diagnostiques et thérapeutiques plus efficaces.

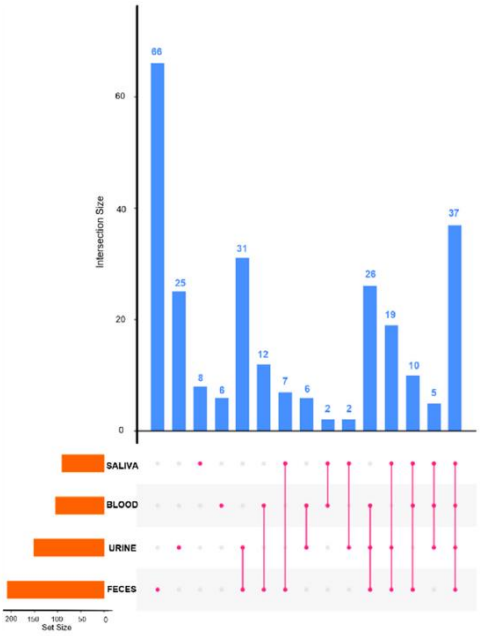


Figure 14 : Exemple de diagramme de complémentarité d'échantillons humains (90 dans la salive, 104 dans le sang, 151 dans l'urine et 208 dans les fèces) pour une couverture métabolique [217]

Tableau 3 : Métabolites (endogènes et exogènes) et caractère invasif de l'échantillonnage des différents compartiments biologiques humains en octobre 2024

Echantillon	Echantillonnage Invasif	Métabolites répertoriés dans HMDB
Sang	OUI	37 228
Fluide Cérébrospinal	OUI	450
Sueur	NON	92
Salive	NON	1 237
Urine	NON	5 661
Fèces	NON	6 791

II.5. Les Techniques Analytiques

En métabolomique, deux techniques se démarquent : la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (MS) couplée à une chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC). La spectroscopie par RMN a une riche histoire qui remonte au milieu du XXe siècle.

Les principes fondamentaux de la RMN ont été découverts indépendamment par Bloch et Purcell, qui respectivement travaillaient sur l'eau et la paraffine, ce qui leur a valu le prix Nobel de physique en 1952. Leurs travaux ont permis d'élucider le comportement des noyaux atomiques, en particulier lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique [218]. La spectroscopie RMN est une technique analytique puissante largement utilisée en chimie, biochimie et science des matériaux pour déterminer les structures moléculaires, quantifier les concentrations moléculaires et étudier la dynamique moléculaire [219,220].

La MS a vu le jour au début du XXe siècle pour mesurer les masses atomiques et s'est depuis développée pour englober un large éventail d'applications [221]. Les progrès de la SM comprennent la compréhension de l'isotopie, les mécanismes de fragmentation et l'introduction de techniques d'ionisation. Ces progrès ont permis d'étendre les applications de la spectroscopie à la chimie, à la biologie, à la médecine et aux sciences de l'environnement.

Dans cette partie, ces appareils, ainsi que leurs forces et faiblesses, vont être présentés.

II.5.1. RMN

La spectroscopie par RMN (**Figure 15**) permet d'accéder à la structure des composés d'un échantillon en interprétant le comportement de l'aimantation des atomes. Tous les noyaux ne sont pas observables en RMN : ils doivent posséder des propriétés magnétiques propres, qui sont retransmises par la valeur du nombre de spin I et le nombre quantique magnétique de spin m_s. Ces valeurs se traduisent physiquement par la direction que peuvent prendre les spins sous l'effet d'un champ magnétique extérieur B_0.

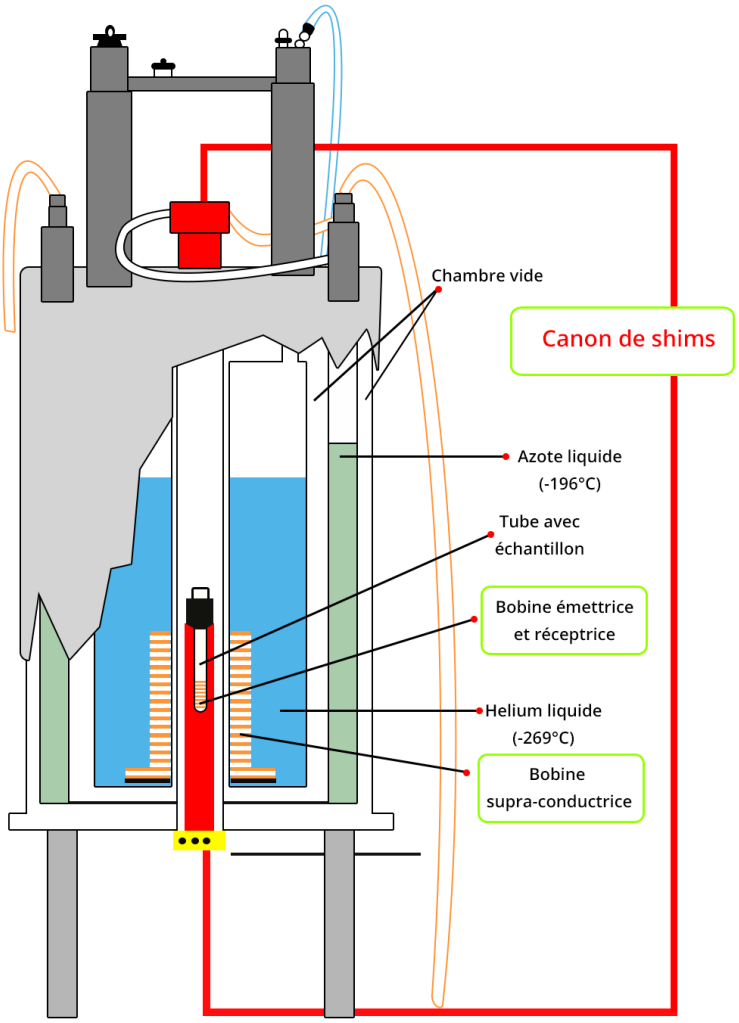


Figure 15 : Schéma d'un appareil RMN [222]

Un atome, de spin I dont la valeur dépend de son nombre de masse A et de son numéro atomique Z, peut prendre (2.I+1) orientations lorsqu'il sera soumis à un champ B_0 et m_s prend toutes les valeurs de I, en positif et négatif. Pour être observable en RMN, un atome doit avoir un nombre de spin I non nul. Il en découle que m_s peut prendre plusieurs valeurs. Or les spins ayant un m_s différent vont pouvoir être différenciés énergétiquement grâce à B_0, en fonction de l'orientation favorable, soit parallèle au champ (α), soit antiparallèle au champ (β) (**Figure 16**).

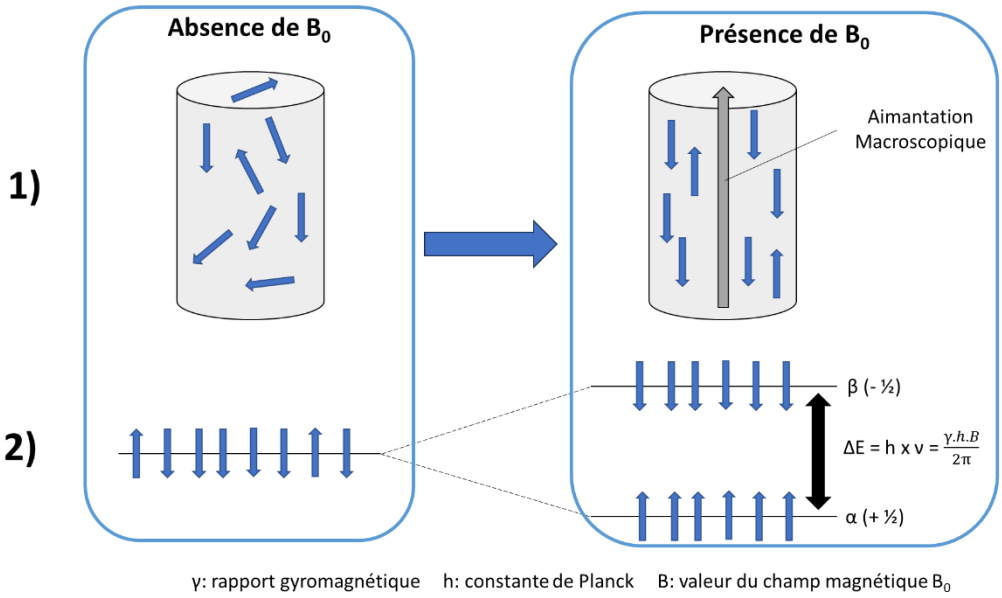


Figure 16 : Schéma explicatif de l'impact du champ B_0 sur l'aimantation (1) à l'échelle macroscopique ; (2) à l'échelle des niveaux énergétiques de spin

Par exemple, le ^{12}C n'est pas observable en RMN car I=0 donc le spin ne peut prendre qu'une orientation alors que le ^{13}C et le ^{1}H possèdent un spin nucléaire de ½ et donc les spins peuvent prendre deux orientations symbolisées par ms= ½ ou ms = -½. Sur le même principe, les atomes de ^{15}N, ^{19}F et ^{31}P sont propices aux mesures RMN pour l'étude de la chimie du vivant.

La mesure RMN consiste à faire passer un spin d'un état énergétique α à l'état énergétique β après excitation par absorption d'une onde électromagnétique B_e. La différence de population est infime, l'application de la loi de Boltzmann pour l'hydrogène indique qu' il existe un spin « en excès » pour 20 700/2 spins totaux [223].

Pour exciter un spin et le faire passer d'un niveau énergétique à l'autre, soit de l'énergie α à l'énergie β, il faut fournir à l'atome une onde à la fréquence de résonnance du noyau ν_0, aussi appelée fréquence de Larmor, qui dépend de B_0 et du rapport gyromagnétique (valeur propre à chaque atome) : $\nu(Larmor) = \frac{\gamma B}{2\pi}$. Avec B_0 selon l'axe z, cette excitation va se traduire par un basculement du spin selon z au plan x0y, soit un basculement de 90°. Le signal en RMN provient de la mesure du retour à l'équilibre des spins. Ce phénomène appelé relaxation est le temps que met le spin à retourner à sa position initiale [224]. Cette relaxation se décompose en une relaxation longitudinale (associée à un transfert d'énergie avec le réseau

environnant) et une relaxation transverse (qui correspond au déphasage des aimantations dans le plan transverse) appelées relaxations T_1 et T_2 respectivement (**Figure 17**).

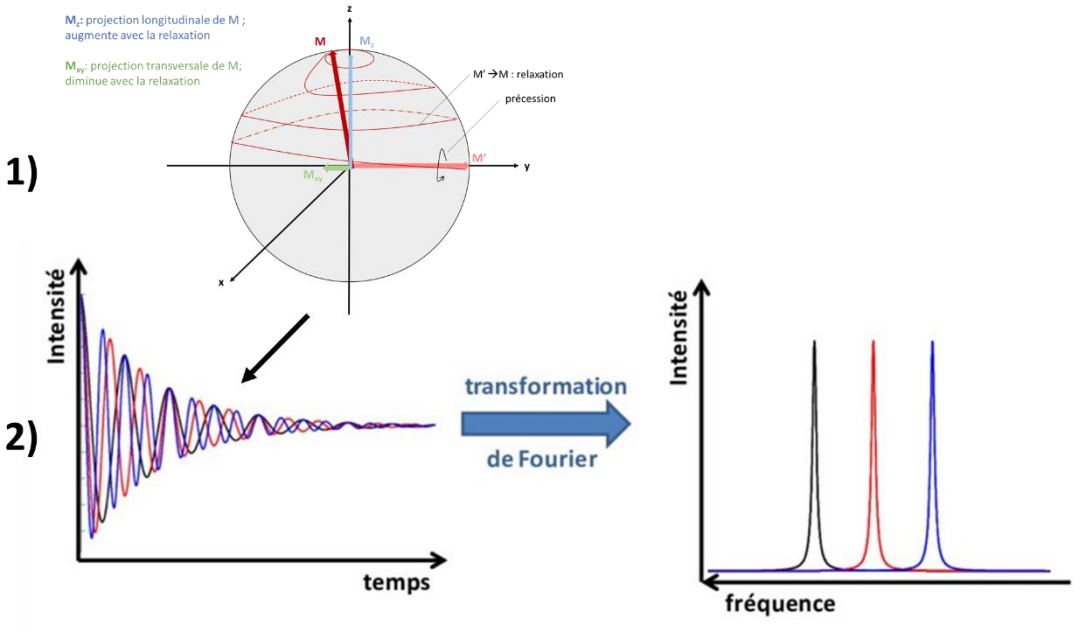


Figure 17 : Principe de la relaxation macroscopique et de son acquisition(1) Schéma de la relaxation du spin après une perturbation par le champ magnétique B_e (2) Enregistrement du signal de l'onde radiofréquence renvoyée par le spin lors de son retour à l'équilibre (FID = Free Induction Decay)et le spectre RMN obtenu après transformation de Fourier [225]

Le RMN est un détecteur universel qui demande peu de préparation d'échantillon. Elle permet de d'identifier des composés mais aussi de les quantifier. Pour ce faire, il est nécessaire d'ajouter un standard de concentration connue à l'échantillon et prendre un compte un temps d'analyse permettant d'observer des relaxations totales des atomes étudiés dans l'ensemble des composés présents. En respectant ces prérequis, la RMN est une analyse robuste et hautement reproductible (**Figure 18**).

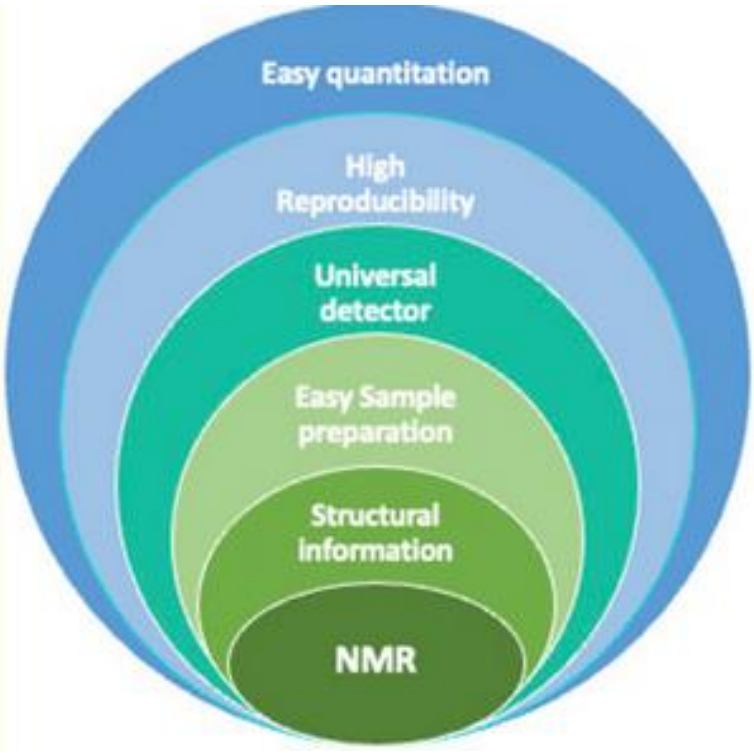


Figure 18 : Points forts de la RMN [226]

La RMN est considérée comme un analyseur universel cependant, en fonction du noyau étudié et de ses caractéristiques (**Tableau 4**), la sensibilité de la mesure sera plus ou moins élevée, nécessitant des RMN de plus en plus puissantes : les RMN vont de 300 MHz à 1,2 GHz [227].

Tableau 4 : Valeurs de différents paramètres physicochimiques de quelques noyaux impactant le signal en RMN ici pour un aimant à 7 Tesla soit 300 MHz

Noyau	ν(MHz)	Abondance Naturelle (%)	γ (10^8 rad.s^{-1}.T^{-1})	Sensibilité par rapport à ^{1}H
^{1}H	300,00	99,98	2,67	1,00
^{19}F	282,67	100,00	2,52	0,83
^{31}P	121,44	100,00	1,08	$0{,}66.10^{-1}$
^{13}C	75,43	1,10	0,67	$1{,}76.10^{-4}$

Il est souvent reproché à la RMN son manque de sensibilité, en comparaison à la spectrométrie de masse. De nouvelles technologies ont donc émergées afin d'améliorer la sensibilité des mesures [228]. La RMN dite « *Dynamic Nuclear Polarization* » [229,230] (**Figure 19**) est une des solutions proposées, applicable pour la 1D [231]: Cette technologie permet de gagner un facteur 658 pour le ^{1}H (de 2617 pour le ^{13}C, de 6491 pour le ^{15}N) [232] en sensibilité mais demande des équipements très lourds qui ne sont pour l'instant pas accessible à la

plupart des laboratoires. La démocratisation de cette technologie permettrait une avancée majeure dans le domaine de la métabolomique par RMN.

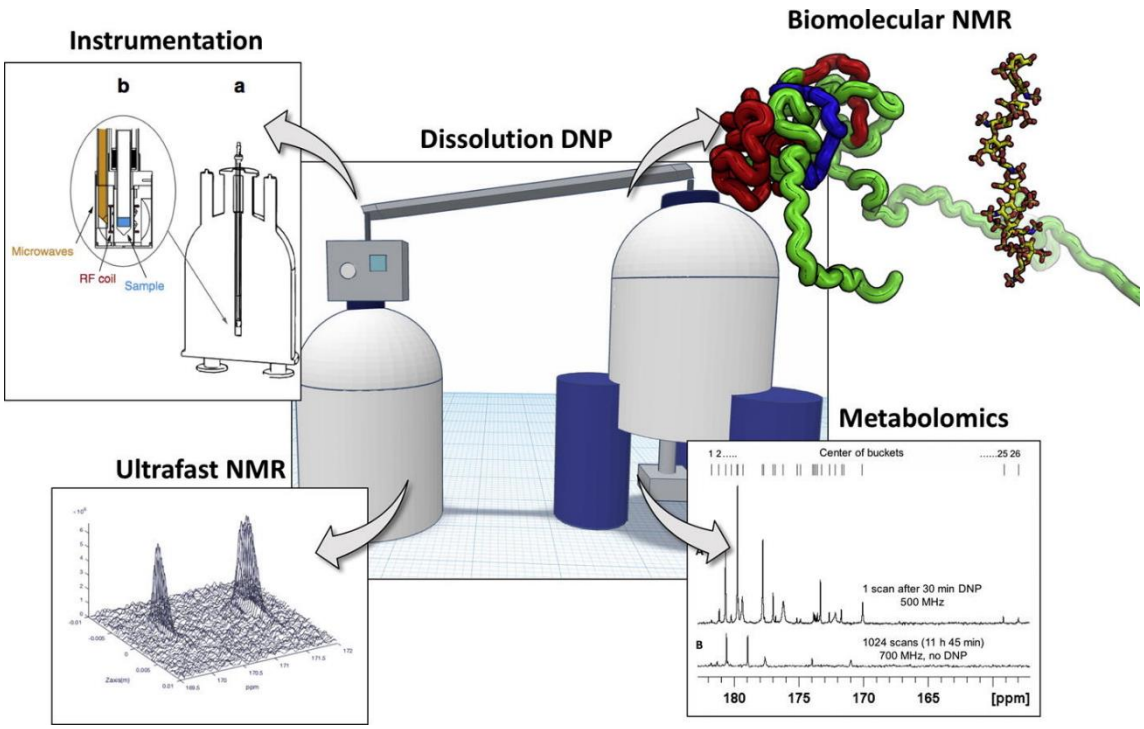


Figure 19 : Schéma du montage d'un spectromètre RMN équipée de DNP [226,233]

La RMN fait preuve de robustesse, de reproductibilité, de capacités quantitatives et d'une préparation minimale des échantillons, ce qui la rend bien adaptée aux applications métabolomiques cliniques [226,234]. La RMN a été utilisée pour le diagnostic de la maladie de Pompe [235], les acidoses urinaires [236], la triméthylaminurie [237], les cancers [238,239] et les maladies dégénératives [240]. De plus, la RMN offre la possibilité de travailler avec des échantillons liquides et solides et de pouvoir étudier les atomes métalliques, bien que ce type d'analyse soit plus complexe, ce qui présente un intérêt pour les études environnementales [241,242]. De nos jours, les principaux fournisseurs sont Bruker, Jeol et Agilent.

II.5.2. Séparation

La chromatographie est une étape clé et quasiment incontournable pour les analyses par spectrométrie de masse de milieux complexes. Elle permet la séparation des composés d'une solution en jouant sur l'affinité « composés/phase mobile/phase stationnaire ». En fonction des caractéristiques physico-chimiques des molécules ciblées. La phase mobile peut être une phase gazeuse (GC), une phase liquide (LC), un fluide supercritique ou une électrophorèse capillaire. Mais d'autres solutions existent.

Chromatographie Phase Gazeuse

En GC [243], un échantillon liquide est introduit dans l'injecteur afin d'être vaporisé. Puis le gaz vecteur va entrainer l'échantillon dans la colonne chromatographique qui va permettre la séparation/l'élution des composés. En phase gazeuse, les colonnes chromatographiques font plusieurs dizaines de mètre (**Figure 20**).

Parmi les composés qui peuvent être étudiés, certains ont une volatilité faible, rendant la GC inadapté à leur analyse. En ajoutant une, ou plusieurs, étape(s) de dérivation, il est possible de rendre un composé volatil. La dérivation est une réaction chimique entre le composé et une autre molécule appelée « étiquette » ou « TAG ». Les dérivations les plus communes en GC sont la silylation, l'acylation ou l'alkylation [244,245]. La dérivation est une étape qui peut être chronophage et qui entraine des biais, notamment dans le cas où la dérivation (et ses conditions opératoires) n'est pas contrôlée.

A l'intérieur de la colonne se trouve la phase stationnaire : si cette dernière est polaire, elle va retenir les composés polaires alors que les composés apolaires élueront en premiers. En phase inverse, les composés retenus sont les composés apolaires.

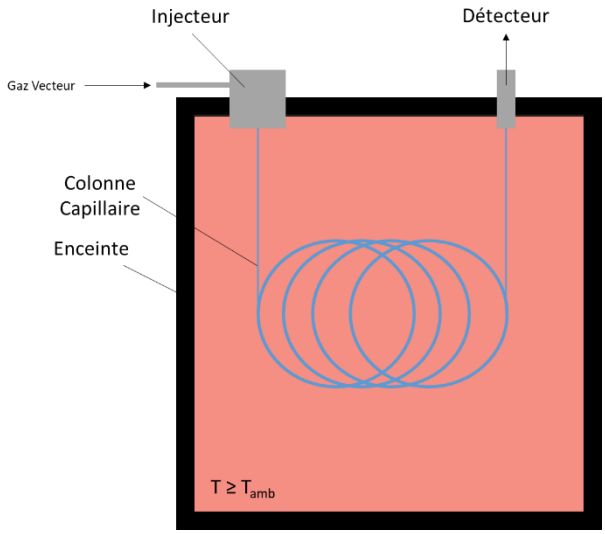


Figure 20 : Schéma d'un appareil à chromatographie à phase gazeuse

Pour améliorer la séparation, il est souvent nécessaire d'opérer à une température élevée, ce qui peut engendrer une dégradation des composés et toutes les colonnes ne sont pas faites pour fonctionner à de telles températures.

Lorsque les composés à étudier sont très volatiles, appelés les COV (Composés Organiques Volatiles), il est possible d'utiliser en amont de la GC, le dispositif *headspace* (**Figure 21**). Un échantillon liquide est placé dans une fiole. Les molécules en phase liquide vont passer en phase vapeur en raison de l'équilibre entre les phases liquide et vapeur ; cet équilibre est représenté par la constante de partage K. En chauffant le flacon, cet équilibre va être déplacé, pour favoriser la phase gazeuse dans l'espace de tête. Les molécules présentes dans l'espace de tête peuvent ensuite être soit injectées directement en chromatographie en phase gazeuse (GC), soit collectées à l'aide d'une fibre poreuse dans la variante SPME-HS (*Solid Phase MicroExtraction-HeadSpace*). La fibre utilisée va dépendre des composés ciblés car elle joue sur l'équilibre « phase gazeuse/fibre », où l'équilibre doit être grandement favorisé pour la fibre.

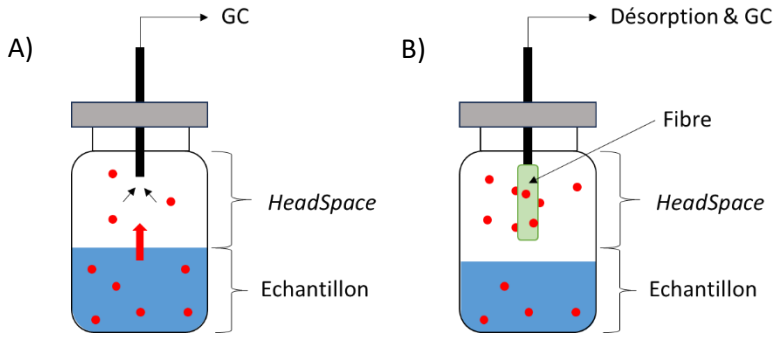


Figure 21 : Schéma d'un prélèvement headspace-GC (A) et de sa variante SPME-HS-GC (B)

*****Chromatographie Liquide*****

En chromatographie liquide (LC) [246], une phase mobile liquide va venir entrainer l'échantillon dans une colonne, qui contient une phase stationnaire. Les équilibres physico-chimiques « molécule-phase stationnaire-phase mobile » va permettre l'élution des composés (**Figure 22**). Il existe de nombreuses phases stationnaires, les plus couramment utilisés sont les phases stationnaires hydrophile et hydrophobes. Par rapport à la GC, il existe d'autres différences : (1) une colonne GC fait plusieurs dizaines de mètres contre une dizaine de centimètres pour une LC, (2) de la température de travail : une centaine de degrés contre une dizaine et les pressions appliquées sur la phase mobile. (3) les pressions en LC sont bien plus élevées, on parle d'ailleurs de LC haute pression.

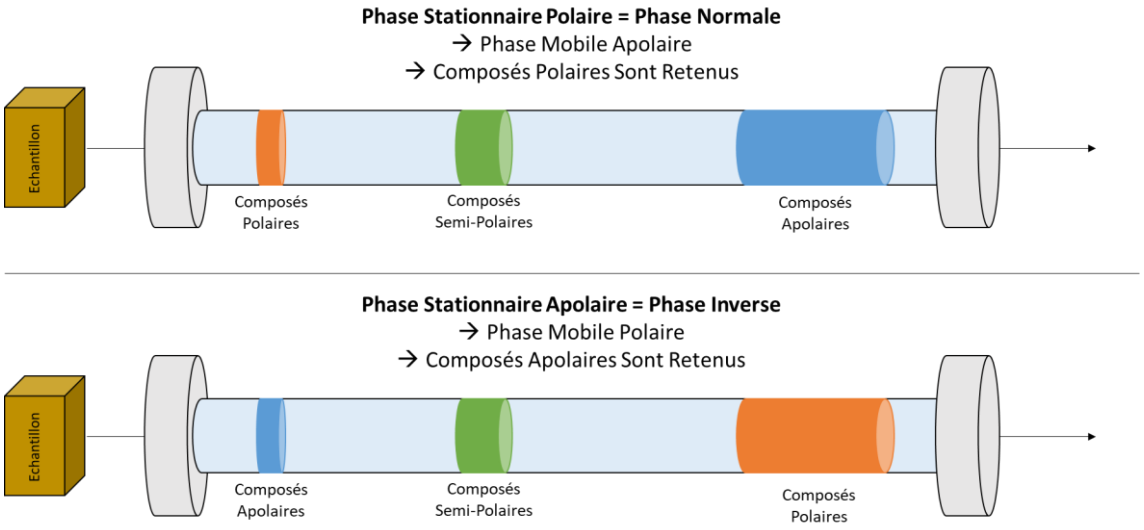


Figure 22 : Schéma des colonnes à chromatographie liquide

*****Chromatographie Fluide SuperCritique (SFC)*****

La chromatographie sur fluide supercritique (SFC) utilise un fluide supercritique à l'instar d'un liquide ou d'un gaz. Les fluides supercritiques sont des substances qui se trouvent à une température et à une pression supérieure à leur point critique, où elles présentent à la fois des propriétés de gaz et de liquide. Le CO_2 est couramment utilisé comme fluide supercritique en raison de ses propriétés favorables. Son utilisation est considérée comme respectueuse de l'environnement et non toxique [247,248].

La SFC peut séparer une large gamme de composés, des petites molécules ce qui rend son utilisation versatile. Bien que son pouvoir de séparation soit considéré comme plus rapide et plus résolutif, le choix restreint en termes de phase mobile et stationnaire peut limiter son utilisation, certains composés ont notamment une faible solubilité en phase supercritique.

La SFC nécessite des connaissances et une expertise spécialisée pour le développement et l'utilisation des méthodes, ce qui la rend pour l'instant peu utilisée par les laboratoires.

*****Electrophorèse Capillaire*****

L'électrophorèse capillaire [249] est une technique de séparation utilisée pour séparer des particules chargées, telles que des protéines ou les acides nucléiques. Le principe de la séparation repose sur le mouvement des particules chargées dans un champ électrique. Une tension est appliquée sur le capillaire ce qui va faire migrer les particules chargées vers

l'électrode de charge opposée. La vitesse de migration dépend de la charge et de la taille des particules ainsi que de l'intensité du champ électrique (**Figure 23**).

L'électrophorèse capillaire permet des séparations hautement résolues : des molécules de tailles similaires mais de charges différentes auront une élution très différente. L'électrophorèse peut permettre de séparer de petites quantités d'analytes, ce qui la rend précieuse pour les applications nécessitant une grande sensibilité, telle que la métabolomique. Cependant, l'électrophorèse ne peut séparer que les particules chargées, ce qui limite son application pour les molécules neutres. Le choix des conditions de tampon et de pH est essentiel pour la réussite de l'électrophorèse et peut nécessiter une optimisation pour différents types d'échantillons [250].

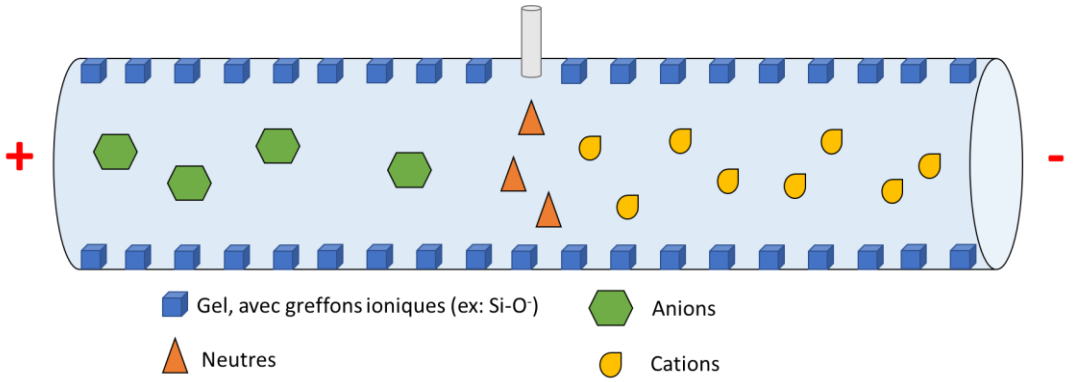


Figure 23 : Schéma du fonctionnement d'une électrophorèse capillaire

*****Injection directe*****

Dans certains cas, il est possible d'injecter son échantillon directement dans le système MS [251,252]. L'absence de préparation d'échantillon représente un gain de temps important. De plus le fait que l'analyse porte sur la matrice native permet une représentation fidèle du milieu biologique. Ces avantages ont permis à la *Direct Infusion Mass Spectrometry* (DIMS) d'être utilisée en contexte clinique pour des analyses à haut débit [253,254]. En contrepartie, la pollution de l'appareil est élevée et nécessite donc un entretien plus régulier, l'absence de séparation et donc l'absence de la connaissance du temps de rétention ($t_{R\ ou}$ RT) de chaque ion complexifie l'identification de molécules [255].

Mobilité ionique

Une des limites de la LC-MS est sa capacité à séparer et différencier des isomères, ou des molécules très similaires d'un point de vue structurel et physico-chimique, tout en gardant des temps d'analyses compatibles avec du haut débit. Quand la valeur de *m/z*, de temps de rétention et le spectre MS^2 ne suffit plus, il est possible de mesurer un nouveau paramètre : la mesure de CCS (*Cross Collision Section*).

La mobilité ionique (**Figure 24**) est une technique séparative qui permet de mesurer la valeur du CCS :

- La mobilité ionique est une grandeur physique qui caractérise la vitesse à laquelle un ion sous forme de gaz se déplace dans un champ électrique.
- La taille et la surface de l'ion (l'aire projetée) influe la fréquence de collision avec les molécules du gaz. La valeur du CCS (Cross Section de Collision) représente l'interaction entre un ion gazeux avec un gaz neutre, lorsqu'il se déplacement sous l'influence d'un champ électrique.

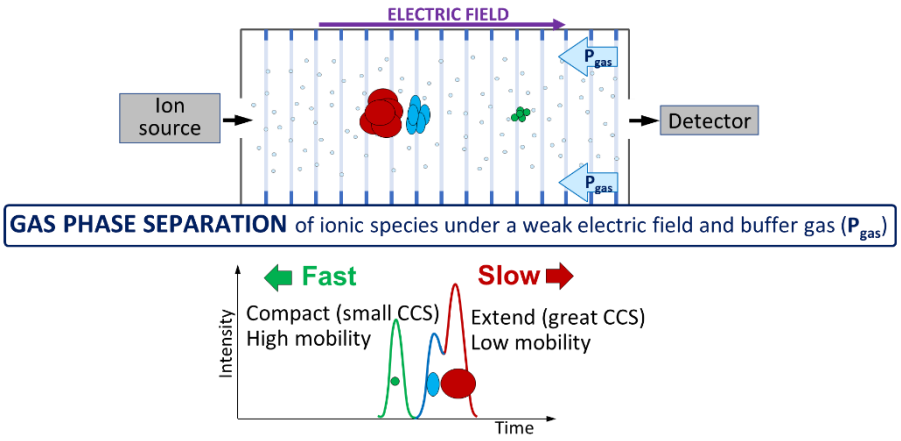


Figure 24 : Schéma de la mobilité ionique (E. Jamin & E. Rathahao-Paris, 13e JS-MTH, 17 octobre 2024)

Plusieurs technologies de mobilité ionique existent (**Figure 25**). Elles jouent sur la nature du gaz, la longueur du tube permettant la séparation, sur le sens du gaz (les ions « remontent » le gaz grâce aux champs électriques ou le gaz poussent les ions à travers le champ électrique) et sur le signal électrique (constant, sinusoïdale ou en créneaux).

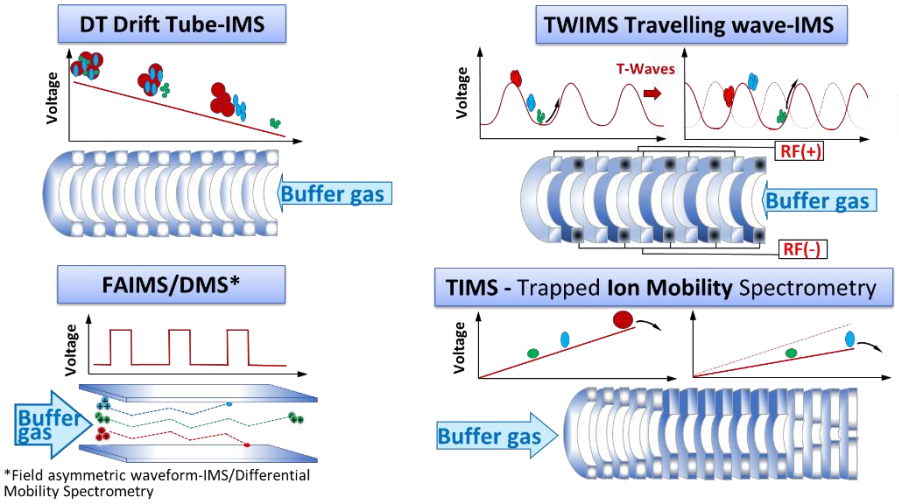


Figure 25 : Les différentes technologiques de mobilité ionique (E. Jamin & E. Rathahao-Paris, 13e JS-MTH, 17 octobre 2024) [256]

En couplant la mobilité ionique à la LC-MS, il est possible d'affiner la caractérisation et l'identification des métabolites présents dans un échantillon biologique complexe en se basant sur *m/z*, RT, la CCS et les spectres MS^2 : c'est qui s'appelle actuellement la métabolomique 3D ou 4D, fonction de la prise en compte des MS^2 ou non [257,258].

La mobilité offre de nouvelles performances. Elle a par exemple permis une caractérisation plus complète du métabolome de l'huile d'olive [259,260], de quantifier le protéome plasmatique de patients avec un trouble cognitif léger (*Mild Cognitive Impairment)* [261] ou d'identifier une protéine qui est un biomarqueur de asthénozoospermie [262].

La mobilité ionique permet de séparer en quelques secondes des composés mais cette dernière n'est pas aussi fine que la chromatographie. Cependant, en combinant de l'injection directe avec mobilité ionique pour une séparation rapide, il devient envisageable de réaliser des analyses très haut débit.

II.5.3. Spectrométrie de Masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique utilisée pour identifier et quantifier les molécules sur la base de leur rapport masse/charge et de leur motif de fragmentation (**Figure 26**) [263,264]. Sur un spectre MS, l'intensité est reliée au nombre à l'abondance d'un ion de rapport *m/z*, m étant la masse et z la charge de l'ion.

L'ionisation est une étape clé en spectrométrie de masse. L'ionisation est le processus par lequel une molécule perd ou gagne des électrons, gagnant une charge électrique et devenant donc un ion. Ce phénomène peut se produire par différents mécanismes, qui seront décrit plus loin dans ce manuscrit. Grâce à l'ionisation, la spectrométrie de masse va pouvoir analyser les ions, en les séparant en fonction de leur masse et de leur charge.

La MS permet de caractériser des mélanges complexes, de déterminer des structures moléculaires et d'étudier les interactions moléculaires. Cette technique polyvalente a des applications allant de la caractérisation de nouvelles molécules à de l'analyse médico-légale en passant par de la protéomique et de la métabolomique.

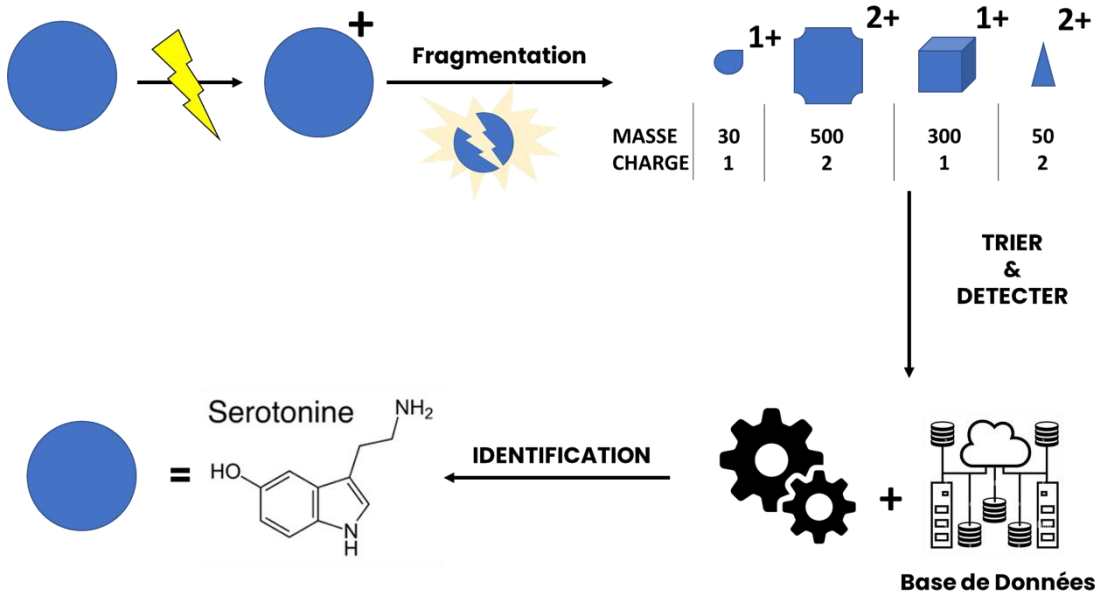


Figure 26 : Schéma de l'analyse et l'identification d'un composé en MS

Un spectromètre de masse est en général composé en 3 blocs constitutifs : la chambre d'ionisation, l'analyseur et le détecteur (**Figure 27**). La chambre d'ionisation est à l'interface de la chromatographie et de l'analyseur. Entre chaque bloc, les conditions de température et

de pression peuvent être très différentes entre (ex : passage de la P_{atm} à un vide poussée), ce qui nécessite de mettre en place des interfaces résistants à des contraintes.



Figure 27 : Schéma de la structure d'un spectromètre de masse

II.5.3.1. Acquisition

En spectrométrie de masse, un ordre est attribué à l'analyse en fonction du nombre de fragmentations appliquées. Cet ordre a pour valeur 1 ou 2 en général, même si des analyses de type n sont possibles. Les notations sont pour l'ordre 1 : MS, MS^1 ou MS1 ; pour l'ordre 2 : MS2, MS^2 ou MS/MS (**Figure 28**).

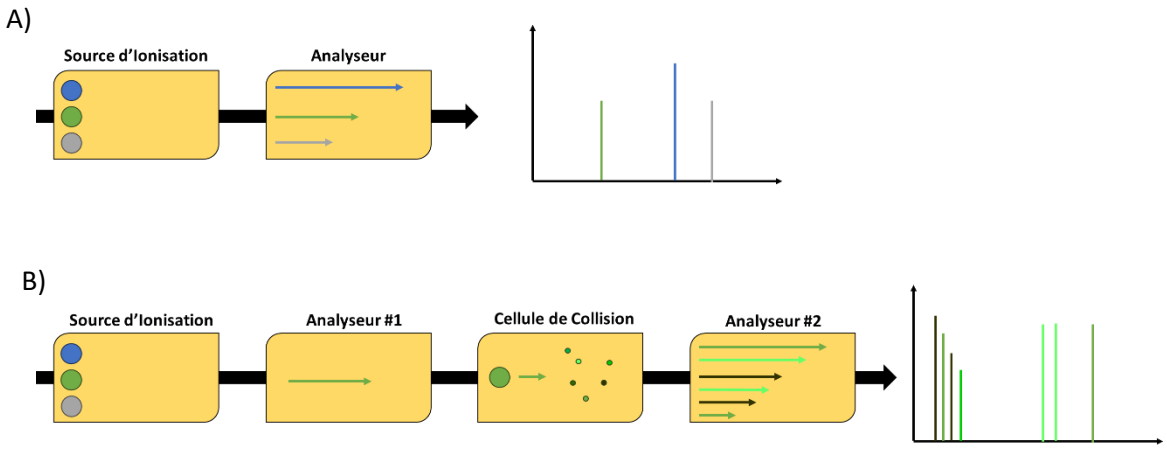


Figure 28 : Différence entre l'utilisation d'un spectromètre en MS (A) ou MS^2 (B) et les spectres associés [265]

Pour une acquisition d'ordre 1, le spectre de masse fournit des informations sur les masses des ions présents dans l'échantillon et leur abondance relative. Il permet notamment d'identifier le poids moléculaire des composés présents dans l'échantillon. La MS^1 permet une mesure précise de la masse, d'identifier les ions moléculaires et possède une sensibilité élevée, compatible pour la détection de composés peu abondants. Cependant, si l'ensemble des composés est inconnu, l'information structurelle étant peu abondante en MS1, l'identification sera complexe et approximative : des composés isobares (même *m/z* mais isomérie différente) ne seront pas distinguables.

L'acquisition d'ordre 2 est à voir comme deux MS1 successives. La première va permettre de sélectionner des ions spécifiques, appelés ions parents, soit en les renseignant dans une

liste ou en choisissant de ne garder que les x ions les plus intenses. Ces ions spécifiques vont être fragmentés dans une cellule de dissociation induite par collision (CID) ou par d'autres méthodes. Ces fragments, appelés ions fils ou *daugther ions*, sont ensuite séparés sur la base de leurs valeurs *m/z* dans le second analyseur. Le spectre de fragmentation obtenu renferme des informations structurelles sur l'ion précurseur. L'identification des composés est alors possible et les composés isobares seront différentiables. Cependant, cette information se gagne au détriment de la sensibilité plus faible que celle du MS1. L'identification des fragments pour reconstruire le squelette de l'ion parent n'est pas immédiate et nécessite des connaissances préalables et une base de données pour l'interprétation des spectres de fragmentation, ce qui s'avère chronophage.

Comme pour la MS1, il existe des variantes à la MS2. En analyse DDA (*Data Dependent Acquisition*), l'opérateur va fixer une consigne sur l'intensité des pics MS. Seul les pics ayant une intensité supérieure à cette consigne seront fragmentés en MS2. Si cette consigne est trop élevée, le nombre de spectre MS2 sera pauvre alors qu'à l'inverse, si elle est trop faible, le temps d'acquisition des spectres en MS2 sera long et impactera la définition des pics chromatographiques. La limite de ce mode d'acquisition est que les ions d'intérêts n'ont pas tous la même intensité, un mauvais réglage de la consigne peut entrainer un manque d'information. En DIA (*Data Independent Acquisition* [266,267]), tous les ions vont être fragmentés. Elle se décline en deux approches : AIF (*All Ion Fragmentation)* et SWATH (*Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra*) (**Figure 29**, **Figure 30**).

- **AIF :** tous les ions sont fragmentés. Pour parvenir à ce résultat, au vu de la diversité des molécules, il est possible d'alterner entre une énergie basse et une énergie haute de fragmentation.
- **SWATH :** Les ions vont être étudiés en fonction du rapport *m/z*, qui va être segmenté en intervalles. Les spectres MS2 obtenus sont plus nombreux mais plus simples à interpréter. La distribution des composés n'étant pas uniforme, il est possible de régler la taille des tronçons.

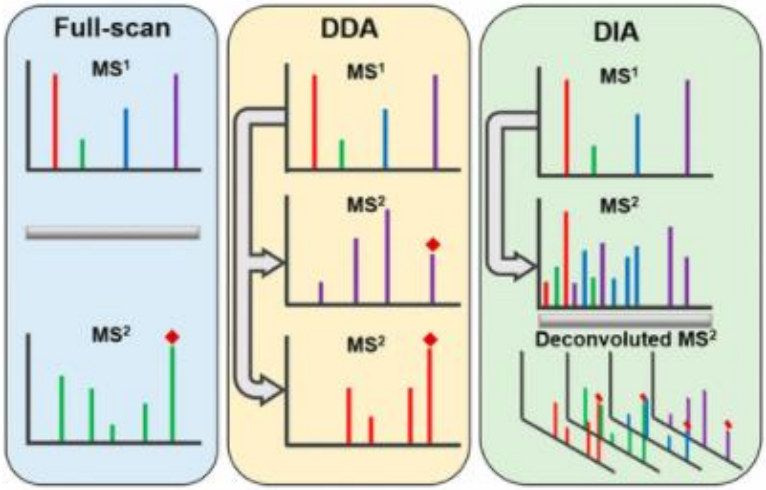


Figure 29 : Schéma du fonctionnement des trois modes d'acquisition en spectrométrie de masse en MS1 et MS2 [268]

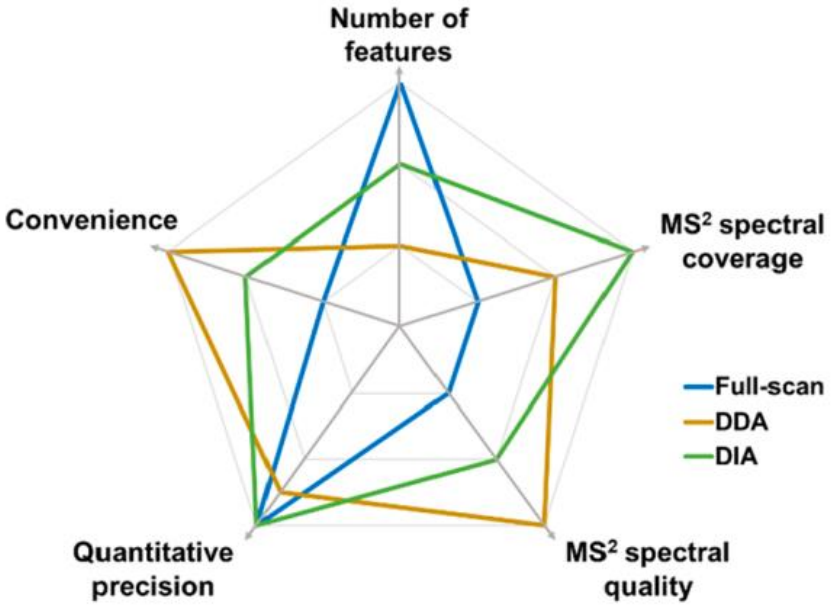


Figure 30 : Résumé des capacités des modes d'acquisition full-scan, DDA et DIA [268]

II.5.3.2. Chambre d'Ionisation

Il existe une multitude de chambres d'ionisation, avec pour chaque constructeur des variantes propres, mais toutes reposent sur les mêmes principes généraux [266,269,270]. L'objectif de cette partie est de décrire de manière non-exhaustive les chambres d'ionisation disponibles.

II.5.3.2.i. Ionisation sous vide

***** EI : Electron Ionization (Ionisation par impact électronique) *****

Les molécules vont pénétrer dans une enceinte sous vide. Une forte tension est appliquée aux extrémités, à la perpendiculaire du trajet des molécules, ce qui va créer un faisceau d'électrons, entre une cathode (production des électrons) et une anode. Au contact de ces électrons, les molécules vont s'ioniser et/ou former des radicaux. Un montage de lentilles en cascade va permettre de les extraire de la chambre, en les focalisant et les accélérant vers l'analyseur (**Figure 31**).

La EI est un mode d'ionisation dure, les électrons ont une énergie de 70 keV (valeur normée) ce qui engendre des ions très énergétiques et donc une très grande fragmentation. Le spectre de fragmentation obtenu est très détaillé, il possède une grande information structurale mais le pic moléculaire, correspondant à l'ion moléculaire, est souvent absent. En cas de co-élution, l'interprétation du spectre devient très complexe.

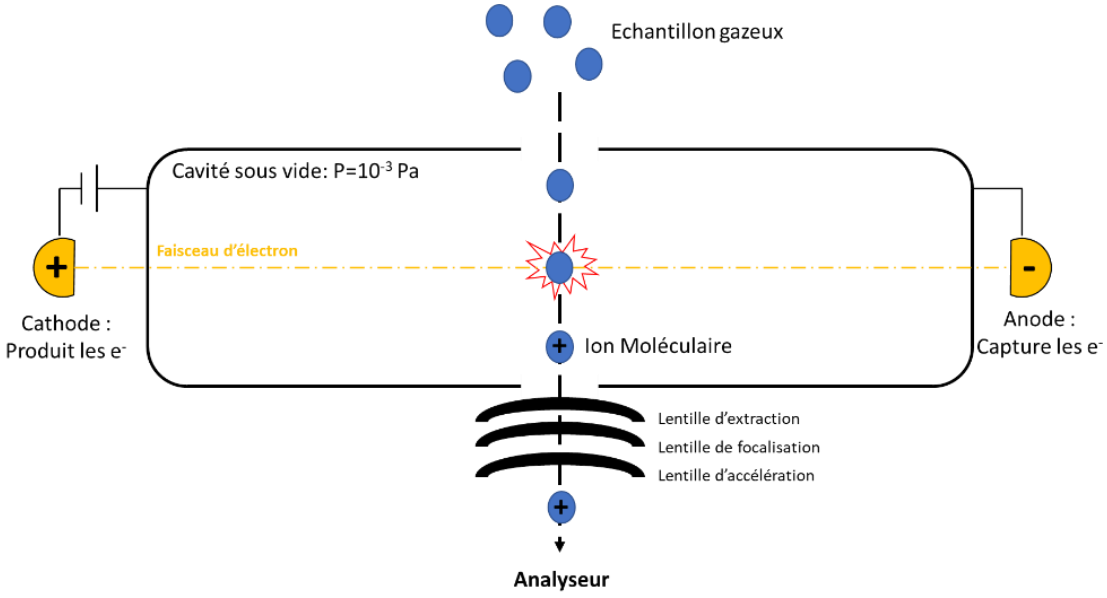


Figure 31 : Schéma d'une ionisation par impact électronique

*****CI : Chemical Ionization (Ionisation chimique)*****

L'ionisation chimique est au contraire de l'EI, une ionisation douce et indirecte. Un gaz (CH_4 ou NH_3) va être ionisé par un faisceau d'électrons et ce sont ces ions de gaz ionisant qui vont transférer leurs énergies aux molécules (**Figure 32**). L'énergie d'un ion est inférieure que celle d'un électron, par leur plus faible cinétique par exemple, la fragmentation induite est

donc moins prononcée. De plus, l'utilisation d'un gaz ionisant peut produire des ions avec adduits (exemple : un CH_5^+ vient se greffer à l'ion).

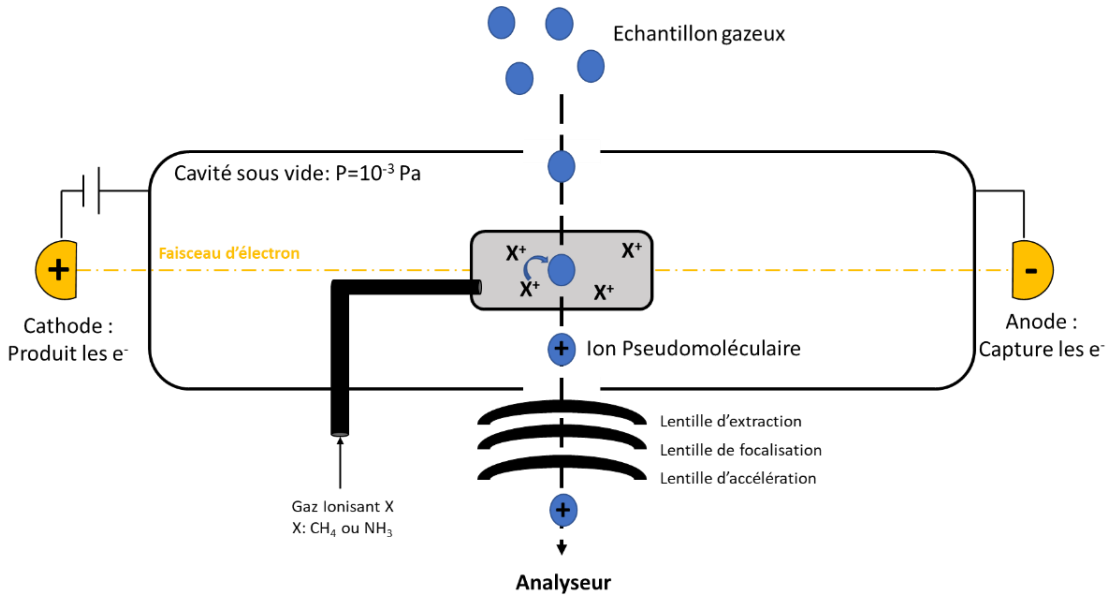


Figure 32 : Schéma d'une ionisation CI

II.5.3.2.ii. Ionisation à pression atmosphérique

*****ESI : ElectroSpray Nebulisation (Ionisation par électronébulisation)*****

Le nébuliseur va transformer un débit de solvant liquide en un spray d'aérosol dans une enceinte chauffée. Chaque gouttelette va contenir une grande quantité d'espèces chargées et le solvant s'évapore petit à petit, la tension de charge va croitre jusqu'à mener à une explosion coulombienne produisant des microgouttelettes. Ce phénomène se produit en cascade, jusqu'à l'obtention des ions (**Figure 33**).

L'ESI est une ionisation particulièrement douce qui possède plusieurs avantages : un bruit de fond faible, la possibilité de former des ions multichargés (ce qui permet d'observer des espèces avec un poids moléculaires élevé) et son affinité pour les composés polaires. En contrepartie, il est important de maîtriser le pH des phases mobiles. Pour faciliter l'ionisation, les solvants contiennent des électrolytes en faible quantité, qui peuvent se combiner aux ions et former des adduits. Même en présence d'électrolytes, l'ESI reste moins adaptée aux composés apolaires.

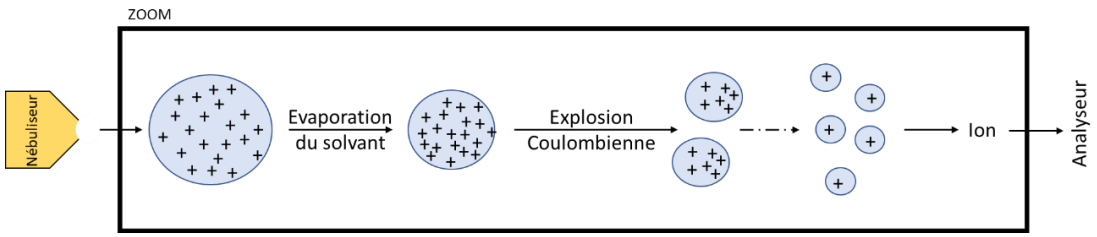


Figure 33 : Schéma d'une ionisation ESI

*****APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionisation chimique à pression atmosphérique)*****

L'APCI est une source d'ionisation douce, particulièrement adaptée aux composés peu polaires ou apolaires (**Figure 34**). L'ionisation provient d'une décharge corona, décharge électrique qui se produit lorsqu'une haute tension est appliquée à une électrode conductrice dans un gaz. La formation d'ions multichargés y est plus rare, les molécules de haute masse molaire sont donc complexes à étudier.

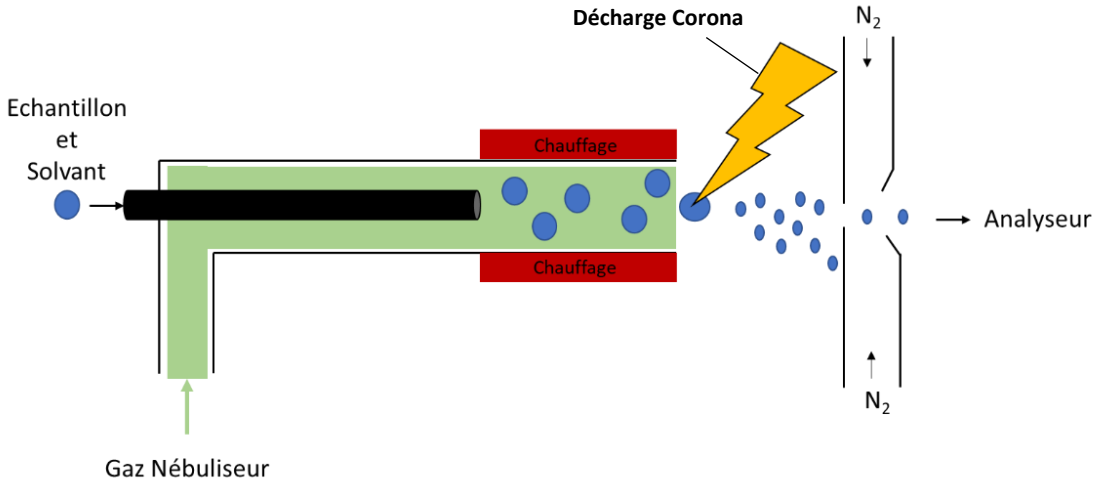


Figure 34 : Schéma d'une ionisation APCI

*****APPI : Atmospheric Pression Photo-Ionization (Photoionisation à pression atmosphérique)*****

L'APPI est une variante de l'APCI, où des rayons UV ionisants remplacent la décharge corona (**Figure 35**). Les lampes UV utilisées sont généralement à base de Krypton. Le Kr possède deux raies d'émission dont l'énergie ne permet pas d'ioniser les solvants, le spectre s'en retrouve nettoyé. Pour faciliter l'ionisation, un dopant est ajouté dans la composition des

phases mobiles. Comme pour l'APCI, l'APPI est particulièrement adaptée pour les composés peu polaires mais aussi apolaires.

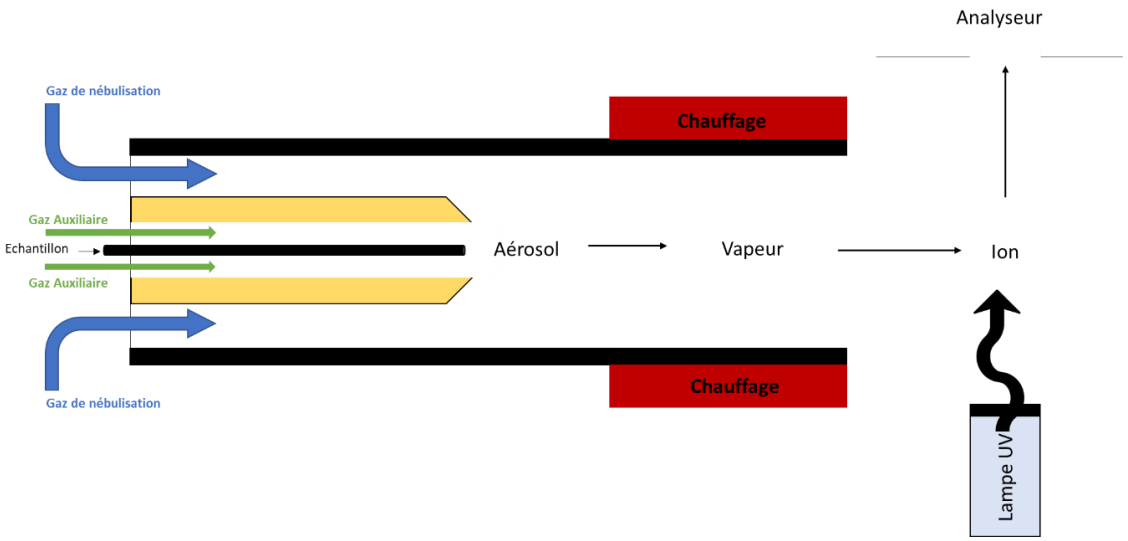


Figure 35 : Schéma d'une ionisation APPI

La **Figure 35** ci-dessus permet de visualiser la complémentarité des techniques d'ionisation de l'ESI, de l'APCI et de l'APPI en fonction de la polarité et de la masse des composés étudiés. Pour analyser l'intégralité des molécules présentent dans un échantillon, il faudrait analyser l'échantillon avec au moins deux sources complémentaires (**Figure 36**). Cependant changer de source au cours d'une analyse demande du temps mais surtout augmente la variabilité. La multi-source ESCi [271] permet au court d'une même analyse des ionisations du type ESI et APCI. L'appareil doit au cours de l'analyse changer de source, le nombre de scan dédié à chaque source est réduit et donc le nombre de points par pic sera aussi réduit.

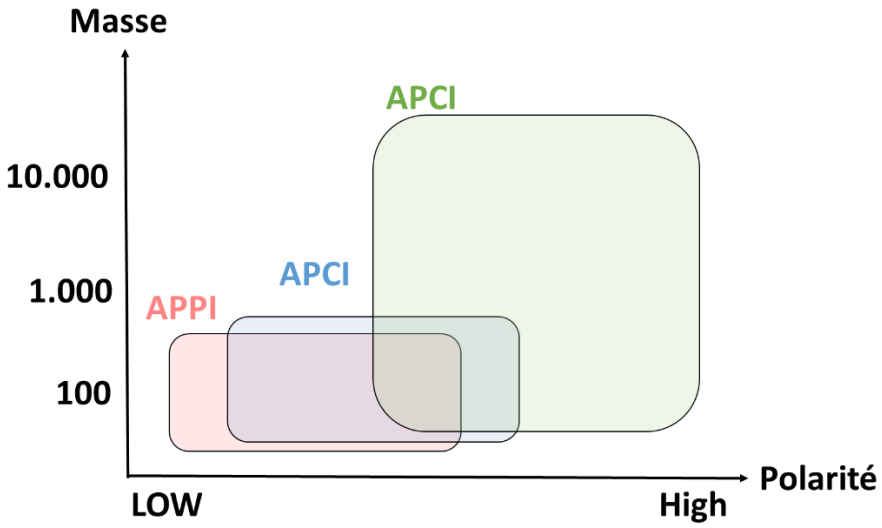


Figure 36 : Champ d'application en masse et en polarité de l'ESI, de l'APCI et de l'APPI [272]

*****UniSpray Technology, par Waters (2017)*****

La technologie UniSpray [273] peut-être apparentée à l'ESI. Avec une ionisation ESI, le voltage et donc l'ionisation sont réalisés dans l'insert. Avec l'UniSpray, le voltage est appliqué sur une cible cylindrique (*cylindrical target)* pour une ionisation indirecte des composés.

En ESI, lorsque les débits sont élevés (proche de 1mL/min) et les phases mobiles fortement aqueuses, l'efficacité d'ionisation a tendance à diminuer, à cause la distribution en taille des gouttelettes. Les différences notables de l'UniSpray en comparaison de l'ESI sont observées aux niveaux des rapports « charge/unité de volume » et de la vitesse d'évaporation du solvant. Le système UniSpray a entre autres été développé pour pallier ces problèmes. Le solvant, ainsi que les composés solvatés, vont être nébulisés et éjectés de l'insert à haute vitesse en direction de la cible cylindrique. Le jet de solvant doit frôler la cible cylindrique et non pas être dirigé dessus. En frôlant la cible, le jet va être dévié de sa course en ligne droite pour se courber, vers l'analyseur. Cette courbure du jet s'appelle l'effet Coanda (**Figure 37**).

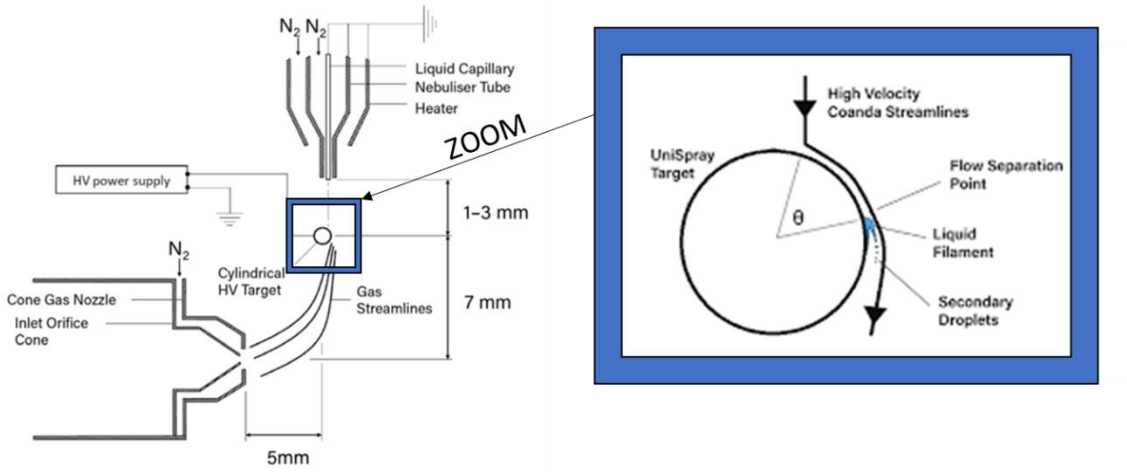


Figure 37 : Schéma explicatif du dispositif UniSpray (inspiré de [273])

*****FAB : Fast Atom Bombardment (Ionisation par bombardement d'atomes rapides)*****

La FAB est une technique d'ionisation à désorption, utilisé sur un « échantillon » solide (**Figure 38**). La projection d'atomes d'argon neutres à haute vélocité sur l'échantillon va ioniser ce dernier. En effet les atomes d'argon sont dans un premier temps ionisés (1), focalisés (2) puis la charge de ces atomes chargés rapides sera échangée avec des atomes d'argon lents (3). Ainsi les atomes d'argon rapides devenus neutres iront impacter l'échantillon coulé dans une goutte de glycérine (5). L'onde provoquée par l'impact suffira à expulser et ioniser les molécules de l'échantillon qui seront poussées (6) et focalisées (7) vers l'analyseur. Cette méthode est très douce, ce qui permet d'observer facilement l'ion moléculaire. Cependant du fait que la matrice visqueuse soit mélangée à l'échantillon, le bruit de fond est important et les pics avec des adduits de matrice sont nombreux.

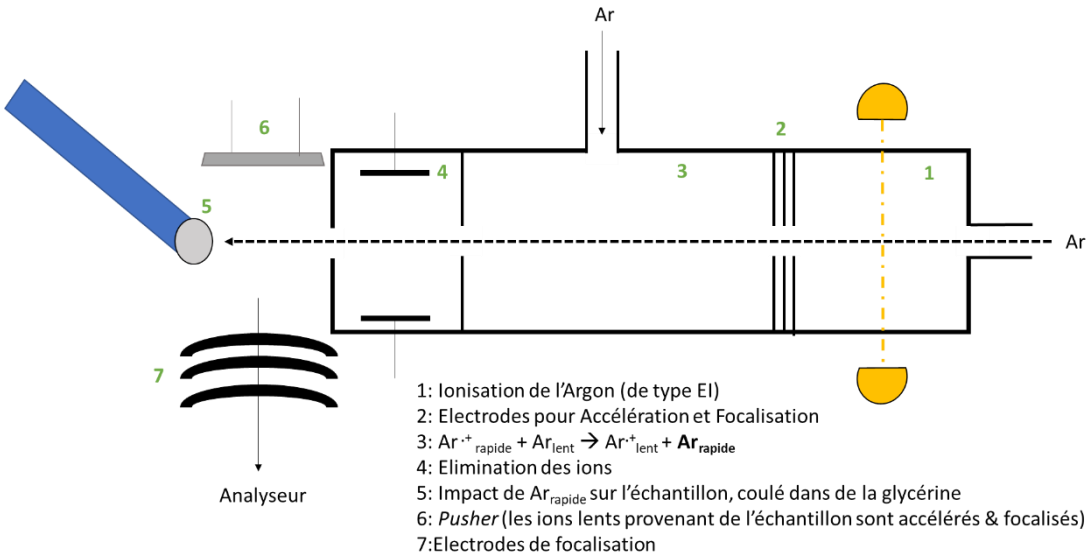


Figure 38 : Schéma d'une ionisation FAB

II.5.3.2.iii. Ionisation à pression atmosphérique permettant de l'imagerie

*****MALDI : Matrix Assisted LASER Desorption Ionisation*****

Le MALDI est une technique d'ionisation à désorption par LASER. Les paramètres expérimentaux à maitriser sont nombreux : la longueur d'onde du laser pour exciter la matrice doit être stable et adaptée à la composition de la matrice (**Figure 39**). La durée de pulsation du faisceau LASER et son angle d'incidence doit être maitrisés. La composition de la matrice, à laquelle l'échantillon est mélangé, a une incidence sur le spectre MS obtenu, notamment sur les adduits formés et sur les molécules qui vont constituer le bruit de fond. Elle est constituée de composés organiques acides et aromatiques, facilement cristallisable (acide sinapique ou acide 2,5-dihydrobenzoïque). L'échantillon est mélangé à la matrice par co-cristallisation : un mélange « échantillon-matrice-solvant » est déposé sur une cible métallique, suivi de l'évaporation du solvant. Le mélange « échantillon-matrice » va être irradié par un LASER (à la longueur d'onde où la matrice a une forte absorption). La désexcitation de la matrice se traduit par un transfert d'énergie vers l'analyte qui est désorbé et ionisé. Les spectres obtenus sont simples et facilement interprétables car on obtient en majorité des ions moléculaires monochargés.

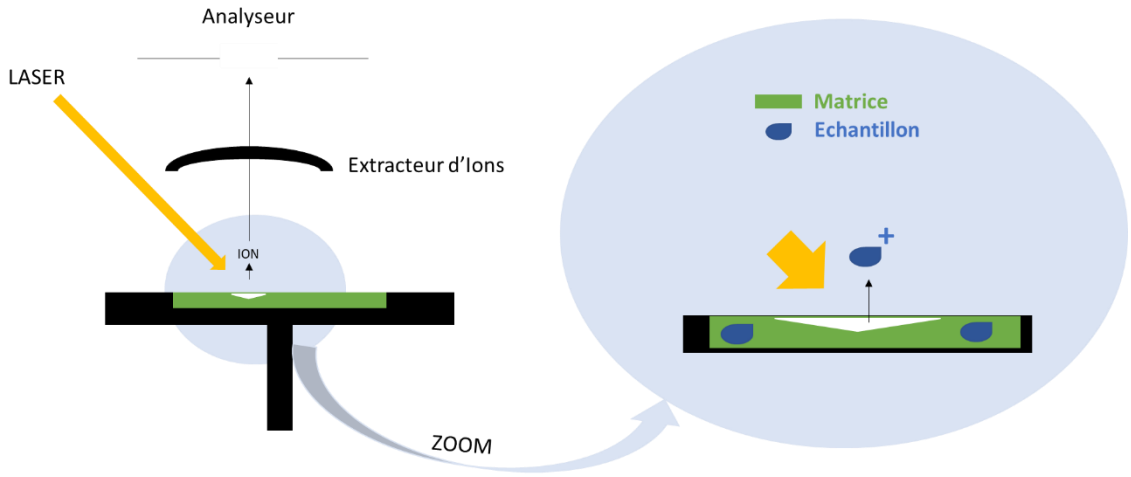


Figure 39 : Schéma d'une ionisation MALDI

*****DESI-MS : Desorption-ionisation par électrospray*****

Avec la DESI, des gouttelettes de solvant chargées sont dirigées vers la surface de l'échantillon (coupe de tissu par exemple), provoquant la désorption des analytes. Les molécules d'analyte sont ionisées en passant en phase gazeuse [274] (**Figure 40**). La DESI-MS est essentiellement employée afin de réaliser de l'imagerie pour visualiser la biodistribution de métabolites [275] mais elle peut aussi être utilisée durant des interventions chirurgicales (car elle fonctionne à pression atmosphérique) [276,277] afin d'analyser les biopsies [278]. Elle permet une analyse rapide et résolue (résolution spatiale de l'ordre de l'unité de micron) d'un échantillon sans préparation pré-analytique. Cependant, la sensibilité de la DESI peut être inférieure aux autres techniques SM, les métabolites sont en compétition pour l'ionisation avec l'ensemble des composés de la matrice étudiée.

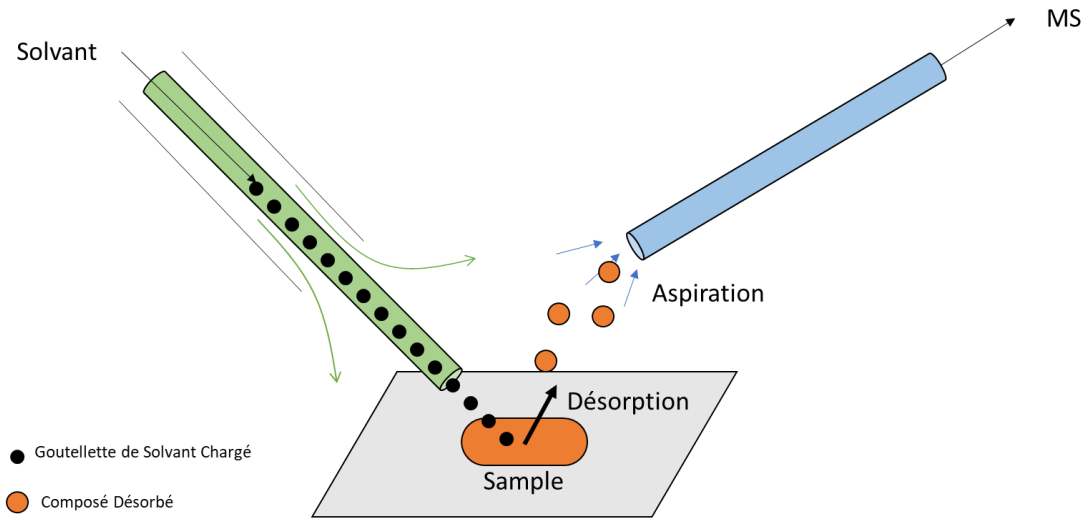


Figure 40 : Schéma de l'ionisation par DESI

*****REIMS : Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry*****

La spectrométrie de masse à ionisation par évaporation rapide (REIMS) associe l'ionisation rapide de l'échantillon à la spectrométrie de masse pour une analyse en temps réel et à haut débit. Un système REIMS utilise généralement un outil électro-chirurgical qui chauffe l'échantillon, provoquant son évaporation rapide. L'évaporation de l'échantillon génère des particules et du gaz en aérosol. Ce processus produit des ions directement à partir de l'échantillon, sans préparation préalable. Les ions sont ensuite transférés dans le spectromètre de masse.

Le REIMS permet une analyse quasi instantanée des échantillons, ce qui le rend particulièrement adapté aux applications nécessitant des résultats rapides (**Figure 41**).

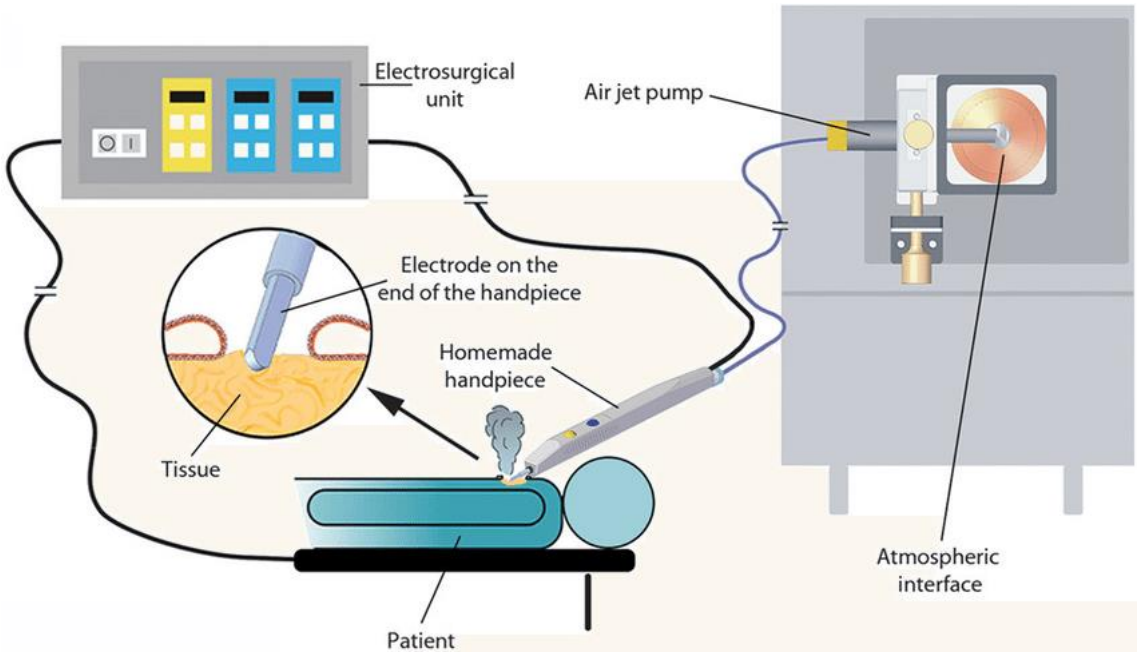


Figure 41 : REIMS, une source d'ionisation adaptée à la chirurgie [279]

II.5.3.3. Analyseurs

Tout comme il existe de nombreuses sources d'ionisation, il existe de nombreux types d'analyseurs [266] en spectrométrie de masse. La technologie employée va définir la vitesse d'analyse, la résolution en masse et la sensibilité globale de l'appareil.

*****Q : Quadripôle*****

Dans un quadripôle (**Figure 42**), les ions passent au centre de 4 pôles magnétiques. Par une application d'un champ électrique oscillant au niveau de ces pôles, les ions seront séparés sur la base de la stabilité de leur trajectoire en fonction de leur rapport masse/charge, permettant ainsi leur détection. Les ions ayant des trajectoires instables dans les conditions (U,V) appliquées sont éjectés en dehors du système. Certains phénomènes minoritaires peuvent venir interférer lors d'une analyse. Les champs U et V sont très légèrement variables, ce qui peut perturber des trajectoires. Lorsque les ions sont à en limite de trajectoire stable, il y a des collisions avec des molécules de gaz résiduel. Enfin, les effets de bord vont affecter les ions qui ne sont pas centrés dans le quadripôle.

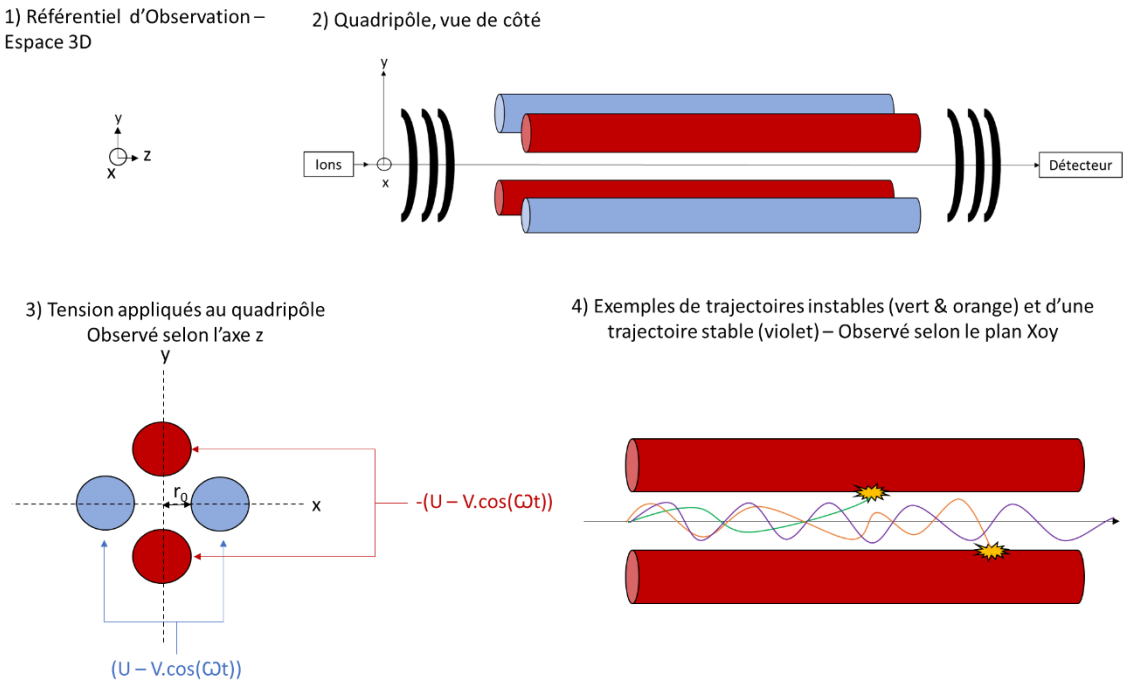


Figure 42 : Schéma d'un quadripôle

*****Le triple quadripôle (QqQ)*****

Un triple quadripôle (QqQ) se compose de trois analyseurs de masse quadripolaires en série (**Figure 43**). Chaque quadripôle remplit une fonction spécifique.

Le premier quadripôle (Q1) sert de filtre de masse : seuls les ions ayant un rapport *m/z* spécifique passe. Le deuxième quadripôle (Q2) est utilisé comme cellule de collision ou de fragmentation. Les ions précurseurs sélectionnés par Q1 subissent tous une dissociation induite par collision (CID). En sortie de Q2 se retrouve l'ensemble des fragments des composés sélectionnés par Q1. Le troisième quadripôle (Q3) sert d'analyseur de masse pour détecter et analyser les ions produits générés en Q2 : comme Q1, il ne laisse passer que les ions d'un rapport *m/z* spécifique.

En résumé : Q1 sélectionne un ion précurseur spécifique, Q2 effectue une fragmentation des ions précurseurs sélectionnés, Q3 analyse les ions produits qui en résultent, fournissant des informations sur le modèle de fragmentation, ce qui donne accès à de l'identification et de la quantification en MS2.

Cette disposition en tandem de trois quadripôles offre une sélectivité et une sensibilité élevées. Les QqQ sont particulièrement utiles pour l'analyse ciblée et quantificative.

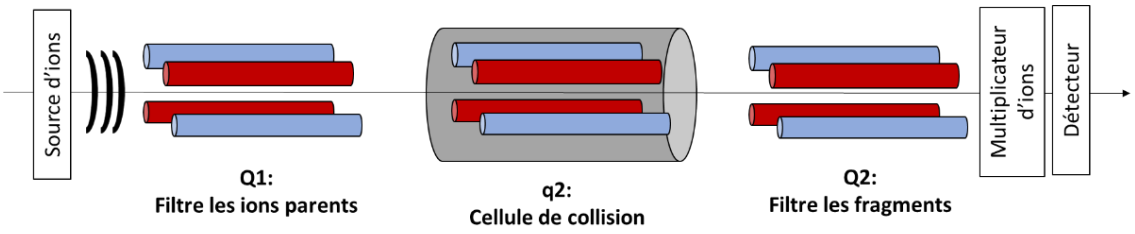


Figure 43 : Schéma d'un triple quadripôle[280]

*****Secteur Magnétique et Electrostatique*****

Dans un secteur magnétique, les ions sont soumis à la fois à un champ électrique (pour les accélérer) et à un champ magnétique produit pour courber leur trajectoire, d'après la loi Lorentz (une particule chargée sera déviée de sa trajectoire lorsqu'elle rentre dans un champ magnétique perpendiculaire). Le champ électrique est en amont du secteur magnétique, il est modulable afin de sélectionner des ions de masse croissante. Le champ magnétique est perpendiculaire à la trajectoire des ions : ils sont déviés sous l'effet de la force de Lorentz. A une vitesse adéquate en entrée de secteur, la courbure des ions épousera la courbure du secteur magnétique (**Figure 44**). Les ions sont donc séparés en fonction du rapport *m/z* : si le rapport *m/z* est faible, la courbure sera moindre ; à l'inverse, les rapports *m/z* élevés seront fortement déviés.

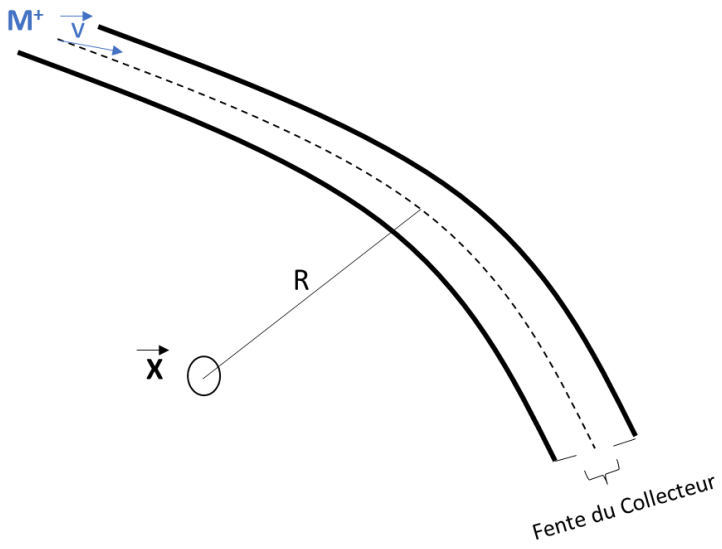


Figure 44 : Schéma d'un secteur magnétique (R = rayon de courbure ; X = orientation du champ magnétique dans l'espace)

FT-ICR : Fourrier Transformation Ion Cyclotron Resonance** [281,282]

Les spectromètres de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) sont des instruments à haute résolution. Ils combinent la courbure des trajectoires par un champ magnétique et l'accélération des ions par des champs électriques (**Figure 45**).

Les ions sont introduits dans une chambre à vide où un puissant champ magnétique est appliqué. Les ions tournent autour des lignes de champs magnétique : c'est le mouvement cyclotronique (la fréquence cyclotronique est la vitesse à laquelle les ions tournent autour du champ magnétique). Pendant ce mouvement cyclotronique, une perturbation est appliquée : un champ électrique. Ce champ électrique est perpendiculaire au champ magnétique, il fait osciller les ions autour de leur position stable. L'amplitude de ces oscillations radiales est détectée et mesurée par transformée de Fourier.

La transformation de Fourier convertit le signal dans le domaine temporel en un spectre dans le domaine fréquentiel, révélant les fréquences présentes dans le signal. Les oscillations radiales des ions induisent un courant variable dans le temps. Des plaques à l'extérieur du cyclotron vont mesurer ces oscillations. L'analyse des fréquences présentes dans le spectre dans le domaine fréquentiel permet de déterminer avec précision les rapports *m/z*.

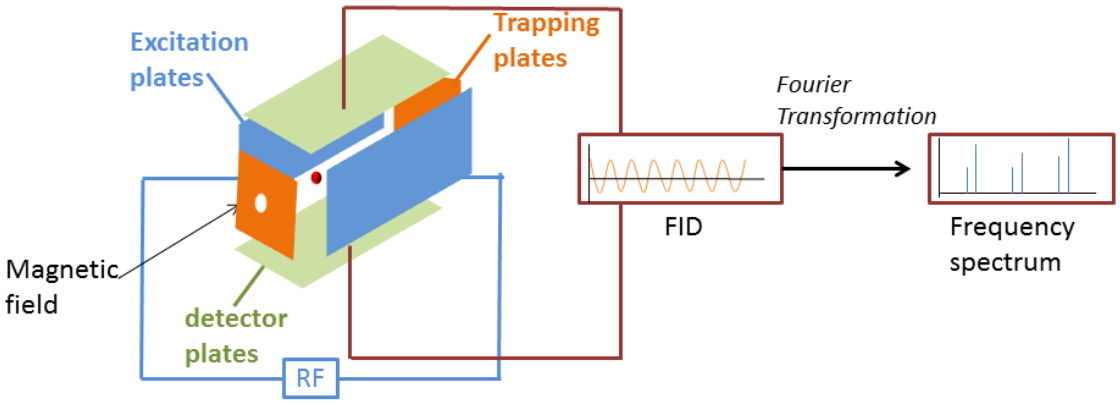


Figure 45 : Schéma d'un FT-ICR [283,284]

*****Trappe Ionique*****

Une trappe ionique peut être assimilée à un piège à ions. Elle se compose de trois électrodes disposées selon une configuration spécifique qui permet de confiner les ions dans une cavité centrale. Ce confinement est possible grâce aux champs électriques appliqués (**Figure 46**). Avec une trappe ionique, l'analyse des ions repose sur deux modes :

- En mode « instabilité sélective de masse », la tension appliquée aux électrodes est ajustée de manière à ce que les ions d'un rapport *m/z* spécifique entrent en résonance avec le champ électrique oscillant. Les ions d'autres rapports *m/z* deviennent instables et sont éjectés du piège. Chaque balayage révèle l'abondance des ions à différents rapports *m/z*.
- En mode « éjection sélective de masse », les ions d'un rapport *m/z* spécifique sont cette fois sélectivement éjectés. Ce mode permet une détection séquentielle des ions et de leurs *m/z*.

Les pièges à ions ont une résolution élevée. Toutefois, les pièges à ions présentent également des limites, telles qu'une gamme de masse limitée, une vitesse de balayage réduite et une sensibilité aux effets de charge, les premiers ions éjectés auront une résolution de moindre qualité car la densité de charge dans la cavité va perturber leur trajectoire, ce qui diminue la résolution [285].

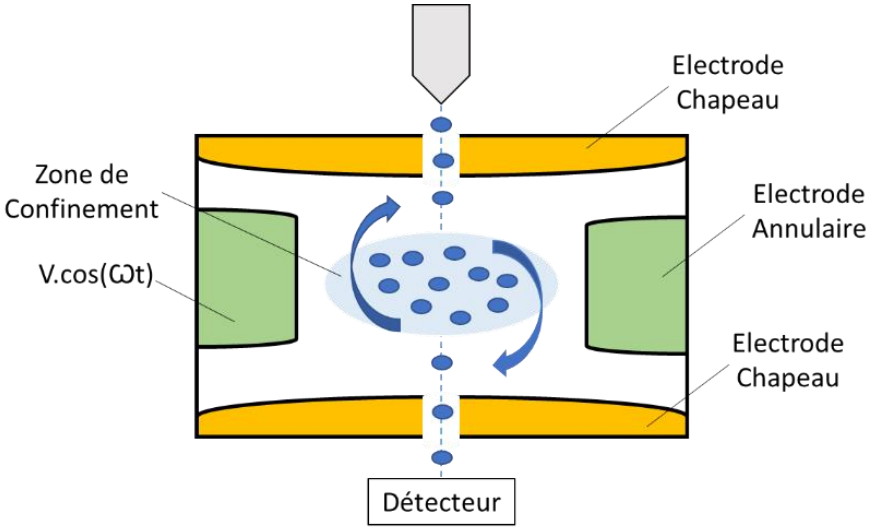


Figure 46 : Schéma d'une trappe ionique

*****TOF : Time-of-Flight (Analyseur à temps de vol)*****

Le temps de vol (TOF) mesure le rapport *m/z* des ions en déterminant le temps nécessaire aux ions pour parcourir une distance connue. L'analyseur TOF se compose d'un tube de vol, une chambre à vide à travers laquelle les ions se déplacent (**Figure 47**).

Les ions sont accélérés dans l'analyseur TOF par l'application d'une haute tension, qui leur fournit une quantité fixe d'énergie cinétique, leur fournissant une certaine vitesse en fonction de leur masse. Le tube de vol mesure généralement plusieurs mètres de long et est sous vide afin de réduire la résistance de l'air et de garantir que les ions peuvent se déplacer sans entrer en collision avec les molécules de gaz. Les ions plus lourds voyagent plus lentement, tandis que les ions plus légers voyagent plus rapidement.

Le temps que mettent les ions à voyager de la source d'ions au détecteur est directement proportionnel à leur rapport *m/z*. Lorsque les ions atteignent l'extrémité du tube de vol, ils rencontrent un détecteur. Le spectre de masse qui en résulte fournit des informations sur les masses et les abondances des ions dans l'échantillon. La spectrométrie de masse TOF offre plusieurs avantages, notamment la rapidité, la sensibilité et une large gamme de masses. Elle est particulièrement utile pour l'analyse de grosses molécules, telles que les protéines, les peptides et les lipides. Toutefois, les spectromètres de masse TOF peuvent avoir un pouvoir de résolution inférieur à celui d'autres types d'analyseurs de masse en mode linéaire simple. La résolution peut être augmentée en mode réflectron. Le temps de vol est augmenté et les ions refocalisés en fonction de leur masse et énergie cinétique, grâce à un filet électrostatique (réflecteur).

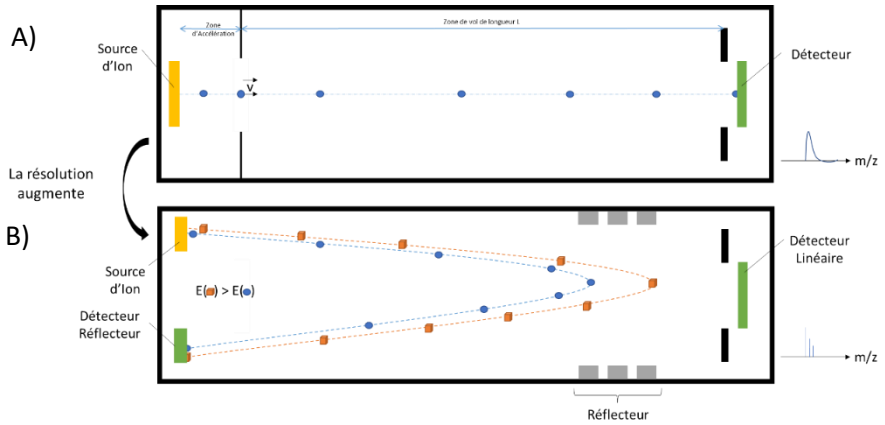


Figure 47 : Schéma d'un analyseur à temps de vol linéaire (A) et à réflectron (B)

Q-TOF

Le Q-TOF combine les capacités des analyseurs quadripolaires et des analyseurs à temps de vol (TOF) pour offrir une haute résolution, une grande précision de masse et une grande sensibilité. Ils sont particulièrement utiles pour identifier des composés inconnus et caractériser des mélanges complexes avec une précision et une exactitude élevée. Quand un appareil ayant une haute résolution est utilisée, telle qu'un Q-TOF, les analyses sont qualifiées de « HRMS » (*High Resolution Mass Spectrometry).*

Dans la première étape de l'analyseur Q-TOF, les ions passent à travers un filtre de masse quadripolaire. Le quadripôle agit comme un filtre de masse, laissant passer les ions d'un rapport *m/z* spécifique tout en filtrant les ions d'autres valeurs *m/z*. Les ions sélectionnés sont accumulés, fragmentés et stockés dans la cellule de collision. Les ions sont ensuite libérés et accélérés dans l'analyseur TOF (**Figure 48**).

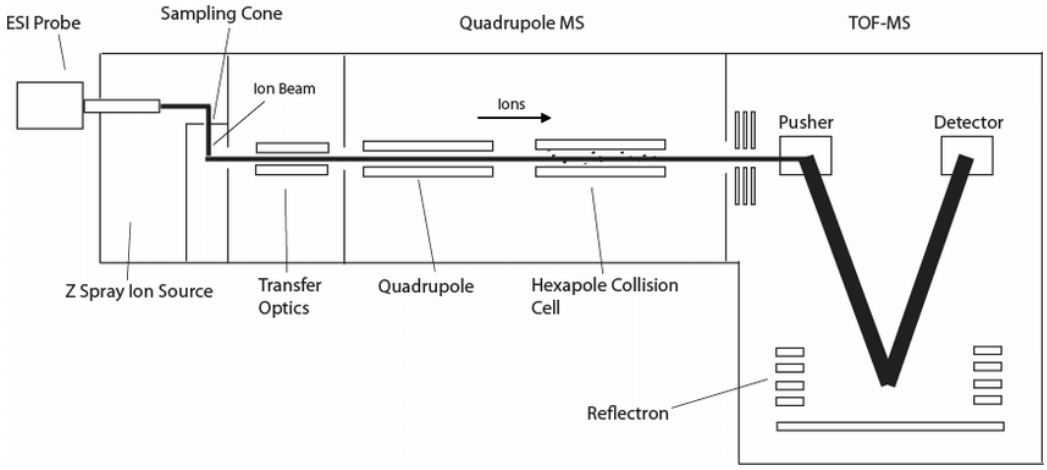


Figure 48 : Schéma de la plateforme Q-TOF [286]

Q-TOF MRT (Waters Corporation, 2021)

Le Q-TOF MRT est un Q-TOF qui utilise un système de réflexion multiple (MRT) pour allonger la distance à parcourir, passant de quelques mètres à 48 mètres (**Figure 49**). Il utilise des miroirs ioniques planaires, pour une focalisation de l'énergie qui permet d'obtenir un pouvoir de résolution supérieur à 200 000, mesurer sur la largeur à mi-hauteur du pic (FWHM) [287]. Ce pouvoir de résolution est une mesure de la capacité à distinguer les ions ayant des rapports *m/z* très proches.

Les analyses en MS sont un compromis entre résolution, sensibilité et temps d'acquisition (résumé dans les **Tableau 5** et **Tableau 6**, à la fin de cette partie). En

métabolomique, il est rare de pouvoir travailler rapidement au maximum des capacités d'un appareil. Or, pouvoir lier, pouvoir de résolution maximal et rapidité d'analyse est la promesse du constructeur de cet appareil, qui a été démontré par Cooper-Sheperd *et al.* [288].

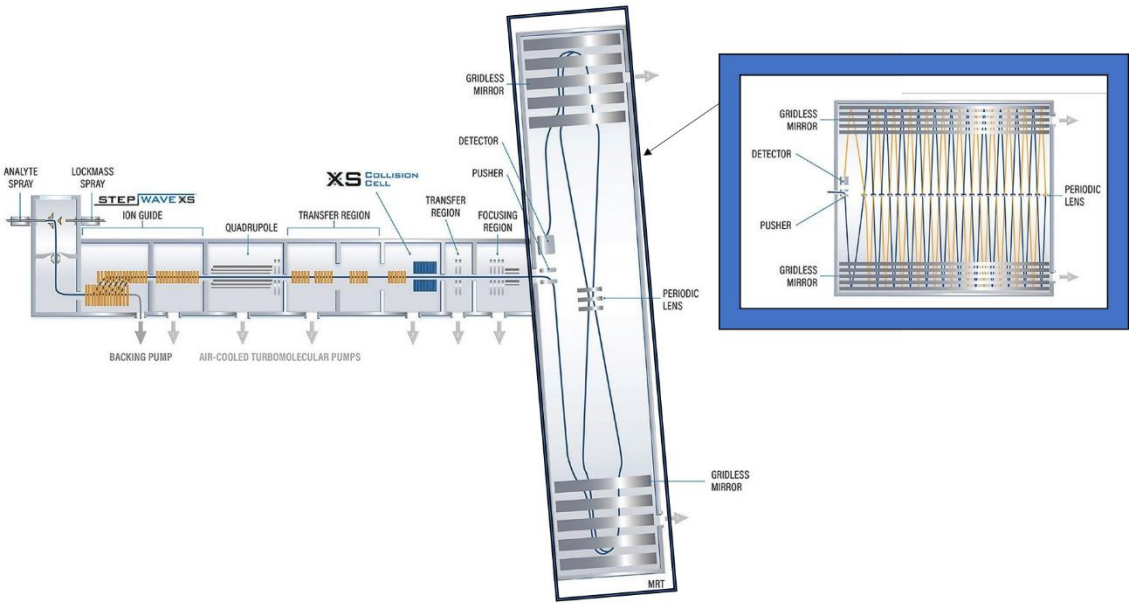


Figure 49 : Schéma du Q-TOF MRT [287]

*****Orbitrap (ThermoFisher Scientific, 2005)*****

Les ions entrent dans l'Orbitrap après avoir été accélérés par un champ électrique [289,290]. Ils ont ensuite été piégés et contraints à une orbite circulaire/elliptique autour d'une électrode centrale par une combinaison de champs électriques et magnétiques (**Figure 50**). La fréquence d'oscillation des ions est mesurée pendant leur orbite. Cette fréquence est directement proportionnelle à *m/z*. Les signaux de fréquence sont détectés et convertis en spectre de masse. Les Orbitraps offrent une très haute résolution, une grande sensibilité et peuvent couvrir une large gamme de masses dans le cadre d'une analyse assez rapide (comme précisé ultérieurement).

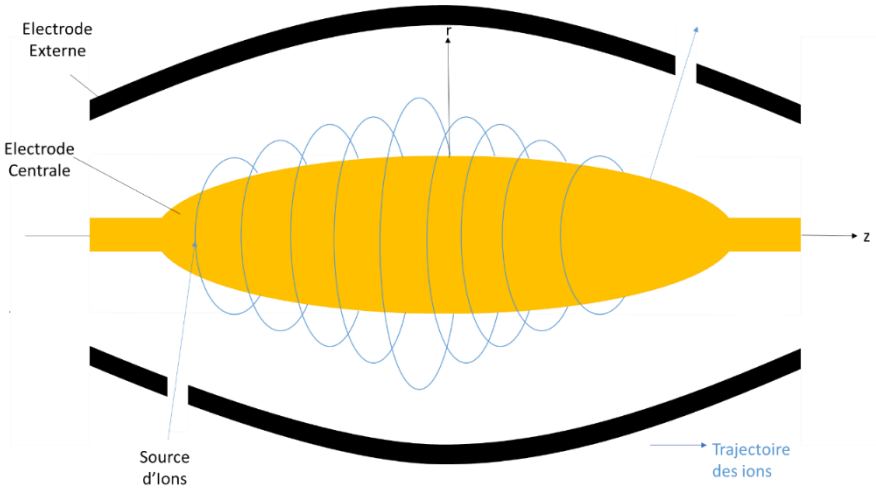


Figure 50 : Schéma d'un Orbitrap

*****Q-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, 2011)*****

Dans le Q-Orbitrap (**Figure 51**), les ions passent d'abord par un filtre de masse quadripolaire. Les ions sélectionnés peuvent être soumis à une dissociation induite par collision (CID) ou à d'autres techniques d'activation pour se fragmenter. Les ions fils sont ensuite injectés dans l'analyseur de masse Orbitrap. Le filtre de masse quadripolaire offre une grande sélectivité, ce qui améliore la spécificité de l'analyse. L'Orbitrap est un analyseur sensible, ce qui permet de détecter des composés peu abondants dans des échantillons complexes. La combinaison d'un filtre de masse quadripolaire et d'un analyseur Orbitrap permet une analyse quantitative ciblée et non ciblée des composés présents dans un échantillon.

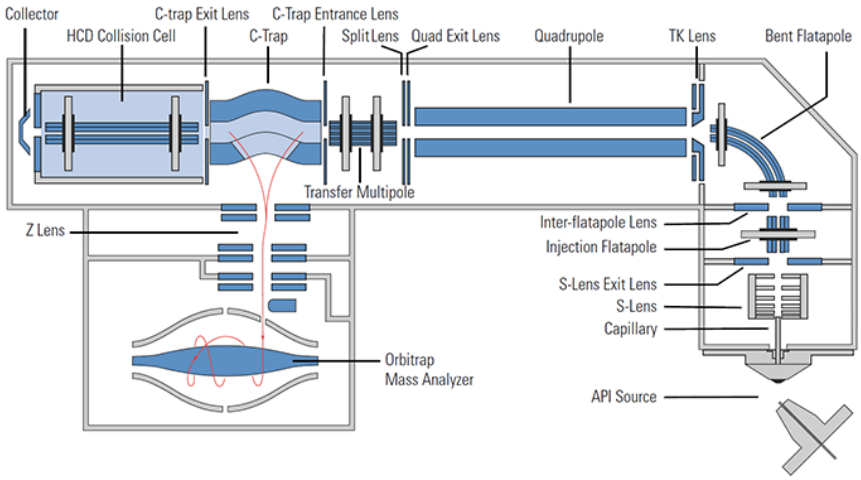


Figure 51 : Schéma d'une plateforme Q-Orbitrap [291]

*****Orbitrap-Fusion (ThermoFisher Scientific, 2013)*****

L'Orbitrap-Fusion [292] est un spectromètre de masse hybride qui combine l'analyseur de masse Orbitrap avec un quadrupôle et un piège à ions (**Figure 52**). Cette configuration permet plusieurs étapes d'analyse de masse, notamment la sélection des ions précurseurs à l'aide du quadripôle, la fragmentation par dissociation induite par collision (CID) ou d'autres techniques dans le piège à ions, et l'analyse de masse à haute résolution dans l'Orbitrap. L'Orbitrap-Fusion offre une polyvalence et des performances élevées pour une large gamme d'applications.

L'Orbitrap-Fusion offre une grande polyvalence grâce à la combinaison de plusieurs analyseurs de masse, ce qui est sensé fournir un accès à une large gamme dynamique, permettant la détection et la quantification de composés. Il convient donc parfaitement aux applications exigeantes telles que la protéomique et la métabolomique.

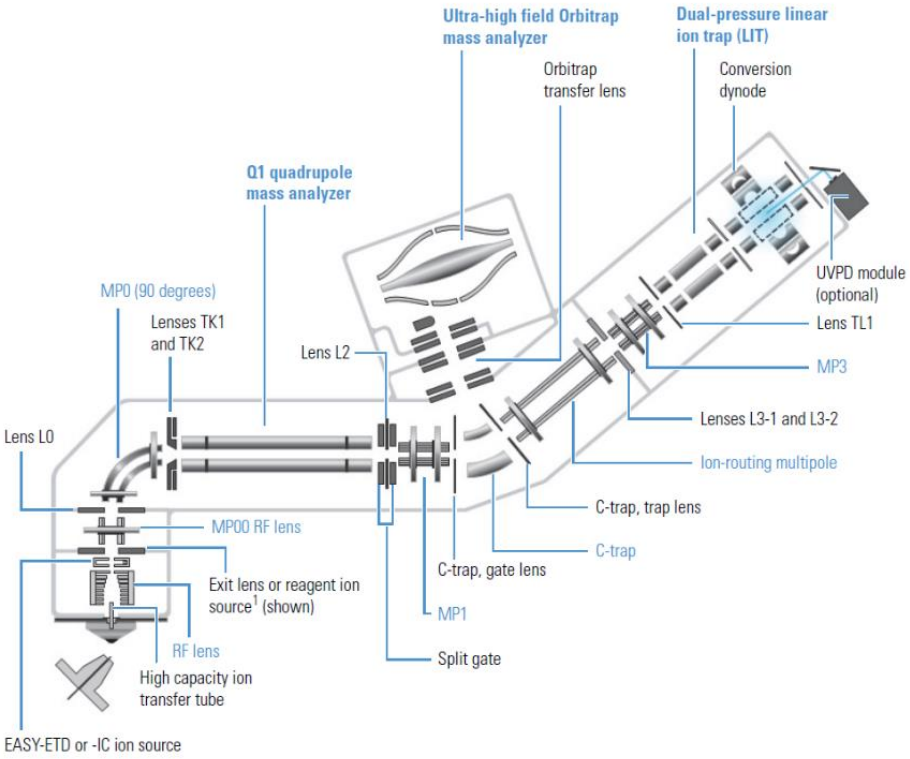


Figure 52 : Schéma du montage Orbitrap Fusion [292]

*****Orbitrap-LTQ (ThermoFisher Scientific, 2005)*****

L'Orbitrap-LTQ, quant à lui, combine l'analyseur de masse Orbitrap avec un piège à ions linéaire (LTQ) (**Figure 53**). Cette configuration permet la sélection et la fragmentation des ions précurseurs dans le piège à ions, suivies d'une analyse de masse à haute résolution dans l'Orbitrap [293]. Le composant LTQ de l'instrument permet de piéger et de fragmenter des ions, tandis que l'analyseur Orbitrap offre une résolution de masse et une précision élevée (comme précisé ultérieurement). L'Orbitrap-LTQ est largement utilisé en protéomique pour sa polyvalence et ses performances en matière de séquençage et d'identification des peptides [294].

Comparé à l'Orbitrap-Fusion, l'Orbitrap-LTQ peut avoir une polyvalence limitée en termes de types d'expériences à réaliser. Il ne dispose pas du filtre de masse quadripolaire présent dans l'Orbitrap-Fusion, ce qui peut limiter certains types de stratégies de sélection et de fragmentation des ions précurseurs. Bien que l'Orbitrap-LTQ offre de bonnes performances en matière d'identification et de séquençage des peptides, sa gamme dynamique peut être quelque peu limitée par rapport aux instruments dotés de plusieurs analyseurs de masse tels que l'Orbitrap-Fusion.

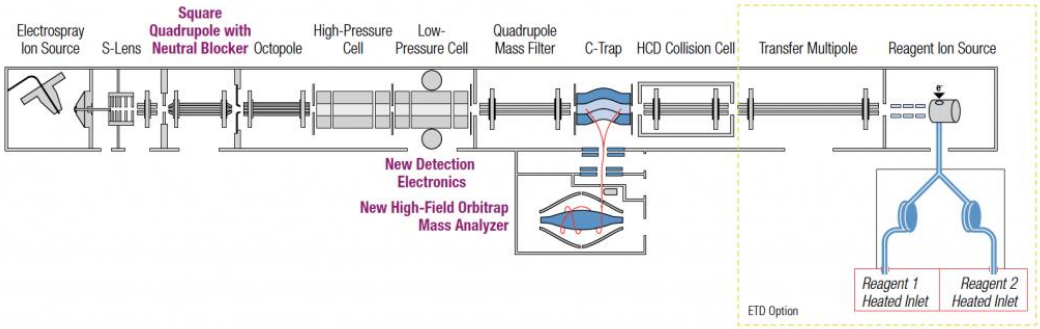


Figure 53 : Schéma d'un appareil MS de type LTQ [295]

*****Résumé*****

Cet aperçu non exhaustif a décrit différents analyseurs de spectrométrie de masse et a mis en évidence leurs principes de fonctionnement, leurs avantages et leurs inconvénients. Des capacités polyvalentes des analyseurs quadripolaires aux performances à haute résolution des instruments Orbitrap ou MRT, chaque type d'analyseur offre des atouts et des applications uniques dans le domaine de la chimie analytique. L'aspect financier pourrait être limitant, les besoins avant l'achat et l'utilisation d'un appareil doivent être correctement

définis pour ne pas viser un appareil plus complexe que nécessaire, qui demande en général une meilleure expertise d'analyse et plus d'entretiens. Le **Tableau 5** et le **Tableau 6** ci-dessous présentent quelques capacités de ces analyseurs, MS1 ou MS2 :

Tableau 5 : Valeurs des caractéristiques attribuées aux différents types d'analyseurs MS1 [96]

Analyseurs	Magnéto-électrostatique	Quadripôle	Temps de vol	Orbitrap	Cyclotronique
Gamme de *m/z*	2500 -15,000	1.000 à 4.000	15.000 à 500.000 (linéaire *vs* réflectron)	1.000 à 4.000	5.000 à 60.000
Pouvoir de résolution	10^4 à 10^5	Unitaire	40.000 - 60.000	> 10^5	> 10^6
Précision de la mesure (ppm)	1 à 5	≈100	≈1	≈1	<1
Gamme dynamique (*m/z*)	10^9	10^7	10^2 à 10^6	10^3 à 10^4	10^2 à 10^5
Vitesse d'acquisition (Hz)	0,1 à 20	1 à 20	10 à 10^6	1 à 300	10^2 à 10
Pression (mbar)	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6} à 10^{-7}	10^{-3}	10^{-10}

Tableau 6 : Caractéristiques numériques des appareils pour la MS^2

Analyseurs		Q-TOF	QqQ	Q-Orbitrap	LTQ	Fusion
Gamme de *m/z*		100 à 10 000	2 à 2 048	50 – 6 000	50 – 4 000	50 – 4 000
Pouvoir de résolution (FHMW)		> 42 000	N/A	140 000	7 500 à > 100 000	7 500-500 000
Précision de la mesure (ppm)	MS	< 1	0,05	< 1-3 (calibration mode)	< 1-3 (calibration mode)	< 1-3 (calibration mode)
	MS/MS	<2	0.1			
Gamme dynamique (*m/z*)		10^5	N/A	>5 000	>4 000	>5 000
Vitesse d'acquisition (spectra/s)		50	8 -20	12 (basse réolution)	N/A	30-40
MS^n max		2	2	2	10	10

II.5.3.4. Les détecteurs

Les détecteurs sont la jonction entre les ions analysés et la production d'un signal mesurable. Il existe une grande diversité de détecteurs disponibles pour optimiser les performances des instruments. De manière non-exhaustive, le principe, les forces et faiblesses de quelques détecteurs vont être détaillés [296–298].

Multiplicateurs d'électrons

Les multiplicateurs d'électrons (Figure 54) utilisent une série de dynodes (électrodes) maintenues à des tensions de plus en plus élevées. Lorsque les ions frappent la première dynode, ils libèrent des électrons, qui sont ensuite accélérés vers les dynodes suivantes. Ce processus aboutit à une cascade de multiplication des électrons, produisant un courant électrique mesurable.

Les multiplicateurs d'électrons offrent une grande sensibilité, des temps de réponse rapides et de faibles niveaux de bruit, ce qui les rend idéaux pour détecter les ions de faible abondance en spectrométrie de masse. Cependant, ils peuvent être sujets à la saturation à des flux d'ions élevés et peuvent souffrir d'effets de vieillissement au fil du temps.

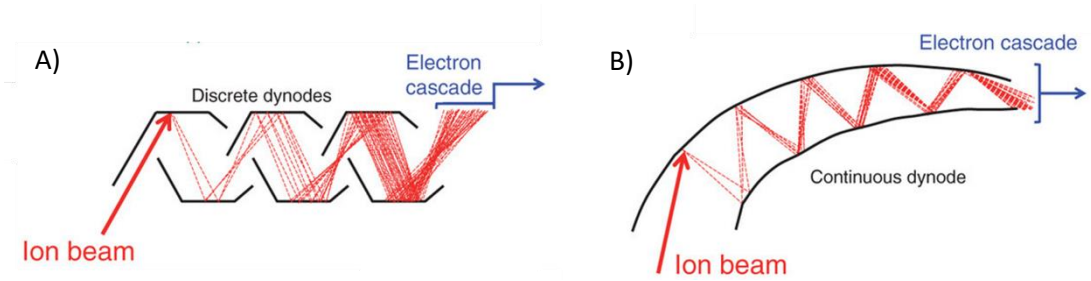


Figure 54 : Schéma du détecteur à multiplicateurs d'électrons discret (A) et continu (B) [299]

Coupes de Faraday

Les coupes de Faraday sont constituées d'une coupelle métallique reliée à un électromètre. Lorsque des ions pénètrent dans la coupelle, ils déposent leur charge, ce qui génère un courant électrique mesurable proportionnel au nombre d'ions (Figure 55).

Les coupes de Faraday sont simples, robustes et peuvent supporter des courants ioniques élevés sans saturation. Elles sont souvent utilisées dans les spectromètres de masse à faible résolution. Elles manquent de sensibilité par rapport à d'autres détecteurs et ne peuvent pas fournir de spectres de masse détaillés.

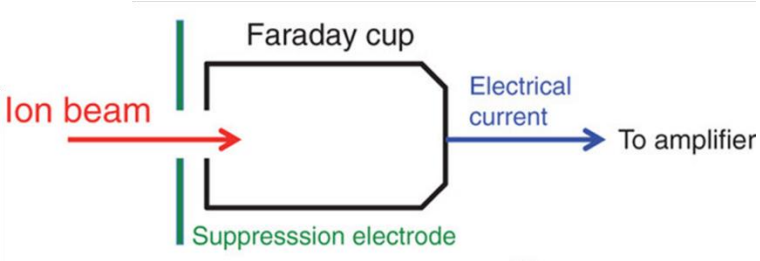


Figure 55 : Schéma du détecteur Coupe de Faraday [299]

*****Détecteurs à Canaux d'électron*****

Les détecteurs à canaux d'électrons sont constitués d'une série de canaux métalliques recouverts d'un matériau secondaire émissif. Lorsque les ions frappent les canaux, ils libèrent des électrons secondaires, qui sont ensuite multipliés par un effet de cascade (**Figure 56**).

Les détecteurs à canaux d'électrons offrent une grande sensibilité, des temps de réponse rapides et peuvent gérer des flux d'ions élevés sans saturation. Ils sont couramment utilisés dans les spectromètres de masse à temps de vol. Ils peuvent souffrir d'effets de vieillissement et nécessiter des alimentations à haute tension.

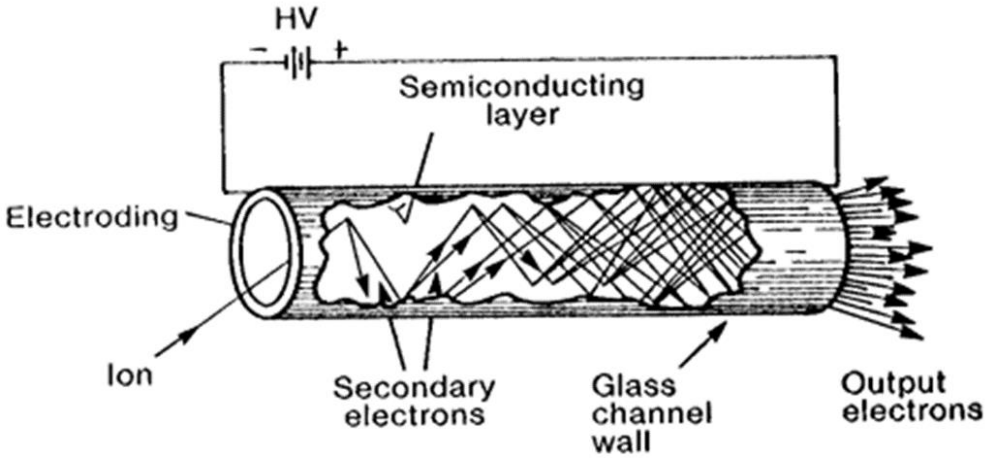


Figure 56 : Schéma d'un détecteur à canaux d'électrons [300]

*****Plaques à microcanaux (MCP)*****

Les détecteurs MCP sont constitués d'une pile de plaques de verre comportant des milliers de canaux minuscules. Lorsque les ions frappent les plaques, ils libèrent des électrons secondaires, qui sont ensuite amplifiés lorsqu'ils traversent les canaux (**Figure 57**).

Les détecteurs MCP offrent une grande sensibilité, des temps de réponse rapides et une haute résolution spatiale. Ils sont couramment utilisés dans les spectromètres de masse

à temps de vol et à mobilité ionique. Ils peuvent être sensibles au bruit et peuvent souffrir d'effets de vieillissement au fil du temps.

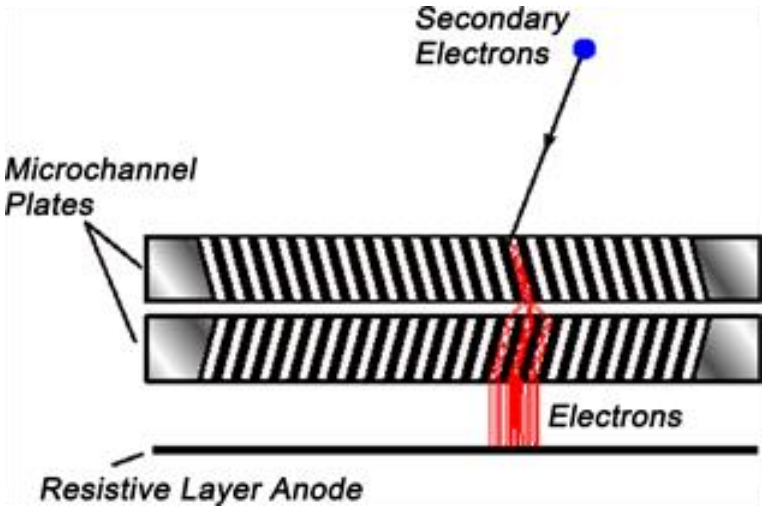


Figure 57 : Schéma du fonctionnement d'un détecteur de plaque à micro-canaux [301]

*****Convertisseurs ion-électron ou ion-photon*****

Les convertisseurs I/E (**Figure 58**) convertissent les ions en électrons par le biais d'interactions avec une surface. Ces électrons sont ensuite détectés à l'aide de multiplicateurs d'électrons ou d'autres détecteurs à base d'électrons. Les convertisseurs I/E sont utilisés dans les spectromètres de mobilité ionique et offrent une grande sensibilité aux signaux ioniques. Ils peuvent souffrir de désorption d'ions et d'autres effets liés à la surface.

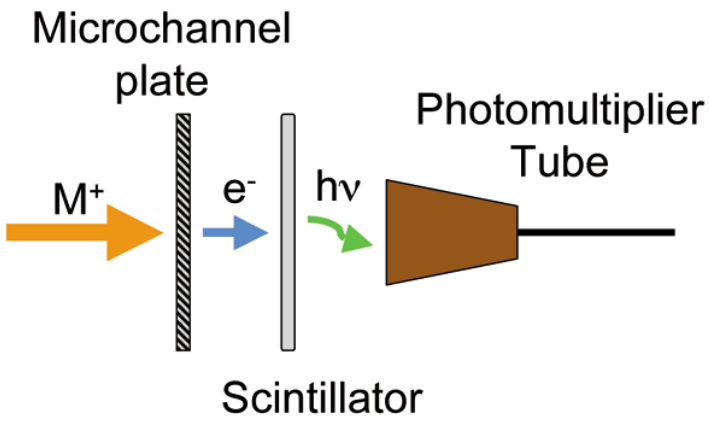


Figure 58 : Schéma d'un convertisseur ion-photon [302]

II.6. Traitement de Données

II.6.1. Introduction

Le traitement des données omiques est une étape cruciale qui permet de convertir les données brutes en une information avec un sens biologique. Les données générées par spectrométrie de masse ou RMN sont volumineuses et complexes : leur analyse manuelle est chronophage [303]. Leur traitement nécessite l'application d'une série d'étapes analytiques rigoureuses pour assurer la qualité et la fiabilité des résultats. Ces étapes incluent la détection des pics, l'alignement, la normalisation, l'identification des composés, l'analyse statistique et la visualisation des données [304,305]. Les analyses statistiques permettent de détecter des différences significatives entre les conditions expérimentales, tandis que la visualisation des résultats facilite leur interprétation biologique [306]. Les données MS et RMN sont fondamentalement différentes, certains outils seront spécifiques à une plateforme alors que d'autres permettront une analyse multi-plateformes.

De nombreux logiciels *open source* permettent de réaliser une ou plusieurs des étapes citées ci-dessus [307,308]. Cependant, pour les utiliser il est souvent nécessaire de convertir les fichiers du format constructeur à un format libre de droit, ce qui peut engendrer une perte ou une modification de la donnée. Ils sont flexibles et évolutifs pour répondre aux besoins spécifiques de la communauté. Par exemple, des outils tels que XCMS [309] et MZmine [310,311] sont couramment utilisés pour la détection des signaux, tandis que MetFrag [312,313] et SIRIUS [314,315] sont utilisés pour l'identification des composés. Pour les analyses plus spécifiques comme en RMN, des logiciels tels que NMRPipe [316] et NMRProcFlow [317] sont utilisés. De plus, des plateformes comme Workflow4Metabolomics [318] et MetaboAnalyst [319,320] intègrent plusieurs de ces étapes dans des pipelines analytiques cohérents et accessibles

II.6.2. Détection des *Features*

La détection des *features,* soit un signal détecté mais qui n'est pas identifié, en métabolomique est une étape cruciale qui consiste à identifier les pics dans les données brutes issus des analyses chromatographie-spectrométrie de masse. Ces pics représentent des métabolites potentiels. Des logiciels open source comme XCMS [321] et MZmine [310,311] sont largement utilisés pour cette tâche. XCMS permet la détection, le jumelage et l'alignement des pics à partir des données de spectrométrie de masse, avec des algorithmes

robustes pour traiter des variations de rétention et de masse. MZmine offre une interface utilisateur graphique conviviale et des outils intégrés pour la détection des pics, la déconvolution et l'alignement. Cependant, un inconvénient de ces logiciels est que la qualité de la détection des *features* dépend fortement des paramètres de l'utilisateur, ce qui peut nécessiter une optimisation minutieuse pour chaque jeu de données.

NMRPipe est un logiciel open source largement utilisé pour le traitement des données RMN en une dimension (1D) [316]. Il permet la transformée de Fourier, le phasage, la correction de ligne de base, et le filtrage des données brutes RMN pour détecter les signaux des métabolites. Ce logiciel supporte une large gamme de manipulations de données mais son apprentissage est complexe et requiert une connaissance approfondie des paramètres de traitement RMN. NMRProcFlow [317] est un logiciel open source spécialement conçu pour le traitement interactif des données RMN. Il permet de réaliser des corrections de phase, des corrections de ligne de base, l'alignement et le découpage des spectres RMN en 1D en variables spectrales fixes ou adaptatives.

MestReNova [322] est un logiciel payant, qui offre des fonctionnalités avancées et une large gamme d'outils pour le traitement et l'analyse des données, telle que la détection et le traitement des *features*/signaux RMN en 1D et 2D [322].

II.6.3. Chimiométrie

La chimiométrie est l'utilisation des méthodes mathématiques, statistiques et informatiques pour extraire, analyser et interpréter l'information, à partir de données complexes [323,324].

La chimiométrie est prépondérante en métabolomique et lipidomique car elle permet d'analyser de grandes quantités de données, de visualiser les relations entre les variables chimiques grâce à la modélisation [325,326]. La chimiométrie permet d'explorer un jeu de données et d'en ressortir des informations d'intérêt, sans devoir le comparer à des connaissances préexistantes [327]. Durant la phase de conception expérimentale, il faut inclure les étapes de traitement des données, de traitement du signal (correction de la ligne de base, alignement des temps de rétention, *détection des features*, …) et de sélection des « variables » pertinentes. Ainsi, la qualité des données est garantie car elle est prise en compte à chaque étape du processus. La chimiométrie et la bioinformatique sont des domaines distincts, qui tendent à se rapprocher et à être utilisés en synergie. La **Figure 59** permet de

visualiser les étapes de chimiométrie durant le déroulé d'une analyse de métabolomique et comment la chimiométrie, couplée à la bioinformatique, permettent d'analyser les données.

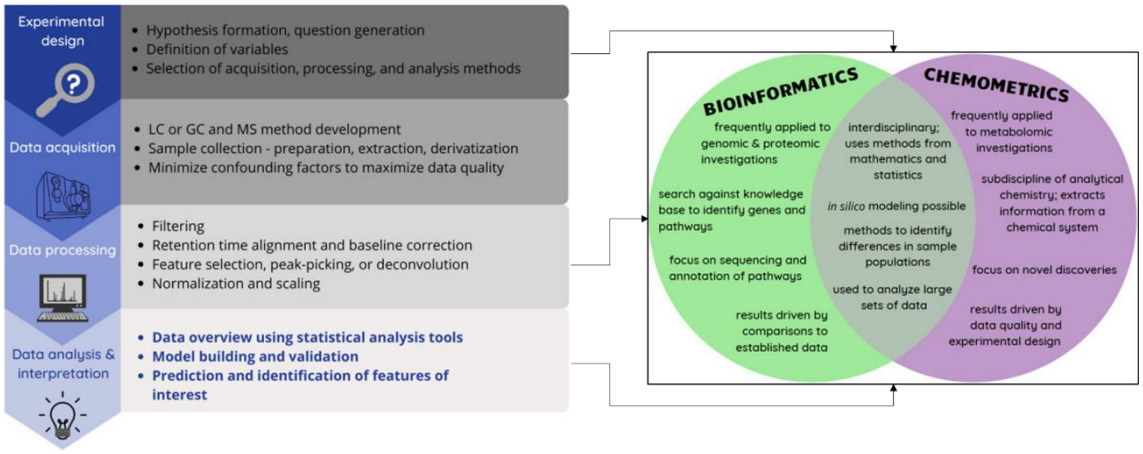


Figure 59 : Présentation des étapes de chimiométrie au cours d'un workflow d'analyse en métabolomique et utilisation de la bioinformatique et de la chimiométrie pour caractérisation de la donnée [327].

II.6.4. Identification Certaine ou Putative de Composés

L'identification de composés consiste à assigner des structures chimiques aux *features* détectées. SIRIUS [146,147] est un logiciel open source qui permet l'identification putative de métabolites en utilisant des prédictions *in silico* basées sur des fragments de spectres de masse. Il utilise des bases de données telles que PubChem pour comparer les fragments observés avec des structures connues. L'avantage de SIRIUS est sa capacité à fournir des identifications rapides et relativement précises. Cependant, toutes les prédictions sont *in silico*, ce qui signifie qu'elles sont basées sur des calculs théoriques et peuvent ne pas toujours correspondre aux composés présents dans l'échantillon réel. MS-DIAL [328,329] est un autre outil open source qui permet l'identification basée sur des bibliothèques de spectres expérimentaux, mais il nécessite des bases de données exhaustives pour une identification fiable.

COLMAR (Complex Mixture Analysis by NMR) [330] est un outil en ligne gratuit qui aide à l'identification des composés dans les mélanges complexes en utilisant des données RMN 1D et 2D. Il compare les spectres RMN expérimentaux avec une base de données de spectres de référence, ce qui permet une identification rapide, précise des composés et facile à utiliser mais tout dépend de la couverture et de la qualité de la base de données de référence. MetaboMiner est un logiciel open source qui utilise les spectres RMN 2D (COSY, TOCSY, etc…)

pour l'identification des métabolites en les comparant à une base de données de spectres de référence [331]. ASICS [332,333] identifie et quantifie automatiquement les spectres RMN. L'identification est réalisée à l'aide de tests statistiques pour comparer le spectre expérimental avec des spectres provenant d'une bibliothèque de spectres de métabolites purs. Quant à ChenomX [334], il est l'outil payant de ces logiciels d'identification.

En spectrométrie de masse, la plupart des logiciels se base sur les données de *m/z*, de temps de rétention ou encore d'intensité pour identifier les molécules [308,335]. FlashEntropy est un logiciel open source conçu pour l'analyse de la diversité chimique dans les données MS et se base sur l'entropie chimique des molécules [336].

W4M (Workflow4Metabolomics) [318] est une plateforme en ligne open source dédiée à l'analyse des données métabolomiques, incluant des outils pour les données LC-MS, GC-MS et RMN. Elle fournit une interface conviviale pour l'analyse complète des données métabolomiques, de la détection des *features* à l'annotation des métabolites et à l'analyse statistique.

II.6.5. Réseaux Moléculaires

Les réseaux moléculaires aident à visualiser les relations entre différents métabolites, souvent basés sur des similarités structurelles ou fonctionnelles. GNPS (Global Natural Products Social) est une plateforme open source qui construit des réseaux moléculaires en comparant les spectres de fragmentation des métabolites [337,338]. Cela permet de découvrir des relations entre les métabolites qui pourraient indiquer des voies de biosynthèse ou des transformations chimiques similaires. L'avantage de GNPS est sa capacité à intégrer des données de divers utilisateurs, augmentant ainsi la richesse des réseaux moléculaires. Toutefois, cette méthode peut générer de faux positifs si les spectres de masse sont mal interprétés.

MetExplore est une plateforme web open source qui permet de construire et d'explorer des réseaux métaboliques basés sur les données MS ou RMN [339,340]. Elle permet l'intégration de données expérimentales et la visualisation des réseaux de métabolites. L'interface web est *user-friendly* et offre la possibilité d'intégrer différentes sources de données omiques.

Cytoscape [341,342] peut également être utilisé pour créer des réseaux moléculaires à partir de données RMN ou MS [341,342]. En utilisant des plugins spécifiques, les utilisateurs peuvent importer leurs données et construire des réseaux basés sur les interactions entre les métabolites. Sa flexibilité et sa capacité à répondre aux besoins de la communauté grâce aux nombreux plugins a permis la large utilisation. En contrepartie, une certaine expertise en bio-informatique pour une utilisation avancée est nécessaire (**Figure 60**).

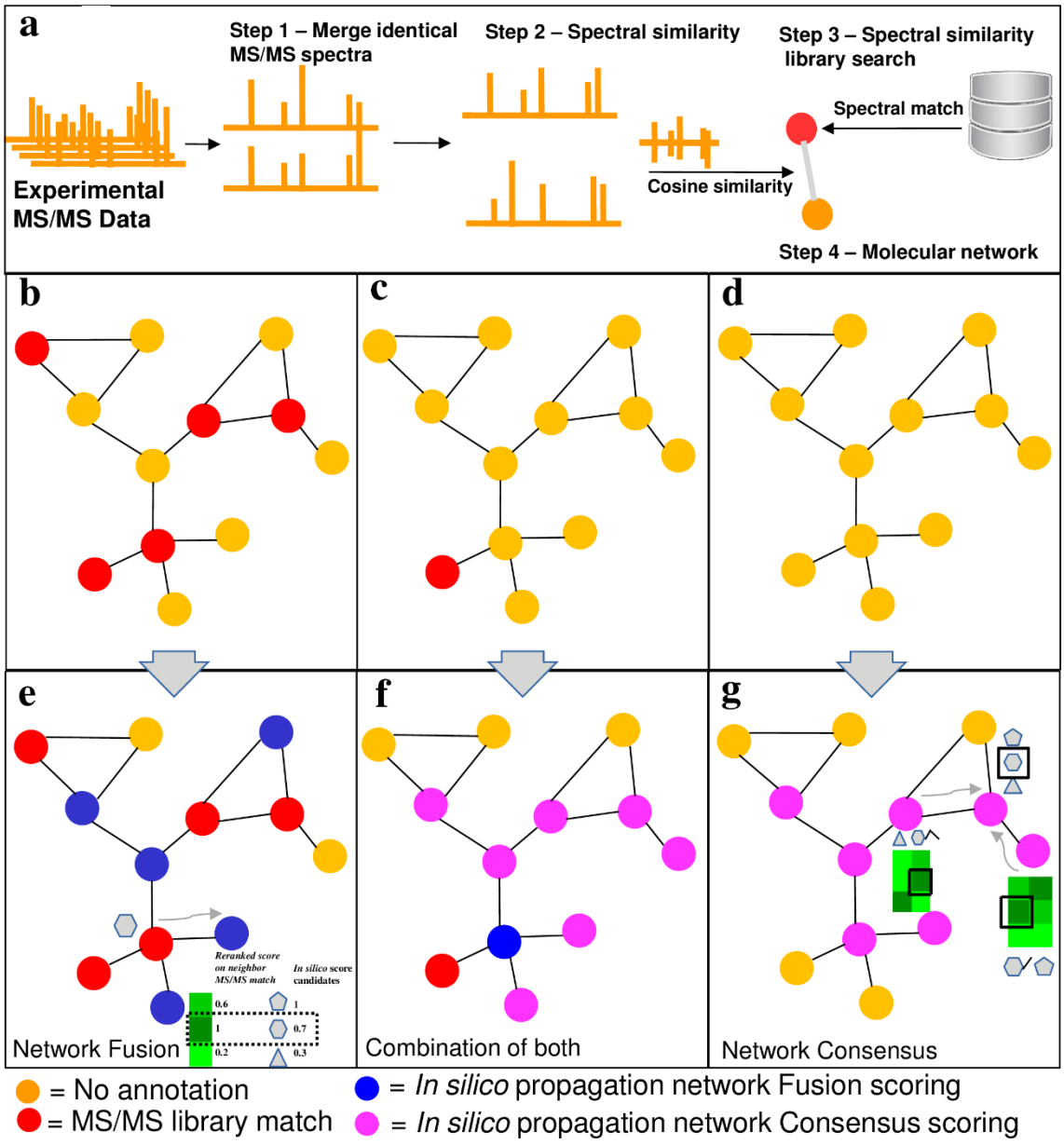


Figure 60 : Workflow permettant d'identifier des composés à l'aide de réseau moléculaire [343]

a) Introduction au réseau moléculaire et à la correspondance de bibliothèque.
b), c) et d) représentent différents degrés d'annotation spectrale dans le réseau.
e), f) et g) illustrent comment la propagation des annotations peut être utilisée pour chaque scénario respectif , en sur basant sur différents types de « scoring »

II.6.6. Cartes Métaboliques

Les cartes métaboliques sont utilisées pour visualiser les voies métaboliques et leur régulation. PathVisio [344,345] et MetaboAnalyst [319,320] sont des outils open source qui permettent la création et l'annotation de cartes métaboliques. PathVisio est particulièrement utile pour la visualisation de données d'expression génique et métabolique dans le contexte des voies métaboliques. MetaboAnalyst propose des outils d'analyse statistique et d'interprétation des données métabolomiques, facilitant la création de cartes métaboliques interactives. Le principal avantage de ces outils est leur capacité à intégrer de grandes quantités de données omiques. Cependant, leur utilisation peut nécessiter une certaine expertise en bioinformatique et en biologie des systèmes pour interpréter correctement les résultats. BioCyc [346,347] permet de replacer les métabolites, identifiés par RMN ou MS, dans leurs voies métaboliques afin d'avoir une approche plus biologique des résultats.

II.6.7. Bases de Données du Métabolome Humain

Les bases de données jouent un rôle essentiel dans l'annotation et l'interprétation des données métabolomiques. HMDB (Human Metabolome Database) [40,348,349] est l'une des bases de données les plus complètes et est librement accessible. Elle contient des informations détaillées sur des milliers de métabolites humains, y compris leurs propriétés chimiques, biologiques et cliniques. Metlin [350] est une autre base de données majeure qui fournit des spectres de masse pour une identification précise des métabolites. L'avantage de ces bases de données est leur exhaustivité et leur mise à jour régulière, ce qui en fait des ressources précieuses pour les chercheurs. Cependant, elles peuvent parfois contenir des informations redondantes ou contradictoires, nécessitant une vérification minutieuse des annotations. En somme, les outils et les bases de données open source en métabolomique offrent une richesse de fonctionnalités pour chaque étape du traitement des données, mais leur efficacité dépend souvent de la qualité des données d'entrée et de l'expertise de l'utilisateur dans l'optimisation des paramètres et l'interprétation des résultats. Afin d'obtenir des données de qualité et avec des protocoles standardisés, le consortium MetaboHub [351] a mis au point la base de données MS et de données RMN PeakForest [352].

HMDB est une base de données complète qui contient des informations sur les métabolites humains, y compris leurs spectres RMN. HMDB est régulièrement mise à jour et

intègre de nombreux spectres (expérimentaux ou prédits) analysés par différentes modalités, tel que la GC-MS, la LC-MS et la RMN. Cependant, de nombreux spectres disponibles sont des spectres prédits *in silico*, ce qui peut compliquer leur utilisation pour identifier des composés en solution complexe.

BMRB (Biological Magnetic Resonance Bank) est une base de données de spectres RMN pour les biomolécules, y compris les métabolites [353,354]. Elle offre des spectres de référence pour aider à l'identification des composés dans les échantillons RMN. La collection de spectres RMN est conséquente et gratuite.

II.7. Quantification

L'analyse quantitative [355] se concentre sur la mesure précise des concentrations de métabolites dans les échantillons biologiques. Elle peut être appliquée dans des approches ciblées ou non-ciblées. En comparant les concentrations de métabolites entre les échantillons, la métabolomique quantitative permet d'identifier des biomarqueurs, des dérégulations métaboliques et des réponses aux interventions ou aux traitements.

II.7.1. Quantification relative

La quantification relative est une méthode utilisée en métabolomique pour mesurer et comparer l'abondance des métabolites dans différents échantillons ou conditions. Contrairement à la quantification absolue, qui détermine la concentration exacte des métabolites, la quantification relative se concentre sur les changements relatifs des niveaux de métabolites entre les échantillons. La normalisation des données est effectuée pour tenir compte des variations dans la préparation des échantillons, la réponse de l'instrument et d'autres facteurs expérimentaux. Il existe de nombreuses méthodes de normalisation, pour la RMN [100] et pour la MS [99]. L'abondance relative de chaque métabolite est comparée entre différents échantillons ou conditions.

La quantification relative est idéale pour comparer les profils métaboliques entre différents échantillons, tels que des groupes témoins ou traités, des états sains ou malades, ou différents moments d'une étude, mettant en évidence des métabolites qui présentent des changements significatifs en termes d'abondance entre différentes conditions. En comparant les changements relatifs dans les niveaux de métabolites, les chercheurs peuvent déduire des altérations dans les voies métaboliques et identifier les nœuds de régulation clés affectés par

différents traitements ou conditions. La quantification relative est souvent plus rapide et moins gourmande en ressources que la quantification absolue, ce qui la rend adaptée aux études à haut débit impliquant un grand nombre d'échantillons. Elle permet la détection et la comparaison d'un large éventail de métabolites, offrant ainsi une vue d'ensemble de l'information métabolique. Cependant, elle oblige à penser et à travailler en campagne d'injection.

En LC-MS, la dérive des appareils HRMS dans le temps empêche de comparer deux campagnes d'injection différentes. Pour pouvoir comparer des données produites à des moments différents, une des approches possibles est l'utilisation d'étalons internes, toujours à la même concentration, ce qui va permettre de tenir compte de la variabilité.

En RMN, où la robustesse est élevée, la dérive appareil est faible. Pour pouvoir comparer des données produites à des moments différents, il faut se placer dans des conditions d'analyses identiques telle que le solvant d'extraction, le pH de la solution, la même taille de tube, la même séquence de pulse et des bobines de *Shim* calibrées.

II.7.2. Quantification Absolue

La quantification absolue permet de déterminer la concentration exacte d'un analyte dans un échantillon. Là où la quantification relative compare des intensités des signaux, la quantification absolue fournit des valeurs précises et spécifiques, indispensables lorsque l'on étudie l'évolution d'un système biologique dans le temps ou que l'on veut comparer les informations métaboliques entre différents sites ou encore lorsque l'on veut étudier l'efficacité d'un traitement par exemple. Pour réussir une analyse quantitative absolue, il existe plusieurs méthodes en LC-MS :

a) Les courbes d'étalonnage externe impliquent la préparation d'une série de solutions standards de l'analyte ciblé à des concentrations connues. En traçant la réponse instrumentale pour chaque solution standard, en fonction de sa concentration, on obtient une courbe d'étalonnage. Puis, en reportant la réponse de l'instrument pour chaque échantillon sur la courbe, il est possible de déterminer sa concentration (**Figure 61**). L'inconvénient de cette méthode est que bien souvent les courbes d'étalonnage sont externes, dans des solvants purs, ce qui va mener une mesure non-juste car les effets matrices (difficulté d'ionisation / compétition) ne sont pas pris en compte.

L'effet matrice en LC-MS traduit les interactions, et surtout les interférences, entre composés constituants de l'échantillon qui interfèrent avec la détection des analytes, entraînant une suppression ou une augmentation du signal. Les principales causes sont la co-élution, la compétition des charges et la formation de complexes [356].

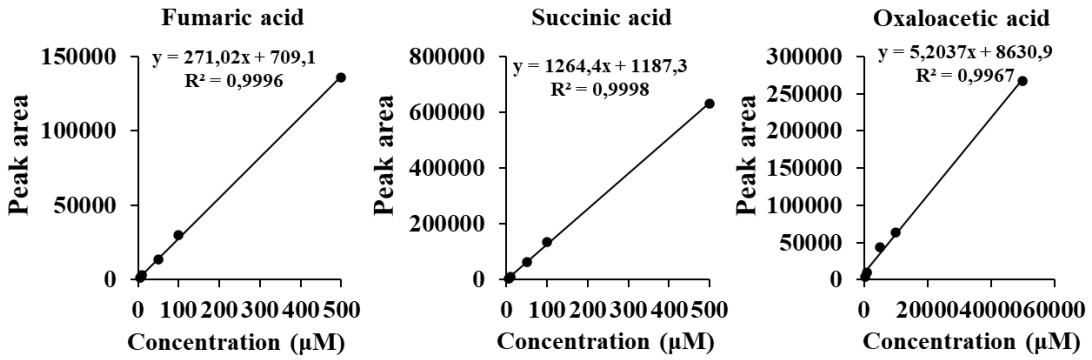


Figure 61 : Courbes de calibrations des acides organiques du cycle de Krebs obtenues par LC-MS [357]

b) La méthode des ajouts dosés peut être vue comme une variante des courbes de calibrations externes : l'ajout de quantités connues de l'analyte aux échantillons, permet de reconstruire une courbe de calibration. En extrapolant ces données, il est possible de déterminer la concentration initiale de l'analyte dans l'échantillon, avec l'ordonnée à l'origine. Cette méthode est particulièrement utile lorsque l'effet matrice est significatif et difficile à contrôler.

c) Pour prendre en compte les effets matrices, il est possible d'ajouter à l'échantillon une nouvelle molécule exogène non-présente initialement et ayant des propriétés proches de celle du composé ciblée (ex : du glucose $^{13}C_6$ pour le glucose) : c'est l'étalonnage interne. Les standards internes doivent être chimiquement similaires aux analytes d'intérêt pour présenter des comportements analytiques comparables, spécialement en spectrométrie de masse où l'efficacité d'ionisation est un paramètre propre à chaque molécule.

En RMN, la quantification absolue pour être atteinte de manière plus directe. En plus des conditions opératoires à respecter, il faut ajouter des composés exogènes comme référence, respecter d'un temps de répétition suffisant pour accumuler assez de signal, réaliser une bascule de l'aimantation des atomes (90°) et attendre que l'ensemble des atomes soient relaxés pour obtenir des données de quantification absolue avec un rapport signal sur bruit

suffisant. A noter qu'en RMN, l'application dans la séquence d'aimantation d'une technique servant à réduire au maximum le signal du solvant, qui serait majoritaire et donc empêcherai toute lecture, empêche de quantifier les pics proches du signal du solvant.

La quantification absolue est essentielle pour obtenir des données fiables et précises en analyse chimique, avec des méthodes telles que la courbe d'étalonnage externe, l'étalonnage interne, les ajouts dosés, et les techniques isotopiques diluées offrant des solutions adaptées à diverses applications analytiques.

II.7.3. Kit de dosage

La complexité des analyses métabolomiques et le temps nécessaire pour développer une méthode a engendré un besoin de méthode prête à l'emploi, facile d'utilisation et qui permettent de réaliser du haut débit d'analyse. Les kits de dosage sont une réponse. Ils sont maintenant essentiels pour mesurer la concentration de divers métabolites dans des échantillons biologiques, réaliser des profils métaboliques et la compréhension des voies métaboliques. De nombreux fournisseurs et société de service existent, tels que Metabolon [358,359], Nightingale Health [360], Biocrates [361] ou encore IROA Technologies [362].

Les kits sont connus pour leur haut niveau de standardisation et de contrôle de qualité. Ils incluent des standards internes pour des métabolites spécifiques ou par famille de métabolites, garantissant une quantification précise et une bonne reproductibilité à travers différents échantillons et expériences. Ces kits sont conçus pour être compatibles avec diverses plateformes analytiques mais la plateforme la plus couramment utilisée est la LC-MS, qui permet une grande sensibilité et spécificité dans la détection des métabolites. Le flux de travail est un critère de choix de l'utilisation de kit et propose en général des solutions « tout-en-un », qui va du protocole de préparation des échantillons à l'analyse des données (**Figure 62**). Par exemple, avec le kit MetIDQ de Biocrates, il faut une durée totale de 38h pour analyser 82 échantillons.

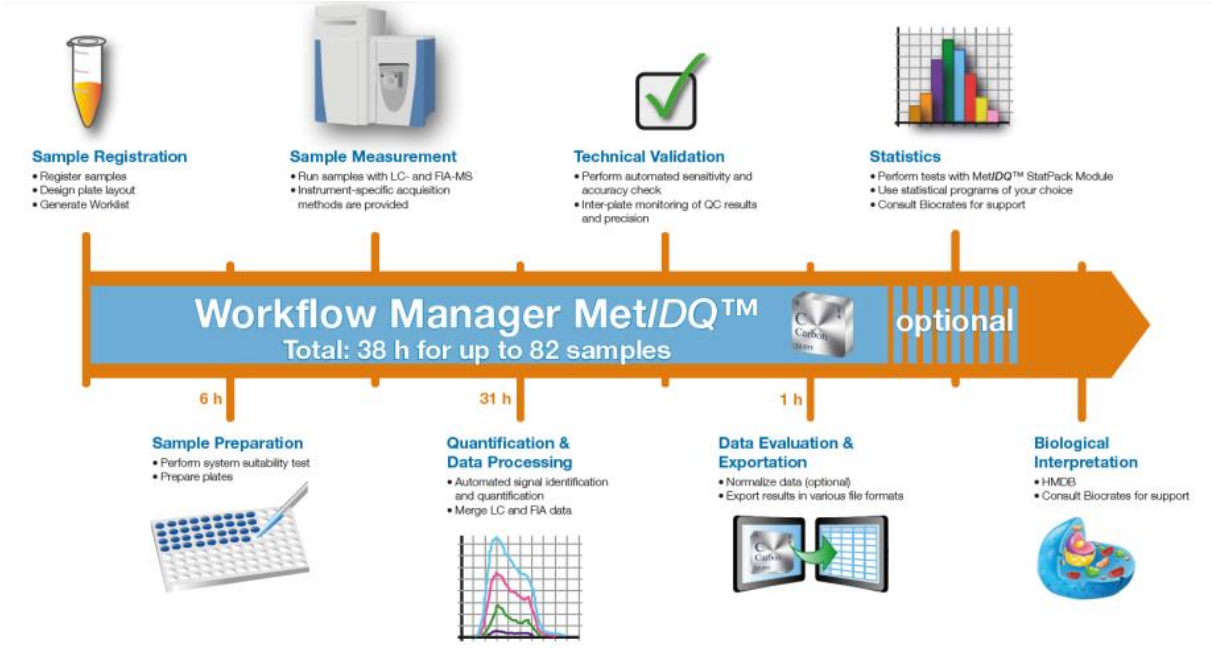


Figure 62: Exemple de workflow disponible avec un kit, tel que le kit AbsoluteIDQ® p400 HR Kit

II.7.4. Utilisation d'étiquette chimique

Les échantillons étudiés contiennent de nombreux métabolites, parfois à des concentrations proches de la trace. En utilisant les méthodes de quantification mentionnées précédemment, quantifier l'ensemble de ces métabolites nécessiterait l'utilisation de différents kits ou de différentes méthodes. Ce processus peut être long, complexe et couteux, notamment avec l'achat d'étalon interne, parfois non-commercialement disponible.

Une autre méthode consiste à utiliser la dérivation. La dérivation a été développé en premier lieu en GC-MS, pour faciliter la vaporisation ou améliorer la stabilité des composés, et donc faciliter leur analyses, avec notamment la silylation [363,364]. La dérivation chimique est une réaction chimique pré-analytique qui permet de faire réagir les molécules possédant une fonction chimique spécifique avec un réactif, appelées étiquettes chimiques, TAG ou *label*. La dérivation est incompatible avec la RMN : rajouter un motif moléculaire à un ensemble de composé va complexifier le signal et brouiller l'interprétation.

Les étiquettes chimiques employées dépendent de l'objectif :

- S'il est ciblé, l'étiquette chimique doit être la plus chimiquement spécifique possible (**Figure 63,A**).
- S'il est exploratoire (non-ciblé), c'est-à-dire observer un maximum de composés, l'étiquette doit pouvoir marquer plusieurs fonctions chimiques (**Figure 63,B**).

La Figure 63 illustre ces deux approches en dérivation : la dérivation spécifique, avec des acides gras à courte chaîne (SCFA) dérivés par une pipérazine et la dérivation exploratoire, avec l'étiquette chimique DmPA-Br (4-(dimethylamino)phenacyl bromide), capable de dériver plusieurs fonctions chimiques différentes.

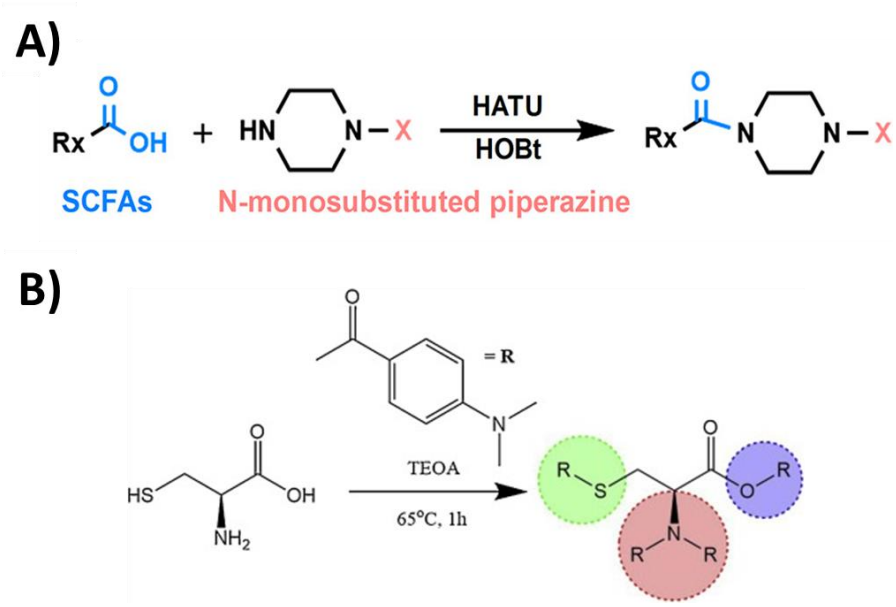


Figure 63: Différentes approches de la dérivation : (A) dérivation spécifique, exemple des acides gras à courte chaîne (SCFA) par une piperazine [365] ; (B) dérivation exploratoire, avec le DmPA-Br [366]

***** Dérivation Isotopique (*Isotope Coded Derivatization, ICD*)*****

Chaque échantillon sera dérivé par une étiquette chimique (étiquette légère) alors que les contrôles qualité (QC), en général un pool constitué d'un petit volume de chaque échantillon, seront dérivés par la version deutérée ou ^{13}C de cette dernière (étiquette lourde). Le workflow général pour remonter à la quantification par ICD est décrit dans la Figure 64, avec l'exemple du dansyl-chloride comme étiquette chimique. Pour obtenir une méthode répétable, il faut se placer dans des conditions de réaction totale ou évaluer le marquage des échantillons à l'aide d'une autre technique, comme la LC-UV avec le dansyl. Après le taux de dérivation souhaité atteint, le QC est introduit avec les échantillons et homogénéisé avant injection. En plus de permettre la quantification de métabolites, les TAG offrent de nombreux autres avantages :

- **Amélioration de l'ionisation** : le groupe fonctionnel introduit peut faciliter l'ionisation du composé (comparé au composé non-dérivé). Une meilleure ionisation permet de gagner en sensibilité car le signal détecté est augmenté.

- **Réduction de l'effet matrice** : la dérivation permet de partiellement « uniformiser » les propriétés chimiques des molécules, ce qui réduit la variabilité des interactions « composé-matrice ».
- **Prévention de la dégradation** : la dérivation permet de stabiliser des composés instables.
- **Meilleure séparation** : La dérivation modifie la polarité de la molécule, la séparation chromatographique, notamment des molécules qui sont des isomères à l'état non-dérivé.

Plusieurs aspects de l'utilisation d'isotopes sont à prendre en compte. Réaliser le marquage de molécules au deutérium (d) est plus simple qu'avec du carbone 13 (^{13}C). En contrepartie, les deutériums sont labiles et pourront facilement s'échanger avec les hydrogènes de l'eau ou du solvant. La préparation de l'échantillon et le stockage des échantillons et produits doivent être contrôlés. En prenant en compte les effets des isotopes sur l'ionisation et le décalage des temps de rétention, Szarka *et al.* [367] recommande le marquage au ^{13}C ou au ^{15}N pour éviter les co-élutions entre composés.

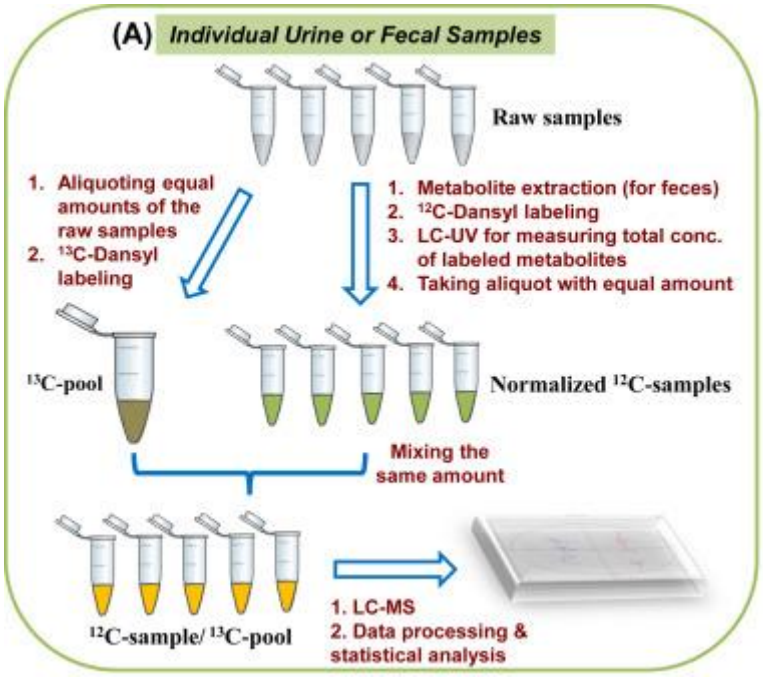


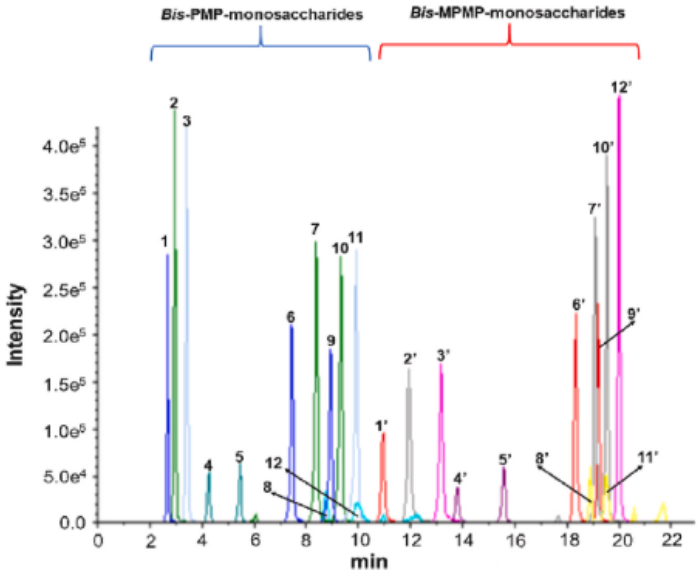
Figure 64: Workflow pour une quantification ICD, exemple du ^{12}C-/^{13}C-dansyl [368]

*****Double Dérivation Non-Isotopique (*Non-Isotopically Paire Labeling*)*****

Cette méthode utilise TAG différentes mais très proches en structure. La première variante est la *Non-Isotopically Paire Labeling* (NIPL). A la place d'un TAG léger et lourd, on utilise deux TAG différents, mais de structure proche, dont l'un sera employé pour la dérivation des échantillons et la seconde pour la dérivation des QC. C'est par exemple le cas pour le Dan-HZ (dansyl hydrazine) et le Dens-HZ (N,N-diethyldansulfonyl hydrazide) , où le groupe méthyle- devient un groupe éthyle- (**Figure 65**). La NIPL est une méthode moins couteuse que l'ICD car elle ne nécessite pas de composés marqués isotopiquement. Les molécules sont donc plus facilement accessibles, mais cette technique présente plusieurs problèmes. Tout d'abord, bien que proche en structure, ces molécules ne réagissent pas forcément de la même manière dans la matrice choisie, leur facteur de réponse n'est pas identique. De plus, le chromatogramme se complexifie avec des co-élutions possibles entre différentes molécules et différents marquages et le temps d'analyse s'allonge (**Figure 66**). La NIPL est donc un mode de marquage efficace sur les échantillons simples, comportant peu de métabolites et moins couteux que la ICD, mais la complexification du chromatogramme et l'allongement du temps d'analyse sont des limites qu'il est difficile d'outrepasser pour développer une méthode d'analyse robuste et utilisable en clinique.



Figure 65: Workflow pour une analyse quantitative des acides gras avec comme NIPL (*Non-Isotopically Paire Labeling*) avec le couple « DMED (2-dimethylaminoethylamine)/DEEA (N,N-diethyl ethylene diamine) » et le couple « Dns-HZ/Dens-HZ » [369]



Peak Number	Monosaccharides
1/1'	Mannose
2/2'	Ribose
3/3'	Rhamnose
4/4'	Glu A
5/5'	Gal A
6/6'	Glucose
7/7'	Xylose
8/8'	Gal NAc
9/9'	Galactose
10/10'	Arabinose
11/11'	ManNAc
12/12'	Fucose

Figure 66: Chromatogramme obtenu par LC-MS/MS des monosaccharides marqués par NIPL (MPMP (1-(4-methylphenyl)-3-methyl-5-pyrazolone)/PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)) [370]

II.8. *Workflow* de travail

Au cours de cette thèse, des analyses ciblées et non-ciblées ont été réalisées. Au cours de cette sous-partie, les différents *workflows* utilisés vont être présentés.

*****Quantification*****

Les échantillons sont injectés sur un spectromètre de masse du type QqQ, le *Xevo TQ-XS (Waters)*, équipé d'une chromatographie liquide *Waters Acquity I-Class UPLC Class*. La gestion du système se fait à l'aide du logiciel *MassLynx*. La quantification est réalisée à l'aide de courbes de calibration en 7 points et d'un étalon interne isotopique, pour chaque molécule. Les données de quantification sont traitées via le logiciel constructeur du module *TargetLynx* de *MassLynx*.

*****Métabolomique/Lipidomique Ciblée Large*****

Les échantillons sont injectés dans un spectromètre de masse *Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific),* équipé d'une source d'ionisation HESI et d'un système LC *UPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex*). Le système LC-MS est géré via le logiciel *Xcalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific)*.

Pour chaque campagne d'injections d'échantillons, un CQ (Contrôle Qualité) est préparé en prélevant un volume identique de chaque échantillon et en les homogénéisant. Durant la séquence d'injection, un aliquot de CQ est injecté tous les 10 échantillons. Tous les échantillons et les CQ sont injectés en MS1 et certains CQ sont également injectés en MS2, pour l'identification de métabolites.

Pour sélectionner les pics chromatographiques, les fichiers « *.raw* » des MS1 sont convertis au format *mzXML*, à l'aide du logiciel *MSconvert*. Ils sont analysés à l'aide de W4M. La liste des *features* et les images de pics chromatographiques correspondantes sont récupérées.

Pour l'identification des métabolites :

- Métabolomique : les spectres MS2 des CQ vont être comparés aux spectres MS^2 d'une chimiothèque de référence *(IROA technologies*) injectée sur l'appareil. Pour chaque correspondance, les coordonnées (*m/z* ; t_R) sont récupérées.
- Lipidomique : les spectres MS2 des CQ vont être comparés aux spectres MS2 de la bibliothèque de spectre de LipidSearch 5.0. Pour chaque correspondance, les coordonnées (*m/z* ; t_R) sont récupérées.

Pour attribuer des métabolites aux *features* des échantillons, une macro. *Excel* va comparer les coordonnées (*m/z* ; t_R). La purification des identifications se fait en 2 étapes : (1) la forme du pic chromatographique est inspectée dans l'image correspondante (obtenue par W4M ou LipidSearch) (2) Cycle d'élimination et de normalisation des signaux par rapport à l'intensité globale du signal des composés identifiés, jusqu'à qu'il n'y ait plus que des métabolites avec des CV < 30 % sur l'ensemble de l'analyse.

CHAPITRE III : Objectifs de la Thèse

La métabolomique émerge comme un outil pertinent et prometteur dans le cadre de l'identification d'une signature caractéristique d'une situation biologique, potentiellement importante pour la découverte de biomarqueurs, la détection de pathologie, la prédiction de l'évolution de la pathologie, suivi de l'état de santé d'un patient, la réponse à un traitement ou pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, les nombreux travaux de recherche et d'application de la métabolomique soulignent à la fois le potentiel de la métabolomique mais aussi les limitations rencontrées : l'accès aux échantillons et la standardisation des méthodes de prélèvements pour une matrice donnée, la couverture métabolique des analyses et le besoin d'augmenter le nombre de molécules détectées et d'abaisser leurs seuils de détection ou encore le besoin de quantifier de manière robuste pour accélérer son transfert vers la clinique sont des problèmes de premier plan, empêchant la généralisation de l'utilisation de la métabolomique dans un contexte clinique. Lors de ce travail de thèse pour décrire le métabolome d'un individu, nous avons abordé différentes stratégies. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'exploration métabolomique et à l'exploration lipidomique à partir d'auto-prélèvement, le sang séché sur buvard, pour faciliter le recueil de la matrice sanguine. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé la dérivation pour explorer le métabolome, suivant deux approches. La première approche était de proposer une méthode ciblée quantitative d'une famille de composés, les acides gras à courte chaîne, dans l'ensemble des échantillons biologiques, pour décrire un individu. La seconde approche a consisté en l'utilisation d'une étiquette chimique versatile, afin d'obtenir une meilleure couverture métabolique.

Quelle que soit la problématique posée, le choix de l'échantillon à analyser et son type de collecte vont conditionner l'information métabolique qu'il en résultera. Chaque échantillon requiert une préparation particulière, du prélèvement à la normalisation des données, et permet d'accéder à une partie du métabolome global. Pour augmenter la couverture métabolique, il est possible de combiner l'analyse de plusieurs types d'échantillons biologiques mais aussi de proposer l'utilisation de « nouveaux » échantillons, tels que des fluides séchés sur un support solide. Un des objectifs de la thèse a été d'étudier l'information biologique contenue dans le prélèvement de « sang séché sur buvard » (*dried blood spot*,

DBS). En plus de permettre l'étude de sang natif, les DBS présentent d'autres avantages comme la faible invasivité de son prélèvement, son faible coût et sa possible utilisation dans les déserts médicaux ou plus largement, dans les zones rurales avec un faible accès aux soins. Nous avons comparé les données métaboliques et lipidiques contenues dans les DBS, avec celles contenues dans le sérum, par des approches non-ciblées et ciblées par LC-MS et SFC-MS. Cette comparaison nous a permis de discuter les avantages de ce type de prélèvement par rapport aux prélèvements plus conventionnels et invasifs dans le but d'étendre et de généraliser son utilisation dans les futures analyses en biologie humaine.

Cependant, pour être utilisable en analyse biologique de routine clinique, l'information doit être quantitative et reproductible. Or, les analyses non-ciblées par LC-MS sont limitées par leur manque de robustesse. La couverture métabolique ou lipidique doit être fiable et reproductible pour proposer des biomarqueurs de pathologie fiables grâce à des données quantitatives comparables dans le temps, en intra et inter laboratoires. Un autre objectif de cette thèse consistait à promouvoir des méthodes de quantification, en analyses ciblées et en semi-ciblées, grâce à la dérivation.

D'après de nombreuses études cliniques, concernant les maladies neurodégénératives et les maladies inflammatoires du système digestif, les acides gras à courte chaîne (*short-chain fatty acids* ou *SCFA*) en sont des biomarqueurs potentiels [371–377]. Il est donc important de pouvoir les quantifier de manière robuste dans un maximum d'échantillons biologiques car leur présence est ubiquitaire chez l'homme. Le premier projet a été de proposer une méthode de quantification par dérivation de six acides gras à courtes chaines (SCFA), avec l'étiquette 3-nitrophenylhydrazine (3NPH). Elle a été développée pour explorer plusieurs types d'échantillons biologiques humains comme le sérum, l'urine, la salive, les fèces, le LCR ainsi que les DBS. Une seule gamme pour étudier l'ensemble des types d'échantillons permet d'étudier de manière exhaustive un patient dans des cas particuliers, comme par exemple des variations rares de pathologie : c'est la métabolomique à l'échelle individuelle, qui se rapproche de la médecine de précision. L'approche ciblée reste restreinte à une famille de molécules alors qu'une pathologie peut engendrer des dérégulations plus larges pouvant déséquilibrer plusieurs types de métabolisme. Ainsi il faut donc envisager de pouvoir observer et quantifier un plus grand nombre de composés en une seule analyse. La dérivation permet justement de dériver toutes les molécules possédant une ou plusieurs fonctions chimiques

spécifiques et de rendre leur détection plus aisée. Par exemple, le 3NPH dérive les acides carboxyliques et les carbonyles [378] alors qu'une autre étiquette, le DmPA-Br dérive les amines primaires et secondaires, les acides carboxyliques et les thiols [379]. C'est dans ce contexte d'analyse semi-ciblée quantitative que s'inscrit un deuxième projet. L'étiquette chimique BASA a été synthétisée par l'ICOA à Orléans avec qui nous collaborons. Lors de ce travail les capacités de marquage de cette nouvelle étiquette ont été évaluées sur une banque de molécules d'intérêt biologique. Cette évaluation est une étape nécessaire avant de pouvoir transposer son utilisation dans des milieux biologiques.

L'objectif global de cette thèse est donc de tendre vers une couverture métabolique la plus large possible et d'essayer de la rendre la plus quantitative possible tout en respectant les critères de biologie clinique. Lors de ce travail, de nombreuses problématiques seront abordées, notamment liées aux conditions pré-analytiques, l'acquisition des données par LC-MS et à l'évaluation de la robustesse.

PARTIE II :

Apport des analyses métabolomiques à partir de nouveaux supports pour compléter l'information biologique clinique

CHAPITRE I : Introduction

La métabolomique permet de compléter l'information biologique en y ajoutant un volet moléculaire. Cet apport permet d'approfondir les connaissances cliniques sur le fonctionnement du métabolisme et sur la compréhension de la physiopathologie de certaines maladies. En clinique, les échantillons sanguins sont omniprésents. Le sang est une matrice systémique, permettant ainsi le reflet du métabolisme global. Mais le mode de prélèvement, la prise de sang, présente plusieurs désavantages. En plus de l'invasivité du prélèvement, qui peut être rédhibitoire avec des patients phobiques, la quantité de sang à prélever peut affecter les patients faibles et ne permet donc pas de multiplier les prélèvements. Cependant l'accès au prélèvement sanguin, n'est pas toujours possible/facile pour le patient. D'après une enquête du Sénat Français datant de 2020, 10 millions de personnes habitent dans des déserts médicaux en France. La situation est bien pire dans des pays où l'accès aux soins est plus difficile [380]. La solution serait d'avoir un type d'échantillon, ou un outil d'échantillonnage, permettant à chacun ou à l'ensemble d'une population d'accéder aux prestations de soins. Les caractéristiques d'un tel échantillon doivent être :

- Peu onéreux : afin de rendre possible son utilisation à très grande échelle
- Prélèvement faiblement ou non invasif : le caractère invasif des prises de sang peut-être un frein pour certaines personnes et peut même s'avérer impossible dans le cas de certaines pathologies, comme par exemple les troubles du spectre de l'autisme
- Faible volume de sang : ce type de prélèvement est donc compatible pour réaliser des analyses biologiques sur des patients vulnérables.
- Réalisable en autonomie : si les patients ont un accès difficile à des professionnels de santé, il est important qu'ils puissent réaliser eux-mêmes un prélèvement en toute sécurité
- Être transportable/envoyable par le réseau postal afin de pouvoir connecter les laboratoires avec les patients

Le sang séché sur buvard, ou *dried blood spot* (DBS) est un échantillon biologique qui consiste à déposer des gouttes de sang sur un papier buvard puis le sécher avant analyse. Cet échantillon est déjà utilisé dans un contexte clinique : le dépistage de maladies néonatales, et

ce dans toute l'Europe. L'échantillonnage est peu invasif, réalisable en autonomie, envoyable par la poste, ce qui permet de connecter les personnes vivant dans des déserts médicaux et les laboratoires d'analyses biologiques. De plus, leur faible coût, leur stabilité [381–383] et la standardisation des papiers buvards les rendent pertinents pour la constitution de grandes cohortes internationales [384,385]. Malgré les avantages de logistique et de coût, actuellement les DBS sont sous utilisés dans le domaine de la métabolomique par manque de validation. En cas de screening du métabolisme pour l'étude de pathologie, l'information contenue dans les DBS doit être de qualité et doit pouvoir être quantitative.

Dans notre projet, nous avons cherché à évaluer de manière objective la qualité de l'information biologique contenue dans les DBS. La quantité de sang total contenu dans les DBS est assez faible et ce type d'échantillon étant encore mal caractérisé d'un point métabolomique et lipidomique, la RMN semble moins adaptée que la LC-MS pour cette première approche. Pour cette caractérisation, nous avons dans un premier temps, optimisé le nombre de punchs, le volume d'injection en LC-MS et le solvant d'extraction selon les critères suivant le nombre de *features* détectées, l'intensité globale, le nombre de composés identifiés ainsi que le coefficient de variation pour chaque composé. Ce travail a été effectué pour une exploration en métabolomique et en lipidomique. Une fois les conditions pré-analytiques choisies, nous avons dans un second temps comparé l'information semi-ciblée (recherche de composés d'une base de données) et ciblée-quantitatif pour les intermédiaires du tryptophane [386], les acides biliaires et les acides organiques (intermédiaires du cycle de Krebs et SCFA [387]) entre les DBS et le sérum (**Figure 67**).

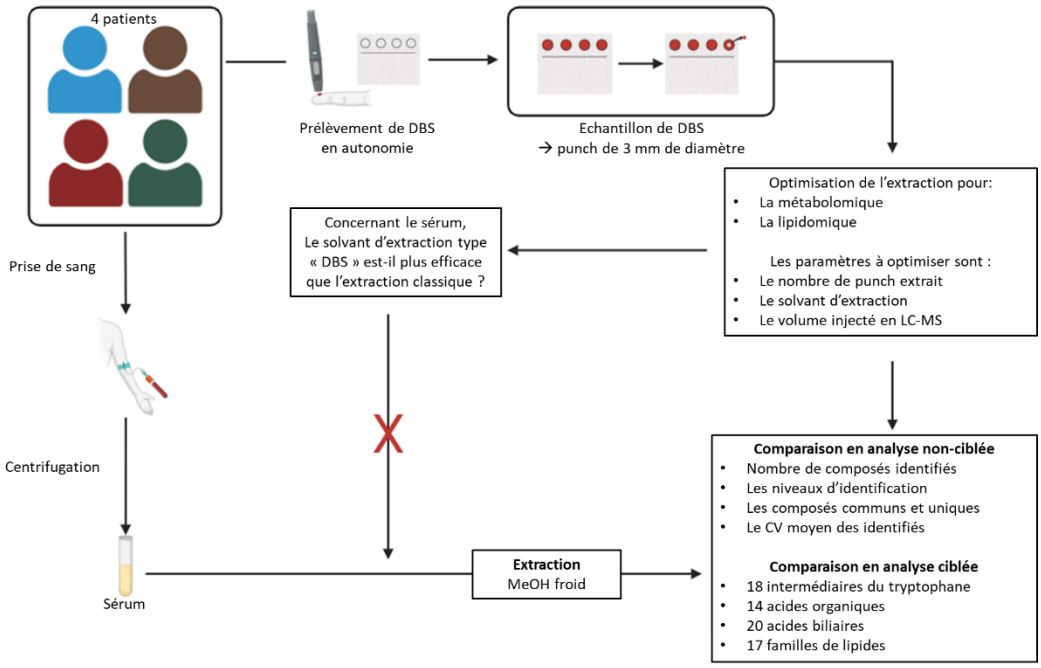


Figure 67 : Protocole général de l'étude métabolomique et lipidomique des DBS en comparaison à celle du sérum

Ce travail est en cours de relecture par l'ensemble des auteurs pour publication.

Le journal ciblé est « *MicroChemical Journal* », *Special Issue* de *Paper-based and miniaturized detection systems for environmental, food, and clinical analysis* (date limite de soumission 31 décembre).

CHAPITRE II : *Publication*

1. Article Scientifique

Comparative Evaluation of Metabolomics and Lipidomics Information Contained in Dried Blood Spot and Serum

Jérémy Monteiro[1], Cyrielle Clement[2], Antoine Lefèvre[1], Axel Dablanc[2], Diane Dufour-Rainfray[1,3], Camille Dupuy[1], Adeline Oury[1], Laurent Galineau[1], Estelle Pujos-Guillot[4], Florence Anne Castelli[5], Justine Bertrand-Michel[2], Hélène Blasco[1,6], Lydie Nadal-Desbarats[1], Emond Patrick[1,3]

1. Université de Tours, INSERM, Imaging Brain & Neuropsychiatry iBraiN U1253, MetaboHub Tours, 37032, Tours, France
2. MetaboHUB-MetaToul-Lipidomique, MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010, Inserm U1297, Université Paul Sabatier Toulouse III, 31432 Toulouse, France
3. CHRU de Tours, Service de Médecine Nucléaire In Vitro, Tours, France
4. Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Plateforme d'Exploration Du Métabolisme, MetaboHUB Clermont, Clermont- Ferrand, France
5. Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (MTS), MetaboHUB, Gif-sur-Yvette cedex, 91191, France
6. Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU de Tours, France

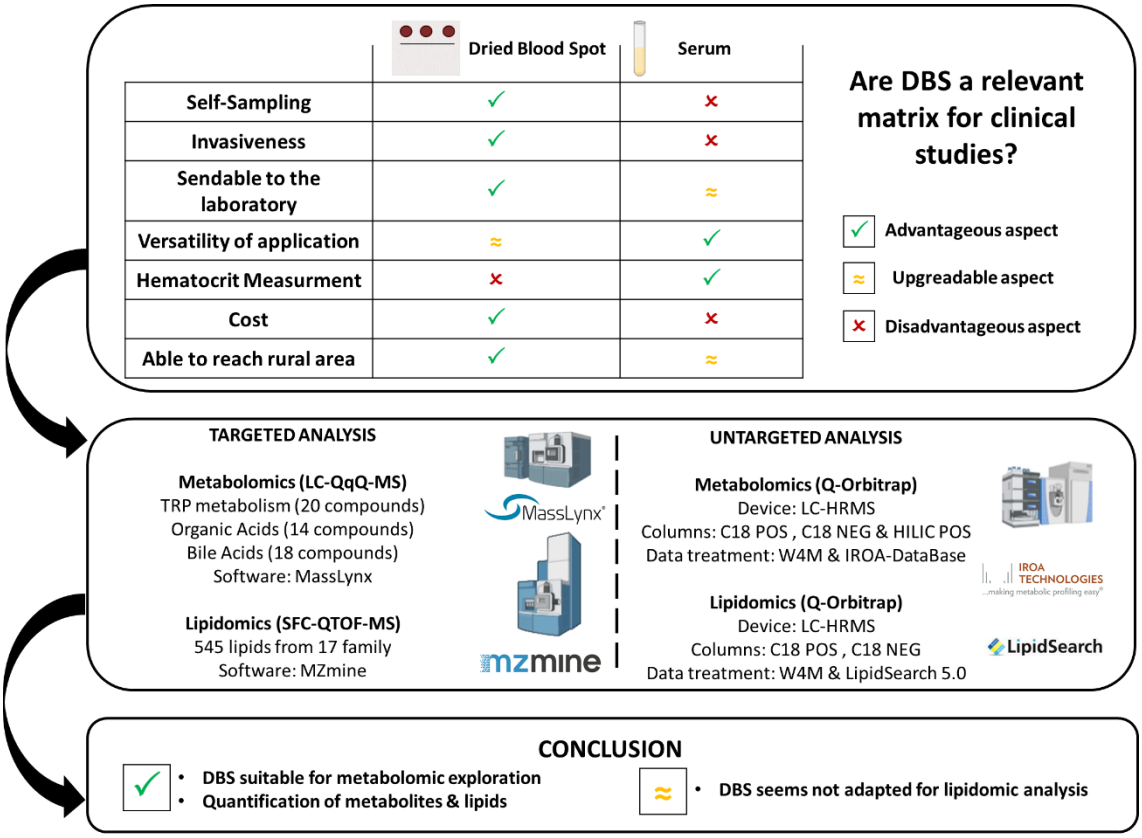
Highlights

- Comparison of metabolomic and lipidomic information between DBS and serum
- Optimization of extraction for exploratory metabolomics of dried blood spot
- Targeted analysis of 54 metabolites for absolute quantification
- Targeted analysis of more than 500 lipids for relative quantification

Keywords

Metabolomics; Lipidomics; Untargeted; Targeted; LC-MS; Dried Blood Spot; Serum

GRAPHICAL ABSTRACT



1. Introduction

Personalized medicine is the most promising area being developed in modern medicine [1]. This approach is based on the individual patient characteristics to tailored therapies and patient care [2]. Its success relies on several factors, such as the quality of the patient's biological description, the ability to describe a disease and to predict its evolution, and the finesse of the patient's monitoring. With all this information, it will then be possible to adapt and optimize the treatment of each patient. However, there are several challenges to overcome such as the need for extensive biological data and the cost of the whole process [3,4]. Metabolomics and lipidomics, the "omics" sciences studying metabolites and lipids respectively, can meet the need for a deeper insight into biological data [5,6]. They offer a real-time snapshot of a metabolic state and so reflecting immediate physiological changes because they are resulting from genetics, proteomics, and environmental influences. By revealing metabolic profiles, metabolomics and lipidomics allow for precise diagnosis, tailored treatments, and proactive health management, ensuring interventions are highly personalized and effective [7–9].

For decades, blood sample collection has remained the most widely used way to monitor a patient's state of health in order to measure a large number of biological markers to make an informed diagnosis [10]. This procedure may be received by some as invasive; it also requires trained medical staff (either in a medical laboratory or at home by a nurse) and sterile equipment [11]. Moreover, intravascular blood access is often associated with inconveniences such as frequent clinical visits, discomfort, anxiety, pain and phobia, which can lead to reduced patient compliance leading to a delay for medical procedures even to reduction in clinical research participation [12,13]. Another concern about blood samples is their pre-analytical procedures and preparation protocols to minimize variability: they can be time-consuming, expensive and blood sample storage and shipping require cold-chain to prevent sample degradation banning a self-sampling [14,15].

To tackle these issues, alternatives blood sampling has emerged [11,16,17]. Having a self-sampling device that can be easily sent by post, for example, should enable better patient monitoring. Capturing small volumes of capillary blood, by dried blood spot (DBS), in a non-invasive manner, presents an alternative to vascular puncture and contributes significantly to the revolution in human healthcare towards preventive, participative and personalised approaches in disease management. This self-sampling overcomes the need for trained staff or hospital visits, leading to a better connexion between healthcare and rural/remote areas (10 % of the French population is living in such place [18]). As a result, it improves patient recruitment and so, increasing statistical power in clinical studies.

Dried Blood Spot (DBS) are blotters papers soaked with blood and are currently used in clinical settings to detect neonatal diseases such as phenylketonuria or mucosividosis [19]. DBS is a self-sampling device containing a lancet (or lancing device) and a solid support (absorbent blotting paper) on which the drops of blood obtained after pricking are deposited. After drying in ambient air (about 3 hours), the support can be sent to the biomedical analysis laboratory by post, for example. This device is very easy to use, requires small amounts of blood, and is less prone to cross-contamination risks between samples [20–22]. All the advantages of DBS have attracted attention and their use in new contexts has been widespread such as carrying out anti-doping tests [23] or the detection of several type of cancer [24]. More generally, blotters are used in targeted studies: quantification of sleep inducers [25] or free polyinsatured fatty acids

[26] are some examples. There is a growing need for quantitative and exploratory data from DBS.

Because there is a need for a sampling tool which can connect patient and biological laboratory, it is first necessary to check whether the quality/quantity of information contained in a new sample type is equivalent to the information contained in the samples already used at clinical level. In this work, we proposed the optimization of the pre-analytical conditions to use DBS (number of punches, extraction solvent & volume injected in the liquid chromatography). Once the pre-analytical conditions established, we evaluated the metabolomics and lipidomics information contained in DBS. This information was compared to the one of serum. We first have explored untargeted data (metabolomics and lipidomics), then we have investigated the quantitative coverage of organic acids (Short-Chain Fatty Acids & TriCarboxylic Acids (TCA) (Krebs cycle intermediates)), intermediates of Tryptophan (TRP) metabolism and Bile Acids (BA).

2. Materials & Methods

2.1. Chemicals

All chemicals are available in **Table S1**.

2.2. Global Workflow

Different extraction protocols of serum, for metabolomics or lipidomics analysis, have been intensively studied and some consensuses have emerged. However, it is not the case for dried blood spot. The **Figure 1** below presents the global workflow of the study, from the optimization of DBS extraction to the objective and comparative evaluation of the biological information contained in DBS in the regard of the one in serum.

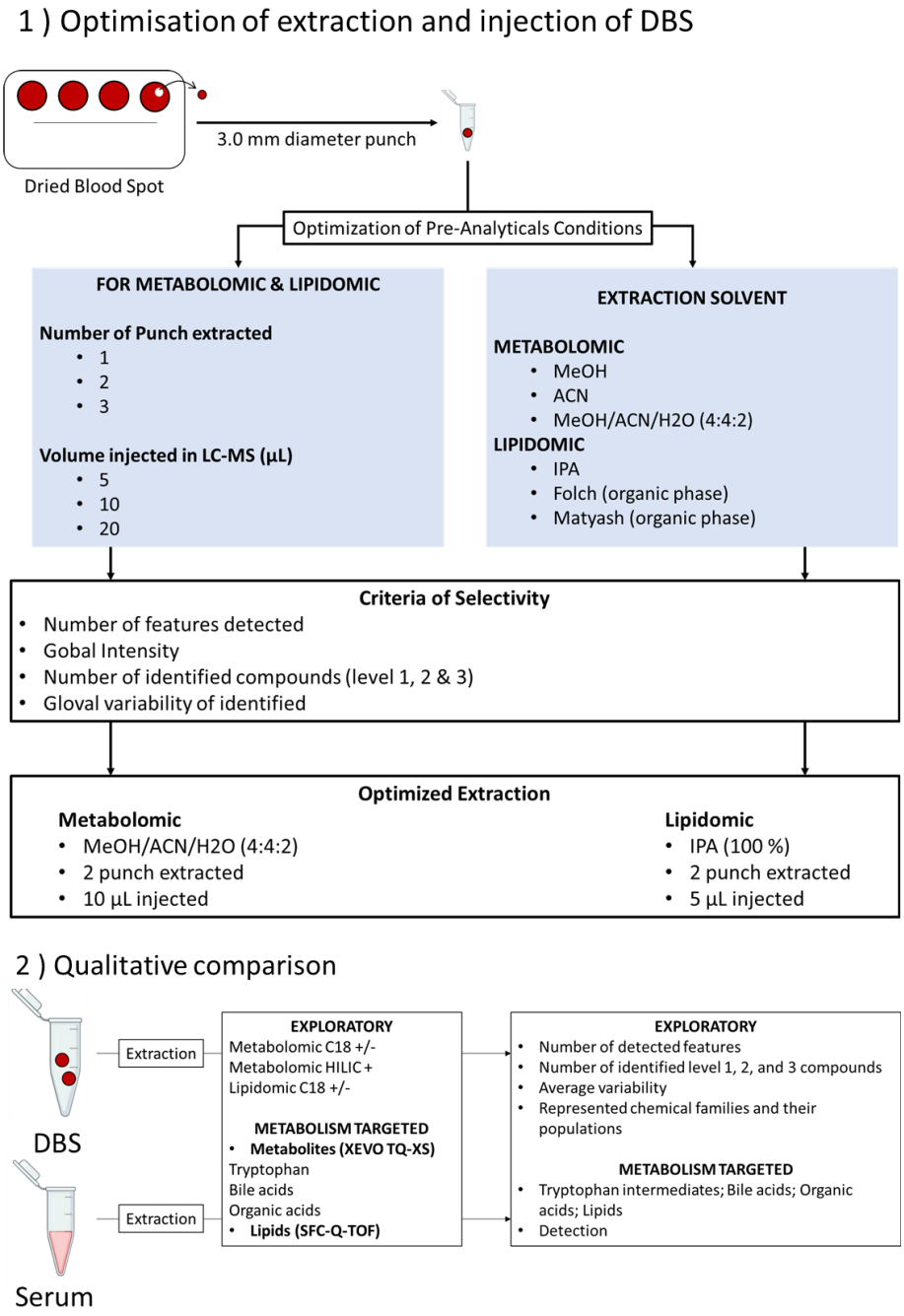


Figure 1 : global workflow of optimisation and comparative analysis

2.1. Sample Extractions

2.1.1. Extraction optimization

The extraction of dried blood spot, on Whatman 903™ blotter paper, was optimized for both metabolomics and lipidomics. Three parameters have been optimized: the number of punch extracted (1, 2 or 3), the solvent of extraction (specific for metabolite extraction or lipid extraction) and the volume injected in the LC-MS system (5 µL, 10 µL or 20 µL). The solvents of extraction were ACN, MeOH and ACN/MeOH/H_2O (4:4:2) for metabolomics and IPA, Folch [27] and Matyash [28] for lipidomics.

Extraction solvents optimized for DBS were different from those for serum. In order to compare the best extractions for each sample, the solvent effect on serum was investigated (conventional extraction, with cold MeOH vs. DBS extraction solvent).

The following extractions are the optimized extractions for each application.

2.1.2. Untargeted Metabolomic

2.1.2.1. DBS

2 punches (3.0 mm diameter disc) were extracted with 200 µL of ACN/MeOH/H_2O (4:4:2) [29,30], vigorously vortexed for 1 min, then allowed to planar agitate for 1 h at strength 8 on 10 (Titramax 1000, Heidolph, Entraigues-sur-la-Sorgue, France) and then centrifuged (10 000 g, 10 min, 4°C). 150 µL of supernatant are aliquoted and dried in a 1.5 mL Eppendorf in a SpeedVac® during 1 h at 40 °C. The dried extracts were redisolved with 75 µL of solvent, depending on the analysis: ACN/H_2O (20:80) for hydrophobic analysis or ACN/H_2O (80:20) for hydrophilic analysis. After being vigorously vortexed during 1min and then allowed to planar agitation for 30 min at strength 8 on 10 for homogenization, all aliquots were transferred in 96-well plates.

2.1.2.2. Serum

50 µL of serum were extracted with 150 µL of cold MeOH [31], vigorously vortexed during 1 min, rest 20 min at -20 °C then allowed to planar agitation for 1 h at strength 8 on 10 (Titramax 1000, Heidolph, Entraigues-sur-la-Sorgue, France). After centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C), 150 µL of supernatant were aliquoted and dried in a 1.5 mL Eppendorf in a Savant SPD111V SpeedVac Concentrator (ThermoFisher, Saint-Herblain, France) during 1 h at 40 °C. The dried extracts were redisolved with 100 µL of solvent , depending on the analysis: ACN/H_2O (20:80) for hydrophobic analysis or ACN/H_2O (80:20) for hydrophilic analysis Before being aliquoted in a 96-well plate, samples have been homogenised (1 min vortex then planar agitation for 1 h at strength 8 on 10)

2.1.3. Untargeted Lipidomic

2.1.3.1. DBS

2 punches were added with 1 mL of internal standard solution, then extracted with IPA (isopropyl alcohol). After being vigorously vortexed during 1 min, then allowed to planar agitate (1 h, strength 8/10, obscurity). (Titramax 1000, Heidolph, Entraigues-sur-la-Sorgue, France), the solutions were centrifuged (10 000 g, 10 min, 4 °C). 500 µL of supernatant were aliquoted and dried in a 1.5 ml Eppendorf in a Savant SPD111V SpeedVac Concentrator (ThermoFisher, Saint-Herblain, France) for 2 h at 40 ° C. The dried extracts were redisolved with 100 µL of ACN/IPA/H_2O (6:3:1). Before being aliquoted in a 96-well plate, samples have been homogenised (1 min vortex then planar agitation for 1 h at strength 8 on 10).

2.1.3.2. Serum

50 µL of serum were extracted following Folch' procedure [27] with 1 mL of internal standard solution. After being vigorously vortexed during 1 min, rest 20 min at -20 °C then allowed to planar agitate (1 h, strength 8/10). After centrifugation (10 000 g, 10 min, 4 °C), Aqueous supernatants were aliquoted and dried in a 1.5 mL Eppendorf in a Savant SPD111V SpeedVac Concentrator (ThermoFisher, Saint-Herblain, France) during 1 h at 40 °C. The dried extracts were redisolved with 100 µL of solvent ACN/IPA/H2O (6:3:1). Before being aliquoted in a 96-well plate, samples have been homogenised (1 min vortex then planar agitation for 1 h at strength 8 on 10).

2.1.4. SCFA

2.1.4.1. DBS & Serum

2 punches were extracted with 200 µL of ACN/MeOH/H_2O (4:4:2) and 50 µL of serum were extracted with 150 µL of cold methanol. After being vigorously vortexed during 1 min and then allowed to planar agitation for 1 h at strength 8 on 10 (Titramax 1000, Heidolph, Entraigues-sur-la-Sorgue, France) and then centrifuged (10 000 g, 10 min, 4 °C). 50 µL of supernatant is derived by 3-nitrophenylhydrazine in a 500 µL 96-well plates.

2.1.4.2. Derivatization process

The derivatization process was adapted from the method described by Liebisch et al. [32]. 50 µL of sample (or solutions for calibration curve points), 50 µL of an aqueous internal standard mixture containing acetic-$^{13}C_2$-acid (for acetic acid and propionic acid), butanoic-d_7-acid (for butyric acid and isobutyric acid) and valeric-d_9-acid (for valeric acid and isovaleric acid), all standards at 1 nM, were added to samples. Then, 50 µL of a 2.5 % pyridine solution in methanol, 50 µL of EDC solution (n-(3-dimethylaminopropyl)-n′-ethylcarbodiimide) in methanol at 105 mM and 50 µL of an aqueous/methanol solution (1:1) of 3-NPH (3-nitrophenylhydrazine) at 175 mM were added. The derivatization solution acted for 1 h at 4 °C. The reaction was quenched by adding 250 µL of acidified water (1 % formic acid). The plate was centrifuged (6 000 rpm, 15 min, 4 °C) and then 100 µL of supernatants were transferred in a 200 µL 96-well plate for injection.

2.1.5. TRP intermediates & TCA intermediates

2 punches were extracted with 200 µL of the internal standards solution (ACN/MeOH/H_2O (4:4:2)) and 25 µL of serum are extracted with 200 µL of the internal standards MeOH solution. The mixture was vigorously vortexed for 1 min, allowed to planar agitation for 1 h at strength 8 on 10 (Titramax 1000, Heidolph, Entraigues-sur-la-Sorgue, France) and centrifuged (10 000 g, 5 min, 4 °C). 150 µL of supernatant is aliquoted and dried in a 1.5mL Eppendorf in a Savant SPD111V SpeedVac Concentrator (ThermoFisher, Saint-Herblain, France) during 1 h at 40 °C. The dried extracted mixture was redisolved with 75 µL of solvent MeOH/H_2O (10:90). Before being aliquoted in a 96-well plate, samples have been homogenised (1 min vortex then planar agitation for 1 h at strength 8 on 10).

2.1.6. Bile acids

2 punches were extracted with 200 µL of the internal standards solution (ACN/MeOH/H_2O (4:4:2)) and 25 µL of serum are extracted with 200 µL of the internal standards MeOH solution. The mixture was vigorously vortexed for 1 min, allowed to planar agitation for 1 h at strength 8 on 10 (Titramax 1000, Heidolph, Entraigues-sur-la-Sorgue, France) and centrifuged (10 000 g, 5 min, 4 °C). 150 µL of supernatant is aliquoted and dried in a 1.5mL Eppendorf in a Savant SPD111V SpeedVac Concentrator (ThermoFisher, Saint-Herblain, France) during 1 h at 40 °C. The dried extracted mixture was redisolved with 75 µL of solvent MeOH/H_2O (10:90). Before being aliquoted in a 96-well plate, samples have been homogenised (1 min vortex then planar agitation for 1 h at strength 8 on 10).

2.2. LC-MS

2.2.1. LC-MS equipment

2.2.1.1. Non-targeted

LC-HRMS analysis was performed on an UPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Germany), coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen,

Germany), equipped with a HESI source (head electrospray ionisation). Xcalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) controlled the system.

2.2.1.2. Targeted

For targeted analysis, analyses were performed on a triple quadrupole Xevo TQ-XS mass spectrometer (Waters, Guyancourt, France), operated in MRM mode in positive and/or negative electrospray ionisation modes (Zspray; ESI) coupled with Waters Acquity I-Class UPLC Class with a column (Dionex, Germany). The acquired data were processed using the MassLynx TargetLynx module (Waters, Guyancourt, France).

2.2.1.3. Supercritical Fluid Chromatography (SFC)-Lipidomic-HILIC [33]

As previously described by Le Faouder et al. [33], SFC-lipidomic analysis were carried out on a Ultra-Performance Convergence Chromatography (UPC2), equipped with a diethylamine (DEA) column, coupled with a Xevo G2-XS (Q-TOF) (Waters, Milford, MA, USA). The ionization source was an ESI, used in both positive and negative mode, in separated acquisition, allowing to analysed Diacylglycerol (DG), Triacylglycerol (TG), Cholesteryl Ester (CE), Acylcarnitine (CAR), Ceramide (CER), Hexosylceramide (HexCer); Dihexosylceramide (Hex2Cer), Lysophosphatidylcholine (LPC), Lysophosphatidylethanolamine (LPE), Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Sphingomyelin (SM), Fatty Acids (FA), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserine (PS).

2.2.2. LC-MS parameters

The characteristics of the chromatographic system, such as column, oven temperature, solvent flow rates and gradient, injection volume, are described in the supplementary data. (**Supplementary Data, 1. LC-MS parameters**).

2.2.3. Data Analysis

For absolute quantification of metabolites, MassLynx® have been used whereas for the relative quantification of lipids, the software used was MZmine [34]. For exploratory analysis, compounds were considered 'identified' if they were detected in all injections of a matrice and their CV were less than 30 % after signal normalisation. W4M [35] was used for features detection. The identification of compounds have been based on MS^2 spectra and retention time, with the injected IROA-database for metabolomics and the software LipidSearch 5.0 for lipidomics [36,37]. Lipid identification are classified among levels of identification, which are: A for " all specific ions are assigned for the head groups and substituents"; B for "all specific ions are assigned for the head groups and some specific ions are assigned for substituents" OR "some specific ions are assigned for the head groups and all specific ions are assigned for substituents"; C for "some specific ions are missing for the head groups and substituents". Compounds assigned as below C-level have not been considered. Once the compounds had been identified using MS^2, the retention times and mass of the parent ion were used to identify them in all the samples injected in MS^1. In the case of lipidomic analysis, an external QC (a pool sample of several biological samples such as serum, egg yolk, feces and brain tissue extract) is injected multiple times and analysed to evaluate the reproducibility of the analysis and to calibrate the retention time of the lipids from the database.

3. Results & Discussion

3.1. Untargeted Analysis

3.1.1. Optimization of DBS extraction

Currently, there are no standardized extraction method for the exploratory analysis of biological information contained in DBS, both for lipidomics [38] or metabolomics [39,40]. In contrast, serum extractions are more consensual [41]. So, to compare the metabolic information obtained from DBS *versus* serum, the first step was to determine the "best pre-analytical" conditions for DBS analyses meaning the number of punches extracted, the extraction solvent (200 µL of extractant for metabolomics and 1 mL of extractant for lipidomics) and the injected volume in the LC-MS system.

Firstly, the extraction solvent was optimised on the basis of one extracted punch and 5 µL injected in LC-MS. The evaluation criteria were the number of features detected, the total signal intensity produced by these features (**Tables S2-3**), the number of identified compounds and the average CV of these identified compounds (**Figures S1-2**). Once the optimum extractant had been determined (for metabolomics and lipidomics), the number of punches and the optimum injection volume were investigated. The evaluation criteria were the number of identified compounds and their global CV (**Figures S3-4**). According to our results, the best extraction solvent for DBS is ACN/MeOH/H_2O (4:4:2) for metabolomics and IPA for lipidomics. As a summary, the parameters evaluated and the optimized conditions are presented in **Tableau 1**.

Tableau 1 : (A) Evaluated parameters; (B) Selected Conditions

A)	Metabolomic	Lipidomic
Modality	C18 +/- HILIC +	C18 +/-
Extraction Solvent	• MeOH • ACN • ACN/MeOH/H_2O (4:4:2)	• Folch • Matyash • IPA
Number of Punch	1, 2 & 3	
Injection Volume (µL)	5, 10 & 20	

B)	Metabolomic	Lipidomic
Modality	C18 +/- HILIC +	C18 +/-
Extraction Solvent	ACN/MeOH/H_2O (4:4:2)	IPA
Number of Punch	2	2
Injection Volume (µL)	10	5

Our aim in this study was to determine the best extraction providing the maximum detected compounds for the best global coverage. For metabolomics extraction, ACN/MeOH/H_2O (4:4:2) allows the best extraction, with 146 compounds, which is in agreement with published papers analysis (**Table S2, Figure S1**) [29,30]. In lipidomics, the extraction solvent is impactful and usually chosen to target specific lipids families [42]. Our aim was to have the widest general coverage. Based on features detected, Folch was the best choice however with 73 lipids identified, with the most "A-level" lipids and the lowest CV among the three extraction methods, IPA was the best compromise and then selected for further analysis (**Table S3, Figure S2**). Concerning the biphasic extractions tested, Folch [27] and Matyash [28], some used them because it allows to use one extract for metabolomics (aqueous phase) and the second one for lipidomics (organic phase). Medina et al. [43] had shown that it leads to a global loss of signal which is the opposite of our objective. Concerning the number

of punches extracted and the volume injected, the extraction of 3 punches leads to less identified compounds (**Figures S3-4**). Our hypothesis is the possible fact that the blotter paper releases compounds during the extraction and so, hinder the analysis of our biological samples. This observation could lead to an increased number of compounds detected without any biological significance. With an injection of 20 µL in the LC-MS system, some chromatographic peak, duplicates itself, falsely leading to a greater number of detected/identified compounds (**Figure S5**).

Our aim is to compare the biological information contained in the DBS with that in the serum under optimal conditions. After optimisation, the extraction solvent for DBS is different from that for serum and the volumes extracted are very different. 2 punches of DBS are equivalent to a test sample of 6 µL of blood. It is not possible to use a number of punches equivalent to 50 µL of blood, as this would mean losing one of the advantages of DBS. We tested the impact of the best extraction solvent (MeOH/ACN/H_2O) for DBS to the consensus solvent for serum (MeOH). As an expected result, MeOH is better suited and 177 compounds were extracted, however 142 compounds were obtained with MeOH/ACN/H_2O of which 131 (74%) were common (**Figure S6**). Because our goal was to gather as much metabolic information as possible by sample type, then the comparison should be made with the best preparation for each sample in order to have as many metabolites as possible. According to the literature and our results, cold MeOH was the best extraction suited for serum and kept for the comparison with MeOH/ACN/H_2O the best one for DBS.

3.2. Metabolomics Coverage

To evaluate the DBS self-sampling in disease management, we compared the metabolic coverage of DBS *versus* serum with a non-targeted approach (**Figure 2**). The assessment criteria were the number of features detected, the number of identified compounds (based on our IROA database) and the CV of these identified compounds. Concerning the features detected, no redundancy sorting has been made. The number of metabolites identified and their mean CVs are almost similar in both sample types. Overall, the metabolic information is as consistent in both samples (**Figure 2.A**).

103 molecules are identified in both samples, which means they are highly correlated (**Figure 2.B**, **Table S4**). More precisely, in terms of chemical class, the distribution of metabolites is equivalent on the DBS and serum sides (**Figure 2.C**). Li et al. [29] and Medina et al. [43] have highlighted this kind of tendency. Among these information, 55 and 34 were DBS and serum specific, respectively. This results is not surprising and have already been highlighted [44]. This discrepancy could be attributed to the fact that whole blood dried on blotter was extracted generating molecules (belonging to red blood cell, for example) not found in serum. 34 metabolites are only detected in serum, whereas DBS are based on whole blood, which contains serum. However, 2 punches of DBS absorb around 6 µL of blood, whereas the serum extraction is performed on 50 µL: molecules that are weakly concentrated in serum are not sufficiently concentrated in the DBS test sample to be detectable.

Among the 55 unique compounds identified in Dried Blood Spot, there are several important metabolites, biomarkers or candidate to this role (**Table S4**). 3-hydroxy-glutaric acid (3HGA) allow to detected and monitor type I glutaric aciduria [45]. In this disease, 3-hydroxyglutaric acid accumulates predominantly in body fluids and in the brain, which means 3HGA is considered as the best biomarkers [46] and could be followed with a simple sampling device as DBS. Another example, with the aging of global population, is prostate cancer which

will be becoming a health issue worldwide and sarcosine is considered to be the best biomarker for prostate cancer [47,48]. Sarcosine is detected in DBS and could therefore be used to monitor this disease. As a last example, kynurenic acid is central in several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Huntington's disease or schizophrenia [49–51]. DBS has a number of advantages, including the ability to reach people living in areas with no easy access to analysis laboratories, and the ability to monitor patients. DBS therefore seem ideally suited to detecting and monitoring these pathologies in the general population.

Despite some differences, 103 molecules are shared between the two samples, allowing to consider DBS as a suitable self-sampling device for clinical metabolomics. To confirm this, it is possible to superimpose the two metabolic data using metabolic maps [52,53]. A quick glance reveals the great similarity between the information of the two sample types (**Figure 3**).

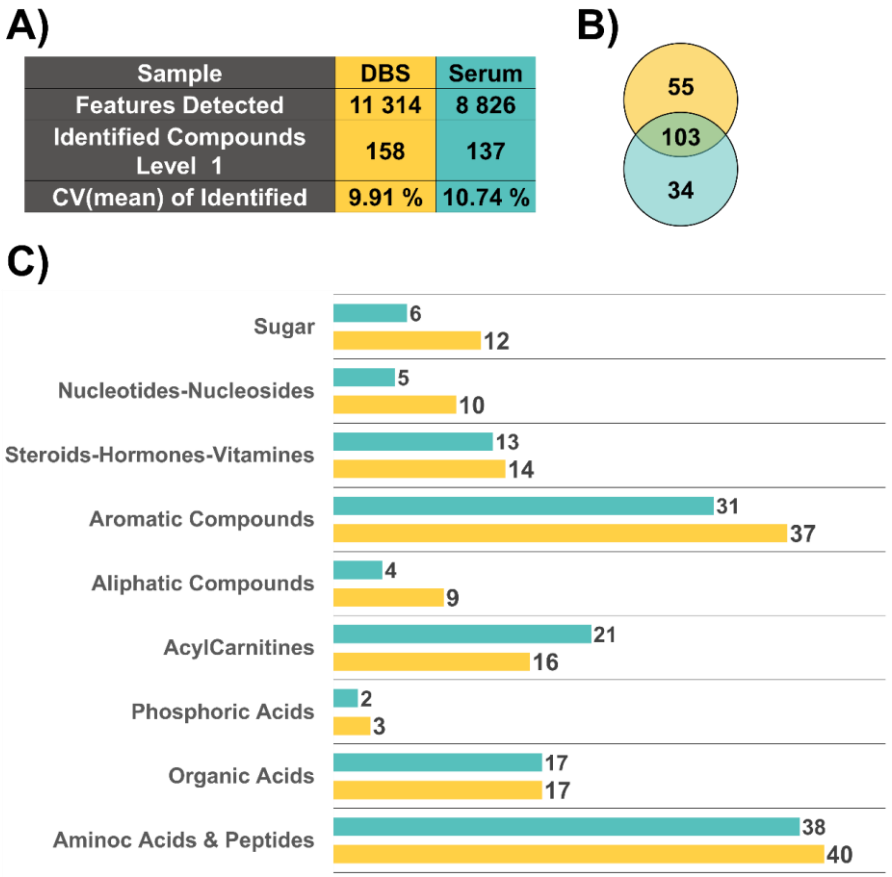


Figure 2: Comparison of the metabolomics information contained in DBS and serum (A) number of detected features, identified compounds and mean CV of identified compounds (level 1), (B) Venn's Diagram of the specific and shared identified metabolites in DBS (yellow) and serum (blue) and (C) Chemical families' proportions in DBS (yellow) and serum (blue).

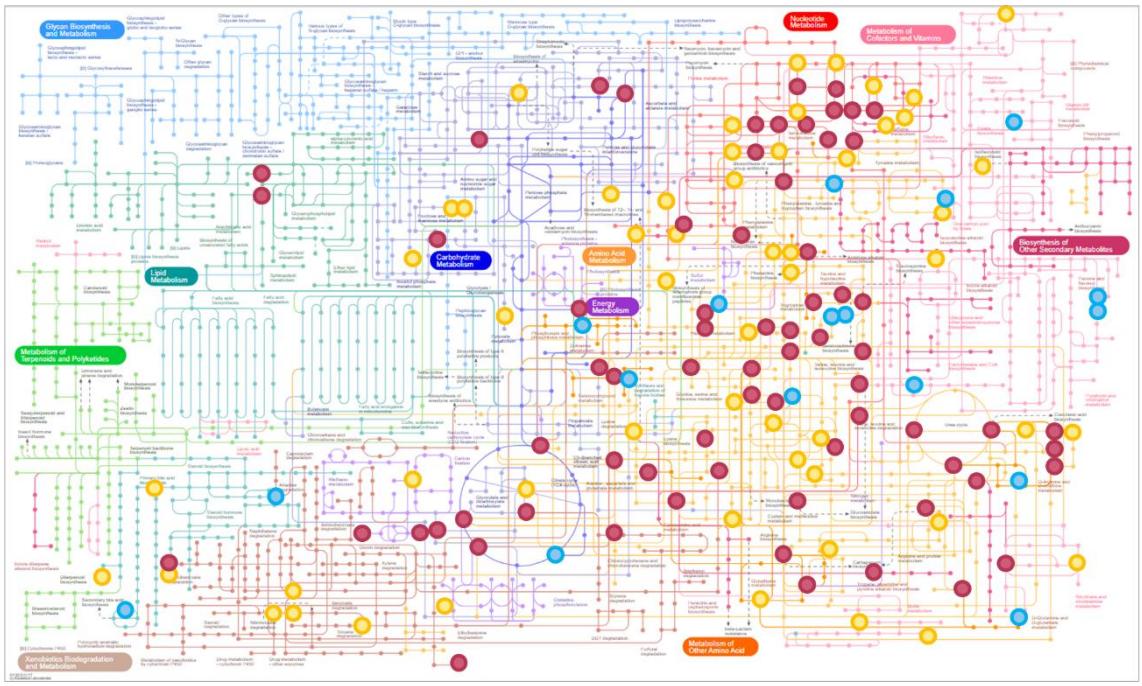


Figure 3: Metabolic card comparing the metabolic coverages of DBS and serum. (Blue dots = serum; Yellow dots = punch; Pink dots = common compounds)

3.3. Lipidomics Coverage

In the same way as the previous part, we have compared the lipidic coverage of DBS *versus* serum with a non-targeted approach (**Figure 4**). The assessment criteria were the same as metabolomics, except for the number of identified compounds: the level of identification was also considered.

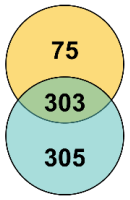
Figure 4.A clearly shows that the lipidic information in DBS is low or at least, difficult to extract from the solid support, in comparison of serum one: among the 683 unique identified lipids, 608 are found in serum against 378 in DBS (**Figure 4.B**). The hypothesis to explain such a discrepancy are: (1) the power of absorption of the blotter paper is greater than the solvent extraction power for lipids (2) lipids are more sensitive to degradation because they are 'stored' on blotting paper, in contact with open air and more easily exposed to UV rays [54–56].

Among the lipidic family population (**Figure 4.C**), high differences are present. Glycerolipids, Lysophosphocholine (LPC) and Phosphocholine (PC) are over expressed in serum. The first ones are highly considered in neurodegenerative disease studies [57,58], whereas LPC are studied with atherogenic disease and PC are studied with cardiovascular disease [59,60]. At first sight, DBS are not the best sample to study these families. However, among the lipids detected, we need to check whether some are potential biomarkers (**Table S5**): PC 34:3 and Triglycerids 52:3 (TG 52:3) are potential biomarkers for Chronic Obstructive Pulmonary Disease [61]; TG 48:1, TG 52:4 and TG 54:2 are potential biomarkers of the Kawasaki Disease [62]; Sphingomyelins (SM) are used to monitor Niemann-Pick disease and Alzheimer disease [63,64]. DBS do not appear to be suitable for screening for diseases with lipid changes, but they can be used to monitor certain diseases with fluctuating concentrations of certain lipids.

A)

Samples		DBS	Serum
Features Detected		2258	10841
Identified Lipids	A	39	119
	B	37	81
	C	302	408
	TOT	378	608
CV(mean) of Identified		10.44 %	11.54 %

B)



C)

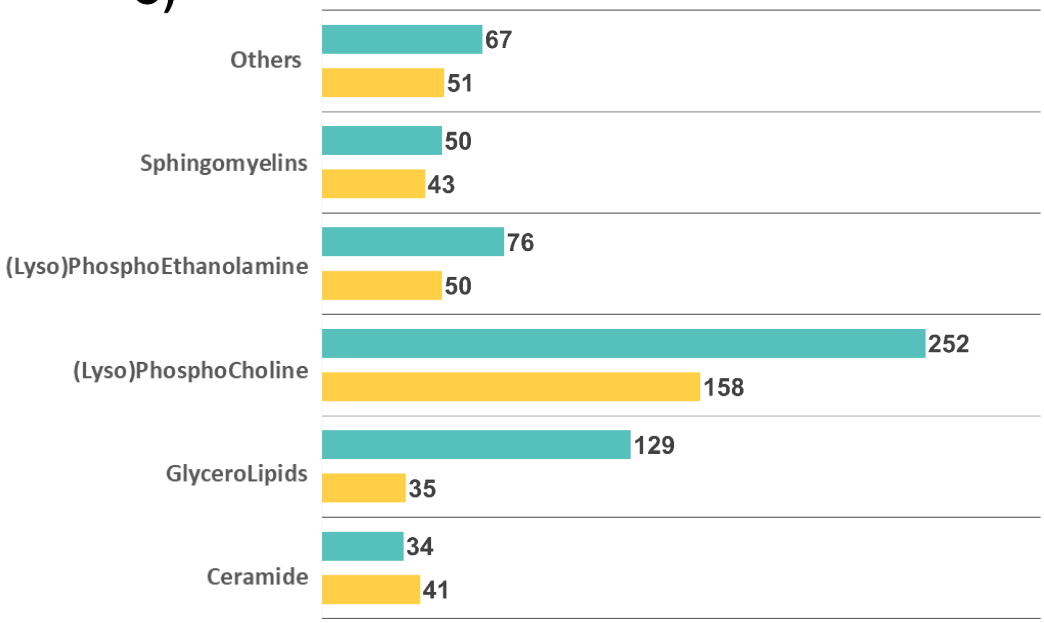


Figure 4: Comparison of the lipidomics information contained in DBS and serum (A) number of detected features, identified compounds and mean CV of identified compounds, (B) Venn's Diagram of the specific and shared identified metabolites in DBS (yellow) and serum (blue) and (C) Chemical families' proportions in DBS (yellow) and serum (blue). (C) Chemical families' proportions in DBS (yellow) and serum (blue).

3.4. Targeted Analysis

In this section, we checked whether we could access the concentration of some metabolites and lipids with DBS through in-house targeted analysis for tryptophan intermediates (TRP), Bile Acids (BA), Organic Acids (OA) and lipid families. A qualitative comparison with serum has been made.

Then, we quantified the above-mentioned compounds in DBS. No comparison was done on quantification because of the hematocrit level. Indeed, a direct comparison between serum and DBS is difficult because hematocrit level will not be available with self-sampling DBS [65,66]. Some strategies are currently in developments to try to bypass this issue but there is no standardization yet [67].

3.4.1. Qualitative comparison

DBS are already used in clinical context for the screening of acylcarnitine and amino acid, as part of the newborn diseases screening and their monitoring [68]. In order to evaluate the potential of DBS for others disease screening, we have compared the accessibility of concentration of compounds from 3 metabolic families, which are clinically important: organic

acids (OA) (including short-chain fatty acids (SCFA) and TriCarboxylic Acids (TCA) intermediates), intermediates from tryptophan (TRP) metabolism and bile acids (**Figure 5**).

SCFA are involved in the gut microbiota-brain axis [69,70] and so are intensively studied in pathology such as Alzheimer or Autism [71,72]. Mutations in genes encoding the TCA cycle enzymes are present in a major part of cancer [73] and TCA cycle disorders have been registered in lactic acidosis as, Joubert acidosis and Leigh disease [74]. The organic acids were quantifiable in DBS (12/14 present in our method) and in serum (13/14). These results showed that DBS can be suitable for the detection and the monitoring of some disease associated with OA dysregulations.

TRP intermediates are central in a lot of inflammatory disorders such as gastrointestinal diseases [75], immune system activity [76] and in neurodegenerative disease [77]. Over the 20 tryptophan metabolism intermediates quantifiable in our method, 15 were assayed in adult DBS (Figure 5). As a comparison, 11 were quantified in the serum. Aust et al. [78] and Bergwerff et al. [79] have quantified some TRP metabolites in neonatal DBS, to the best of our knowledge these are the first whole TRP metabolism data available for adults [80–82].

Bile Acids play leading roles in type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver diseases [83] or neurological [84] diseases: lithocholic acid is a potential biomarker for Alzheimer's disease [85]. More bile acids were detected in the serum than in the DBS (Figure 5). The small quantity of blood present in a DBS punch (6 µL in 2 punches) does not allow all of them to be detected. However, Janzen et al. [86] were able to detect disorders of bile acid metabolism using DBS, which are therefore relevant for monitoring this family of compounds.

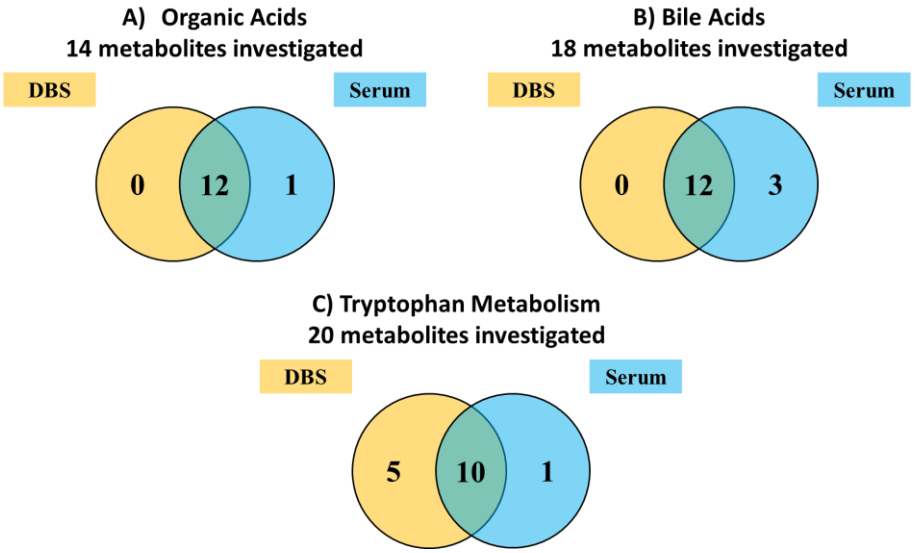


Figure 5: Comparison of quantifiable metabolites in DBS and serum

In our study, we highlighted that DBS and serum were different from an exploratory point of view and in family proportion but DBS were still interesting because several biomarkers could be detected. In their study, Le Faouder et al. [33] have showed that DBS and whole blood samples have the same lipidomic profile, qualitatively and quantitatively, among 17 lipid families. We applied the same SFC-TOF-MS methodology to compare DBS and serum. **Figure 6** and **Table 2** highlight the fact that less lipids can be quantified with DBS. However, some family are highly represented like DG, studied in diabetes, [87]; PI ,which play key roles in the nervous system [88] or FA, which allows to monitor the non-alcoholic fatty liver disease

[89]. Notwithstanding the narrower coverage of DBS, it remains a tool of choice for quantifying lipids.

Table 2: Relative quantification of lipid families

Lipidic Family	DBS Number of Quantified	SERUM Number of Quantified
DG	**21**	**36**
TG	**25**	**46**
CE	**1**	**3**
CAR	**3**	**18**
CER	**12**	**16**
HexCer (1)	**0**	**1**
Hex2Cer (1)	**0**	**6**
LPC	**4**	**24**
LPE (1)	**0**	**6**
PC	**44**	**57**
PE	**2**	**25**
SM	**28**	**32**
FA (2)	**23**	**23**
PG	**0**	**0**
PI (2)	**16**	**16**
PS (2)	**1**	**1**
TOTAL	**180**	**301**

(1) : Only detected in serum
(2) : All compounds are commons

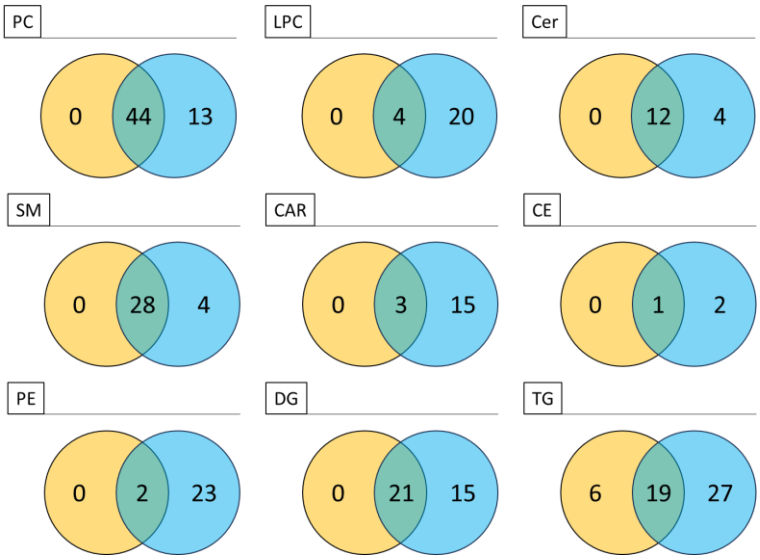


Figure 6: Distribution of lipids between DBS (yellow disk) and serum (blue disk) for some lipidic families through Venn's Diagram

3.4.2. Metabolic and lipidic quantification in DBS

In the previous section, we assessed the capabilities of DBS to be used as a quantification support. We now need to check the quality of the quantification, in line with clinical standards. The following **Table 3** and **Table 4** present the concentration, in nM, and the CV of metabolites and of whole lipid families, respectively.

Most of the metabolites (**Table 3**) have a CV < 20 % which means the DBS is suitable to produce clinical-friendly data. However, 4 metabolites have a CV > 30 %: citric acid, glycolithocholic acid, taurocholic acid and hyocholic acid. At first sight, this type of CV seems prohibitive in a clinical context, but it should be borne in mind that pathology detection is based on thresholds: analytical variability should make it possible to highlight biological variability. If a pathology leads to a strong shift in concentration for a molecule, or several molecules, the differences in concentration levels will be detected and well separated from 'healthy' cases despite a higher CV. For example, kidney disease has a major impact on citric acid: in non-diabetic patients suffering from chronic kidney disease, citric acid production can be reduced by up to 70%.

Lipids concentration are highly modified under cancers metabolism [93,94], in chronic kidney disease [90] or in non-alcoholic fatty liver disease [91,92], which means that several lipids are impacted at once. In order to facilitate the detection of these kind of pathologies, DBS can be used as a check-up system were a global lipidic family is quantified and if the pathologic threshold is exceeded, meaning for the patient a high possibility to have the pathology, a more accurate quantification is carried out on each lipid, in order to identified which kind of

pathology allowing precise medicine. **Table 4** presents global concentrations of lipid families as an asset for disease detection.

Table 3 : Quantification of organic acids from the Krebs Cycle (TCA), Short-Chain Fatty Acids (SCFA), intermediates from the tryptophan metabolism (TRP) and bile acids in DBS, over 10 repeatabilities

Metabolite	Family	Concentration (nM)	CV (%)	Metabolite	Family	Concentration (nM)	CV (%)
Citric acid	TCA	14,111	31.34	Xanthurenic Acid	TRP	< LOQ	-
Fumaric acid	TCA	298	10.86	Indole-3-acetamide	TRP	19	12.15
Isocitric acid	TCA	< LOQ	-	Kynurenic Acid	TRP	110,866	2.93
Malic acid	TCA	548	6.33	Indole-3-Lactic Acid	TRP	230	7.82
Succinic acid	TCA	1,552	10.03	Indole-3-Aldehyde	TRP	10,860	5.07
Ketoglutaric acid	TCA	43,064	11.77	Tryptophol	TRP	< LOQ	-
Aconitic acid	TCA	1,894	10.23	Indole-3-Acetic Acid	TRP	314	9.35
Itaconic acid	TCA	< LOQ	-	Melatonin	TRP	< LOQ	-
Acetic Acid	SCFA	35,500	14.77	Taurohyocholic acid	Bile Acids	< LOQ	-
Propionic Acid	SCFA	5,234	14.90	Glycohyocholic acid	Bile Acids	< LOQ	-
Butyric Acid	SCFA	1,470	17.29	Glyco-γ-muricholic acid	Bile Acids	135	12.76
Isobutyric Acid	SCFA	1,692	12.44	Lithocholic acid	Bile Acids	< LOQ	-
Valeric Acid	SCFA	2,789	6.61	Glycodeoxycholic acid	Bile Acids	486	10.58
Isovaleric Acid	SCFA	2,651	18.97	Glycolithocholic acid	Bile Acids	11	34.83
Picolinic Acid	TRP	< LOQ (	-	Glycocholic acid	Bile Acids	295	13.06
3-OH-kynurenine	TRP	< LOQ (	-	Sulfated cholic acid	Bile Acids	< LOQ	-
Quinolic Acid	TRP	182	10.67	Taurochenodeoxycholic acid	Bile Acids	56	23
Serotonin	TRP	< LOQ	-	Glycochenodeoxycholic acid	Bile Acids	715	10.03
5-hydroxytryptophane	TRP	< LOQ	-	Sulfated lithocholic acid	Bile Acids	< LOQ	-
Kynurenine	TRP	115	8.87	Taurodeoxycholic acid	Bile Acids	< LOQ	-
3-OH-anthranilic acid	TRP	< LOQ	-	Taurocholic acid	Bile Acids	5	50.34
Tryptamine	TRP	< LOD	-	Taurolithocholic acid	Bile Acids	< LOQ	-
Tryptophan	TRP	< LOQ	4.33	Hyocholic acid	Bile Acids	110	36.53
5-OH-indole Acetic Acid	TRP	943	8.62	Cholic acid	Bile Acids	1,124	9.58
Inxodyl-3-sulfate	TRP	72,860	7.76	Deoxycholic acid	Bile Acids	126	12.05
N-acetyserotinine	TRP	< LOQ	-	Ursodeoxycholic acid	Bile Acids	40	21.7

Table 4 : Global concentrations of lipid families in DBS

Lipidic Family	DG	TG	CE	CAR	CER	HexCer	Hex2Cer	LPC	LPE	PC	PE	SM	FA	PG	PI	PS
Number of Quantified	21	25	1	3	12	0	0	4	0	44	2	28	23	0	16	0
Total Concentration (nM)	39.2	67.7	4.5	3.4	135.4	-	-	28.9	-	857.2	8.5	1,682	6,635	-	36,626	-

4. Conclusion

DBS presents several advantages for blood sampling from a clinical point-of-view: it is an inexpensive self-sampling device, easily shipped by post service from patient to the

hospital, it can be used for disease screening, health check-up or patient monitoring. The use of DBS should therefore be widespread in more clinical studies. The objective of this study was to objectively access the quality of the biological information contains in dried blood spot with metabolomics and lipidomics, in comparison with a clinical reference sample, serum. In addition, we optimized the pre-analytical conditions (solvent of extraction, number of punch extracted and volume injected in the LC-MS system) for both omics sciences.

We reported the identification of 158 "level 1 confidence" metabolites and 378 lipids (39 class A, 37 class B & 308 class C) from DBS, using LC-C18/HILIC-MS analysis, with a global CV < 12%, making untargeted analysis of DBS reliable. From a metabolomics point of view, most of the serum information is found in the DBS. There is therefore a good chance that serum biomarkers will be found in DBS. However, from a lipid point of view, the information contained in DBS is less extensive than the one contained in serum. Still, 39/52 metabolites among organic acids, tryptophan intermediates and bile acids were quantifiable and 180 lipids can be quantified among 16 families in DBS. The possibility to quantify a large number of compounds makes this type of sampling suitable for the detection and the monitoring of pathology.

DBS are a promising device for clinical studies and because of the reliable quantity, quality and repeatability of the data, it is a possible answer to the need for sampling tools which can connect patient and hospital. In the future, blood samples and DBS samples should be studied in parallel in disease study cohorts. However, in the case of cohorts, the long-term stability of the DBS is essential and should be determined

5. Bibliography

[1] Letertre MPM, Giraudeau P, de Tullio P. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Clinical Metabolomics and Personalized Medicine: Current Challenges and Perspectives. Front Mol Biosci 2021;8. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.698337.

[2] Chan IS, Ginsburg GS. Personalized Medicine: Progress and Promise. Annual Review of Genomics and Human Genetics 2011;12:217–44. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082410-101446.

[3] Di Sanzo M, Cipolloni L, Borro M, La Russa R, Santurro A, Scopetti M, et al. Clinical Applications of Personalized Medicine: A New Paradigm and Challenge. Current Pharmaceutical Biotechnology 2017;18:194–203.

[4] Pastorino R, Loreti C, Giovannini S, Ricciardi W, Padua L, Boccia S. Challenges of Prevention for a Sustainable Personalized Medicine. Journal of Personalized Medicine 2021;11:311. https://doi.org/10.3390/jpm11040311.

[5] Luque de Castro MD, Quiles-Zafra R. Lipidomics: An omics discipline with a key role in nutrition. Talanta 2020;219:121197. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121197.

[6] Kennedy AD, Wittmann BM, Evans AM, Miller LAD, Toal DR, Lonergan S, et al. Metabolomics in the clinic: A review of the shared and unique features of untargeted metabolomics for clinical research and clinical testing. Journal of Mass Spectrometry 2018;53:1143–54. https://doi.org/10.1002/jms.4292.

[7] Gaca-Tabaszewska M, Bogusiewicz J, Bojko B. Metabolomic and Lipidomic Profiling of Gliomas—A New Direction in Personalized Therapies. Cancers 2022;14:5041. https://doi.org/10.3390/cancers14205041.

[8] Kirwan JA, Kaddurah-Daouk R, Mitchell T, Pischon T, Schmidt MA, Velagapudi V. Biobanking for Metabolomics and Lipidomics in Precision Medicine. Clinical Chemistry 2019;65:827–32. https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.298620.

[9] Wang R, Li B, Lam SM, Shui G. Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression. Journal of Genetics and Genomics 2020;47:69–83. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.11.009.
[10] Pickup L, Atkinson S, Hollnagel E, Bowie P, Gray S, Rawlinson S, et al. Blood sampling - Two sides to the story. Applied Ergonomics 2017;59:234–42. https://doi.org/10.1016/j.apergo.2016.08.027.
[11] Thangavelu MU, Wouters B, Kindt A, Reiss IKM, Hankemeier T. Blood microsampling technologies: Innovations and applications in 2022. Analytical Science Advances 2023;4:154–80. https://doi.org/10.1002/ansa.202300011.
[12] Simundic A-M, Church S, Cornes MP, Grankvist K, Lippi G, Nybo M, et al. Compliance of blood sampling procedures with the CLSI H3-A6 guidelines: An observational study by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PRE) 2015. https://doi.org/10.1515/cclm-2014-1053.
[13] Melnikow J, Kiefe C. Patient compliance and medical research. Journal of General Internal Medicine 1994;9:96–105. https://doi.org/10.1007/BF02600211.
[14] Atkins LB. Blood Sample Collection and Handling. Advanced Monitoring and Procedures for Small Animal Emergency and Critical Care, John Wiley & Sons, Ltd; 2012, p. 599–610. https://doi.org/10.1002/9781118997246.ch47.
[15] Hernandes VV, Barbas C, Dudzik D. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. ELECTROPHORESIS 2017;38:2232–41. https://doi.org/10.1002/elps.201700086.
[16] Bloem K, Schaap T, Boshuizen R, Kneepkens EL, Wolbink GJ, Vries A de, et al. Capillary Blood Microsampling to Determine Serum Biopharmaceutical Concentration: Mitra® Microsampler vs Dried Blood Spot. Bioanalysis 2018;10:815–23. https://doi.org/10.4155/bio-2018-0010.
[17] Volumetric absorptive microsampling (VAMS) as an alternative to conventional dried blood spots in the quantification of miltefosine in dried blood samples n.d. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.012.
[18] Déserts médicaux : L'État doit enfin prendre des mesures courageuses ! Sénat 2023. https://www.senat.fr/rap/r19-282/r19-282.html (accessed May 28, 2024).
[19] DGOS. Programme national de dépistage néonatal. Ministère de la Santé et de la Prévention 2023. https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/maladies-rares/DNN (accessed October 5, 2023).
[20] Komada K, Sugiyama M, Vongphrachanh P, Xeuatvongsa A, Khamphaphongphane B, Kitamura T, et al. Seroprevalence of chronic hepatitis B, as determined from dried blood spots, among children and their mothers in central Lao People's Democratic Republic: a multistage, stratified cluster sampling survey. International Journal of Infectious Diseases 2015;36:21–6. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.04.020.
[21] Lakshmy R, Tarik M, Abraham RA. Role of dried blood spots in health and disease diagnosis in older adults. Bioanalysis 2014;6:3121–31. https://doi.org/10.4155/bio.14.242.
[22] Snijdewind IJM, van Kampen JJA, Fraaij PLA, van der Ende ME, Osterhaus ADME, Gruters RA. Current and future applications of dried blood spots in viral disease management. Antiviral Research 2012;93:309–21. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.12.011.
[23] Kojima A, Nishitani Y, Sato M, Kageyama S, Dohi M, Okano M. Comparison of urine analysis and dried blood spot analysis for the detection of ephedrine and methylephedrine in doping control. Drug Testing and Analysis 2016;8:189–98. https://doi.org/10.1002/dta.1803.
[24] Graham SF, Chevallier OP, Roberts D, Hölscher C, Elliott CT, Green BD. Investigation of the Human Brain Metabolome to Identify Potential Markers for Early Diagnosis and Therapeutic Targets of Alzheimer's Disease. Analytical Chemistry 2013;85:1803–11. https://doi.org/10.1021/ac303163f.
[25] Mainero Rocca L, L'Episcopo N, Gordiani A, Staderini A. Direct multiclass desorption electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for the analysis of sleep inducers

and ototoxic drugs in dried blood spots. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2022;36:e9265. https://doi.org/10.1002/rcm.9265.
[26] Hewawasam E, Liu G, Jeffery DW, Muhlhausler BS, Gibson RA. A validated method for analyzing polyunsaturated free fatty acids from dried blood spots using LC–MS/MS. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2017;125:1–7. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.08.010.
[27] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. Journal of Biological Chemistry 1957;226:497–509. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5.
[28] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics[*s]. Journal of Lipid Research 2008;49:1137–46. https://doi.org/10.1194/jlr.D700041-JLR200.
[29] Li K, Naviaux JC, Monk JM, Wang L, Naviaux RK. Improved Dried Blood Spot-Based Metabolomics: A Targeted, Broad-Spectrum, Single-Injection Method. Metabolites 2020;10:82. https://doi.org/10.3390/metabo10030082.
[30] Li K, Naviaux JC, Bright AT, Wang L, Naviaux RK. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics. Metabolomics 2017;13:122. https://doi.org/10.1007/s11306-017-1264-1.
[31] Want EJ, O'Maille G, Smith CA, Brandon TR, Uritboonthai W, Qin C, et al. Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry. Anal Chem 2006;78:743–52. https://doi.org/10.1021/ac051312t.
[32] Liebisch G, Ecker J, Roth S, Schweizer S, Öttl V, Schött H-F, et al. Quantification of Fecal Short Chain Fatty Acids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry—Investigation of Pre-Analytic Stability. Biomolecules 2019;9:121. https://doi.org/10.3390/biom9040121.
[33] Le Faouder P, Soullier J, Tremblay-Franco M, Tournadre A, Martin J-F, Guitton Y, et al. Untargeted Lipidomic Profiling of Dry Blood Spots Using SFC-HRMS. Metabolites 2021;11:305. https://doi.org/10.3390/metabo11050305.
[34] Katajamaa M, Miettinen J, Orešič M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. Bioinformatics 2006;22:634–6. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk039.
[35] Giacomoni F, Le Corguillé G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Pétéra M, et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics 2015;31:1493–5. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813.
[36] Taguchi R, Ishikawa M. Precise and global identification of phospholipid molecular species by an Orbitrap mass spectrometer and automated search engine Lipid Search. Journal of Chromatography A 2010;1217:4229–39. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.034.
[37] Wu T, Guo H, Zhang T, Sun R, Tao N, Wang X, et al. LipidSearch-based manual comparative analysis of long-chain free fatty acids in thermal processed tilapia muscles: workflow, thermal processing effect and comparative lipid analysis. International Journal of Food Science & Technology 2022;57:1197–207. https://doi.org/10.1111/ijfs.15498.
[38] Ferreira HB, Guerra IMS, Melo T, Rocha H, Moreira ASP, Paiva A, et al. Dried blood spots in clinical lipidomics: optimization and recent findings. Anal Bioanal Chem 2022;414:7085–101. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04221-1.
[39] Ward C, Nallamshetty S, Watrous JD, Acres E, Long T, Mathews IT, et al. Nontargeted mass spectrometry of dried blood spots for interrogation of the human circulating metabolome. Journal of Mass Spectrometry 2021;56:e4772. https://doi.org/10.1002/jms.4772.
[40] Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. International Journal of Neonatal Screening 2020;6:26. https://doi.org/10.3390/ijns6020026.
[41] Fonseca TAH, Von Rekowski CP, Araújo R, Oliveira MC, Justino GC, Bento L, et al. The Impact of the Serum Extraction Protocol on Metabolomic Profiling Using UPLC-MS/MS and FTIR Spectroscopy. ACS Omega 2023;8:20755–66. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01370.

[42] Aldana J, Romero-Otero A, Cala MP. Exploring the Lipidome: Current Lipid Extraction Techniques for Mass Spectrometry Analysis. Metabolites 2020;10:231. https://doi.org/10.3390/metabo10060231.
[43] Medina J, Van Der Velpen V, Teav T, Guitton Y, Gallart-Ayala H, Ivanisevic J. Single-Step Extraction Coupled with Targeted HILIC-MS/MS Approach for Comprehensive Analysis of Human Plasma Lipidome and Polar Metabolome. Metabolites 2020;10:495. https://doi.org/10.3390/metabo10120495.
[44] Drolet J, Tolstikov V, Williams BA, Greenwood BP, Hill C, Vishnudas VK, et al. Integrated Metabolomics Assessment of Human Dried Blood Spots and Urine Strips. Metabolites 2017;7:35. https://doi.org/10.3390/metabo7030035.
[45] Varadkar S, Surtees R. Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: A modified hypothesis. J Inherit Metab Dis 2004;27:835–42. https://doi.org/10.1023/B:BOLI.0000045767.42193.97.
[46] Seminotti B, Latini A, Amaral AU, Leipnitz G, Wajner M. 3-Hydroxyglutaric Acid as a Neurotoxin. In: Kostrzewa RM, editor. Handbook of Neurotoxicity, Cham: Springer International Publishing; 2022, p. 1383–401. https://doi.org/10.1007/978-3-031-15080-7_229.
[47] Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. Nature 2009;457:910–4. https://doi.org/10.1038/nature07762.
[48] Cernei N, Heger Z, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Babula P, et al. Sarcosine as a Potential Prostate Cancer Biomarker—A Review. International Journal of Molecular Sciences 2013;14:13893–908. https://doi.org/10.3390/ijms140713893.
[49] Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex n.d.
[50] Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease n.d. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.08.012.
[51] Zhen D, Liu J, Zhang XD, Song Z. Frontiers | Kynurenic Acid Acts as a Signaling Molecule Regulating Energy Expenditure and Is Closely Associated With Metabolic Diseases n.d. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.847611.
[52] Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. Nucleic Acids Research 2021;49:W388–96. https://doi.org/10.1093/nar/gkab382.
[53] Darzi Y, Letunic I, Bork P, Yamada T. iPath3.0: interactive pathways explorer v3. Nucleic Acids Research 2018;46:W510–3. https://doi.org/10.1093/nar/gky299.
[54] Comparative study of UV and visible light induced degradation of lipids in non-axenic senescent cells of Emiliania huxleyi n.d. https://doi.org/10.1016/j.marchem.2010.01.007.
[55] Stability of lipids in plasma and serum: Effects of temperature-related storage conditions on the human lipidome n.d. https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2021.10.002.
[56] Holčapek M, Liebisch G, Ekroos K. Lipidomic Analysis. Anal Chem 2018;90:4249–57. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05395.
[57] Watanabe Y, Kasuga K, Tokutake T, Kitamura K, Ikeuchi T, Nakamura K. Alterations in Glycerolipid and Fatty Acid Metabolic Pathways in Alzheimer's Disease Identified by Urinary Metabolic Profiling: A Pilot Study. Front Neurol 2021;12:719159. https://doi.org/10.3389/fneur.2021.719159.
[58] Casas-Fernández E, Peña-Bautista C, Baquero M, Cháfer-Pericás C. Lipids as Early and Minimally Invasive Biomarkers for Alzheimer's Disease. Curr Neuropharmacol 2022;20:1613–31. https://doi.org/10.2174/1570159X19666211102150955.
[59] Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine n.d. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.05.029.
[60] Frostegård J. Antibodies against phosphorylcholine and protection against atherosclerosis, cardiovascular disease and chronic inflammation. Expert Review of Clinical Immunology 2022;18:525–32. https://doi.org/10.1080/1744666X.2022.2070475.

[61] Ben Anes A, Ben Nasr H, Tabka Z, Tabka O, Zaouali M, Chahed K. Plasma Lipid Profiling Identifies Phosphatidylcholine 34:3 and Triglyceride 52:3 as Potential Markers Associated with Disease Severity and Oxidative Status in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Lung 2022;200:495–503. https://doi.org/10.1007/s00408-022-00552-z.
[62] Chen X, Zhao Z-W, Li L, Chen X-J, Xu H, Lou J-T, et al. Hypercoagulation and elevation of blood triglycerides are characteristics of Kawasaki disease. Lipids in Health and Disease 2015;14:1–9. https://doi.org/10.1186/s12944-015-0167-2.
[63] Mielke MM, Lyketsos CG. Alterations of the Sphingolipid Pathway in Alzheimer's Disease: New Biomarkers and Treatment Targets? NeuroMolecular Medicine 2010;12:331–40. https://doi.org/10.1007/s12017-010-8121-y.
[64] Fan M, Sidhu R, Fujiwara H, Tortelli B, Zhang J, Davidson C, et al. Identification of Niemann-Pick C1 disease biomarkers through sphingolipid profiling n.d.
[65] De Kesel PM, Capiau S, Lambert WE, Stove CP. Current Strategies for Coping with The Hematocrit Problem in Dried Blood Spot Analysis. Bioanalysis 2014;6:1871–4. https://doi.org/10.4155/bio.14.151.
[66] De Kesel PM, Sadones N, Capiau S, Lambert WE, Stove CP. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. Bioanalysis 2013;5:2023–41. https://doi.org/10.4155/bio.13.156.
[67] Is the hematocrit still an issue in quantitative dried blood spot analysis? Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2019;163:188–96. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.010.
[68] Newborn Screening - Chromsystems n.d. https://chromsystems.com/en/products/newborn-screening.html (accessed August 29, 2024).
[69] Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. Frontiers in Endocrinology 2020;11.
[70] Besten G den, Eunen K van, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. Journal of Lipid Research 2013;54:2325–40. https://doi.org/10.1194/jlr.R036012.
[71] Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. Aliment Pharmacol Ther 1998;12:499–507. https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1998.00337.x.
[72] Wang G, Yu Y, Wang Y-Z, Wang J-J, Guan R, Sun Y, et al. Role of SCFAs in gut microbiome and glycolysis for colorectal cancer therapy. Journal of Cellular Physiology 2019;234:17023–49. https://doi.org/10.1002/jcp.28436.
[73] Sajnani K, Islam F, Smith RA, Gopalan V, Lam AK-Y. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. Biochimie 2017;135:164–72. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.008.
[74] Bénit P, Bortoli S, Chrétien D, Rak M, Rustin P. Pathologies liées aux déficits du cycle de Krebs. Revue Francophone des Laboratoires 2018;2018:49–57. https://doi.org/10.1016/S1773-035X(18)30120-5.
[75] Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee A a. M. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. Neurogastroenterology & Motility 2009;21:1239–49. https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01370.x.
[76] Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. Immunology & Cell Biology 2003;81:247–65. https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2003.t01-1-01177.x.
[77] Comai S, Bertazzo A, Brughera M, Crotti S. Chapter Five - Tryptophan in health and disease. In: Makowski GS, editor. Advances in Clinical Chemistry, vol. 95, Elsevier; 2020, p. 165–218. https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.08.005.
[78] Aust A-C, Benesova E, Vidova V, Coufalikova K, Smetanova S, Borek I, et al. Profiling Tryptophan Catabolites of Human Gut Microbiota and Acute-Phase Protein Levels in Neonatal Dried Blood Specimens. Frontiers in Microbiology 2021;12.
[79] Bergwerff CE, Luman M, Blom HJ, Oosterlaan J. Paediatric reference values for total homocysteine, tryptophan, tyrosine and phenylalanine in blood spots. Scandinavian Journal of

Clinical and Laboratory Investigation 2017;77:410–4. https://doi.org/10.1080/00365513.2017.1334167.
[80] Wang C, Zhu H, Zhang W, Song F, Liu Z, Liu S. Second-tier test for quantification of underivatized amino acids in dry blood spot for metabolic diseases in newborn screening. Amino Acids 2012;44:661–71. https://doi.org/10.1007/s00726-012-1389-5.
[81] Al-Qahtani W, Abdel Jabar M, Masood A, Jacob M, Nizami I, Dasouki M, et al. Dried Blood Spot-Based Metabolomic Profiling in Adults with Cystic Fibrosis. J Proteome Res 2020;19:2346–57. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00031.
[82] Aust A-C, Benesova E, Vidova V, Coufalikova K, Smetanova S, Borek I, et al. Frontiers | Profiling Tryptophan Catabolites of Human Gut Microbiota and Acute-Phase Protein Levels in Neonatal Dried Blood Specimens n.d. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.665743.
[83] Molinaro A, Wahlström A, Marschall H-U. Role of Bile Acids in Metabolic Control. Trends in Endocrinology & Metabolism 2018;29:31–41. https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.002.
[84] Hurley MJ, Bates R, Macnaughtan J, Schapira AHV. Bile acids and neurological disease. Pharmacology & Therapeutics 2022;240:108311. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108311.
[85] Marksteiner J, Blasko I, Kemmler G, Koal T, Humpel C. Bile acid quantification of 20 plasma metabolites identifies lithocholic acid as a putative biomarker in Alzheimer's disease. Metabolomics 2017;14:1. https://doi.org/10.1007/s11306-017-1297-5.
[86] Janzen N, Sander S, Terhardt M, Das AM, Sass JO, Kraetzner R, et al. Rapid quantification of conjugated and unconjugated bile acids and C27 precursors in dried blood spots and small volumes of serum [S]. Journal of Lipid Research 2010;51:1591–8. https://doi.org/10.1194/jlr.D003814.
[87] Markgraf DF, Al-Hasani H, Lehr S. Lipidomics—Reshaping the Analysis and Perception of Type 2 Diabetes. International Journal of Molecular Sciences 2016;17:1841. https://doi.org/10.3390/ijms17111841.
[88] Raghu P, Joseph A, Krishnan H, Singh P, Saha S. Frontiers | Phosphoinositides: Regulators of Nervous System Function in Health and Disease n.d. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00208.
[89] The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease n.d. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.10.001.
[90] Gai Z, Wang T, Visentin M, Kullak-Ublick GA, Fu X, Wang Z. Lipid Accumulation and Chronic Kidney Disease. Nutrients 2019;11:722. https://doi.org/10.3390/nu11040722.
[91] Dai H, Wang W, Chen R, Chen Z, Lu Y, Yuan H. Lipid accumulation product is a powerful tool to predict non-alcoholic fatty liver disease in Chinese adults. Nutrition & Metabolism 2017;14:1–9. https://doi.org/10.1186/s12986-017-0206-2.
[92] Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. Cellular and Molecular Life Sciences 2018;75:3313–27. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6.
[93] Pakiet A, Kobiela J, Stepnowski P, Sledzinski T, Mika A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. Lipids Health Dis 2019;18:29. https://doi.org/10.1186/s12944-019-0977-8.
[94] Santos CR, Schulze A. Lipid metabolism in cancer. The FEBS Journal 2012;279:2610–23. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x.

2. Données complémentaires

Lorsqu'un support solide est utilisé pour étudier un échantillon biologique, il est important de vérifier s'il est inerte ou s'il relargue des composés, potentiellement des contaminants, lors de l'extraction. Le papier buvard à la base des DBS est composé de cellulose, qui ne peut donc pas être considéré comme inerte.

Pour évaluer les composés communs entre le DBS et son support solide, une analyse métabolomique non-ciblée LC-MS de DBS et du papier Whatman 903 (

Figure 68, **Tableau 7**) a été réalisé : 20 % des métabolites sont communs avec le support solide, bien que leurs intensités soient bien plus faibles dans le support blanc. En soustrayant le blanc aux échantillons, ce genre de problème peut être résolu. Avec des extractions « agressives », à base de chloroforme, d'ultrasons, le tout chauffé ont été testé sur DBS et punch blanc vierge. Le résultat est, dans les deux cas, que le punch se délite (libération de petites particules), complexifiant l'attribution de l'origine de chaque signal, entre le sang séché et le support solide. Il serait possible d'utiliser ce genre d'extraction en rajoutant une étape de filtration entre l'extraction et l'injection mais cela amènera à une plus grande variabilité de manipulation.

Cependant, 7 composés ne sont détectés qu'avec le support blanc vierge. Parmi eux, 3 de ces composés sont des propositions de biomarqueurs de pathologies, détectables dans le sang (HMDB, [40]): l'acide 3-aminoisobutanoique est entre autre un marqueur de la déficience en méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase ; l'acide (S)-3-Hydroxyisobutyrique est entre autre un marqueur du diabète de type 2) et l'alcool benzylique est entre autre un marqueur de l'urémie. Dans le cas où ces pathologies sont étudiées avec des DBS, il faudra se référer aux autres biomarqueurs ou prendre en compte l'apport du support solide au signal. L'origine de ces composés reste compliquée à expliquer mais existe plusieurs hypothèses quant à leurs origines :

- Processus de fabrication [388] : les composés sont utilisés en tant qu'additif lors du processus de fabrication ou dans l'encre déposé sur le papier buvard. Ces composés peuvent aussi faire partie de la formulation d'huile et produit de nettoyage utilisés par la machinerie et donc, pouvant contaminer le support solide.

- Fragmentation en source [389,390] : les molécules observées sont en faites issues de molécules plus complexes
- Contamination biologique [391,392] : en manipulant le papier, il existe des risques de contamination par le toucher, le souffle ou l'environnement (pas de manipulation en salle blanche). La peau étant recouverte de bactérie, les métabolites du support vierge peuvent être dues à la consommation de la cellulose, principale constituant du papier buvard.

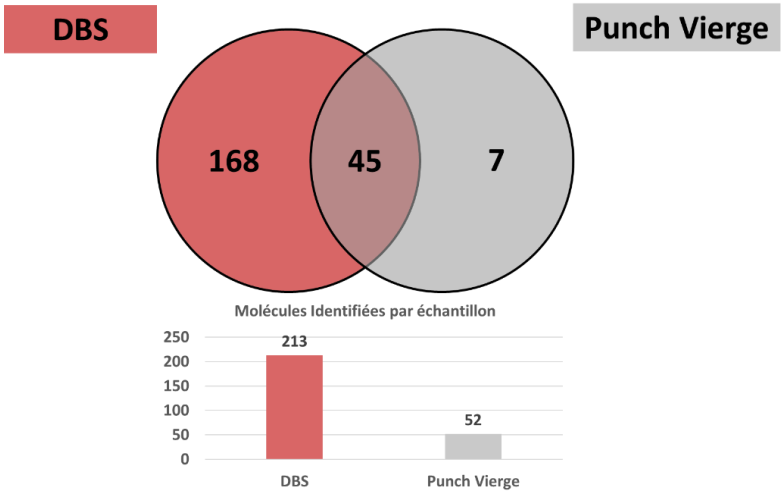


Figure 68 : Diagramme de Venn comparant les métabolites identifiés en analyse non-ciblée (C18 +/-, HILIC +) entre les DBS et le support vierge (Whatman 903).

Tableau 7 : Métabolites présents à la fois dans les DBS et le support solide ou uniquement dans le support solide

Métabolite	Appartenance	Métabolite	Appartenance	Métabolite	Appartenance
1-PHENYLETHANOL	Commun	GLYCOLATE	Commun	Propanoylcarnitine	Commun
2-Ethy2-hydroxybutyric acid	Commun	HYPOXANTHINE	Commun	PUTRESCINE	Commun
3-Hydroxyglutarate	Commun	LACTATE	Commun	SORBATE	Commun
3-Hydroxyoctanoic acid	Commun	ALANINE	Commun	TAURINE	Commun
4-HYDROXY-3-METHOXYPHENYLGLYCOL	Commun	Carnitine	Commun	TRIGONELLINE	Commun
4-HYDROXY-PROLINE	Commun	GLUTAMIC ACID	Commun	TYRAMINE	Commun
4-METHYLCATECHOL	Commun	LYSINE	Commun	URACIL	Commun
5-Oxoproline	Commun	PROLINE	Commun	Urocanic acid	Commun
ALPHA-AMINOADIPATE	Commun	THREONINE	Commun	XANTHINE	Commun
ALPHA-D-GLUCOSE	Commun	TYROSINE	Commun	3-AMINOISOBUTANOATE	Punch Vierge
Alpha-ketoisovaleric acid	Commun	N6-(DELTA2-ISOPENTENYL)-ADENINE	Commun	3-hydroxyisobutyrate	Punch Vierge
CADAVERINE	Commun	N6,N6,N6-Trimethylysine	Commun	4-ACETAMIDOBUTANOATE	Punch Vierge
Citraconic acid	Commun	N-ACETYALANINE	Commun	4-Hydroxyphenyllactic acid	Punch Vierge
CORTISOL	Commun	N-Acetyaspartic acid	Commun	BENZYLALCOHOL	Punch Vierge
ARABINOSE	Commun	N-ACETYLNEURAMINATE	Commun	METHYL JASMONATE	Punch Vierge
DEOXYRIBOSE	Commun	N-acetytyrosine	Commun	N-ACETYDGLUTAMICACID	Punch Vierge
GLYCERATE	Commun	NICOTINAMIDE	Commun		
GLYCEROL 2-PHOSPHATE	Commun	PHOSPHOCHOLINE	Commun		

Les DBS sont peu chers et facilement utilisables, ce qui rend leur utilisation à grande échelle pertinente. Pour un élément est produit cette grande échelle, il faut vérifier sa stabilité inter-lots. Pour évaluer cette stabilité (**Figure 69**), nous avons étudié les acides gras à courte chaîne (C2 : acide acétique, C3 : acide propionique, (I)C4 : acide (iso)butyrique, (I)C5 : acide (iso)valérique) dans trois types de papier buvard : dépistage néonatale, *NeoNat* ; partie vierge des papiers buvards de contrôle ChromSystem, *Control* ; et le papier buvard servant au suivi des patients, *AdultTracking*. Puis, pour se placer dans le cadre de campagnes de dépistage, une comparaison a été faite entre des DBS et le *AdultTracking.*

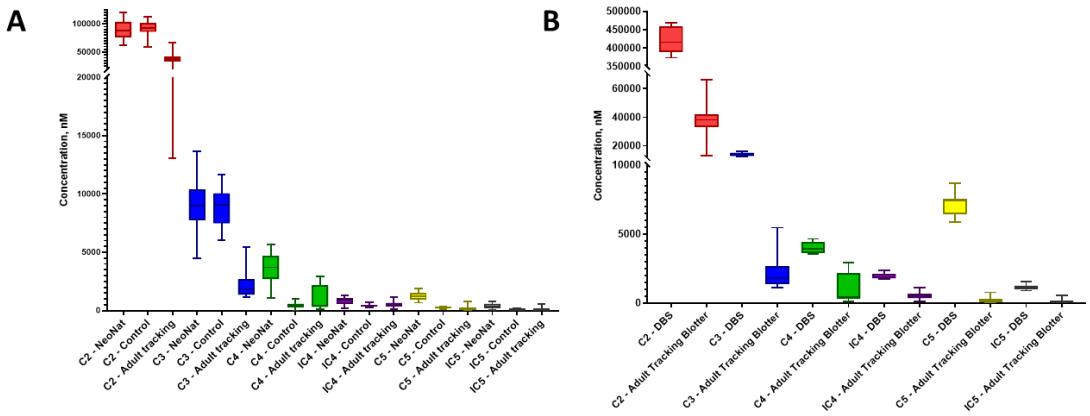


Figure 69 : Comparaison préliminaires des concentrations en SCFA dans 1 punch de 3 mm de diamètre (n=10), extrait au méthanol froid dans (A) trois types de support solide vierge : NeoNat, Control et AdultTracking (B) entre les DBS et le support vierge AdultTracking

Le support solide est très variable, et en termes de SCFA, l'étendue des concentrations ne sont pas négligeables, bien que différente d'un papier buvard imbibé de sang. Ces résultats sont préliminaires et de nouvelles analyses doivent être lancées pour affiner ces résultats ou adapter les extractions, ils posent cependant la question de la néosynthèse de métabolites. Si comme évoqué précédemment, la papier buvard est contaminé par des bactéries, celles-ci vont « consommer » des éléments sanguins et produire de nouveaux métabolites. Pour empêcher ce type de développement bactérien, il faudra étudier s'il est possible de pulvériser des antibactériens, tel que l'azide de sodium, sur les supports solides.

D'autres types de prélèvements sanguins existent et sont réputés très stables, tels que le VAMS [393,394]. La récolte du sang se fait ici sur une fibre polymère inerte. L'appareil est cependant plus couteux que les DBS : une étude comparative devra être menée afin de définir les avantages, inconvénients et quel est le meilleur compromis entre les deux types d'échantillon.

CHAPITRE III : Conclusion

1. Bilan

D'un point de vue exploratoire, les DBS semblent adaptés aux analyses métaboliques, grâce à une couverture équivalente au sérum. Pour les analyses lipidiques, les DBS semblent moins riches que le sérum, avec deux fois moins de lipides détectés. L'aspect très encourageant de nos résultats résident dans la grande quantité de molécules quantifiables avec les DBS. Leur utilisation pour réaliser des bilans de santé semble donc pertinente et adaptée pour des suivis longitudinaux sur des molécules spécifiques, comme c'est déjà le cas pour le suivi de la phénylcétonurie par exemple. Les DBS semblent donc prometteur pour une utilisation plus répandue [395–397]. Plusieurs problématiques doivent cependant être étudiés pour passer à une telle échelle : la stabilité à long terme de l'échantillon et comment normaliser les données, exploratoire et quantitative [381,398,399].

Tout d'abord, en supposant un prélèvement en autonomie à son domicile, il est nécessaire de standardiser le « type » de papier buvard employé, définir les conditions de prélèvement, de séchage et de transport optimales au patient au risque de rajouter une variabilité de « prélèvement » à la variabilité biologique. Un second point est la stabilité du DBS sur le long terme lors de la construction d'une cohorte et le stockage des échantillons jusqu'à analyse. Une fois les conditions optimales de prélèvements et de stockage déterminées, des campagnes de prélèvements de patients et pathologiques pourront être réalisées afin de spécifier quelles pathologies sont détectables et/ou surveillables.

Concernant la quantification, pour des matrices sanguines le taux d'hématocrite est régulièrement utilisé. Ce prélèvement se faisant en autonomie par le patient à son domicile, cette information ne sera pas disponible. Il convient d'étudier d'autres moyens de normaliser le signal [400]:

- Peser les *punchs* permettrait de prendre indirectement en compte à la fois le volume absorbé et le taux d'hématocrite.
- Normaliser l'ensemble des signaux à une molécule. Les critères pour définir cette molécule devrait être un lien avec l'hématocrite.

- Utiliser des *punchs* secs imbibés de différents étalons internes permettrait de normaliser différentes familles de composés.
- Normaliser par rapport au signal total ou en PQN [401].

Certaines des manipulations proposées semblent complexes à mettre en place dans un contexte de suivi à grande échelle ou augmenterait fortement le prix de l'analyse, ce qui vient contrebalancer un des avantages de départ des DBS. Un travail comparatif de ces méthodologies pourrait être effectué. Cependant, en prenant en compte les variabilités liées à l'hématocrite et à l'absorbance des buvards, il reste possible d'utiliser les DBS pour mettre à jour des seuils de détection de pathologies [402].

2. Pertinence des matrices sanguines

Les DBS sont un support pour le sang total, soit le plasma/sérum avec les éléments figurés du sang. Analyser une telle matrice, quand le sérum et le plasma sont plus répandus en métabolomique et lipidomique, posent la question de la pertinence de l'information extraite et de son interprétation.

Plusieurs questions se posent concernant la proportion de l'information provenant des cellules sanguines. Une des premières questions concerne le lieu où le sang prélevé, soit la différence entre du sang capillaire et du sang veineux. De nombreuses études montrent que d'un point de vue métabolomique, il n'existe pas de différences significativement qui pourraient gêner voire modifier l'interprétation de résultats obtenus avec ces « types » de prélèvements [403–405].

Au-delà de cette problématique, d'autres questions restent encore sans réponse claire. Nous pouvons citer comme exemple : 1) est-ce que l'information obtenue par le sang total est une représentation « aussi » systémique que le sérum ou le plasma, 2) la détermination et l'interprétation des métabolites échangés entre les éléments figurés et le sérum. Un élément de réponse pour la première est la comparaison de l'enrichissement des voies métaboliques en rentrant les métabolites identifiés dans MetaboAnalyst [319] (Tableau 8). L'enrichissement est calculé en prenant en compte le nombre de métabolites identifiés faisant partie d'une voie métabolique (*hits*), par rapport à l'ensemble des métabolites de la voie (*TOT.*) et comparé à l'ensemble des métabolites identifiés dans l'échantillon. Toutes les voies significativement

enrichies dans le sérum le sont aussi avec les DBS, qui donne accès à plus de voies enrichies. Il conviendra donc, dans le futur, d'étudier et de comparer plus en détails le culot cellulaire sanguin au sérum pour mieux interpréter la répartition des métabolites. Cependant, des études réalisées avec pour échantillon les DBS ont déjà permis de mieux comprendre certaines pathologies [399,400]. La possibilité de pouvoir décrire plus en détail le métabolisme sanguin apporterait un meilleur niveau de lecture.

Tableau 8 : Enrichissement des voies métaboliques pour le DBS et le sérum – Top « p-value < 0,05 », par MetaboAnalyst (09/12/2024) [319]

MetaboAnalyst		DBS			Serum		
Metabolism	TOT.	Hits	Enrichment Ratio	p-value	Hits	Enrichment Ratio	p-value
Ammonia Recycling	31	8	3.11	0.003	8	3.49	0.001
Glycine and Serine Metabolism	59	12	2.45	0.002	11	2.52	0.003
Urea Cycle	28	8	3.45	0.001	7	3.38	0.003
Aspartate Metabolism	35	7	2.41	0.021	7	2.71	0.011
Carnitine Synthesis	22	5	2.75	0.030	5	3.09	0.019
Malate-Aspartate Shuttle	10	3	3.62	0.043	3	4.06	0.032
Arginine and Proline Metabolism	52	9	2.09	0.023	8	2.08	0.032
Purine Metabolism	73	11	1.82	0.032	10	1.86	0.036
Pyrimidine Metabolism	57	10	2.12	0.015	-	-	-
Beta-Alanine Metabolism	34	7	2.48	0.018	-	-	-
Methionine Metabolism	42	8	2.30	0.018	-	-	-
Alanine Metabolism	17	4	2.84	0.045	-	-	-

3. Perspectives

Actuellement la littérature n'est pas très importante concernant l'utilisation du buvard comme type de support pour d'autres matrices que le sang. Avec du papier buvard imprégné d'urine, Blasco *et al.* [236] ont développé une méthode RMN pour détecter des erreurs innées du métabolisme (acidurie organique, déficit en ornithine transcarbamylase). De leur côté, Souza *et al.* [406] ont utilisé ce type d'échantillon pour la détection de la maladie de Pompe. Abdel-Rehim *et al.* [407] ont, quant à eux, testé la capacité du prélèvement « salive séchée sur buvard » en comparaison de la salive native, pour suivre le suivi et la quantification de la lidocaïne. Les résultats similaires obtenus sont une preuve du potentiel de ce type de prélèvement salivaire.

Les buvards sont souvent utilisés avec des échantillons dont le prélèvement est peu invasif et pour la possibilité d'être réalisé en autonomie par le patient. Mais les buvards peuvent s'avérer utiles pour remplacer les méthodes, ou les kits, de prélèvement actuel(le)s,

souvent onéreux ou seulement réalisable dans les principaux hôpitaux du pays, tout en restant compatible avec les tests biologiques. Par exemple au Laos, pays avec une forte population rurale, les tests PCR réalisé sur LCR doivent être transportés à l'hôpital de la capitale pour être analysés. Les conditions de transport sont difficiles et le LCR est un échantillon précieux et sensible, dont le prélèvement est très invasif. Elliot *et al.* [408] ont démontré la possibilité de dépister la méningite en réalisant le test PCR sur du papier buvard imprégné de LCR, dont le transport est plus aisé.

Peu importe le fluide imprégnant le papier filtre, les études qui font état d'une nouvelle utilisation sont généralement ciblées sur quelques métabolites ou xénobiotiques (notamment dans le dopage [165]) d'intérêt et n'utilise qu'une faible partie de l'information métabolique potentielle. Pour ces différentes études, le type de buvard utilisé n'est pas standardisé, les matrices explorées jusqu'à aujourd'hui sont limitées. Par conséquent le prélèvement sur le papier buvard reste un support de prélèvement avec du potentiel avec les différents types de fluides biologiques (urine, salive, larmes ou eaux fécales), à condition que le prélèvement, le support et les méthodologies pré-analytiques soient standardisés et qu'un travail de validation soit entrepris.

Un travail est en cours pour caractériser l'information métabolique et lipidique contenues dans des DLS (Dried Liquid Spot) d'urine, de salive et d'eau fécale par LC-MS. De plus, inspiré par le travail de Cirillo *et al.* [409], différentes méthodes d'extraction des DLS sont en cours d'investigations pour optimiser le profil métabolique par RMN. La **Figure 70** résume l'approche envisagée sur les DLS.

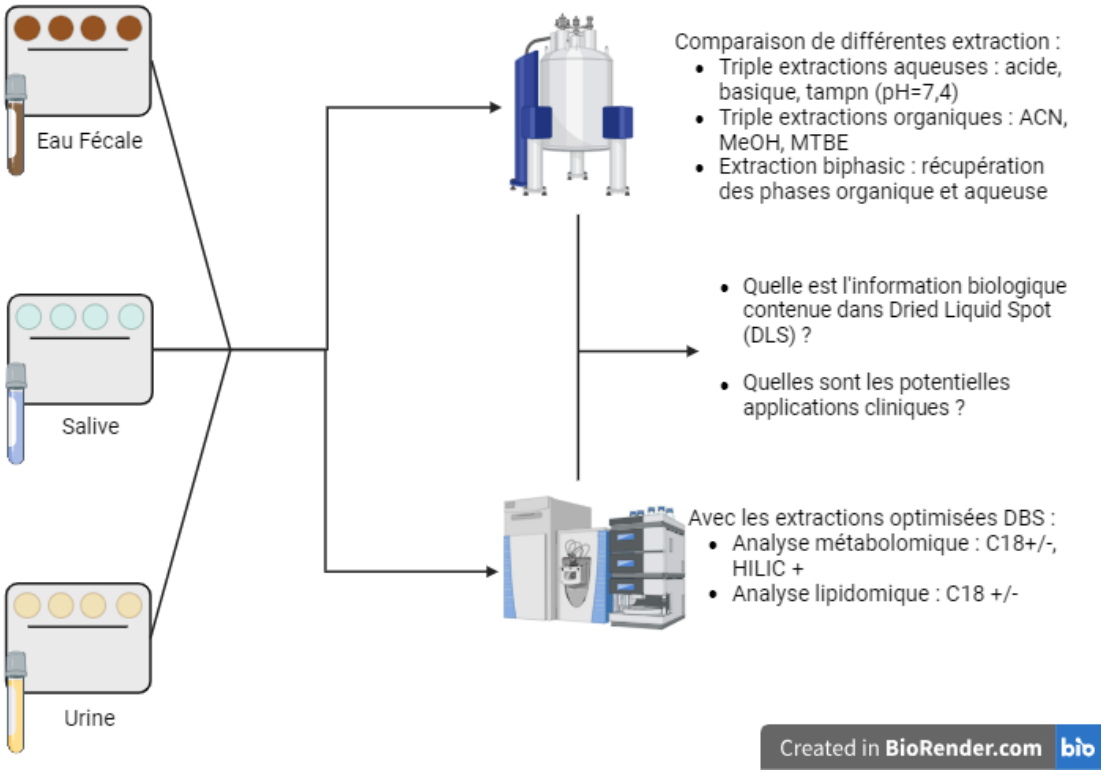


Figure 70 : Schéma simplifié des analyses en cours sur les *Dried Liquid Spot*, où le liquide est de l'urine, de la salive ou de l'eau fécale

PARTIE III :

Quantification de l'information métabolique

Dans un contexte biologique, qui plus est clinique, il est impératif de proposer de l'information quantitative répétable. Être capable de déterminer les intervalles de concentrations de molécules dans le cas d'un patient sain et d'un patient malade est une étape nécessaire pour mettre en place des seuils de détection précoce de maladie. Différentes méthodologies de quantification ont été présentées plus tôt dans ce manuscrit (II.7. Quantification) : la quantification absolue reste l'objectif principal. Dans ce travail, nous avons exploré le potentiel et l'apport de la dérivation pour la quantification du métabolisme à travers une approche ciblée et une approche ciblée large.

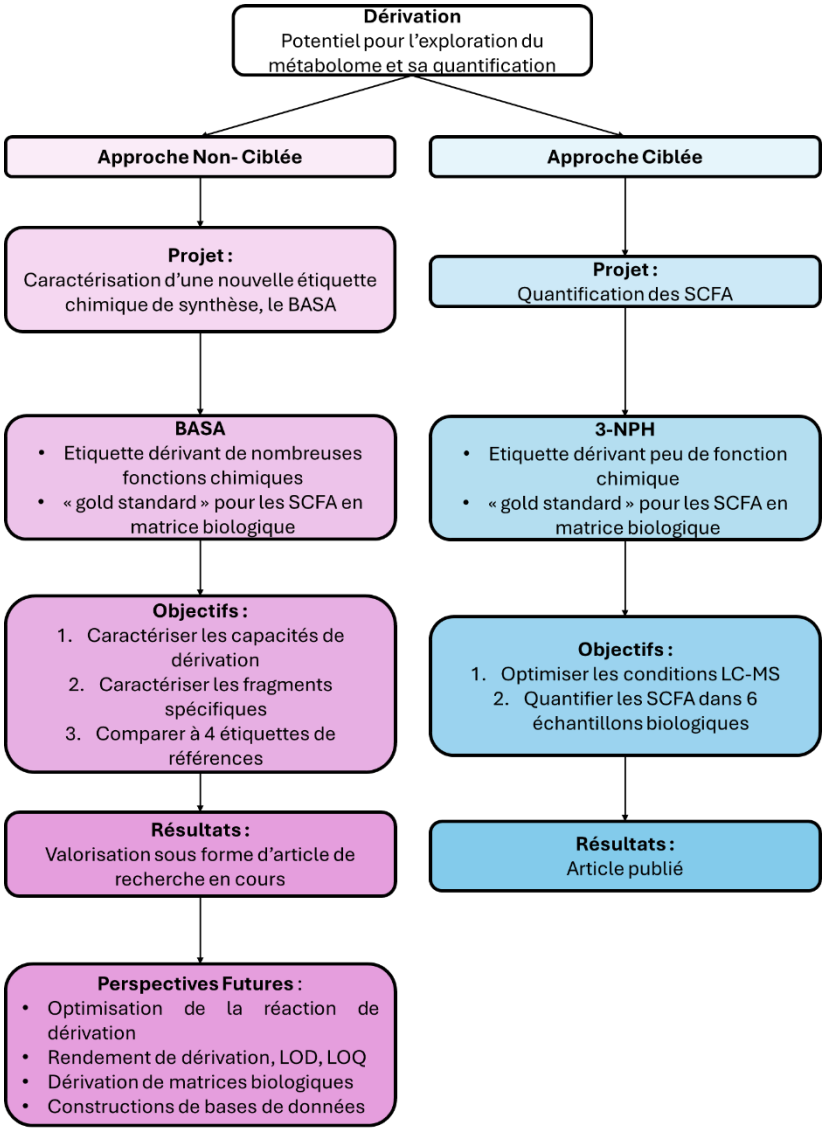


Figure 71 : Schéma de l'utilisation de la dérivation dans deux projets. Le projet BASA pour la dérivation exploratoire et le projet SCFA pour la dérivation ciblée et quantitative

CHAPITRE I : Analyse Ciblée Quantitative des SCFA

II.1. Introduction

La production de données quantitatives est essentielle dans un contexte clinique. Les données quantitatives permettent une mesure objective des indicateurs de santé. Elles facilitent également la détection précoce des tendances dans l'évolution de la maladie, pour prévenir les complications [410,411] et suivre les maladies chroniques [412–414]. Les maladies chroniques, telles que le diabète, l'hypertension et les maladies cardiaques, nécessitent une surveillance continue et précise des paramètres de santé [415,416]. Enfin, les données quantitatives sont cruciales pour la recherche clinique, car elles permettent d'identifier des facteurs de risque et de mettre en évidence des seuils pathologiques.

L'étude des acides gras est un enjeu clinique en raison de leur rôle dans de nombreuses pathologies [417] mais aussi leurs potentiels thérapeutiques [418]. Les acides gras à courte chaîne (SCFA), ayant un squelette carboné composé de 2 à 5 atomes, sont principalement produits par la fermentation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal [419]. Leur implication ou dérégulation des maladies neurodégénératives [372,373,420,421], dans le cancer du côlon [422] ou dans diverses maladies inflammatoires [374,423,424] ,telles que la maladie de Crohn [425,426], en font une cible thérapeutique importante. De plus, des recherches plus récentes suggèrent qu'ils pourraient avoir un rôle dans la régulation de maladies métaboliques comme le diabète de type 2 et l'obésité [427,428]. La compréhension approfondie des mécanismes d'action des SCFA et leur modulation par l'alimentation ou des interventions probiotiques pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Les acides gras à courte chaîne sont des molécules bioactives et ubiquitaires : être capable de fournir des données quantitatives et reproductibles dans les différentes matrices humaines apporterait une visualisation précieuse. Mais plusieurs problématiques freinent cette approche.

Les concentrations en SCFA varient énormément entre les différents types d'échantillons, ce qui requiert de multiplier les gammes d'étalonnage, et la variabilité biologique est élevée car la production des SCFA provient en majorité du système digestif et donc de l'alimentation. Bien que les SCFA soient ubiquitaires, leur étude se concentre sur les échantillons sanguins, urinaires et sur les fèces. La salive et le LCR sont souvent mis de côté,

même dans le cas de pathologie neurodégénérative. De plus, dans la partie précédente nous avons mis en avant le potentiel des DBS dans le contexte clinique, ainsi nous les avons donc inclus dans cette étude.

Dans notre projet nous avons voulu créer une méthode permettant de n'utiliser qu'une seule gamme d'étalonnage par SCFA, pour toutes les matrices et compatible avec des analyses LC-MS à haut débit, grâce à la dérivation au 3-nitrophénylhydrazine (3-NPH). Ce type de méthodologie permet d'étudier rapidement l'ensemble des prélèvements d'un patient, ce qui est parfois nécessaire lorsque un patient présentent des symptômes nouveaux ou que l'absence d'hypothèses claires nécessitent une étude plus spécifique, plus personnelle [429–431] : cela permet d'utiliser la métabolomique à l'échelle individuelle et donc se rapproche de la médecine de précision.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer (1) les conditions MS optimales. La 1ère étape a été de rechercher la transition la plus spécifique et sensible des SCFA dérivés au 3-NPH, puis d'optimiser la fragmentation (*Cone Voltage*, *Energy Collision) (2)* optimiser les paramètres pour pouvoir réaliser des analyses haut-débits tout en évitant la pollution du système et les effets mémoires.

Deux fragments des dérivés de 3-NPH sont connus et réputés spécifiques : 152 *m/z* et 137 *m/z* [378,432,433]. Dans nos conditions de travail, et dans le cas des acides gras, un autre fragment plus spécifique a émergé : l'ion résultant d'une perte de fragment de 43 Da. Pour confirmer ce motif, des acides gras plus longs et portant des ^{13}C ou du deutérium sur des positions clefs ont été étudiés. Ce fragment disparait à des énergies de collision élevées, l'optimisation de l'énergie de collision a donc aboutit à des valeurs entre 10 eV et 20 eV. Le *Cone Voltage* n'avait que peu d'impact.

De nombreux articles proposent différents gradients LC pour l'analyse des acides gras dérivés au 3-NPH. Le début du gradient a été ajusté pour éviter les coélutions entre les isomères de SCFA et, la fin du gradient a été rallongé pour limiter la pollution de l'appareil et empêcher les effets mémoires : trois solutions très concentrées sont utilisées pour la dérivation et l'échantillon injecté contient le surplus de ces solutions de dérivation. Le fait de rallonger le gradient permet de laver/nettoyer le système d'injection entre chaque injection et éviter les effets mémoires.

L'optimisation des conditions LC-MS et l'adaptation des extractions d'échantillons a permis de préparer, pour chaque métabolite, une gamme d'étalonnage étendue couvrant les concentrations « élevées » en SCFA des fèces ou de la salive mais aussi les concentrations « faibles » en SCFA du LCR, tout en gardant une variabilité contenue. La **Figure 72** décrit notre approche pour la description multi-matrices des SCFA quantifiés.

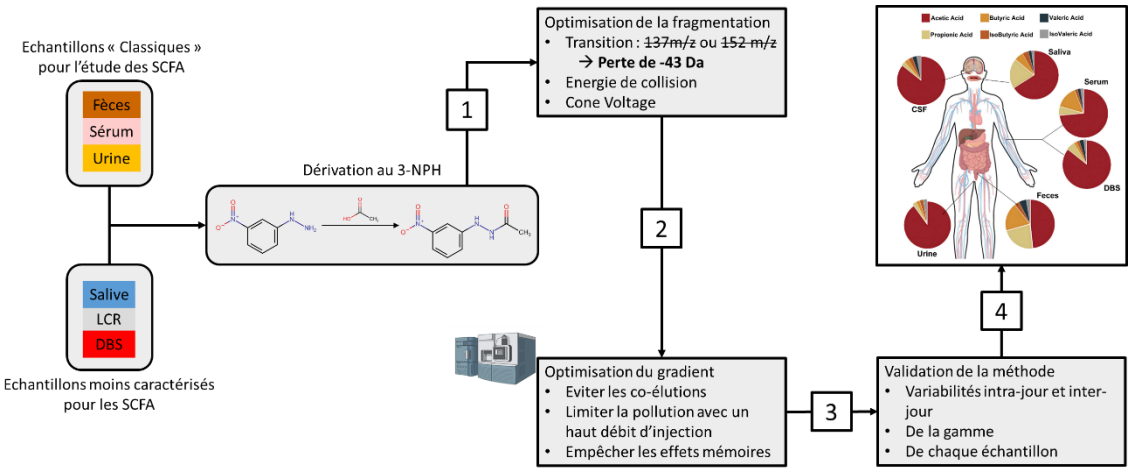


Figure 72 : Graphical Abstract de la quantification multi-matrices des SCFA par dérivation au 3-NPH

Ce travail est publié dans le journal « **American Journal of Analytical Chemistry** », Vol15, No.6, de Juin 2024 et a pour titre « . **Multi-Compartment SCFA Quantification in Human** ».

DOI: 10.4236/ajac.2024.156012

II.2. Publication

Scientific Research Publishing

American Journal of Analytical Chemistry, 2024, 15, 177-200
https://www.scirp.org/journal/ajac
ISSN Online: 2156-8278
ISSN Print: 2156-8251

Multi-Compartment SCFA Quantification in Human

Jérémy Monteiro[1], Antoine Lefèvre[1], Diane Dufour-Rainfray[1,2], Adeline Oury[1], Gabrielle Chicheri[1], Laurent Galineau[1], Hélène Blasco[1,3], Lydie Nadal-Desbarats[1], Patrick Emond[1,2]

[1]Imaging Brain & Neuropsychiatry iBraiN U1253, Université de Tours, INSERM, MetaboHub Tours, Tours, France
[2]CHRU de Tours, Service de Médecine Nucléaire in Vitro, Tours, France
[3]Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHRU, Tours, France
Email: lydie.nadal@univ-tours.fr, Jeremy.monteiro@univ-tours.fr

How to cite this paper: Monteiro, J., Lefèvre, A., Dufour-Rainfray, D., Oury, A., Chicheri, G., Galineau, L., Blasco, H., Nadal-Desbarats, L. and Emond, P. (2024) Multi-Compartment SCFA Quantification in Human. *American Journal of Analytical Chemistry*, **15**, 177-200.
https://doi.org/10.4236/ajac.2024.156012

Received: May 3, 2024
Accepted: June 21, 2024
Published: June 24, 2024

Copyright © 2024 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Open Access

Abstract

Short-chain fatty acids (SCFA) play an important role in human biochemistry. They originate primarily from the digestive system through carbohydrates microbial fermentation. Most SCFA produced in the colon are absorbed by the intestinal wall and enter the bloodstream to be distributed throughout the body for multiple purposes. At the intestinal level, SCFA play a role in controlling fat storage and fatty acid metabolism. The effects of these beneficial compounds therefore concern overall health. They facilitate energy expenditure and are valuable allies in the fight against obesity and diabetes. SCFA are also involved in the regulation of the levels of several neurotransmitters such as GABA (γ-aminobutyric acid), glutamate, serotonin, dopamine, and norepinephrine. Their role is also highlighted in many inflammatory and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) or Parkinson's disease (PD). To have a realistic picture of the distribution of SCFA in different biological compartments of the human body, we propose to study SCFA simultaneously in five human biological samples: feces, saliva, serum, cerebrospinal fluid (CSF), and urine, as well as in Dried Blood Spot (DBS). To evaluate their concentration and repeatability, we used 10 aliquots from pooled samples, analyzed by 3-nitrophenylhydrazine (3-NPH) derivation and liquid chromatography coupled with high sensitivity mass spectrometry (LC-QqQ-MS). We also evaluated the SCFA assay on Dried Blood Spot (DBS). In this work, we adapted the pre-analytical parts for each sample to be able to use a common calibration curve, thus facilitating multi-assay quantification studies and so being less time-consuming. Moreover, we proposed new daughter ions from the same neutral loss (43 Da) to quantify SCFAs, thus improving the sensitivity. In conclusion, our methodology, based on a unique calibration curve for all samples for each SCFA, is well-suited to quantified

them in a clinical context.

Keywords

LC-MS, 3-Nitrophenylhydrazine, Short-Chain Fatty Acids, Human Biological Samples, Quantification

1. Introduction

Increasing evidence that short-chain fatty acids (SCFA) play an important role in the maintenance of the gut and in human biochemistry [1] meaning metabolic health. Short-chain fatty acids are small molecules that originate in the digestive system through microbial fermentation of carbohydrates [2]. Most SCFA produced in the colon are absorbed by the intestinal wall and enter the bloodstream to be distributed throughout the body for multiple purposes. The literature highlights the involvement of SCFA in intestinal permeability, lipid metabolism, insulin sensitivity, and inflammation [3]. SCFA can bind to G-protein-coupled receptor (GPR41/43) in the colon leading to the activation of intestinal gluconeogenesis thus affecting satiety and glucose homeostasis [4] [5] or with cellular receptors to regulate glucose storage, fatty acid oxidation or fuel the tricarboxylic acids (TCA) cycle [6]. In a recent review, You *et al.* [7] discuss first how SCFA regulate intestinal function to improve obesity and the possible pathways related to obesity pathological processes and secondly discuss dietary management strategies to enrich SCFA-producing bacteria and whether fecal bacteria transplantation therapy to restore the composition of the gut to regulate SCFA can help prevent or improve obesity. SCFA are also involved in the regulation of the levels of various neurotransmitters such as GABA (γ-aminobutyric acid), glutamate/glucose or dopamine [8] [9].

Due to their significant involvement in a wide variety of biochemical pathways, the role of SCFA in pathologies has been intensively studied [3] [10], especially in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) or Parkinson's Disease (PD) [2] [11]. Yilmaz *et al.* [12] described a higher propionic acid concentration in saliva of AD patient compared to healthy ones. Wu *et al.* [13] have studied two levels of progression of AD: healthy control, mild amnestic cognitive impairment, and AD patient. They found a decreased concentration of SCFA in the stool, ranging from healthy patients to more affected ones. For PD, the role of the microbiota has also been studied. Although the exact role of SCFA in PD is still unclear Sampson *et al.* [14] have proposed a way of explaining their implications with neurodegenerative diseases. SCFAs may cross the blood brain barrier (BBB) and altered cells in the central nervous system (CNS): Mitchell *et al.* [15], have studied the influx of fatty acids in brain and concluded SCFA cross the BBB because of albumin-binding, intracellular-binding and fatty acids transporters as FATP-1, FATP-4 and FAT/CD36 [15]. The modification of SCFA levels was also described in Autism Spectrum Disorders (ASD) [16] [17],

Colon Cancer [18], Crohn's Disease [19] or cardiovascular diseases [20]. Despite the crucial role of SCFA and their ubiquitous repartition in biological systems, the quantification of SCFA in the different biological compartments is not systematic to describe an individual.

To analyse SCFA, a number of technologies can be used: 1) NMR is a quantitative and robust method but lacks sensitivity for some applications; 2) Capillary electrophoresis requires pretreatment of the sample leading to poor repeatabilities; 3) Enzymatic detection is a very selective technique that able to identify isomers. Unfortunately, the inhibitors naturally present in biological samples can interfere with the enzymatic detection, limiting its possibilities [3] [21].

Through the years, chromatography coupled with mass spectrometry (MS) has become the analysis of reference for the quantification of SCFAs. Gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) are used and both generally involve derivatisation [22]: a preanalytical step to improve the detection of compounds. GC-MS has long been the method of choice because of the low instrument cost and the robustness/sensitivity. For SCFA in GC-MS, the most common derivative agents are based on silylation, esterification, or alkylation [23]. For LC-MS analysis, precolumn derivatization has been promoted because native SCFA have a poor ionisation efficiency and the ion suppressions occurring in biological samples make their analysis tough. Known labels are dimethylamino phenacyl bromide (DmPA-Br) [24] [25] which is used to label carboxyl, thiol and amine functions; Dansyl-Chloride (Dns-Cl) [26] for phenols, hydroxyls, and amines; Girard's reagents for carbonyls [27] and 3-nitrophenylhydrazine (3-NPH) labels carbonyls, phosphoryls and carboxylic acids. 3-NPH, brought to the forefront by Han *et al.* [28], is the reference label for the study of SCFA in biological samples, especially feces, due to the high increase in ionisation efficiency. In addition, 3-NPH is compatible with aqueous solutions facilitating the step of chemical derivation in biological samples thus avoiding a drying step improves the reproducibility of the method. 3-NPH is largely analysed in the negative ionisation mode, producing less background noise compared to the positive mode. Liebisch *et al.* [29] have quantified SCFA from 2 to 4 carbons in feces.

Given the implications of SCFAs in many diseases, several studies have reported quantification of SCFA in one or more biological samples [29] [30] [31] [32] [33]. Lastly, Valdivia-Garcia *et al.* [34] have developed a robust method to quantify SCFA in 5 biological samples (feces, duodenal content, stoma content, urine, and serum) and, more especially, they have used a unique calibration curve for feces, duodenal content and stoma content. This all-in-one calibration curve approach is interesting when investigating SCFA from different biological compartments to describe the impact of SCFA distribution on pathologies.

In this work, we propose absolute quantification of SCFA using to 6 heterogenous human biological samples (feces, saliva, serum, cerebrospinal fluid (CSF), urine and dried blood spot (DBS)) using 3-NPH derivatization and LC-MS quantification using a unique calibration curve with a dynamic range covering all these biological concentrations. Our aim was to facilitate multi-assay

quantification studies to reach a more global view of the SCFA biological distribution. We adapted the preanalytical preparation for each sample and, in order to gain sensitivity, we proposed a new transition with a specific neutral loss of 43 Da to quantify SCFA.

2. Materials & Methods

2.1. Reagents & Solutions

All chemical compounds were purchased from Sigma-Aldrich acetic acid (C2, >99.5%), propionic acid (C3, >99.5%), butyric acid (C4, >99%), isobutyric acid (IC4, >99.5%), valeric acid (C5, >99%), isovaleric acid (IC5, >99%), decanoic acid (>99%), formic acid (FA, AnalaR Normapur grade), 3-nitrophenylhydrazine hydrochloride (3NPH-HCl, >98%), n-(3-dimethylaminopropyl)-n'-ethylcarbodiimide (EDC, >97%) and pyridine (>99.5%). Internal standards were purchased from Toronto Research Chemicals: acetic-$^{13}C_2$-acid, butyric-d_7-acid, valeric-d_9-acid and decanoic-$^{13}C_4$-acid. Solvents such as MeOH (Hipersolv Chromanorm, >99.9%), H_2O LC-MS Grade (Lichrosolv), ACN (HiperSolv Chromanorm, >99.9%) were purchased from VWR.

2.2. Sample Preparation

2.2.1. Ethics

All samples were obtained in accordance with French legislation (Loi Jardé). In French hospitals with a research mission, the use of sample leftovers for research purposes is based on the principle of no opposition. According to Loi Jardé, no requirement of Ethical Committee or Institutional Review Board was required because no new sampling was required. This law also stipulates that patients must be fully informed of this information/practice and patients must have the possibility, at any time, of objecting to the use of their samples in research. The analyses were always performed in accordance with confidentiality rules. Data were coded without mention of first and last names, and the results were produced in a way that does not allow patients to be identified. Patients did not invoke their right to have a right of access, rectification, portability and limitation of the processing of data and/or biological samples.

2.2.2. Feces

Feces samples were freshly collected from 5 healthy volunteers in ethanol and homogenised to quench metabolism and stabilise the metabolome [29]. Then, samples were stored at −80˚C until analysis. For the analyses, samples returned to room temperature during 4 h and then 400 µL were aliquoted twice with a wide bore cone. One is for the quantification process; other one will be dried 10 h at 50˚C under vacuum with a SpeedVac™ (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) to determine the amount of dried matter per aliquot for the normalization process. The repeatability of the sampling of 400 µL aliquots of homogenate aliquots and the drying process to determine the dry matter have been studied. For the derivatization process, the samples were centrifuged (10 min,

20,000 g, 4˚C) and then 50 µL of supernatant was diluted and derivatised.

2.2.3. Saliva

Samples were collected from 10 patients and pooled in tubes adapted to the collection of saliva (Salivette®, SARSTEDT S.A.R.L., Marnay, France) and they were stored at −80˚C under 1 h. For analysis, samples were kept at room temperature for 4 h and then vortexed during 30 s. Then 50 µL of the sample was extracted with 450 µL of cold MeOH. After 30 s of vortex, and 10 min of rest, the sample was centrifuged (20,000 g, 10 min, 4˚C). 50 µL of supernatant was diluted 5 times and then derived.

2.2.4. Serum

Blood samples were collected from 10 patients by venipuncture in dry tubes. They were centrifuged at 2000 g for 10 min, and then the serum was collected, aliquoted in 100 µL fractions and frozen at −80˚C until analysis. Samples were excluded if there was hemolysis, jaundice, or lipemia. 50 µL of pooled serum samples were extracted with 150 µL of cold methanol. After shaking for 30 s, they are left to stand for 10 min and then centrifuged (20,000 g, 10 min, 4˚C). 50 µL of supernatants were derived.

2.2.5. Dried Blood Spot (DBS)

Capillary blood was spotted on filter papers PerkinElmer 226® (PerkinElmer, Greenville, USA). After collection, the samples were allowed to dry at room temperature, protected from light, for 3 h. The DBSs were aliquoted into calibrated punches (3.0 mm disc) containing 3 µL of blood (2020 Annual Summary Report of the Quality Assurance Program) in a 1.5 mL Eppendorf tube and stored at room temperature, without light exposure. To avoid any significant change in metabolomic composition, DBS were analyzed within a month as previously recommended [35]. Punches were extracted with 120 µL of cold methanol and extracted during 20 min of planar agitation. 50 µL of supernatant was derived.

2.2.6. Urine

Urine samples were freshly collected from 10 patients and centrifuged at 2000 g for 10 min. Before any further step, creatinine concentrations were measured by the enzyme method (Cobas®, Roche Diagnostics). The urine samples were then aliquoted and stored at −80˚C. For analysis, 100 µL of cold MeOH/pyridine (4:1 v:v) were added to 100 µL of urine samples. After shaking for 30 s and before centrifugation (20,000 g, 10 min, 4˚C), a 10 min rest time was applied. Then 50 µL of supernatants were derived.

2.2.7. Cerebrospinal Fluid (CSF)

CSF samples were collected from 20 patients in polypropylene tubes (SARSTEDT SARL, Marnay, France) and centrifuged at 4000 g for 10 min at 4˚C. The supernatants were aliquoted into polypropylene tubes (Sorenson Bioscience, Bernolsheim, France) and frozen at −80˚C. For analysis, 100 µL of sample was extracted with 100 µL of cold MeOH. After shaking for 30 s, they were left to stand

for 10 min and then centrifuged (20,000 g, 10 min, 4˚C). 50 µL of supernatants were derived.

2.3. LC-MS Analysis

LC-MS instruments are described below. Further information concerning electrospray ionisation (ESI) parameters, LC-MS characteristics of each SCFA, and the calibration curve is available in supplementary data (**Tables S1-S4**).

2.3.1. Derivatization

For 50 µL of sample (or for calibration curve points), 50 µL of an aqueous internal standard mixture containing acetic-$^{13}C_2$-acid (for acetic acid and propionic acid), butanoic-d_7-acid (for butyric acid and isobutyric acid) and valeric-d_9-acid (for valeric acid and isovaleric acid), all at the concentration is 1 nM, were added to samples. Then, 50 µL of a 2.5% pyridine solution in methanol, 50 µL of EDC solution (n-(3-dimethylaminopropyl)-n'-ethylcarbodiimide) in methanol at 105 mM and 50 µL of an aqueous/methanol solution (1:1) of 3-NPH (3-nitrophenylhydrazine) at 175 mM were added. The derivatization solution acted for 1 h at 4˚C. The reaction was quenched by adding 250 µL of acidified water (1% formic acid). The derivatization reaction is described in detail and a mechanism is proposed (**Figure S1**). The stability of 3-NPH-SCFA derivatives, in aqueous solution or in biological sample has been previously established [36] [37] [38] [39] and therefore not investigated here.

2.3.2. Chromatography

Chromatography was carried out on a Waters Acquity I-Class UPLC Class with a column Phenomenex Kinetex 1.7 µm XB – C18 (150 mm × 2.10 mm) and kept at 55˚C (Waters, Guyancourt, France). The solvent system is composed of mobile phase A [0.1% formic acid in water] and of a mobile phase B [0.1% formic acid in acetonitrile]. Chromatographic separation started with a flow rate of 0.6 mL/min at 85 %A, until 2 min. Then %A decreased to 80%, then to 75% at 4 min. At 6 min %A is down to 60%, 50% at 8 min and then 15% at 9 min. From 9.5 to 12.4 min, %A is 0% and then from 12.5 to 14.5 min a loop on the starting condition. The injection volume was 5 µL. Carryover has been evaluated by comparing theoretical and experimental concentrations of a low-level solution, from the calibration curve, after the injection of the highest level from calibration curve (**Table S1**).

2.3.3. Mass Spectrometry

Analyses were performed on a triple-quadrupole Xevo TQ-XS mass spectrometer (Waters, Guyancourt, France), operated in MRM mode with negative electrospray ionisation modes (Zspray; ESI -). Experimental masses of parent ions and daughter ions of every standard, injected alone, were investigated through a high-resolution spectrometer before the optimization of the MRM parameters on the triple quadrupole (QqQ) for the quantification methods. To validate the fragmentation patterns specific to 3-NPH-derived fatty acids, decanoic acid and

decanoic-$^{13}C_4$-acid were also fragmented. Specific daughter ions, which can be used for quantification, were then fragmented at 5, 10, 20, 30, 40 and 50 eV to determine the optimal range of fragmentation energy. Then each ion was fragmented every 2 eV in its optimum range to determine the fragment and collision energy that give the best S/N ratio. ESI parameters are available in the supplementary data (**Table S4**).

2.3.4. Data Processing

The acquired data were processed using the MassLynx TargetLynx module (Waters, Guyancourt, France). Quantification was evaluated by plotting the peak area ratio of each SCFA to the corresponding internal standard.

3. Results & Discussion

3.1. New Fragmentation Patterns

All compounds derived with 3-NPH have common fragments: 137 m/z and 152 m/z. The investigation for these specific fragments, to enable quantification, was performed in high resolution on a UPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Germany) coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Chromatographic conditions were the same as described above. Once the fragmentation candidates had been found using the high-resolution apparatus (Q-Exactive, Q-Orbitrap), the fragmentation conditions were optimised on the high-sensitivity apparatus that will be used for quantification (XEVO TQ-XS, triple quadripole). The previously mentioned fragments are generally those used for LC-MS quantification. However, upon successive injection of the compounds in high resolution, another fragmentation pattern has emerged: Loss of 43 Da relative to the mass of the parent ion (**Figure 1**).

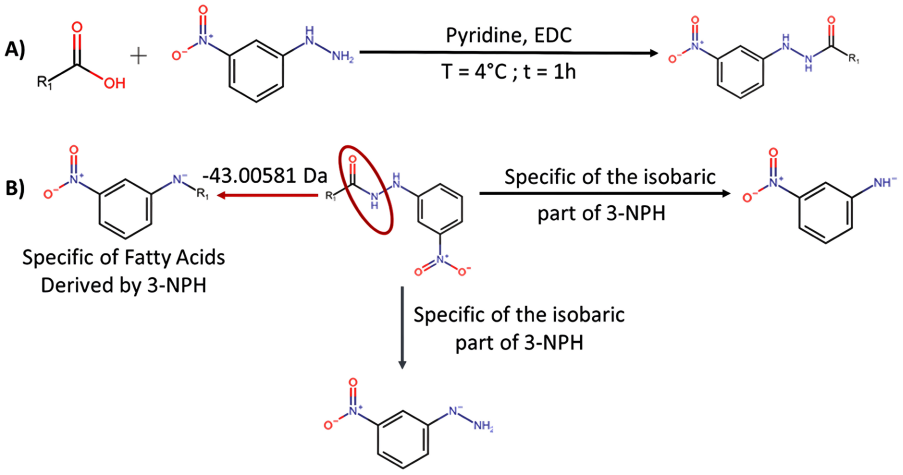


Figure 1. (A) Reaction of 3-NPH derivatization & (B) Main fragments of a fatty acid derivatized with 3-NPH.

The fragment resulting of this loss could also be observed on medium chain fatty acids. The loss formula has been verified using several ^{13}C linear fatty acids

where the carbon that carries the acid function is a ^{13}C, such as decanoic acid and decanoic-$^{13}C_4$-acid (Figure 2), validating the specificity of this fragment in fatty acids. This fragment is the one giving the best S/N ratio and peak intensity so the highest specificity is illustrated with valeric acid in Table 1.

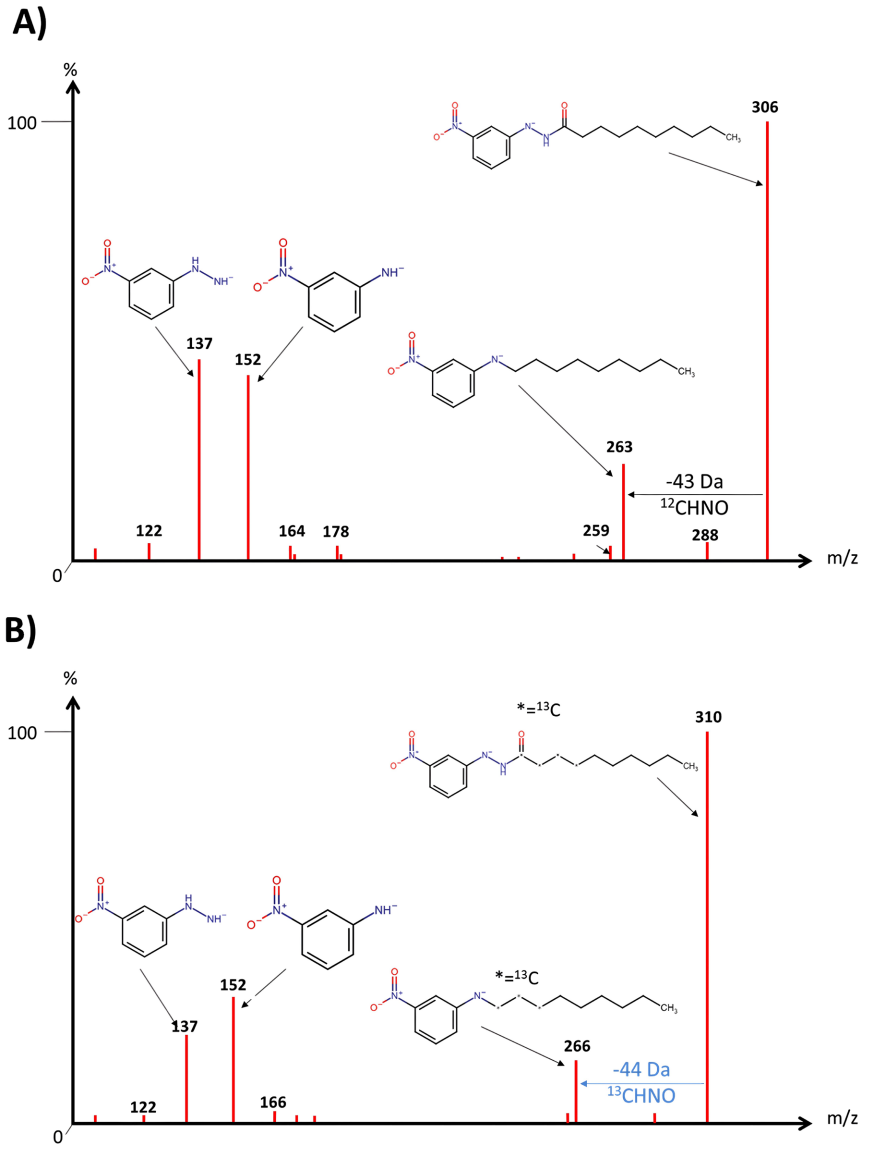


Figure 2. Fragmentation pattern study on low sensibility Xevo TQ-XS (A) decanoic acid (B) decanoic-$^{13}C_4$-acid.

Table 1. Comparison of the 3 main fragments of derived valeric acid at the concentration of 46,500 nM in aqueous solution.

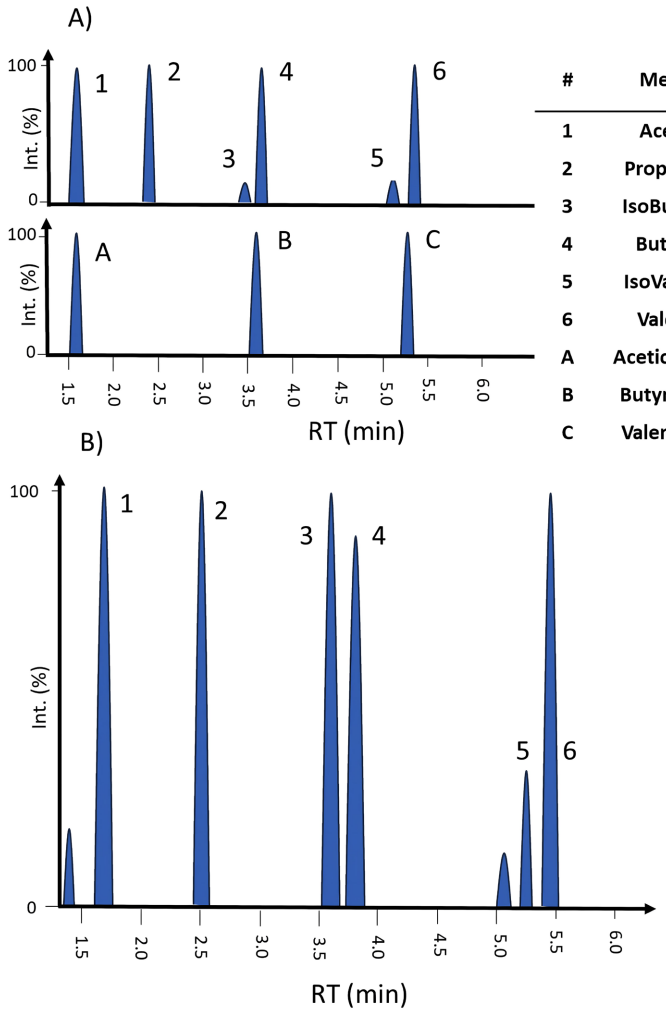
Fragment	CE optimum (eV)	S/N	Intensity (u.a.)
137 m/z	14	1920	3.61×10^8
152 m/z	14	10,835	5.34×10^7
193 m/z*	14	15,071	1.99×10^8

*: Loss of 43 Da.

The ion produced by the loss of 43 Da was therefore chosen as the daughter ion, except for the case of acetic acid, where the small size of the carbon chain should prevent rearrangement. The S/N ratio has been calculated with MassLynx after smoothing of the chromatogram (Window Size Scan = 2/Number of Smooth = 2). The noise region was 2 min long, after the peak of interest, and the method of calculation was the mean noise. This gain in specificity will make it possible to quantify SCFAs in matrices where they are poorly concentrated and, therefore, would have been lower than the limit of quantification (LOQ) with another specific fragment.

3.2. Quantitative Data for 5 Human Biological Samples and DBS

Chromatographic peaks of 3-NPH-derived SCFA elute between 1 min and 7 min. There is no acquisition before 1 min because the excess of derivatization reagents elutes in this interval and will cause heavy pollution of the apparatus. Typical standard solution chromatograms and some typical matrix chromatograms are available in Figure 3.



#	Metabolite	RT (min)
1	Acetic Acid	1.59
2	Propionic Acid	2.87
3	IsoButyric Acid	3.44
4	Butyric Acid	3.63
5	IsoValeric Acid	5.08
6	Valeric Acid	5.33
A	Acetic-13C2-Acid	1.59
B	Butyric-d7-Acid	3.60
C	Valeric-d9-Acid	5.28

Figure 3. Example of chromatograms (A) calibration curve (B) DBS.

The quantitative data are summarized in Table 2. The intra-day repeatability and the inter-day repeatability have been evaluated with 10 aliquots of distinct pooled samples, prepared and analyzed independently. The first one (n_1) was used for intra-day analysis and the second one (n_2) for inter-day analysis. The inter-day injections were carried out within 1 month.

Table 2. Intra-day ($n_1 = 10$) and inter-day ($n_2 = 10$) repeatabilities of SCFAs quantification in 6 biological samples, from 2 different pools.

		Feces		Saliva		Serum		DBS		CSF		Urine	
Metabolite	Variability	Mean (nM/mg of dry matter)	CV (%)	Mean (µM)	CV (%)	Mean (nM)	CV (%)	Mean (nM)	CV (%)	Mean (nM)	CV (%)	Mean (nmol/mmol of creatinine)	CV (%)
Acetate	Intra-Day	59.35	5.66	14,357	4.71	57,349	7.65	128,742	7.42	24,414	4.48	3459	7.75
	Inter-Day	71.3	7.71	14,323	10.26	64,280	7.48	148,383	7.79	24,467	7.89	3416	4.39
Propionate	Intra-Day	28.42	7.09	3851	5.06	4804	6.62	4285	7.82	232	7.81	59.9	10.32
	Inter-Day	35.74	8.13	3915	11.14	5174	15.48	4709	7.52	208	12.03	44.4	17.98
Butyrate	Intra-Day	23.5	6.43	332	4.22	12,971	7.26	1235	8.73	<LOQ	N/A	59.6	5.35
	Inter-Day	28.32	8.4	365	7.95	14,477	8.69	1349	11.08	<LOQ	N/A	42.3	20.44
Isobutyrate	Intra-Day	4.08	7.37	81	4.07	921	8.58	626	8.30	278	7.40	18.7	13.11
	Inter-Day	5.13	9.22	85	7.76	1035	13.72	689	12.21	299	8.91	16.2	14.51
Valerate	Intra-Day	6.08	6.91	3.1	8.06	433	9.70	2243	8.36	<LOQ	N/A	<LOD	N/A
	Inter-Day	7.05	8.07	2.8	12.86	452	8.85	2621	7.50	<LOQ	N/A	<LOD	N/A
Isovalerate	Intra-Day	3.34	6.66	78	5.90	309	15.53	360	12.29	96.7	16.25*	15.2	15.59
	Inter-Day	3.82	8.92	77	5.97	374	14.44	419	12.44	101.1	21.15*	17.6	11.95

LOQ: Concentration where S/N was ≥10; LOD: Concentration where S/N was ≥3; *: above the LOQ but below the dynamic range of concentration.

3.2.1. Feces

In feces, we can notice that as the chain length increases, the concentration decreases. In literature, most of the studies normalized the concentrations of each metabolite in feces to the wet matter. Han *et al.* [28] quantified SCFA with isotope-coded derivatization with $^{13}C_6$-3-NPH on 6 patients. The concentration ranges for acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid and isovaleric acid normalized to the wet matter were respectively 23.2 - 58.3, 5.0 - 14.4, 4.4 - 11.9, 0.08 - 2.26, 0.19 - 2.94 and 0.05 - 3.23 nmol/mg wet matter. As we normalized the concentration to the dried matter, we cannot compare our results with those of Han *et al.* Indeed, the percentage of humidity was not measured, thus impeding the conversion. Liebisch *et al.* [29] quantified acetic acid, propionic acid and butyric acid in feces with a dried weight normalization, on 22 healthy volunteers. Respectively, the concentration ranges are 102 - 1210, 19 - 340 and 18 - 370 nmol/mg_{DW}. Except for the concentration of acetic acid, our results are in the same range as Liebisch's.

Homogenising the samples in ethanol has the effect of stabilising the sample. Without ethanol quenching, at the time of collection, patient samples need to be at the laboratory within 4 h before storage at −80˚C. During the time between collection and storage, metabolism is still running, affecting the dosage of metabolites. Moreover, the stools samples are not homogeneous and the sampling could be impactful. So, with the aim of avoiding these known drawbacks, we develop these preanalytical steps in EtOH. Our method is inspired by the colorectal cancer screening kit that uses organic solvent [40] [41]. The ethanol stops the enzymatic reactions and stabilises the sample. In return, we cannot normalize our data with the quantity of wet matter as in many papers or with the data provided by HMDB [42]. However, the coefficients of variation are contained, for both intra-day and inter-day repeatabilities. This EtOH sample collection leads to lower variability and longer-term storage that are more suitable for assays.

3.2.2. Saliva

The quantification of SCFA in saliva by 3-NPH derivatization-LC-MS is uncommon. Nagatomo *et al.* [43] quantified 12 SCFA in saliva of healthy mouse and Sjögren syndrome (SS) mouse by LC-MS with derivatization of 2-picolylamine. SCFA concentrations are clearly higher in SS mouse. However, concentrations of SCFA in mouse saliva are different from human values. Methods for quantification of metabolites in human saliva are more frequently GC-MS based.

Kawase *et al.* [44] quantified SCFA by GC-MS in saliva from 5 patients (men & women) who suffered from various periodontal diseases with a method validated according to the Food & Drug Administration criteria. In periodontal disease, the concentration of SCFA could be higher because of the gingival pathogens [45] [46]. The concentrations are between 1812 - 4117 µM for acetic acid, 185 - 836 µM for propionic acid, 12 - 162 µM for butyric acid, 3 - 50 µM for isobutyric acid, 3 - 21 µM for valeric acid and 2 - 26 µM for isovaleric acid. Acetic acid, propionic acid, butyric acid and isovaleric acid are less concentrated than in our samples. One of the explanations could be the time of sampling. Indeed, we looked at the SCFA concentration during a full circadian cycle and we noted the concentration was much higher at waking time or in early morning than during the rest of the day (data not shown). Therefore, we conclude that sampling time is really impactful in saliva-based studies.

The quantification of SCFA in saliva remains infrequent but can bring information on the oral microbiota, especially with the ability of our method to quantify compounds at low concentrations. For example, Szczeklik *et al.* [47] have highlighted differences in SCFA concentration between people with gastro-oesophageal reflux disease. Ho *et al.* [48] have highlighted the decreasing levels of SCFA in people with peanut allergy. Our method is appropriate for such a use.

3.2.3. Serum

Valdivia-Garcia *et al.* [34] quantified propionate and isovalerate in serum at 170

nM and 570 nM. Two points are important: the difference in propionic acid concentration and the fact that they have not detected acetate, butyrate, isobutyrate, and valerate in a pooled mixture purchased from Sigma-Aldrich. Many articles use fragments 137 m/z and 152 m/z as daughter ions because they are specific for 3-NPH labelling [49]. Our analysis has highlighted the loss of 43 Da of the derived SCFA, which gave a highly specific fragment with better S/N ratios. This may explain the discrepancy between their results and ours for propionate. Dei Cas *et al.* [50] quantified some SCFA and MCFA (Medium Chain Fatty Acids) in 54 serum from healthy patients also with 137 m/z fragment. The biological concentration determined are: 7831 - 13,415 nM for butyrate, 5606 - 10,260 nM for isobutyrate, 470 - 764 nM for valerate and 6511 - 16,106 nM for isovalerate. Butyrate and valerate correspond to the concentrations found here, whereas other SCFA are more concentrated by a factor of 10. This may be explained by the high heterogeneity of the 54 patients, which has been highlighted by Dei Cas *et al.* [50].

3.2.4. Dried Blood Spot (DBS)

Although to our knowledge, there is no literature on SCFA assays on DBS, targeted analysis has been developed on other compounds such as MCFA [51] or carnitines [49]. For their part, Ingels *et al.* [52] have developed the specific quantification of hydroxybutyric acid using spot derivatization by GC-MS analysis.

There is growing interest in DBS for several reasons: less invasive than blood sampling, participative medicine is increasing either for pathology follow-up or for the diagnosis of older people. DBS are easily storable and stable over time. Several studies have explored the potential and the qualities of DBS for the early detection of pathologies. For example, Barone *et al.* [53] have studied acylcarnitine modifications in children with ASD. Wang *et al.* [54] have worked on breast cancer detection and Zytkovicz *et al.* [55] on metabolic disorders in newborns. Although DBS are already used for the early detection of pathologies as a newborn screening, the long-term stability of SCFA in DBS should be evaluated in future studies. However, our method enables the quantification of SCFA in DBS and may be used to explore a potential dysfunction of this metabolism in a wide range of pathologies.

3.2.5. Cerebrospinal Fluid (CSF)

Wishart *et al.* [56] have characterized the CSF metabolome using NMR, GC-MS & LC-MS, creating the CSF Metabolome, currently integrated and completed in HMDB. The concentration ranges given are 31 - 171 µM for acetic acid, 0 - 6 µM for propionic acid, 0 - 2.8 µM for butyric acid, 0 - 3.6 µM for isobutyric acid and 0 - 2.7 µM for isovaleric acid. Our results fit these data however the CV of isovaleric acid is slightly higher than 20%. This variability can be explained by the fact that the raw data obtained was below the dynamic range but above the LOQ. Moreover, in biological studies, and more particularly in the study of a disease, the aim is to be able to diagnose it among a cohort of healthy and pathological

patients. In the case of neurodegenerative diseases, abnormal SCFA production can be detected by the digestive system [57] [58]. Given the close connection between the CSF and the BBB (and more generally the CSF and the brain), it would be interesting to study SCFA in the CSF in the case of neurodegenerative diseases or intestinal disorders [59] [60]. They are rarely quantified in CSF even for neurodegenerative disease because urine, serum and feces are actually the matrices of choice for their availability. However, the CSF investigation may better reflect the "metabolic state" of the brain in diseases.

3.2.6. Urine

In urine, valeric acid concentrations is not detected and this result seems to be in agreement with the data available on HMDB [42] for adults. Valdivia-Garcia *et al.* [34] have produced data for 4 groups: Crohn's disease, Pouchitis, Ulcerative Colitis, and control groups. On the control group, acetate, propionate and isobutyrate have not been detected. This result is not that surprising. In fact, urine is known to be a highly variable matrix. In our results, except for acetic acid, others SCFA concentrations are weakly concentrated, which can explain the higher CVs. However, this variability must still be low enough to differentiate pathological patients; for example, patients with acidosis are likely to have different concentrations of SCFA than healthy ones [61]. In animals, acidosis is strongly correlated with SCFA levels [62] [63]. Hanstock *et al.* [62] have studied the link between acid accumulation in the hindgut of rats following the fermentation of commonly consumed carbohydrate sources on behavioural parameters indicating anxiety and aggression. As a result, they have predicted that acid accumulation in the hindgut of rats can cause behavioural problems.

3.2.7. Global

Analysing multiple biological matrices and quantifying metabolites can be difficult due to the variations of the large variations of the matrix from sample to sample and the highly variable background concentrations that have been checked in the Human Metabolome Database (**Table S5**). We have adapted the method of Valdivia-Garcia *et al.* [34] to match the diversity of our biological samples. The calibration curve was extended to take into account the SCFA concentrations in the matrices studied. To have a single curve, the preanalytical steps have been adapted. In particular, the dilutions used during the extraction step. The specific usual fragments recognised as coming from a compound derived from 3-NPH are 137 m/z and 152 m/z. As our study focused on a restricted family of compounds, we were able to highlight a new fragment that resulted from the loss of 43 Da from parent ion. The high specificity of this fragment makes it more sensitive. Using the fragment that lost 43 Da results in better LOQs. Combined with our dilutions, this fragment makes it possible to combine highly concentrated and low-concentration matrices within the same calibration curve with minimal matrix effect. The matrix effect in 3-NPH-derived biological samples has been intensively studied. For Liebisch *et al.* [29], the matrix effects of SCFA in feces ranged from 3% to 6.5%. In the Valdivia-Garcia study [34] on

urine, feces, and serum, the highest matrix effect was found for isovalerate, especially in urine, but it is otherwise less than 15% in absolute value.

We provide reference values for saliva, CSF, and DBS. There is a marked lack of data for these samples, whereas they present some advantages. DBS is an alternative to serum tests. This type of sampling provides access to a population with limited access to healthcare while allowing monitoring. The oral microbiota is rich and studying the evolution of SCFA in saliva according to the time of day could provide information on the circadian rhythm. CSF is a rare matrix and is not one of the usual samples. However, SCFAs are ubiquitous in all living compartments. Studying the CSF could give us access to information from the brain, under the guise of understanding these exchanges. This "one calibration curve for all" method along with the neutral loss of 43 Da means that studies investigating the role of SCFA are no longer restricted to specific matrices and can be proposed as a "multi-compartment" description to evaluate the global biological dysregulation or diversity of SCFA (Figure 4).

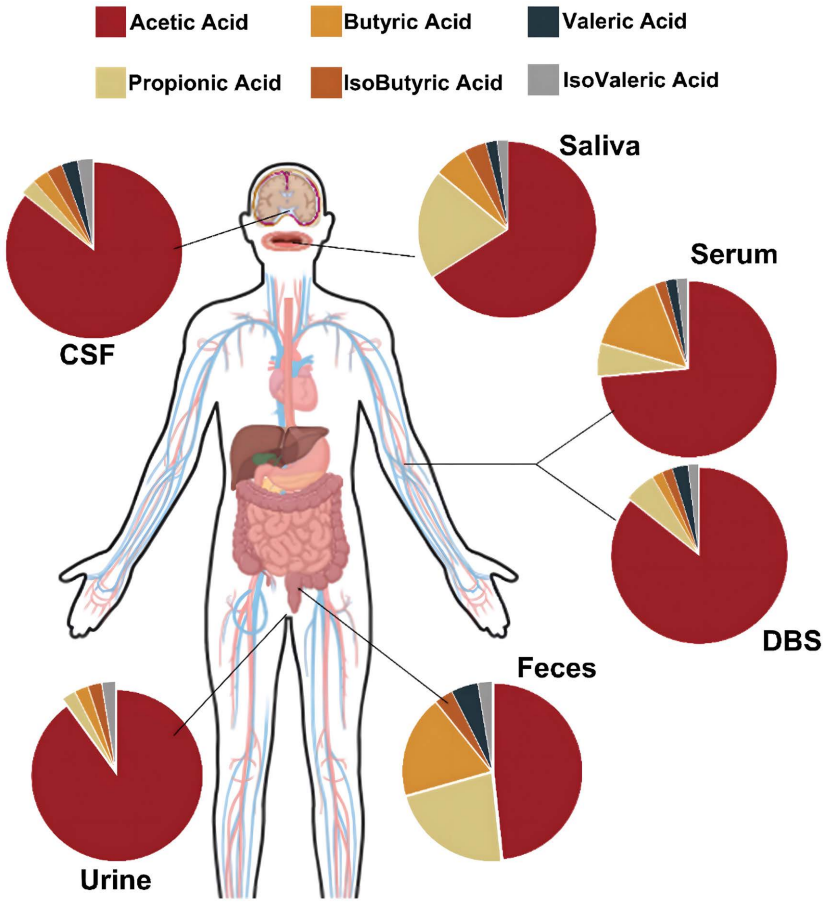


Figure 4. Pie charts illustrating the proportion of each SCFA by biological samples and DBS.

4. Conclusion

SCFAs have been extensively and intensively studied by 3-nitrophenylhydrazine

derivatization-LC-MS² because of their implication in metabolism and diseases. In our study, we present a quantification method with specific preanalytic steps for 6 samples (CSF, feces, saliva, serum, urine, and DBS) using the same derivatization process, a single calibration curve, and a highly specific fragment for derived SCFA. This method makes it possible to include new types of samples in future clinical studies of SCFA. Moreover, the results were obtained according to the same procedure allowing the direct comparison of metabolite balances between biological compartments. This work also proposes new SCFA concentration ranges for CSF and DBS. Future work is planned on the multicompartment quantification of SCFA in different diseases.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

J. Monteiro was the recipient of a Ph.D. fellowship from the Université of Tours. This work was supported by the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" INSERM and the University of Tours. The authors thank the Department of "Analyse des Systèmes Biologiques" (PST ASB, Université de Tours, France) for their help with sample analyses.

References

[1] Morrison, D.J. and Preston, T. (2016) Formation of Short Chain Fatty Acids by the Gut Microbiota and Their Impact on Human Metabolism. *Gut Microbes*, **7**, 189-200. https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082

[2] Silva, Y.P., Bernardi, A. and Frozza, R.L. (2020) The Role of Short-Chain Fatty Acids from Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, **11**, Article 25. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025

[3] Primec, M., Mičetić-Turk, D. and Langerholc, T. (2017) Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Human Feces: A Scoping Review. *Analytical Biochemistry*, **526**, 9-21. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.03.007

[4] Blaak, E.E., Canfora, E.E., Theis, S., Frost, G., Groen, A.K., Mithieux, G., *et al.* (2020) Short Chain Fatty Acids in Human Gut and Metabolic Health. *Beneficial Microbes*, **11**, 411-455. https://doi.org/10.3920/bm2020.0057

[5] Armstrong, C.W., McGregor, N.R., Lewis, D.P., Butt, H.L. and Gooley, P.R. (2016) The Association of Fecal Microbiota and Fecal, Blood Serum and Urine Metabolites in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Metabolomics*, **13**, Article No. 8. https://doi.org/10.1007/s11306-016-1145-z

[6] den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D. and Bakker, B.M. (2013) The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism. *Journal of Lipid Research*, **54**, 2325-2340. https://doi.org/10.1194/jlr.r036012

[7] You, H., Tan, Y., Yu, D., Qiu, S., Bai, Y., He, J., *et al.* (2022) The Therapeutic Effect

of SCFA-Mediated Regulation of the Intestinal Environment on Obesity. *Frontiers in Nutrition*, **9**, Article 886902. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.886902

[8] Wang, G., Yu, Y., Wang, Y., Wang, J., Guan, R., Sun, Y., *et al.* (2019) Role of SCFAS in Gut Microbiome and Glycolysis for Colorectal Cancer Therapy. *Journal of Cellular Physiology*, **234**, 17023-17049. https://doi.org/10.1002/jcp.28436

[9] Shuwen, H., Miao, D., Quan, Q., Wei, W., Zhongshan, Z., Chun, Z., *et al.* (2019) Protective Effect of the "Food-Microorganism-SCFAS" Axis on Colorectal Cancer: From Basic Research to Practical Application. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **145**, 2169-2197. https://doi.org/10.1007/s00432-019-02997-x

[10] Roy, C.C., Kien, C.L., Bouthillier, L. and Levy, E. (2006) Short-Chain Fatty Acids: Ready for Prime Time? *Nutrition in Clinical Practice*, **21**, 351-366. https://doi.org/10.1177/0115426506021004351

[11] Qian, X., Xie, R., Liu, X., Chen, S. and Tang, H. (2022) Mechanisms of Short-Chain Fatty Acids Derived from Gut Microbiota in Alzheimer's Disease. *Aging and Disease*, **13**, 1252-1266. https://doi.org/10.14336/ad.2021.1215

[12] Yilmaz, A., Geddes, T., Han, B., Bahado-Singh, R.O., Wilson, G.D., Imam, K., *et al.* (2017) Diagnostic Biomarkers of Alzheimer's Disease as Identified in Saliva Using ^{1}H NMR-Based Metabolomics. *Journal of Alzheimer's Disease*, **58**, 355-359. https://doi.org/10.3233/jad-161226

[13] Wu, L., Han, Y., Zheng, Z., Peng, G., Liu, P., Yue, S., *et al.* (2021) Altered Gut Microbial Metabolites in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Signals in Host-Microbe Interplay. *Nutrients*, **13**, Article 228. https://doi.org/10.3390/nu13010228

[14] Sampson, T.R., Debelius, J.W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G.G., Ilhan, Z.E., *et al.* (2016) Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, **167**, 1469-1480.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018

[15] Mitchell, R.W., On, N.H., Del Bigio, M.R., Miller, D.W. and Hatch, G.M. (2011) Fatty Acid Transport Protein Expression in Human Brain and Potential Role in Fatty Acid Transport across Human Brain Microvessel Endothelial Cells. *Journal of Neurochemistry*, **117**, 735-746. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07245.x

[16] Yu, Y. and Zhao, F. (2021) Microbiota-Gut-Brain Axis in Autism Spectrum Disorder. *Journal of Genetics and Genomics*, **48**, 755-762. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.07.001

[17] Srikantha, P. and Mohajeri, M.H. (2019) The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article 2115. https://doi.org/10.3390/ijms20092115

[18] Carretta, M.D., Quiroga, J., López, R., Hidalgo, M.A. and Burgos, R.A. (2021) Participation of Short-Chain Fatty Acids and Their Receptors in Gut Inflammation and Colon Cancer. *Frontiers in Physiology*, **12**, Article 662739. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.662739

[19] Piotrowska, M., Binienda, A. and Fichna, J. (2021) The Role of Fatty Acids in Crohn's Disease Pathophysiology—An Overview. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **538**, Article 111448. https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111448

[20] Chen, X., Chen, X. and Tang, X. (2020) Short-Chain Fatty Acid, Acylation and Cardiovascular Diseases. *Clinical Science*, **134**, 657-676. https://doi.org/10.1042/cs20200128

[21] Furuhashi, T., Sugitate, K., Nakai, T., Jikumaru, Y. and Ishihara, G. (2018) Rapid

Profiling Method for Mammalian Feces Short Chain Fatty Acids by GC-MS. *Analytical Biochemistry*, **543**, 51-54. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.001

[22] El-Maghrabey, M.H., Kishikawa, N. and Kuroda, N. (2020) Current Trends in Isotope-Coded Derivatization Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric Analyses with Special Emphasis on Their Biomedical Application. *Biomedical Chromatography*, **34**, e4756. https://doi.org/10.1002/bmc.4756

[23] Zhang, S., Wang, H. and Zhu, M. (2019) A Sensitive GC/MS Detection Method for Analyzing Microbial Metabolites Short Chain Fatty Acids in Fecal and Serum Samples. *Talanta*, **196**, 249-254. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.049

[24] Willacey, C.C.W., Naaktgeboren, M., Lucumi Moreno, E., Wegrzyn, A.B., van der Es, D., Karu, N., *et al.* (2019) LC-MS/MS Analysis of the Central Energy and Carbon Metabolites in Biological Samples Following Derivatization by Dimethylaminophenacyl Bromide. *Journal of Chromatography A*, **1608**, Article 460413. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460413

[25] Willacey, C.C.W., Karu, N., Harms, A.C. and Hankemeier, T. (2020) Metabolic Profiling of Material-Limited Cell Samples by Dimethylaminophenacyl Bromide Derivatization with UPLC-MS/MS Analysis. *Microchemical Journal*, **159**, Article 105445. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105445

[26] Hsieh, Y., Chien, K., Chang, C., Hung, C., Li, L., Chiang, W., *et al.* (2022) Development of a Method for Dansylation of Metabolites Using Organic Solvent-Compatible Buffer Systems for Amine/Phenol Submetabolome Analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1189**, Article 339218. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339218

[27] Zhang, Y., Wang, B., Jin, W., Wen, Y., Nan, L., Yang, M., *et al.* (2019) Sensitive and Robust MALDI-TOF-MS Glycomics Analysis Enabled by Girard's Reagent T On-Target Derivatization (GTOD) of Reducing Glycans. *Analytica Chimica Acta*, **1048**, 105-114. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.015

[28] Han, J., Lin, K., Sequeira, C. and Borchers, C.H. (2015) An Isotope-Labeled Chemical Derivatization Method for the Quantitation of Short-Chain Fatty Acids in Human Feces by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **854**, 86-94. https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.015

[29] Liebisch, G., Ecker, J., Roth, S., Schweizer, S., Öttl, V., Schött, H., *et al.* (2019) Quantification of Fecal Short Chain Fatty Acids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry—Investigation of Pre-Analytic Stability. *Biomolecules*, **9**, Article 121. https://doi.org/10.3390/biom9040121

[30] Rahman, M.N., Diantini, A., Fattah, M., Barliana, M.I. and Wijaya, A. (2021) A Highly Sensitive, Simple, and Fast Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for the Quantification of Serum Short-Chain Fatty Acids and Their Potential Features in Central Obesity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **413**, 6837-6844. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03639-3

[31] Kim, K., Lee, Y., Chae, W. and Cho, J. (2022) An Improved Method to Quantify Short-Chain Fatty Acids in Biological Samples Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Metabolites*, **12**, Article 525. https://doi.org/10.3390/metabo12060525

[32] Bihan, D.G., Rydzak, T., Wyss, M., Pittman, K., McCoy, K.D. and Lewis, I.A. (2022) Method for Absolute Quantification of Short Chain Fatty Acids via Reverse Phase Chromatography Mass Spectrometry. *PLOS ONE*, **17**, e0267093. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267093

[33] Chen, L., Sun, X., Khalsa, A.S., Bailey, M.T., Kelleher, K., Spees, C., *et al.* (2021) Accurate and Reliable Quantitation of Short Chain Fatty Acids from Human Feces by Ultra High-Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spec-

trometry (UPLC-HRMS). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **200**, Article 114066. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114066

[34] Valdivia-Garcia, M.A., Chappell, K.E., Camuzeaux, S., Olmo-García, L., van der Sluis, V.H., Radhakrishnan, S.T., *et al.* (2022) Improved Quantitation of Short-Chain Carboxylic Acids in Human Biofluids Using 3-Nitrophenylhydrazine Derivatization and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **221**, Article 115060. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115060

[35] Trifonova, O.P., Maslov, D.L., Balashova, E.E. and Lokhov, P.G. (2019) Evaluation of Dried Blood Spot Sampling for Clinical Metabolomics: Effects of Different Papers and Sample Storage Stability. *Metabolites*, **9**, Article 277. https://doi.org/10.3390/metabo9110277

[36] Shafaei, A., Vamathevan, V., Pandohee, J., Lawler, N.G., Broadhurst, D. and Boyce, M.C. (2021) Sensitive and Quantitative Determination of Short-Chain Fatty Acids in Human Serum Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **413**, 6333-6342. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03589-w

[37] Calvigioni, M., Bertolini, A., Codini, S., Mazzantini, D., Panattoni, A., Massimino, M., *et al.* (2023) HPLC-MS-MS Quantification of Short-Chain Fatty Acids Actively Secreted by Probiotic Strains. *Frontiers in Microbiology*, **14**, Article 1124144. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1124144

[38] Xiang, L., Ru, Y., Shi, J., Wang, L., Zhao, H., Huang, Y., *et al.* (2023) Derivatization of N-Acyl Glycines by 3-Nitrophenylhydrazine for Targeted Metabolomics Analysis and Their Application to the Study of Diabetes Progression in Mice. *Analytical Chemistry*, **95**, 2183-2191. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02507

[39] Wang, H., Wang, C., Guo, L., Zheng, Y., Hu, W., Dong, T.T.X., *et al.* (2019) Simultaneous Determination of Short-Chain Fatty Acids in Human Feces by HPLC with Ultraviolet Detection Following Chemical Derivatization and Solid-Phase Extraction Segmental Elution. *Journal of Separation Science*, **42**, 2500-2509. https://doi.org/10.1002/jssc.201900249

[40] Marotz, C., Cavagnero, K.J., Song, S.J., McDonald, D., Wandro, S., Humphrey, G., *et al.* (2021) Evaluation of the Effect of Storage Methods on Fecal, Saliva, and Skin Microbiome Composition. *mSystems*, **6**, e01329-20. https://doi.org/10.1128/msystems.01329-20

[41] Shaukat, A. and Levin, T.R. (2022) Current and Future Colorectal Cancer Screening Strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **19**, 521-531. https://doi.org/10.1038/s41575-022-00612-y

[42] Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., *et al.* (2007) HMDB: The Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, **35**, D521-D526. https://doi.org/10.1093/nar/gkl923

[43] Nagatomo, R., Kaneko, H., Kamatsuki, S., Ichimura-Shimizu, M., Ishimaru, N., Tsuneyama, K., *et al.* (2022) Short-Chain Fatty Acids Profiling in Biological Samples from a Mouse Model of Sjögren's Syndrome Based on Derivatized LC-MS/MS Assay. *Journal of Chromatography B*, **1210**, Article 123432. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123432

[44] Kawase, T., Hatanaka, K., Kono, M., Shirahase, Y., Ochiai, K., Takashiba, S., *et al.* (2020) Simultaneous Determination of 7 Short-Chain Fatty Acids in Human Saliva by High-Sensitivity Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatography*, **41**, 63-71. https://doi.org/10.15583/jpchrom.2019.025

[45] Imai, K., Togami, H. and Okamoto, T. (2010) Involvement of Histone H3 Lysine 9 (H3K9) Methyltransferase G9a in the Maintenance of HIV-1 Latency and Its Reactivation by BIX01294. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 16538-16545. https://doi.org/10.1074/jbc.m110.103531

[46] Yu, X., Shahir, A., Sha, J., Feng, Z., Eapen, B., Nithianantham, S., *et al.* (2014) Short-Chain Fatty Acids from Periodontal Pathogens Suppress Histone Deacetylases, EZH2, and SUV39H1 to Promote Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Replication. *Journal of Virology*, **88**, 4466-4479. https://doi.org/10.1128/jvi.03326-13

[47] Szczeklik, K., Krzysciak, W., Osiewicz, M., Bystrowska, B., Kuszaj, M., Piatek-Guziewicz, A., *et al.* (2022) Short-Chain Fatty Acids in the Saliva of Patients with Gastroesophageal Reflux Disease. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **73**, 521-530. https://doi.org/10.26402/jpp.2022.4.05

[48] Ho, H., Chun, Y., Jeong, S., Jumreornvong, O., Sicherer, S.H. and Bunyavanich, S. (2021) Multidimensional Study of the Oral Microbiome, Metabolite, and Immunologic Environment in Peanut Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **148**, 627-632.e3. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.028

[49] Han, J., Higgins, R., Lim, M.D., Atkinson, K., Yang, J., Lin, K., *et al.* (2018) Isotope-Labeling Derivatization with 3-Nitrophenylhydrazine for LC/Multiple-Reaction Monitoring-Mass-Spectrometry-Based Quantitation of Carnitines in Dried Blood Spots. *Analytica Chimica Acta*, **1037**, 177-187. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.045

[50] Dei Cas, M., Paroni, R., Saccardo, A., Casagni, E., Arnoldi, S., Gambaro, V., *et al.* (2020) A Straightforward LC-MS/MS Analysis to Study Serum Profile of Short and Medium Chain Fatty Acids. *Journal of Chromatography B*, **1154**, Article 121982. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.121982

[51] Liu, G., Mühlhäusler, B.S. and Gibson, R.A. (2014) A Method for Long Term Stabilisation of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Dried Blood Spots and Its Clinical Application. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **91**, 251-260. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.09.009

[52] Ingels, A.M.E., Lambert, W.E. and Stove, C.P. (2010) Determination of Gamma-Hydroxybutyric Acid in Dried Blood Spots Using a Simple GC-MS Method with Direct "on Spot" Derivatization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398**, 2173-2182. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4183-9

[53] Barone, R., Alaimo, S., Messina, M., Pulvirenti, A., Bastin, J., Ferro, A., *et al.* (2018) A Subset of Patients with Autism Spectrum Disorders Show a Distinctive Metabolic Profile by Dried Blood Spot Analyses. *Frontiers in Psychiatry*, **9**, Article 636. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00636

[54] Cao, Y., Wang, Q., Gao, P., Dong, J., Zhu, Z., Fang, Y., *et al.* (2016) A Dried Blood Spot Mass Spectrometry Metabolomic Approach for Rapid Breast Cancer Detection. *OncoTargets and Therapy*, **9**, 1389-1398. https://doi.org/10.2147/ott.s95862

[55] Zytkovicz, T.H., Fitzgerald, E.F., Marsden, D., Larson, C.A., Shih, V.E., Johnson, D.M., *et al.* (2001) Tandem Mass Spectrometric Analysis for Amino, Organic, and Fatty Acid Disorders in Newborn Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry*, **47**, 1945-1955. https://doi.org/10.1093/clinchem/47.11.1945

[56] Wishart, D.S., Lewis, M.J., Morrissey, J.A., Flegel, M.D., Jeroncic, K., Xiong, Y., *et al.* (2008) The Human Cerebrospinal Fluid Metabolome. *Journal of Chromatography B*, **871**, 164-173. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.05.001

[57] Hirschberg, S., Gisevius, B., Duscha, A. and Haghikia, A. (2019) Implications of Di-

et and the Gut Microbiome in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article 3109. https://doi.org/10.3390/ijms20123109

[58] Majumdar, A., Siva Venkatesh, I.P. and Basu, A. (2023) Short-Chain Fatty Acids in the Microbiota-Gut-Brain Axis: Role in Neurodegenerative Disorders and Viral Infections. *ACS Chemical Neuroscience*, **14**, 1045-1062. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.2c00803

[59] Ntranos, A., Park, H., Wentling, M., Tolstikov, V., Amatruda, M., Inbar, B., *et al.* (2021) Bacterial Neurotoxic Metabolites in Multiple Sclerosis Cerebrospinal Fluid and Plasma. *Brain*, **145**, 569-583. https://doi.org/10.1093/brain/awab320

[60] Xie, J., Bruggeman, A., De Nolf, C., Vandendriessche, C., Van Imschoot, G., Van Wonterghem, E., *et al.* (2023) Gut Microbiota Regulates Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Function and Aβ Pathology. *The EMBO Journal*, **42**, e111515. https://doi.org/10.15252/embj.2022111515

[61] MacFabe, D.F. (2012) Short-Chain Fatty Acid Fermentation Products of the Gut Microbiome: Implications in Autism Spectrum Disorders. *Microbial Ecology in Health & Disease*, **23**, Article 19260. https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.19260

[62] Hanstock, T., Clayton, E., Li, K. and Mallet, P. (2004) Anxiety and Aggression Associated with the Fermentation of Carbohydrates in the Hindgut of Rats. *Physiology & Behavior*, **82**, 357-368. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.04.002

[63] Meissner, S., Hagen, F., Deiner, C., Günzel, D., Greco, G., Shen, Z., *et al.* (2017) Key Role of Short-Chain Fatty Acids in Epithelial Barrier Failure during Ruminal Acidosis. *Journal of Dairy Science*, **100**, 6662-6675. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12262

Supplementary Data

S1. Method Validation

S1.1. Linearity of the Method—Limit of Quantification (LOQ)

The calibration curves were obtained by injecting seven standard solutions. The regression parameters of slope, intercept and correlation coefficient were calculated by weight (1/x) linear regression. Linearity was assumed when the regression coefficient was greater than 0.995.

The limit of quantification (LOQ) corresponded to the concentration of derived metabolite producing a signal-to-noise ratio (S/N) equal than to 10. The concentration of each LOQ was determined by diluting the less concentrated point of the calibration curve. The S/N was calculated using MassLynx in RMS method. The region selected for the "Noise" was 2 min long and always selected after the peak of interest on the chromatogram.

S1.2. Intra Assay Accuracy and Precision

For the calibration curve, the intra-day precision and accuracy were evaluated using 10 independent replicates for each level of QC (low, medium, high) injected the same day. The inter-day precision and accuracy were evaluated with one independent injection per QC level on 10 separate days. The intra-day and inter-day precisions were restricted to less than 15% for medium and higher levels whereas it is less than 20% for low level. Same criteria were applied for the accuracy. Accuracy was defined as the ratio of the difference between the spiked concentration and the observed concentration to the spiked concentration, while precision was defined by the coefficient of variance (CV%) as the ratio of the standard deviation to the mean. For matrices, the intra-day and inter-day precision have been evaluated with two separate pools.

S1.3. Carry Over

Carryover is a potential source of error with automatic sampler, especially with high concentration. In the aim to evaluate this possible contamination between two samples, standard solutions must be injected one after the other: low level from the calibration curve—highest level from calibration curve—low level a second time. The comparison of the integration between the concentrations will allow the evaluation of carry-over.

$$\text{Carry Over}\left(\text{CO}\%\right) = \frac{\text{Mean of Low Level \#2} - \text{Mean of Low Lovel \#1}}{\text{Mean of Low Level \#1}} * 100$$

S2. Tables

Table S1. Retention time, fragmentation parameters of SCFA and range of concentrations of the calibration curve.

Metabolite	RT (min)	Parent Ion (m/z)	Daugther Ion (m/z)	CE (-eV)	Cone Voltage (V)	Internal Standard	Dynamic Range of Concentration (nM)	LOQ_a[2] (nM)	CO (%)
Acetic Acid	1.67	194.1	152.0[1]	14	20	Acetic-$^{13}C_2$-Acid	638 - 425,000	0.42	4.47
Propionic Acid	2.50	208.1	165.1	16	20	Butyric-d_7-Acid	300 - 200,000	0.27	6.53
Isobutyric Acid	3.60	222.1	179.1	14	20	Butyric-d_7-Acid	30 - 20,000	0.04	13.22
Butyric Acid	3.73	222.1	179.1	14	20	Butyric-d_7-Acid	338 - 225,000	0.42	0.62
Isovaleric Acid	5.25	236.1	193.1	14	20	Valeric-d_9-Acid	18 - 12,000	0.12	15.76
Valeric Acid	5.50	236.1	193.1	14	20	Valeric-d_9-Acid	140 - 46,500	0.10	2.67
Acetic-$^{13}C_2$-Acid	1.67	196.1	152.0[1]	14	20	-	-	-	-
Butyric-d_7-Acid	3.72	229.1	186.1	14	20	-	-	-	-
Valeric-d_9-Acid	5.44	245.1	202.1	14	20	-	-	-	-

1: For acetic acid, and its internal standard, the loss of 43Da is not possible; 2: Concentration where S/N was ≥10.

Table S2. Intra-day and inter-day repeatabilities of the calibration curve, prepared in water.

Metabolite	Concentration (nM)	Intra-Day (n = 10)			Inter-Day (n = 10)		
		Mean + sd (nM)	CV (%)	Accuracy (%)	Mean + sd (nM)	CV (%)	Accuracy (%)
Acetic Acid	17,000	16,955 + 1058	6.24	0.27	17,551 + 1448	8.25	3.24
	170,000	166,246 + 3599	2.17	2.21	169,252 + 8945	5.28	0.44
	340,000	342,841 + 4555	1.33	0.84	333,227 + 10,447	3.14	1.99
Propionic Acid	8000	8228 + 635	7.71	2.85	8136 + 684	8.4	1.7
	80,000	79,569 + 1948	2.45	0.54	78,613 + 3832	4.87	1.73
	160,000	159,870 + 2076	1.3	0.08	156,731 + 9277	5.92	2.04
Butyric Acid	9000	8879 + 488	5.5	1.35	8884 + 732	8.24	1.29
	90,000	90,360 + 1947	2.16	0.4	88,579 + 4656	5.26	1.58
	180,000	182,728 + 2579	1.41	1.52	174,105 + 9579	5.5	3.27
Isobutyric Acid	800	803 + 59	7.35	0.42	767 + 63	8.21	4.07
	8000	7997 + 162	2.02	0.04	7864 + 425	5.4	1.69
	16,000	16,237 + 266	1.64	1.48	15,616 + 826	5.29	2.4
Valeric Acid	1860	1871 + 115	6.16	0.6	1833 + 156	8.51	1.45
	18,600	18,270 + 279	1.53	1.77	17,909 + 825	4.6	3.71
	37,200	37,471 + 682	1.82	0.73	36,356 + 1998	5.5	2.27
Isovaleric Acid	480	468 + 29	6.19	2.5	479 + 43	8.99	0.21
	4800	4791 + 96	2	0.19	4609 + 167	3.62	3.98
	9600	9555 + 201	2.11	0.47	9559 + 725	7.59	0.43

Repeatabilities are based on 10 injections of each of the three levels of calibration curve QC. The inter-day injections were carried out within a maximum of 1 month.

Table S3. LC gradient.

#	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
1	0	0.6	85	15
2	2	0.6	80	20
3	4	0.6	75	25
4	6	0.6	60	40
5	8	0.6	50	50
6	9	0.6	45	55
7	9.5	0.6	0	100
8	12.4	0.6	0	100
9	12.5	0.6	85	15
10	14.5	0.6	85	15

Table S4. ESI parameters.

Polarity	NEG
Capillary Voltage	3 kV
Desolvatation Temperature	450˚C
Source Temperature	150˚C
Nebuliseur Gas Flow	7.0 bar
Cone Gas Flow Temperature	150˚C
Desolvatation Gas Flow	1200 L/hr

Table S5. HMDB concentrations of SCFA in biological samples.

Metabolite	Serum (µM)	Urine (µmol/mmol of cretinine)	Feces (nmol/g of wet matter)	Saliva (µM)	CSF (µM)
Acetic Acid	20 - 60	2.5 - 106.0	12,800 - 103,400	20 - 25,000	20 - 170
Propionic Acid	0.5 - 1.5	0.2 - 5.7	4500 - 27,800	<1 - 6000	0 - 6
Butyric Acid	0.3 - 1.5	0.5 - 81.0	4000 - 53,000	5 - 5000	0.2 - 8.2
Isobutyric Acid	0.7 - 4.4	0.86 - 4.02	-	15 - 1760	0.0 - 3.6
Valeric Acid	0.3 - 1.2	0.0 - 8.5	600 - 3800	0 - 200	-
Isovaleric Acid	0.3 - 2.7	0.8 - 66.0	300 - 6000	15 - 100	0.0 - 2.7

S3. Figures

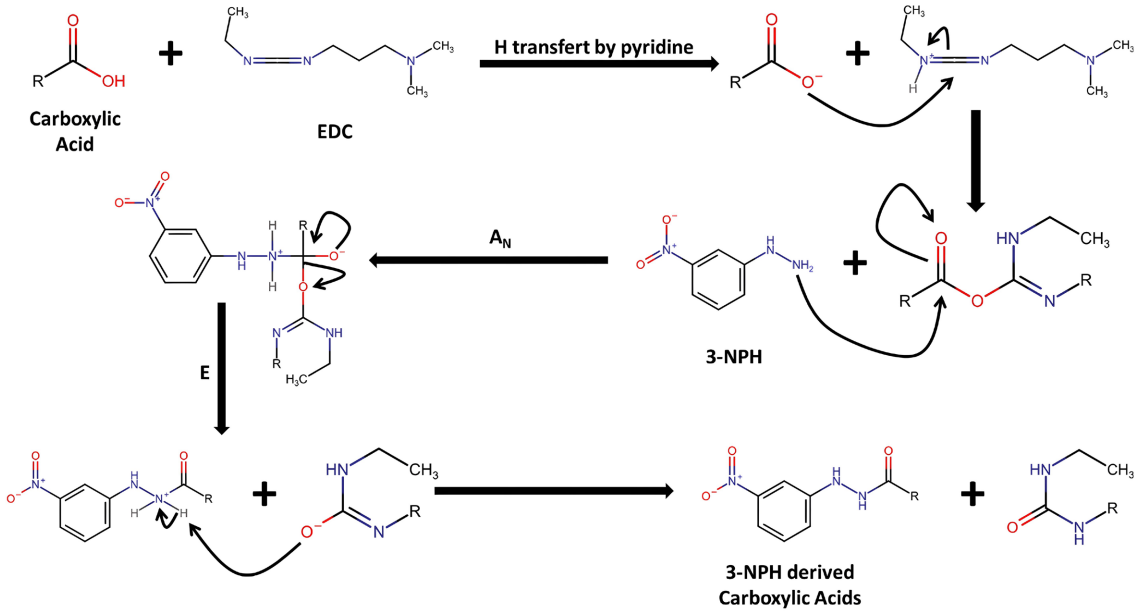


Figure S1. Mechanism of derivation of carboxylic acids with pyridine, EDC & 3NPH.

II.3. Conclusion

Les SCFA sont des métabolites de première importance. Leurs liens avec les maladies du système digestif [434,435] sont connus depuis longtemps et plus récemment, il y a eu un regain d'intérêt pour eux avec la mise en évidence de connexion avec des troubles neurodéveloppementaux ou neurodégénératifs [436–438]. Mais les SCFA sont impliqués dans de nombreuses autres pathologies, qui touchent tous les compartiments biologiques [439]. Il y a donc un besoin en méthode capable de quantifier les SCFA dans l'ensemble des matrices biologiques.

Notre méthode propose de les quantifier par « dérivation au 3NPH » -LC-MS^2. Nous proposons une courbe calibration unique par métabolite, qui permet de quantifier l'ensemble des matrices biologiques. Les intervalles de concentration biologiques étant très différents, l'étendue des gammes est agrandie. Il est possible de quantifier les SCFA, même faiblement concentrés comme dans le LCR, grâce à l'optimisation des conditions d'extractions de chaque matrice et en ayant mis en avant une nouvelle transition des SCFA dérivés au 3NPH qui par sa grande spécificité permet de gagner en sensibilité.

La robustesse de la méthode permet de l'inscrire et de l'utiliser pour études (pré)cliniques, avec des coefficients de variation aux alentours des 20%, au maximum. Il est donc envisageable de passer des premiers intervalles de concentration proposés dans cette étude, à l'aide d'un échantillon pool de patients sains, à la création d'une base de données de concentration des SCFA dans l'ensemble des matrices biologiques, dans des cas pathologiques. L'avantage d'avoir accès à la biodistribution des SCFA à grande échelle pourrait permettre de différencier les sous-populations de ces pathologies pour mieux adapter les traitements reçus. Changer d'échelle est aussi envisageable : dans des cas de pathologies rares ou de supposition de nouvelle variation encore inconnu, pouvoir comparer l'ensemble des échantillons d'un patient comparer aux bases de données, permettant de se rapprocher de la métabolomique à l'échelle individuelle [440].

Avoir des données plus intégratives, de pouvoir visualiser l'ensemble de la biodistribution d'une famille semble une approche intéressante pour observer les corrélations, positives ou négatives, d'un contexte pathologique. L'importance de l'axe

« microbiote intestinal-cerveau » étant en jeu dans de nombreuses pathologies, il serait intéressant d'employer la technique développée pour l'étudier.

Cependant, les SCFA ne représentent qu'une petite fraction des métabolites impliqués, peu importe la pathologie. Il serait préférable de pouvoir analyser un plus grand nombre de composés en même temps pour une représentation plus fidèle : c'est le compromis à faire entre les approches non-ciblée et ciblée-quantitatif de la métabolomique. Il est donc nécessaire de développer des méthodologies capables de tendre vers une approche non-ciblée et quantitative pour améliorer la qualité des informations obtenues et produire des données respectant les principes FAIR.

CHAPITRE II : Analyse Semi-Ciblée

II.1. Introduction

Il est impossible de visualiser l'ensemble du métabolome en une analyse. *A minima*, il est préconisé d'utiliser l'ionisation positive (POS) et négative (NEG) ou d'utiliser des colonnes hydrophiles et hydrophobes pour atteindre le spectre de molécules le plus large possible. A ce stade, la quantification des molécules reste néanmoins relative. L'objectif est donc de tendre vers des analyses non-ciblées de quantification absolue.

Dans un premier temps, la dérivation, qui améliore la sensibilité, permet de travailler de sous-métabolome en sous-métabolome. Là aussi plusieurs dérivations et plusieurs analyses seront nécessaires mais la couverture au sein de chaque ensemble sera plus grande. Une seconde possibilité consiste à réaliser des analyses multiplateformes pour bénéficier des avantages des différents appareils utilisés.

II.2. La dérivation

Le fonctionnement de la dérivation, ses avantages et inconvénients ont été développés dans l'introduction de cette thèse. La dérivation est une réaction chimique pré-analytique entre une solution, ou un échantillon, et une étiquette chimique. L'étiquette chimique va venir se greffer sur les molécules possédant une fonction chimique capable de réagir avec cette dernière dans les conditions de dérivation (T, t, pH ou hv). La dérivation permet donc de se focaliser sur un ou des sous-métabolomes en fonction de la versatilité de la partie réactive de l'étiquette chimique.

Produire des données quantitatives absolues lors d'une analyse semi-ciblée (basée sur une chimiothèque) présentent des obstacles : l'achat des étalons internes ; que ce soit en termes de disponibilité commerciale, du coût et de l'existence de composés non identifiés. Le processus de l'ICD permet d'obtenir un étalon interne pour toutes les molécules dérivées. Un contrôle qualité (QC) va être réalisé à partir d'un volume x de chaque échantillon. D'un côté, les échantillons sont dérivés avec la version de l'étiquette « légère » (non marquée par des isotopes) ; de l'autre, le QC est dérivé avec l'étiquette « lourde », (marquée au 13C ou au 2H). En « réintroduisant » un volume x du QC dans chaque échantillon, il y a bien pour chaque molécule dérivée son étalon interne dans la matrice (**Figure 1**). Ainsi, l'effet matrice est

diminué, aboutissant à des données précises et fiables. Les qualités de l'ICD ont permis son essor, elle est discutée dans de nombreux articles [441,442] et son utilisation est même transférée dans le domaine de l'imagerie en métabolomique[365] (**Figure 2**).

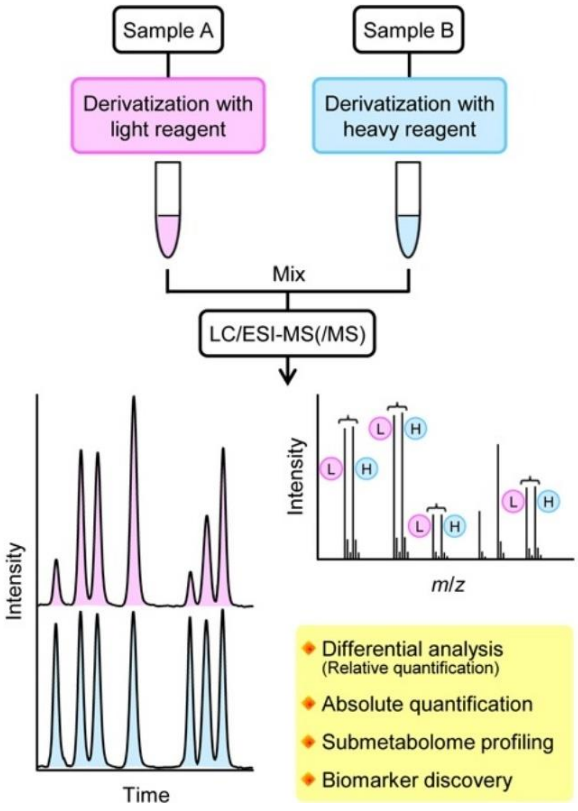


Figure 1 : Principe de l'ICD (*Isotope Coded Derivatization*) [441]

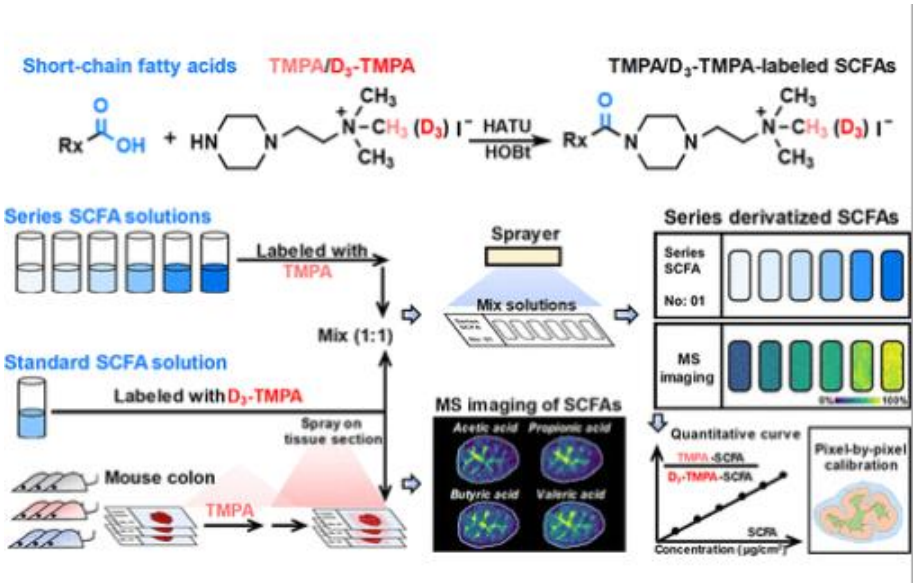


Figure 2: Application de l'ICD pour l'imagerie en MALDI-MS [365]

L'intérêt porté à la dérivation pour l'analyse de métabolome est grandissant. Pour s'adapter au besoin, qu'il soit ciblé ou exploratoire, de nouvelles étiquettes chimiques sont, et doivent, être produites puis évaluées avant d'être employées sur des échantillons cliniques. Dans le cadre de la métabolomique exploratoire, l'objectif serait d'avoir une étiquette chimique versatile, qui améliore l'efficacité d'ionisation des composés dérivés comparée à leur état natif et avec un motif de fragmentation spécifique afin d'améliorer l'identification des composés dérivés. Le BASA a été synthétisé par le laboratoire ICOA d'Orléans (Institut de Chimie organique et Analytique), avec qui nous avons collaboré dans ce but. Le BASA est l'association de deux structures, une pour l'ionisation et une pour la réactivité chimique, reliées par un « bras ». Pour l'ionisation, c'est la structure du Dansyl-Cl qui a été choisi alors que pour la réactivité, la fonction chimique devait avoir la même réactivité que le DmPA-BR. Le « bras » reliant ces deux structures est le propane-1,3-diamine. L'étiquette ainsi synthétisée est sensée être versatile dans son marquage tout en présentant des motifs de fragmentation facilement identifiable. Ses capacités de marquage, et la caractérisation de la fragmentation, ont été étudiées sur une centaine de molécules différentes.

Afin de mieux appréhender le potentiel du BASA, ses capacités ont été comparées à 4 étiquettes de références : le Dansyl-Cl [368], le DmPA-Br [379], le 3-NPH [432]et le PITC [443] . Chaque étiquette amène des motifs de fragmentation aux composés dérivés, ce qui permet de les détecter/identifier rapidement. Ces fragments distincts permettent de trouver des transitions spécifiques pour quantifier les composés dérivés. La première étape du projet a donc été de déterminer les motifs de fragmentation engendrés par une dérivation au BASA, en ionisation positive et en mode négatif. Ensuite, pour caractériser les capacités de marquage du BASA, une chimiothèque de 107 molécules, qui permet de balayer l'ensemble des structures et fonctions chimiques appartenant au métabolome humain, a été dérivée par chaque étiquette (les conditions de dérivation optimales de chaque étiquette ont été respectées) et analysée par LC-HRMS, en mode positif et négatif La **Figure 3** résume notre approche pour caractériser et comparer notre étiquette BASA.

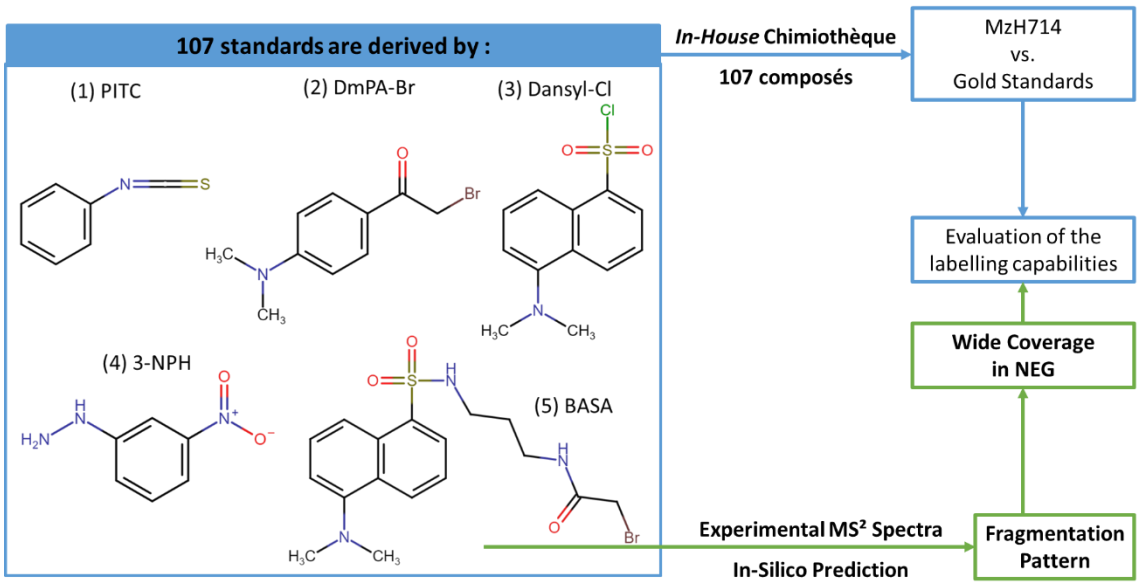


Figure 3 : Protocol pour l'étude du BASA avec une première partie de caractérisation individuelle (vert) puis une comparaison aux "gold standards" (bleu)

Ce travail est en cours de relecture par l'ensemble des auteurs pour publication.

Les journaux ciblés sont : Analytical Chemistry, Analytica Chimica Acta, Talanta, Journal of Chromatography A.

II.3. Publication

Evaluation of a new chemical label *BASA* : comparison with gold standards

Jérémy Monteiro[1], Karen Ple[2], Antoine Lefèvre [1], Hamid Marzag[2], Benjamin Blondeau[2], Camille Dupuy[1], Adeline Oury [1], Sylvain Routier[2], Lydie Nadal-Desbarats[1], Patrick Emond[1,3]

(1)- Université de Tours, INSERM, Imaging Brain & Neuropsychiatry iBraiN U1253, 37032, Tours, France

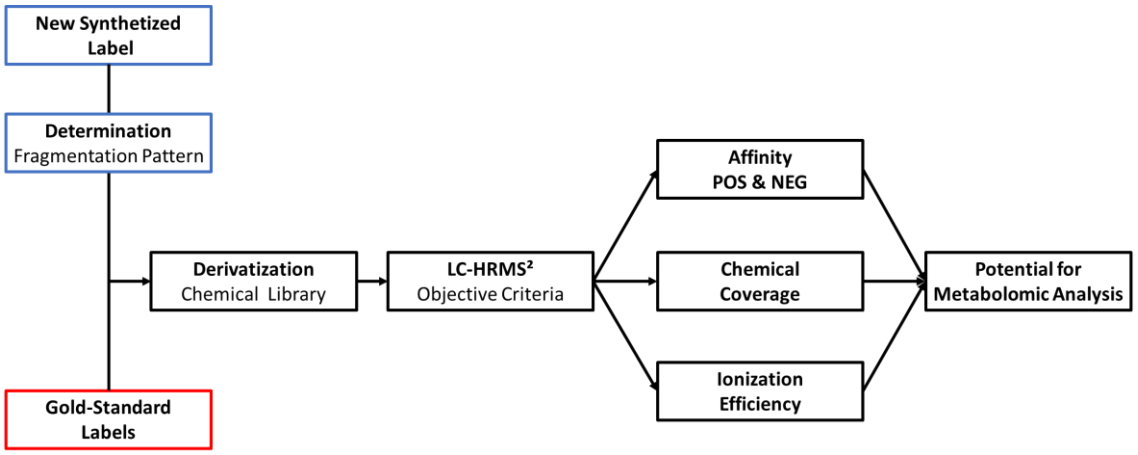
(2)- Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, CNRS UMR 7311, Orléans, France.

(3)-CHRU de Tours, Service de Médecine Nucléaire In Vitro, Tours, France.

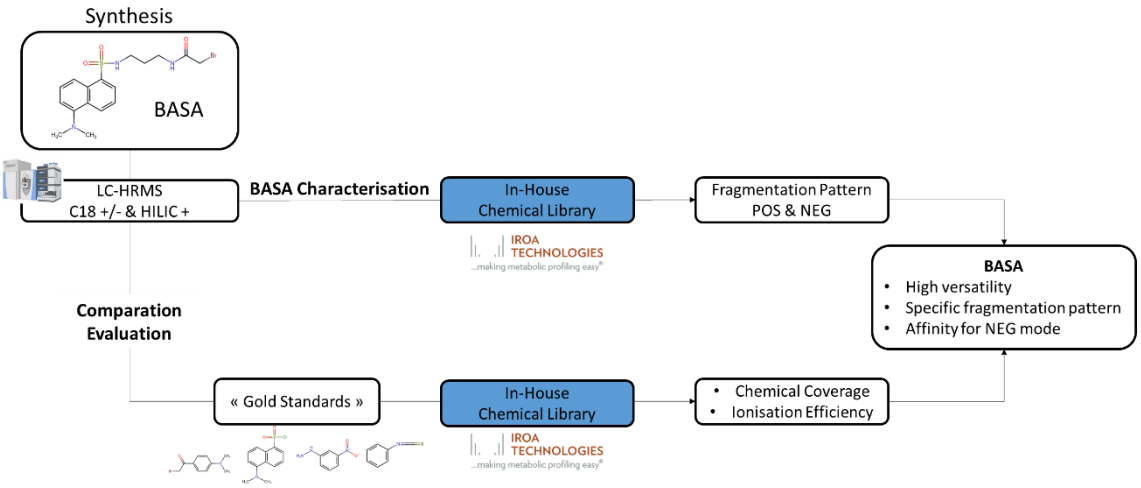
HIGHLIGHTS

- Study of a new α-bromoamide label, BASA, for exploratory metabolomics derivatization
- Evaluation of BASA's labelling capacity on 107 compounds
- Comparison of coverage diversity with gold standards: DmPA-Br, Dansyl-Cl, 3-NPH and PITC
- BASA's preferential ionisation is negative

GRAPHICAL ABSTRACT v1



GRAPHICAL ABSTRACT v2



Introduction

Personalized medicine is the customization of medical treatments to fit the unique characteristics of each patient [1,2]. In oncology for example, genomic advances have made it possible to identify genetic variations that affect disease risk and drug response [3]. This precision allows for more accurate diagnoses, targeted therapies, and better patient outcomes. However, not all diseases benefit from this level of knowledge. Despite significant progress, challenges remain to improve the biological characterization of certain pathologies, and to break the bottleneck of transfer to clinical practice [4]. Metabolomics could help address these issues [5].

Metabolomics is the science studying metabolites within a biological system. A metabolite is a small molecule (molecular weight < 1500 Da) involved in a biological pathway [6]. Analyzing metabolites helps us to understand how diseases alter normal metabolic pathways and how patients respond to treatments. Integrating metabolomics into personalized medicine has several advantages: improving disease diagnosis and prognosis by identifying unique metabolic signatures, and better understanding the biochemical effects of drugs [5].

There are two main metabolomic approaches: exploratory or quantitative [7]. On one hand, exploratory metabolomics involves the comprehensive profiling and analysis of metabolites within a biological sample without prior assumptions about which metabolites are important. The goal of this approach is to identify as many metabolites as possible and to understand their relative abundance and variations across different conditions or experimental groups [8–10]. On the other hand, quantitative metabolomics focuses on accurately measuring the concentrations of specific metabolites within a biological sample. This approach involves the use of targeted analytical methods to quantify predefined sets of metabolites with known identities and concentrations [11–13]. Quantitative metabolomics is particularly useful for studying metabolic pathways and understanding the dynamics of metabolite changes in response to various stimuli or perturbations. Both exploratory and quantitative metabolomics play crucial roles in advancing our understanding of metabolism in health and disease, thus facilitating biomarker discovery, drug development, and personalized medicine initiatives [14–16].

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry (MS) are the reference analytical techniques used for metabolite detection [17–19]. NMR is a robust technique which allows easy quantification. Its lack of sensitivity, even with the current development of Dynamic Nuclear Polarization (DNP) [20,21], is often criticized. When high sensitivity is required, mass spectrometry is used and coupled with gas chromatography (GC-MS) or liquid chromatography (LC-MS) for the separation of metabolites [7]. Over time, mass spectrometers have become increasingly sensitive, making it possible to identify compounds in even lower concentrations [17,22,23]. However, in a biological environment, matrix effects and the coexistence of compounds at very different concentrations mean that not all metabolites can be observed at once [10]. To overcome these problems, there are several possibilities. Firstly, it is possible to carry out several types of analysis in both ionisation modes, positive (POS) and negative (NEG), using hydrophilic and hydrophobic columns, allowing the observation of a greater diversity of metabolites [24–27]. While this methodology enables data comparison and a greater degree of confidence for compound identification it requires multiple injections, different preparations to adapt to the columns and/or several extractions to highlight polar or apolar compounds. An alternative solution is to slightly reduce the field of compounds to be studied by focusing on sub-metabolomes rather than trying to observe the whole metabolome [28,29].

One approach toward this "downsizing" is possible with a pre-analytical step called derivatization [30]. Derivatization is a chemical reaction in which a set of molecules reacts with a label, depending on its chemical properties. In the metabolomics, derivatization is commonly used to improve the detection of compounds by increasing ionization efficiency [31]. Numerous labels exist but there are some commercially available 'gold standards' which are widely used: Dansyl-Chloride (Dns-Cl), dimethylaminophenacyl bromide (DmPA-Br), 3-nitrophenylhydrazine (3-NPH) and phenylisothyocyanate (PITC). Dns-Cl [32],used to derive amines and phenols, it is best known for its ability to greatly improve the ionisation capacity of the derived compounds and to consistently produce highly recognisable fragments. The strength of DmPA-Br [33,34] comes from its functional group coverage. Carboxylic acids, thiols and primary or secondary amines can all be detected using this reagent. 3-NPH [35,36] is the reference label for the study of fatty acids, especially in feces. It is also able to derive carboxylic acids. Finally, PITC [37] derives amines and is integrated in the Biocrates® kit [38].

Improvement in ionisation efficiency is not the only advantage of derivatization. In addition, the formation of common fragments or characteristic ions during mass spectrometry fragmentation is often observed. This facilitates structure elucidation and enhances the specificity of metabolite identification. These characteristic fragments can provide valuable information about the chemical structure of the metabolite [34,39]. By merging these strengths, new ways of quantifying metabolites have emerged. Traditionally, to quantify a compound, a calibration curve is constructed. This is used to relate the response factor, *i.e.* the ratio between the response of the compound and the response of its internal standard (IS, deuterated or with several ^{13}C atoms) to the concentration. Internal standards are expensive and are very often not commercially available. To overcome this problem, it is possible to carry out two derivatization reactions in parallel during the biological analysis: this process is called *Isotope Coded Derivatization* (ICD). [30,40]. The samples are derived with a "light" chemical label (without isotopes), while the Quality Control (QC), which is a pool of all the samples, is derived with the "heavy" version of the label (with isotopes). Once derivatization is complete, the QC is introduced into each sample. During LC-MS analysis, the sample will therefore contain all the derived compounds and their heavy-label equivalents: an IS is produced for each metabolite. Given its potential, the ICD process is being used more and more. To improve its versatility, it is important to produce new chemical labels to adapt to every situation. In this study, we propose the evaluation of a new chemical label and its comparison with commercially available "gold standards". This compound, 2-bromo-N-{3-[5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido]propyl}acetamide or BASA, benefits from the advantages of both Dansyl and DmPA-Br, for its fragmentation pattern as well as its chemical reactivity for a wide labelling coverage of chemical functions, respectively.

1. Materiels & Methods

1.1. Chemicals

All chemical compounds were purchased from Sigma-Aldrich : dansyl cloride (Dns-Cl, ≥99%), phenyl isothiocyanate (PITC, ≥99%), 4-(dimethylamino)phenacyl bromide (DmPA-Br, 97%), bromoacetyl bromide (≥98%), triethylamine (Et_3N, ≥99%), decanoic acid (>99%), formic acid (FA, AnalaR Normapur grade), 3-nitrophenylhydrazine hydrochloride (3NPH-HCl, >98%), n-(3-dimethylaminopropyl)-n'-ethylcarbodiimide (EDC, >97%) , pyridine (>99.5%) and the derived compounds (*Sup . Data ; 1. List of derived compounds from IROA in-house database*).

are from the in-house IROA Technologies database (MSMLS, AOMLS, FAMLS and BACSMLS), purchased from Sigma-Aldrich.

Solvents such as methanol (MeOH, Hipersolv Chromanorm, >99.9%), H_2O LC-MS (Lichrosolv), acetonitrile (ACN, HiperSolv Chromanorm, >99.9%), dichloromethane (DCM, EMSURE ACS ISO, >99.8%), 1,4-dioxane (dioxane, EMSURE ACS ISO, ≥99.5%) were purchased from VWR and Sigma-Aldrich.

1.2. BASA Synthesis

The BASA label was prepared in a three-step procedure. Compound **3** was obtained in quantitative yield starting from the commercially available mono-protected amine **1** and dansyl chloride **2**. Removal of the Boc protecting group followed by reaction with bromoacetyl bromide gave the desired BASA label in 59 % yield over 2 steps. Experimental procedure and compound characterization can be found in the supplementary information (*Sup. Data; 2. Chemical characterization of BASA synthesis intermediates).*

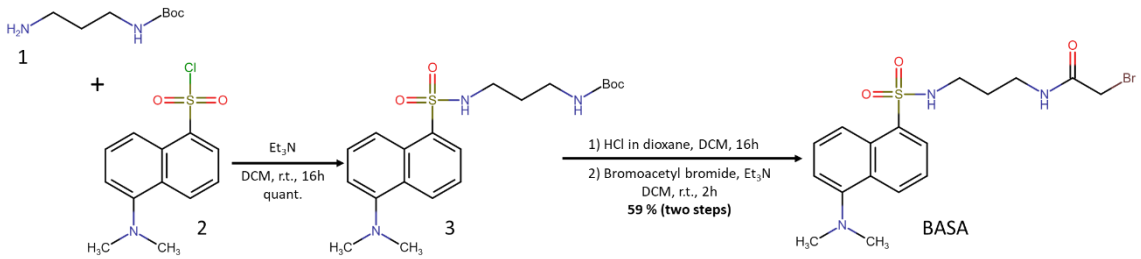


Figure 1: Synthesis of the BASA label

1.3. Derivatization Reactions

Each chemical label required different experimental conditions for optimal derivatization. The different protocols used are described in the following section. **Figure 2** shows the structural formula of each label.

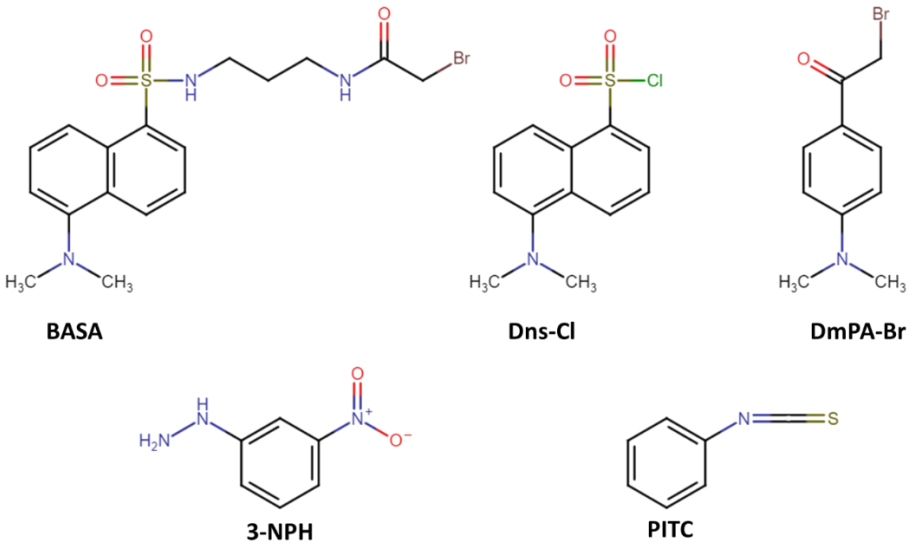


Figure 2 : Synthetized BASA label and commercially available labels: DmPA-Br, Dns-Cl, 3-NPH and PITC.

1.3.1. Dns-Cl

The derivatization process was inspired by Kang et al. [41]. Briefly, in a 500 µL 96-well plate, 50 µL of sample, 50 µL of dansyl-chloride solution (180 mM) and 50 µL of $KHCO_3$/KOH (2 M) were successively added. Then, the mixture was homogenized during 1 min with planar agitation (strength 8/10) and then left to react during 1 h at 4 °C. To quench the reaction, 50 µL of ACN at 1 % of formic acid (FA) and 300 µL of MTBE have been added and homogenised with planar agitation during 10 min before injection.

1.3.2. DmPA-Br & BASA

The derivatization protocol used for BASA is based on the DmPA-Br protocol because of their similar reactivity. The process was inspired by Willacey et al. [34]. Briefly, 50 µL of sample, 50 µL of a mixture of DMSO/DMF (1:1), 50 µL of TEA in ACN (750 mM), 50 µL of DmPA-Br (or BASA) solubilized in ACN (162 mM) were successively added to a 1 mL, 96-well plate. The mixture was homogenized with planar agitation (1 min, strength 8/10) and left to react during 1 h at 65 °C. To quench the reaction, 50 µL de ACN/AF (0.5%) and 250 µL of ACN were added and homogenized.

1.3.3. PITC

The PITC derivatization was adapted from the Biocrates® protocol [38]: 50 µL of sample, 50 µL of PITC (408 mM) in a mixture of EtOH, pyridine and H_2O (1:1:1) were added to a 1 mL, 96-well plate. The mixture was homogenised with planar agitation (1 min, strength 8/10) and left to react during 1 h at room temperature.

1.3.4. 3-NPH

The optimal conditions with 3-NPH depended on the targeted family. For a maximum number of compounds to be detected, two temperatures were successively applied. The derivatization process was inspired by Meng et al. [35]. 50 µL of samples, 50 µL of pyridine, 50 µL of EDC and 50µL of 3-NPH (215 mM) were successively added to a 1 mL, 96-well plate. The mixture was homogenized with planar agitation (1 min, strength 8/10) and left to react during 1 h at 4 °C and then 1 h at 40 °C.

1.4. The Chemical Library

In order to evaluate the labelling capacities of BASA against the commercial labels, 107 standard compounds, from the commercially available compound library IROA [42], were derived according to the protocols described above. The concentration of each one was 1 mg/mL, ranging from 1.0 mM to 0.1 mM. All standards were derived by each label and injected in NEG and POS mode on hydrophilic and hydrophobic columns. The 107 molecules were chosen to represent a global chemical diversity and to cover a large number of metabolic classes. The **Figure 3** below presents the diversity of the compounds studied:

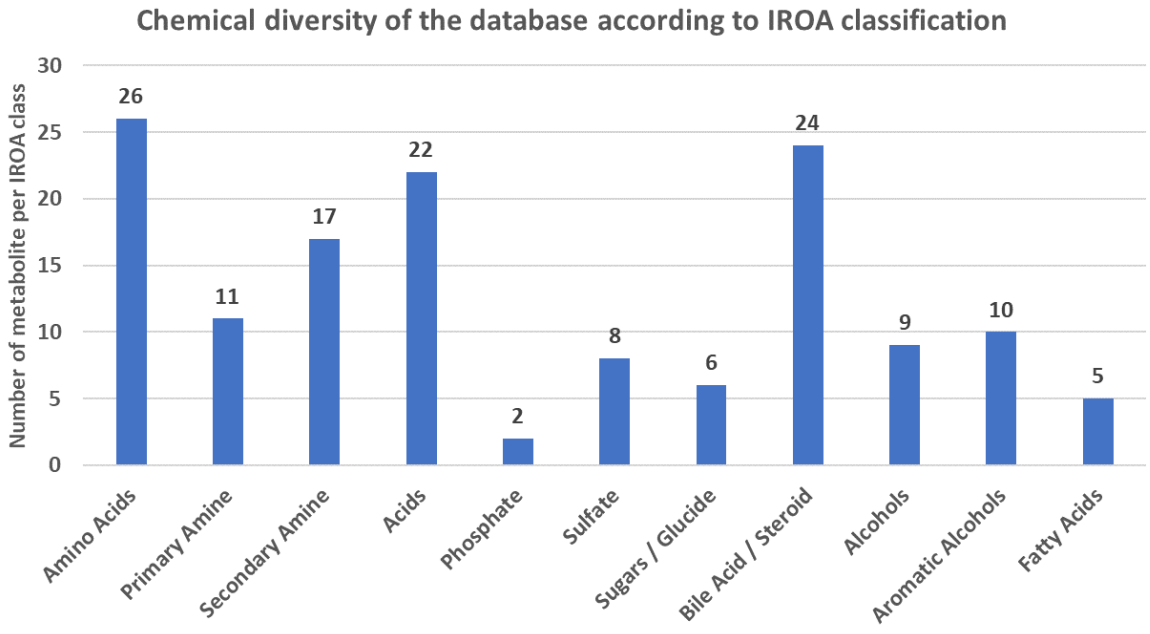


Figure 3: Distribution in numbers of molecules studied according to their metabolic class (based on the IROA classification)

1.5. LC-MS Analysis

1.5.1. LC-MS equipment

LC-HRMS analysis was performed on an UPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Germany), coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The chromatography system was separately equipped with two columns. RP-LC (Reverse Phase Liquid Chromatography) Phenomenex Kinetex® XB-C18 (1.7 µm 100 A 150 x 2.1 mm from Phenomenex, CA, USA) kept at a constant temperature of 55 °C. The auto-sampler temperature was set at 4 °C (Ultimate WPS-3000 UHPLC system, Dionex, Germany). The HESI source (head electrospray ionisation) was used for both chromatography systems with a spray voltage of 3.5 kV, the temperatures were set at: 325 °C for the capillary, 350 °C for the heater and the sheath gas flow of 50 arbitrary units (AU), an auxiliary gas flow of 13 AU, a sweep gas flow of 3 AU, and a tube lens S-Lens RF level of 50, operated in positive (ESI+) and negative (ESI-) electrospray ionization modes (one run for each mode). Detection was performed with a full-scan acquisition at 70,000 resolution (m/z = 200), which ranged from 58.0 to 870.0 m/z, with an automatic gain control (AGC) target of 105 charges and a maximum injection time (IT) of 250 ms. Xcalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) controlled the system.

1.5.2. Chomatographic Gradients

The solvent system used consisted of a mobile phase A (H_2O + 0.1% FA) and a mobile phase B (ACN + 0.1% of FA). A constant flow rate of 0.5 mL/min over a run of 13.7 min was used with a multistep gradient. The multistep gradient (followed by 2 min of equilibration time) was programmed as follows: 0 to 2 min, 2 %B; 2 to 6 min, 2–30 %B; 6 to 9 min, 30–75 %B; 9 to 9.5 min, 75–100 %B; 9.5 to 11.8 min, 100 %B; 23 to 24 min, 11.8-12 min, 100-2 %B, 12-13.7 min, 2 %B. The injection volume was 5 µL.

2. Results & Discussion

2.1. MS^2 Fragmentation

Derived compounds present a common pattern of fragmentation which make them easily detected and identified. For example, compounds derived by 3-NPH systematically present a 137 m/z and a 152 m/z fragment. In order to determine the correct fragmentation pattern of BASA, both theoretical and *in-silico* predictions [43] were used and verified with experimental data. Fragmentation pattern have been investigated in both POS and NEG modes.

2.1.1. POS mode

The specific fragments expected were the isobaric part of Dns-Cl (171.1 Da), the loss of SO_2 and the rupture of the S-N bond of the sulfonamide [44–46]: **Figure 4.A** displays the different fragments expected. All of these fragments were found in derived compounds as illustrated with creatinine (**Figure 4.B**). The most specific fragment is the one obtained by cleavage of the amide bond (identified in green in **Figure 4**). This fragment is very interesting because the molecule corresponding to this ion, N-(3-aminopropyl)-5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamide, does not appear in either the Human Metabolome DataBase (HMDB) [47] or in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [48], suggesting that it is absent from biological samples and is therefore highly selective.

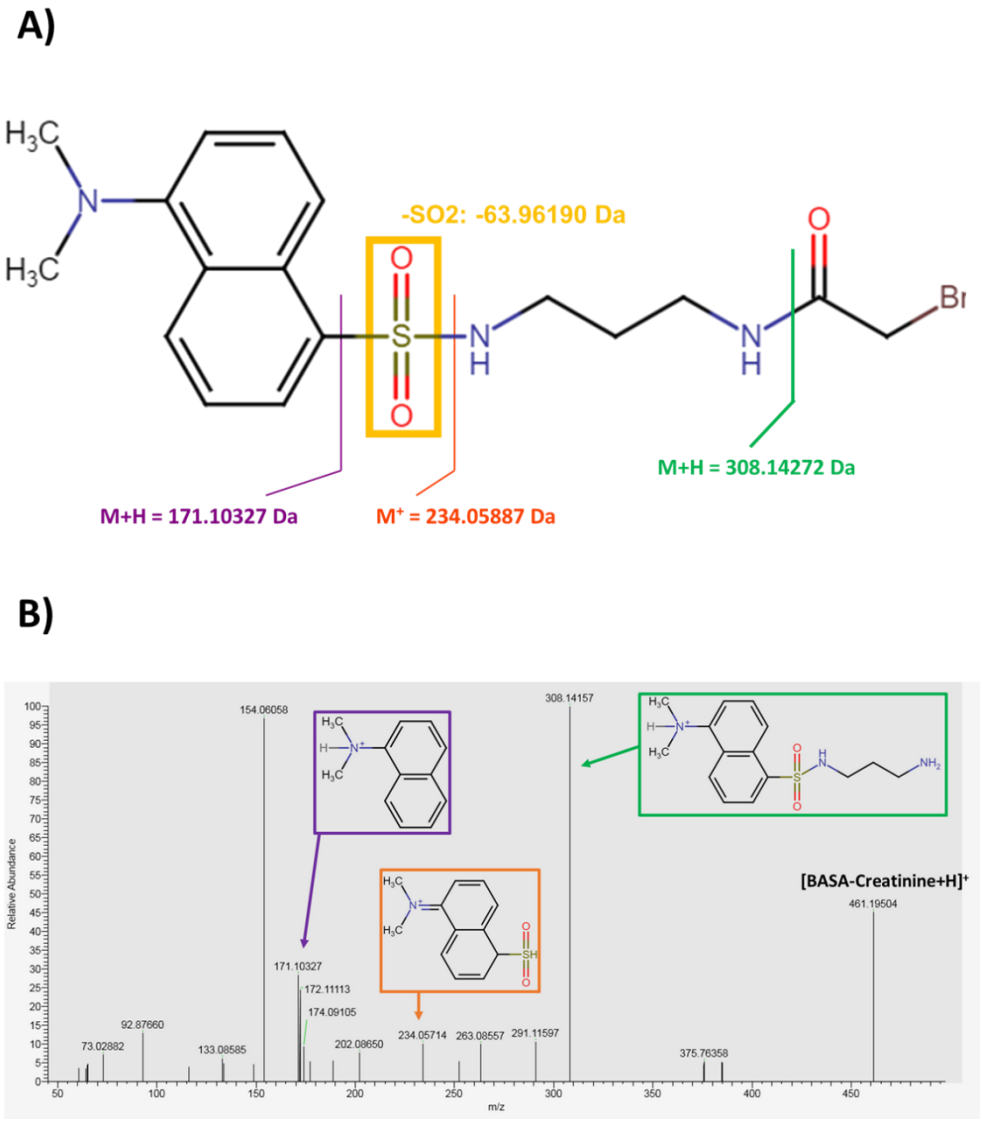


Figure 4: (A) Theoretical Fragmentation Pattern of BASA in a Positive Ionization mode (B) Experimental MS² spectra of creatinine derived with BASA (isolation window = 1 Da)

2.1.2. NEG mode

In our study we found that BASA derivatives were more easily detected in the negative mode. There are few papers on the negative fragmentation of sulfonamides. The work of Guo et al. [49] helped us to determine the possible fragmentation pattern (**Figure 5.A**) and is illustrated by the reaction of acetic acid and our BASA tag (**Figure 5.B**). The three main fragments have a medium relative intensities but, because of the high selectivity of the N-(3-aminopropyl)-5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamide fragment (green, **Figure 5**), there were no detection problems.

To check for potential misidentifications and provide further evidence of fragment specificity, we looked at whether these m/z ratios could correspond to biological molecules.

The blue fragment, 5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamide, and the orange fragment, 5-(dioxo-6-sulfanyl)-N,N-dimethylnaphthalen-1-amine, produced no results in KEGG. Only one entry exists in HMDB for the blue fragment. The molecule was detected in blood in a single study [50], but was not quantified. The only link between this molecule and the metabolome would be through exposure to this compound or a derivative. 5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamide (or dansylamide) would therefore be a molecule of the exposome and not of the human metabolome.

As a result, even if the relative intensity of these fragments is medium, their high specificity to BASA-derived compounds means they can be easily detected, even in biological samples.

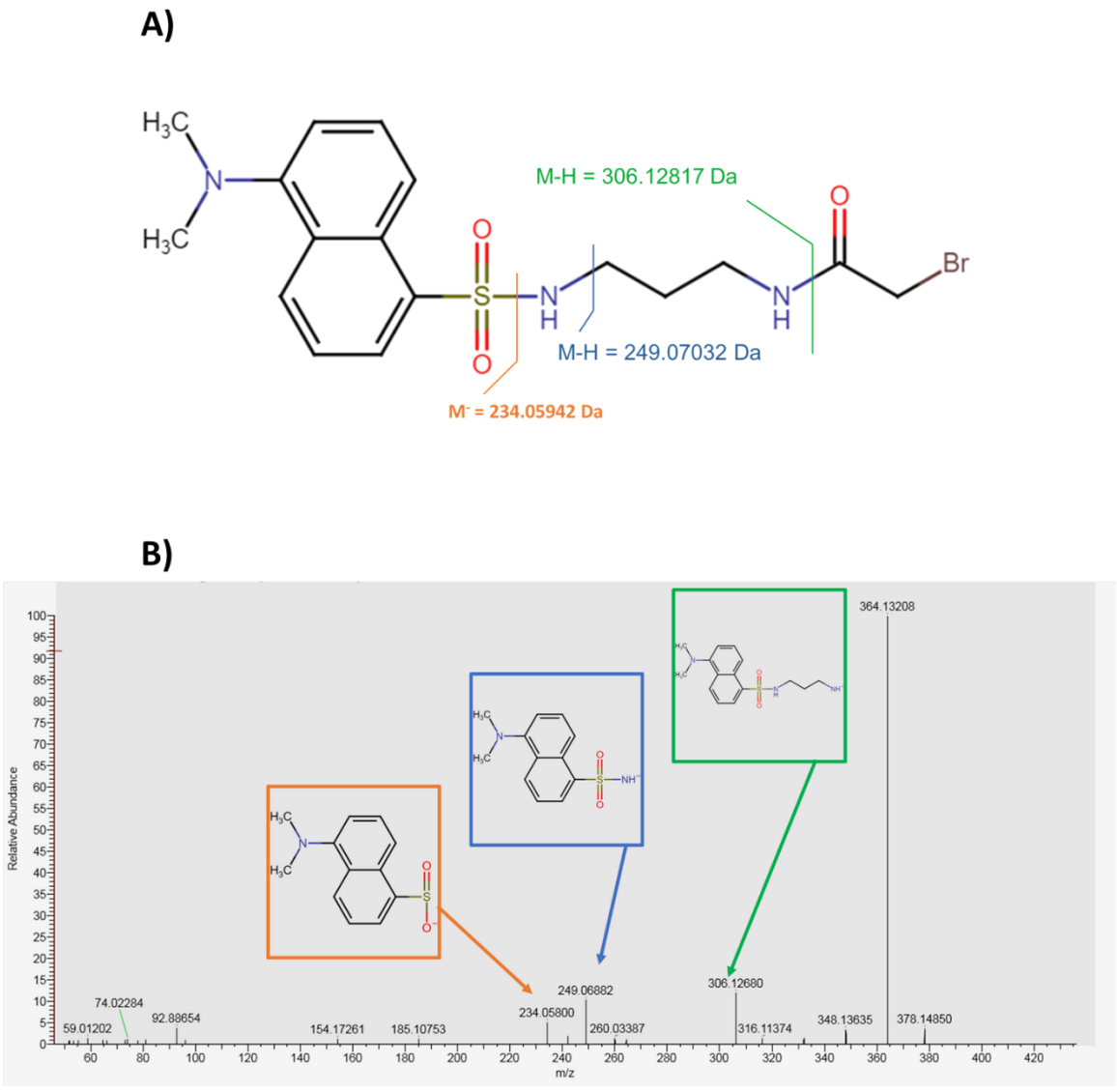


Figure 5: (A) Theoretical Fragmentation Pattern of BASA in Negative Ionization mode (B) Experimental MS² spectra of acetic acid derived with BASA (isolation window = 1 Da)

2.2. Evaluation of BASA labelling capacities

2.2.1. Ionization Mode Affinity

Figure 6 presents the complementarity between the POS and NEG modes for each label using Venn's diagrams. As a reminder, the library is made up of 107 compounds, and none of the labels derive all of the compounds. Firstly, our results agreed with the literature ionisation modes, Dns, DmPA and PITC were always analyzed through positive ionization whereas 3-nitrophenylhydrazine derivatives needed to be analyzed in both ionization modes. The detection of derived carboxylic compounds was favored in the negative mode whereas amino acids were detected in the positive mode.

The fact that BASA was more efficient in the negative mode was surprising. Its structure is a "dansyl body" (positive detection) with an α-bromoamide reactivity. We expected that BASA-derivatization would also be well detected in the positive mode, because the isobaric part of BASA is a Dansyl squeleton. This preference for NEG mode may be induced by the "linker" between the dansyl backbone to the chemically reactive part. The NEG mode has a reduced background noise, compared to positive ionization. There are fewer molecules capable of generating an H^- than capturing an H^+, which can lead to better sensitivity, especially interesting in biological samples with high competition for ionization.

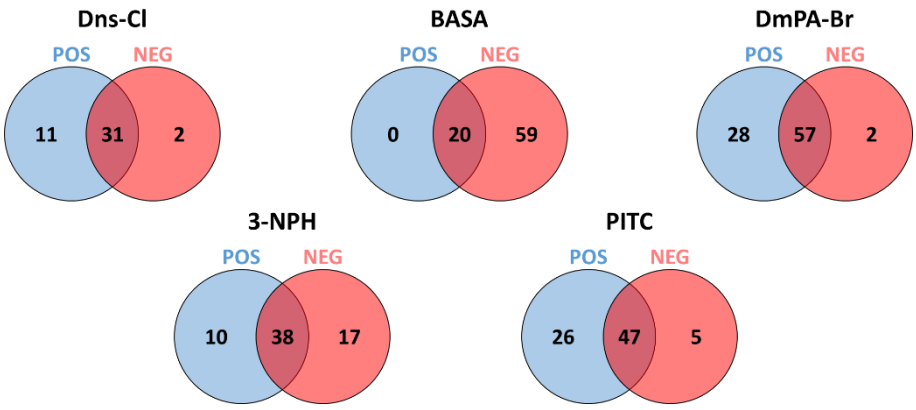


Figure 6: Evaluation of the complementarity of POS and NEG ionisation mode for each label on the in-house library (107 compounds)

2.2.2. Chemical Coverage

Another objective of derivatization, especially in metabolome exploration, is to increase the number of detected compounds. Some labels, like PITC or 3-NPH are known to be specific for only a few chemical functions. **Figure 7.A** shows that the percentage of the 107

derived standards is more or less the same for PITC, DmPA and BASA. Most of the coverage comes from the POS mode for the first two and essentially from the NEG mode for BASA. Next comes 3-NPH, but to achieve 61% coverage, both the POS and NEG modes are necessary. **Figure 7.B** is a Venn diagram representing the number of compounds commonly derived by each label.

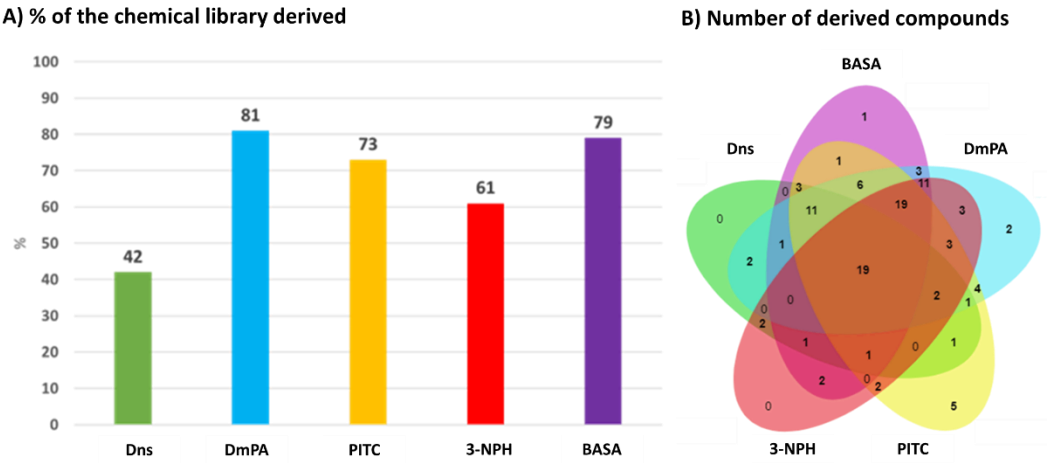


Figure 7: A) percentage of the homemade library derived by each label B) Summary of derivatization capabilities, based on the number of compounds derived in the in-house library

Table 1 summarizes which metabolic classes can be derived for each chemical label. Some of the reactivity that we observed was not previously referenced in the literature. However, this type of result is not surprising: previously, Willacey et al. [51] had extended the functional group coverage of DmPA and demonstrated its versatility. In **Table 1**, we can see that BASA is able to label the same functional groups as DmPA-Br. This result is expected due to the similar reactivity of these functions: an α-bromoketone in DmPA and an α-bromoamide in BASA.

Table 1: Marking capacity of labels according to IROA class

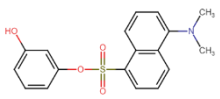
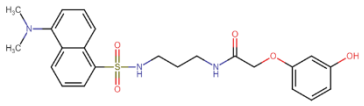
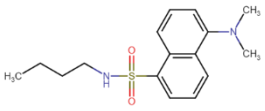
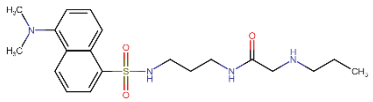
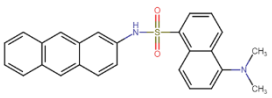
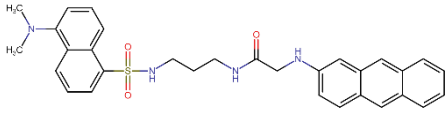
	Amino Acids	Primary Amines	Secondary Amines	Others Organic Acids	Sugars	Alcohols	Aromatic Alcohols	Thiols	Fatty Acids
Dns	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✗
PITC	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✗
DmPA	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✗
3-NPH	✗	✗	✗	✓	✓	✗	✗	✗	✓

BASA	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✗

2.2.3. Increasing detection sensitivity

Another important point when evaluating a label is ionization efficiency. To be qualified as a well-suited label for a metabolome, a label must increase the ionization efficiency of a compound after derivatization. Previous studies have already reported these findings with gold standards [35,52]. Here we focus on a cross comparison of BASA-derived, and Dns-derived compounds. **Table 2** below compares the ratio between "positive intensity/negative intensity" of several compounds derived by BASA or Dns-Cl. A high value for the "I_{POS}/I_{NEG}" ratio means that the ionization efficiency of the derivatized compound is better in POS mode; whereas a low value for the ratio means that the ionization efficiency is better in NEG mode. Compared to Dns, the negative ionization of BASA is more advantageous. As a result, BASA derived compounds have a higher ionization efficiency, more than its "parent" molecule, due to the combination of the Dansyl-like skeleton and the preference for the NEG mode.

Table 2: Comparison of the intensity of BASA and Dansyl compounds derived in negative and in positive ionization modes

Molecule	Dns-Derived	I_{POS}/I_{NEG}	BASA-Derived	I_{POS}/I_{NEG}
Resorcinol		$3.76.10^{5}$		$5.21.10^{-07}$
Butylamine		19		$4.36.10^{-04}$
2-Aminoanthracene		0.09		$9.80.10^{-08}$

3. Conclusion

Derivatization is a useful tool for metabolomics exploration and for large quantitative methods, especially with the use of Isotope Coded Derivatization. While Dns-Cl or 3-NPH are specific to a few chemical classes, others labels are more flexible, such as DmPA-Br.

In this report, a new chemical label, BASA, has been synthetized to merge the qualities of the Dansyl group (ionization efficiency; highly specific fragments) and of DmPA (large reactivity). Its affinity with the NEG mode, where there is less background noise, and it is very

specific fragmentation are promising for biological exploration. Moreover, it is possible that the "linker" used to join the isobaric part of the molecule with the reactive one has an influence on the observed preference for the NEG mode: it would therefore be interesting to modify it either to generate new specific and characteristic fragments or to modulate its reactivity by playing on steric hindrance. Its derivatization in a biological environment, where competition between molecules is much greater and the matrix effect is important, still remains to be assessed to fulfil the criteria necessary for use in a clinical context.

Bibliography

[1] Stefanicka-Wojtas D, Kurpas D. Personalised Medicine—Implementation to the Healthcare System in Europe (Focus Group Discussions). J Pers Med 2023;13:380. https://doi.org/10.3390/jpm13030380.
[2] Goetz LH, Schork NJ. Personalized Medicine: Motivation, Challenges and Progress. Fertil Steril 2018;109:952–63. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.006.
[3] Hoeben A, Joosten EAJ, van den Beuken-van Everdingen MHJ. Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. Cancers (Basel) 2021;13:242. https://doi.org/10.3390/cancers13020242.
[4] Najafzadeh M, Davis JC, Joshi P, Marra C. Barriers for integrating personalized medicine into clinical practice: A qualitative analysis. American Journal of Medical Genetics Part A 2013;161:758–63. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35811.
[5] Le Gouellec A, Plazy C, Toussaint B. What clinical metabolomics will bring to the medicine of tomorrow. Front Anal Sci 2023;3. https://doi.org/10.3389/frans.2023.1142606.
[6] Aderemi AV, Ayeleso AO, Oyedapo OO, Mukwevho E. Metabolomics: A Scoping Review of Its Role as a Tool for Disease Biomarker Discovery in Selected Non-Communicable Diseases. Metabolites 2021;11:418. https://doi.org/10.3390/metabo11070418.
[7] Segers K, Declerck S, Mangelings D, Heyden YV, Eeckhaut AV. Analytical techniques for metabolomic studies: a review. Bioanalysis 2019;11:2297–318. https://doi.org/10.4155/bio-2019-0014.
[8] Zhao S, Li L. Chemical derivatization in LC-MS-based metabolomics study. Trends in Analytical Chemistry 2020. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115988.
[9] Gray N, Lawler NG, Yang R, Morillon A-C, Gay MCL, Bong S-H, et al. A simultaneous exploratory and quantitative amino acid and biogenic amine metabolic profiling platform for rapid disease phenotyping via UPLC-QToF-MS. Talanta 2021;223:121872. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121872.
[10] Alseekh S, Aharoni A, Brotman Y, Contrepois K, D'Auria J, Ewald J, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. Nat Methods 2021;18:747–56. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1.
[11] Noack S, Wiechert W. Quantitative metabolomics: a phantom? Trends in Biotechnology 2014;32:238–44. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.03.006.
[12] Koek MM, Jellema RH, van der Greef J, Tas AC, Hankemeier T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. Metabolomics 2011;7:307–28. https://doi.org/10.1007/s11306-010-0254-3.
[13] Büscher JM, Czernik D, Ewald JC, Sauer U, Zamboni N. Cross-Platform Comparison of Methods for Quantitative Metabolomics of Primary Metabolism. Anal Chem 2009;81:2135–43. https://doi.org/10.1021/ac8022857.

[14] Wishart DS. Quantitative metabolomics using NMR. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2008;27:228–37. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.001.
[15] Liu X, Ser Z, Cluntun AA, Mentch SJ, Locasale JW. A Strategy for Sensitive, Large Scale Quantitative Metabolomics. JoVE (Journal of Visualized Experiments) 2014:e51358. https://doi.org/10.3791/51358.
[16] Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD. Analytical strategies for LC–MS-based targeted metabolomics. Journal of Chromatography B 2008;871:236–42. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.031.
[17] Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrometry Reviews 2007;26:51–78. https://doi.org/10.1002/mas.20108.
[18] Villas-Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrometry Reviews 2005;24:613–46. https://doi.org/10.1002/mas.20032.
[19] Smolinska A, Blanchet L, Buydens LMC, Wijmenga SS. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. Analytica Chimica Acta 2012;750:82–97. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049.
[20] Plainchont B, Berruyer P, Dumez J-N, Jannin S, Giraudeau P. Dynamic Nuclear Polarization Opens New Perspectives for NMR Spectroscopy in Analytical Chemistry. Anal Chem 2018;90:3639–50. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05236.
[21] Ribay V, Dey A, Charrier B, Praud C, Mandral J, Dumez J-N, et al. Hyperpolarized 13C NMR Spectroscopy of Urine Samples at Natural Abundance by Quantitative Dissolution Dynamic Nuclear Polarization. Angewandte Chemie International Edition 2023;62:e202302110. https://doi.org/10.1002/anie.202302110.
[22] Khodadadi M, Pourfarzam M. A review of strategies for untargeted urinary metabolomic analysis using gas chromatography–mass spectrometry. Metabolomics 2020;16:66. https://doi.org/10.1007/s11306-020-01687-x.
[23] Wang X, Sun H, Zhang A, Wang P, Han Y. Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies. Journal of Separation Science 2011;34:3451–9. https://doi.org/10.1002/jssc.201100333.
[24] Contrepois K, Jiang L, Snyder M. Optimized Analytical Procedures for the Untargeted Metabolomic Profiling of Human Urine and Plasma by Combining Hydrophilic Interaction (HILIC) and Reverse-Phase Liquid Chromatography (RPLC)–Mass Spectrometry*,. Molecular & Cellular Proteomics 2015;14:1684–95. https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046508.
[25] Xie B, Wang Y, Jones DR, Dey KK, Wang X, Li Y, et al. Isotope Labeling-Assisted Evaluation of Hydrophilic and Hydrophobic Liquid Chromatograph–Mass Spectrometry for Metabolomics Profiling. Anal Chem 2018;90:8538–45. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01591.
[26] Chen J, Zhou L, Zhang X, Lu X, Cao R, Xu C, et al. Urinary hydrophilic and hydrophobic metabolic profiling based on liquid chromatography-mass spectrometry methods: Differential metabolite discovery specific to ovarian cancer. ELECTROPHORESIS 2012;33:3361–9. https://doi.org/10.1002/elps.201200140.
[27] Podlecka-Piętowska A, Kacka A, Zakrzewska-Pniewska B, Nojszewska M, Zieminska E, Chalimoniuk M, et al. Altered Cerebrospinal Fluid Concentrations of Hydrophobic and Hydrophilic Compounds in Early Stages of Multiple Sclerosis—Metabolic Profile Analyses. J Mol Neurosci 2019;69:94–105. https://doi.org/10.1007/s12031-019-01336-6.
[28] Wang Y-Z, Chen Y-Y, Wu X-Z, Bai P-R, An N, Liu X-L, et al. Uncovering the Carboxylated Metabolome in Gut Microbiota–Host Co-metabolism: A Chemical Derivatization-Molecular Networking Approach. Anal Chem 2023;95:11550–7. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02353.
[29] Chen C-J, Lee D-Y, Yu J, Lin Y-N, Lin T-M. Recent advances in LC-MS-based metabolomics for clinical biomarker discovery. Mass Spectrometry Reviews 2023;42:2349–78. https://doi.org/10.1002/mas.21785.

[30] El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Kuroda N. Current trends in isotope-coded derivatization liquid chromatographic-mass spectrometric analyses with special emphasis on their biomedical application. Biomedical Chromatography 2020;34:e4756. https://doi.org/10.1002/bmc.4756.
[31] Han J, Lin K, Sequeira C, Borchers CH. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 2015;854:86–94. https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.015.
[32] Hsieh, Chien, Chang, Hang, Li. Development of a Method for Dansylation of Metabolites Using Organic Solvent-Compatible Buffer Systems for Amine/Phenol Submetabolome Analysis | Elsevier Enhanced Reader. Analytica Chimica Acta 2021. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339218.
[33] Willacey C, Naaktgeborena M, Moreno EL. LC–MS/MS analysis of the central energy and carbon metabolites inbiological samples following derivatization bydimethylaminophenacyl bromide. Journal of Chromatography A 2019. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460413.
[34] Willacey C, Karu N, Harms A. Metabolic profiling of material-limited cell samples by dimethylaminophenacyl bromide derivatization with UPLC-MS/MS analysis. Miccrochemical Journal 2020;159. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105445.
[35] Meng X, Pang H, Sun F, Jin X, Wang B, Yao K, et al. Simultaneous 3-Nitrophenylhydrazine Derivatization Strategy of Carbonyl, Carboxyl and Phosphoryl Submetabolome for LC-MS/MS-Based Targeted Metabolomics with Improved Sensitivity and Coverage. Anal Chem 2021;93:10075–83. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00767.
[36] Han J, Lin K, Sequria C, Yang J, Borchers CH. Quantitation of low molecular weight sugars by chemical derivatization-liquid chromatography/multiple reaction monitoring/mass spectrometry. ELECTROPHORESIS 2016;37:1851–60. https://doi.org/10.1002/elps.201600150.
[37] Shigemura Y, Iwasaki Y, Sato Y, Kato T, Seko T, Ishihara K. Detection of Balenine in Mouse Plasma after Administration of Opah-Derived Balenine by HPLC with PITC Pre-Column Derivatization. Foods 2022;11:590. https://doi.org/10.3390/foods11040590.
[38] Hampel D, Shahab-Ferdows S, Hossain M, Islam MM, Ahmed T, Allen L. Human Milk Metabolomics Using Biocrates AbsoluteIDQ® p180 Kit Assay (OR06-04-19). Current Developments in Nutrition 2019;3:nzz036.OR06-04-19. https://doi.org/10.1093/cdn/nzz036.OR06-04-19.
[39] Liebisch G, Ecker J, Roth S, Schweizer S, Öttl V, Schött H-F, et al. Quantification of Fecal Short Chain Fatty Acids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry—Investigation of Pre-Analytic Stability. Biomolecules 2019;9:121. https://doi.org/10.3390/biom9040121.
[40] Bruheim P, Kvitvang HFN, Villas-Boas SG. Stable isotope coded derivatizing reagents as internal standards in metabolite profiling. Journal of Chromatography A 2013;1296:196–203. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.072.
[41] Kang J, Zhu L, Lu J, Zhang X. Application of metabolomics in autoimmune diseases: Insight into biomarkers and pathology. Journal of Neuroimmunology 2015;279:25–32. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.01.001.
[42] iroatech. Libraries for Mass Spectometry. IROA TECHNOLOGIES n.d. https://www.iroatech.com/libraries-for-mass-spectometry/ (accessed October 2, 2024).
[43] Chao A, Al-Ghoul H, McEachran AD, Balabin I, Transue T, Cathey T, et al. In silico MS/MS spectra for identifying unknowns: a critical examination using CFM-ID algorithms and ENTACT mixture samples. Anal Bioanal Chem 2020;412:1303–15. https://doi.org/10.1007/s00216-019-02351-7.
[44] Dasenaki ME, Thomaidis NS. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC–ESI–MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. Analytica Chimica Acta 2010;672:93–102. https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.034.
[45] Göbel A, McArdell CS, Suter MJ-F, Giger W. Trace Determination of Macrolide and Sulfonamide Antimicrobials, a Human Sulfonamide Metabolite, and Trimethoprim in Wastewater Using

Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Anal Chem 2004;76:4756–64. https://doi.org/10.1021/ac0496603.

[46] Sun M, Dai W, Liu DQ. Fragmentation of aromatic sulfonamides in electrospray ionization mass spectrometry: elimination of SO2 via rearrangement. Journal of Mass Spectrometry 2008;43:383–93. https://doi.org/10.1002/jms.1335.

[47] Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Research 2007;35:D521–6. https://doi.org/10.1093/nar/gkl923.

[48] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Research 2000;28:27–30. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27.

[49] Guo Z, Jie X, Zhu P, Sun J, Gu J, Su F, et al. Fragmentation pathways of deprotonated amide-sulfonamide CXCR4 inhibitors investigated by ESI-IT-MSn, ESI-Q-TOF-MS/MS and DFT calculations. Journal of Mass Spectrometry 2019;54:869–77. https://doi.org/10.1002/jms.4439.

[50] Barupal DK, Fiehn O. Generating the Blood Exposome Database Using a Comprehensive Text Mining and Database Fusion Approach. Environmental Health Perspectives 2019;127:097008. https://doi.org/10.1289/EHP4713.

[51] Willacey CCW, Naaktgeboren M, Lucumi Moreno E, Wegrzyn AB, van der Es D, Karu N, et al. LC–MS/MS analysis of the central energy and carbon metabolites in biological samples following derivatization by dimethylaminophenacyl bromide. Journal of Chromatography A 2019;1608:460413. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460413.

[52] Liu X, Lv Q, Song X, Chen Y, Zhao L, Yan M, et al. Screening for Bisphenol Chemicals: A Strategy Based on Dansyl Chloride Derivatizatio n Coupled with In-Source Fragmentation by High-Resolution Mass Spectrometry. Anal Chem 2023;95:6227–34. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03461.

II.4. Conclusion

Une des problématiques en métabolomique est la couverture de l'analyse vis-à-vis du métabolome. La dérivation est une des options qui permettraient d'accéder aux parties du métabolome manquantes. Le DmPA-Br et le Dansyl-Cl sont des étiquettes chimiques disponibles dans le commerce. Elles sont réputées pour leur versatilité et/ou pour l'amélioration de l'efficacité d'ionisation des composés une fois dérivés.

L'évaluation du BASA sur une chimiothèque de 107 composés a permis de démontrer qu'il a une versatilité équivalente au DmPA-Br et qu'il produit des fragments très spécifique, similaire en structure à ceux du Dansyl. L'avantage principale du BASA réside dans son mode d'ionisation préférentiel, le mode négatif (NEG). Le mode NEG permet d'avoir un bruit de fond plus réduit qu'en positif (POS). En milieu biologique, la « compétition » entre molécules pour s'ioniser est plus grande en POS qu'en NEG, ce qui engendre un bruit de fond plus élevé et des intensités maximums plus faibles. Ce potentiel gain en sensibilité qu'offre le BASA pourra s'avérer très utile pour explorer le métabolome mais surtout permettra de quantifier les métabolites faiblement concentrés, d'autant plus qu'il est possible de moduler le « bras » du BASA pour modifier sa réactivité (gêne stérique) ou y introduire des atomes/fonctions produisant des fragments encore plus caractéristiques et facilitant l'ionisation.

Il faudra dans un premier temps optimiser les conditions de dérivation du BASA, qui seront potentiellement à adapter en fonction des familles de métabolites ciblées et de créer une base de données des composés dérivés au BASA. Les effets matrices étant importants en milieu biologique, il faudra analyser des échantillons biologiques dérivés au BASA, pour évaluer objectivement son apport en milieu biologique et identifier les familles que le BASA dérivent en milieu complexe. Une fois défini, il sera possible de développer des méthodes ciblées de quantification et/ou de l'utiliser avec la méthodologie de l'ICD.

CHAPITRE III : Conclusion & Perspectives

L'objectif de la métabolomique est de réussir à caractériser l'entièreté du métabolome, c'est-à-dire identifier tous les métabolites et de réussir à les quantifier. Réussir à combiner une approche non-ciblée et une approche quantitative est un des grands défis rencontrés. Actuellement, la métabolomique non-ciblée par chromatographie-spectrométrie de masse reste semi-quantitative : le grand nombre d'espèces détectées, couplées aux différentes coélutions, empêche d'atteindre une analyse « non-ciblée quantitatif ».

La dérivation chimique peut permettre d'outrepasser ces problèmes. Il existe de nombreuses étiquettes chimiques, ayant des utilisations différentes. Certaines étiquettes sont spécifiques à certaines familles, comme le 3NPH avec les acides gras, permettant des approches ciblées ; d'autres sont plus versatiles, comme le DmPA-Br qui dérivent les thiols, alcools et les amines, permettant d'explorer plusieurs sous-métabolomes en même temps. La dérivation permet donc à la fois de faire de la quantification absolue et de l'exploration. Cependant, la quantification absolue n'est pas immédiate, avec la mise en place de gamme d'étalonnage et le besoin en étalon interne isotopique pour chaque métabolite étudié, et la dérivation chimique est un étape pré-analytique qui entraîne de la variabilité. Cependant, une approche permettrait de réunir les avantages de l'exploratoire et du quantitatif tout en limitant les couts et les manipulations supplémentaire : l'ICD (*Isotop Coded Derivatization*).

L'ICD permet de se rapprocher de ce niveau de caractérisation. Cette méthodologie permet de quantifier l'ensemble des molécules dérivées, à condition d'avoir à disposition l'étiquette sous sa forme « légère » (sans marquage isotopique) et sa version « lourde » (isotopiquement marquée). L'ICD est une opportunité pour « atteindre » une exploration quantitative du métabolome. Le BASA doit être étudié sous ce prisme, sachant qu'il existe du Dns-Cl deutérée qui permet donc de produire la version « lourde » du BASA.

Bien que l'ICD permette de s'affranchir des effets matrices en obtenant des étalons internes *in situ*, la quantification n'est pas pour autant absolue. Pour cela il faut avoir accès à une courbe de calibration. Une étiquette marquée isotopiquement d'une seule manière ne suffit pas. Avoir accès à plusieurs isotopologues (molécule dont un ou des atome(s) ont été remplacé par un isotope) d'une étiquette pourrait résoudre le problème. Pour créer des

isotopologues, le principe de l'échange isotopique (HDX, *Hydrogen-Deuterium eXchange*) [444] est déjà utilisé. L'HDX a déjà des applications connues en lien avec la MS [445], en métabolomique et fluxomique [446], pour différencier des isomères, caractériser des structures de xénobiotiques synthétiques ou de « nouvelles » molécules biologiques, étudier les biotransformations subies par un composé. La HDX-MS a été « déclinée » en SIL-MS (*Stable Isotop-Labeled*) pour permettre de la quantification de composés , en utilisant le ^{2}H [447,447], en utilisant du ^{18}O [448] et du ^{13}C [449].

En couplant le principe de l'ICD et de l'HDX et/ou de la SIL, il serait possible d'obtenir plusieurs isotopologues d'une même étiquette. Cependant, en l'état actuel, les manipulations en laboratoire seraient assez lourdes : dériver un QC autant de fois qu'il y a d'isotopologues multiplie les manipulations mais aussi nécessite d'avoir un volume de QC élevé et n'est donc pas compatible avec certaines matrices biologiques. La solution serait d'avoir dans une même solution l'ensemble des isotopologues, dans des proportions précises, afin de pouvoir bâtir une gamme d'étalonnage où chaque point de gamme correspond à une dérivation par un isotopologue. Un tel processus permettrait de s'affranchir de la disponibilité commerciale des étalons internes et des effets matrices, aboutissant à une quantification représentative de l'état biologique. Ce travail est le sujet d'un programme ANR français : ANR-23-CE29-0015 [450], porté par le CEA de Saclay auquel nous sommes associés. Avec cette stratégie, les analyses à haute résolution par spectrométrie de masse deviendront robustes et interopérables.

Pour améliorer les capacités à quantifier le métabolome, la dérivation n'est qu'une des approches possibles et surtout, elle est spécifique à la MS. La RMN est une plateforme qui permet des quantifications robustes mais qui a une sensibilité considérée comme faible par rapport à la GC-MS ou la LC-MS. La d-DNP, qui a été décrite en introduction de thèse, est un gain significatif en sensibilité pour la RMN : d'au moins un ordre 2 avec l'hydrogène et d'au moins un ordre 4 pour le ^{13}C [230,451]. Ce gain de sensibilité n'est pas réservé à l'exploration du métabolome : la quantification reste possible en d-DNP. Grâce à ce gain de sensibilité, en particulier le gain en ^{13}C, il a été possible de quantifier dans l'urine des composés qui ne l'était pas jusqu'ici [452]. La technologie d-DNP reste récente et de nombreux développement sont en cours. Récemment, il a été réalisé en une seule expérimentation d-DNP un spectre ^{1}H et ^{13}C, sans que cela n'impacte la qualité de l'acquisition [453]. Il est donc envisageable de

produire un matériel de référence à base d'un pool d'échantillons biologiques, de le quantifier de manière robuste par d-DNP et d'utiliser cet échantillon en tant que QC pour une analyse par ICD-LC-MS (**Figure 4**).

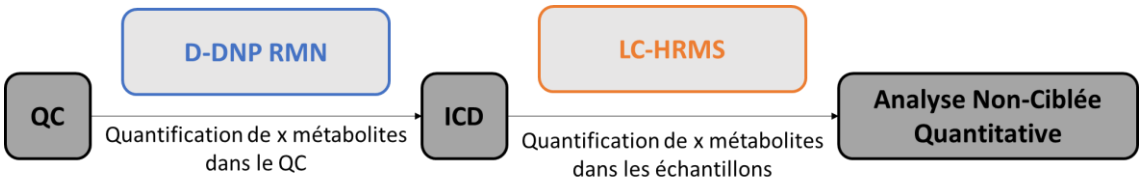


Figure 4 : Analyse multiplateformes et ICD pour atteindre les analyses non-ciblées quantitatives

PARTIE IV :

Conclusion Générale & Perspectives

La métabolomique et la lipidomique permettent d'étudier les systèmes biologiques au niveau moléculaire, avec l'analyse des métabolites et des lipides. Elles ont permis d'approfondir nos connaissances biologiques et d'améliorer notre compréhension de l'impact d'une pathologie, et ses répercussions.

L'intégration de la métabolomique en contexte clinique reste cependant limitée. Les cliniciens ont besoin de données robustes, et à la fois exploratoires et quantitatives. De par leurs avantages et défauts, ni la RMN ni la MS ne permettent à l'heure actuelle d'obtenir ces 3 caractéristiques lors d'une analyse. Une autre problématique est la difficulté que représente une analyse métabolomique. De nombreux champ de connaissances sont nécessaires et de nombreux corps de métier se côtoient pour aboutir à une interprétation biologique de la donnée métabolique : la collecte des échantillons, l'optimisation de la préparation, l'analyse chimique (RMN, GC-MS ou LC-MS), le traitement statistique des données et l'intégration et l'interprétation de ces données dans un ensemble biologique.

Cette thèse de chimie analytique est axée sur les blocs pré-analytique et analytique, avec le développement de méthodes de quantification en métabolomique à visée clinique.

Le prélèvement d'échantillon biologique est une étape primordiale dans le processus d'analyse. Il doit être pertinent par rapport à la pathologie étudiée. Pour être proactif sur l'étude de maladie, des campagnes de recrutement sont lancées. Le grand public n'est pas toujours au rendez-vous, pour plusieurs raisons : le prélèvement d'échantillon n'est pas toujours anodin (caractère invasif), les démarches à suivre (se déplacer sur les lieux une ou plusieurs fois, suivre des indications strictes) ou par manque d'information, que ce soit sur les règles éthiques ou sur l'utilité du don. Finalement, ces problématiques s'appliquent même aux patients malades. Il convient donc de trouver une solution, un type d'échantillon, qui soit à la fois sans ou avec caractère invasif faible, qui soit simple d'utilisation et qui puissent éviter les déplacements. Le sang séché sur buvard (DBS) peut répondre à ces problèmes d'échantillonnage. Par exemple, il est réalisable en autonomie par le patient qui peut l'envoyer par courrier à un laboratoire d'analyse. Les analyses non-ciblée et ciblée, en métabolomique et lipidomique, des DBS a permis de mettre en avant la qualité de l'information biologique contenue. La « qualification » objective de l'information métabolomique et lipidomique des DBS permet d'envisager leur utilisation en contexte

clinique, de par la qualité de l'information, mais aussi en étant compatible avec le besoin en prélèvement qui permettent une haute obtempération de la part du grand public. Les DBS ont une couverture métabolique et lipidique équivalentes à celle du sérum, un échantillon sanguin de référence. Une partie de son information est nouvelle car *via* le sang séché, nous avons accès aux globules rouges. Mais une partie de l'information est perdue car un punch de DBS contient un faible volume d'échantillon, rendant impossible l'analyse des molécules sanguines faiblement concentrées.

Pour améliorer la couverture du métabolome et du lipidome, il est nécessaire de développer de nouvelles technologies ou de nouvelles méthodologies. D'un côté, spectromètres RMN et MS deviennent de plus en plus sensibles, avec la d-DNP RMN ou de nouveaux appareils en LC-MS tel que la technologie « TOF MRT ». Mais ces appareils et technologies sont jeunes et doivent encore être calibrées avant d'être transférables en clinique. Il faut donc coupler à ces nouvelles technologies, de nouvelles méthodologies qui vont permettre une meilleure visualisation et caractérisation des molécules biologiques.

La dérivation est une réaction chimique entre une étiquette chimique (appelée TAG ou *label*) et l'échantillon, comme étape pré-analytique supplémentaire, qui permet de greffer un motif moléculaire (soit la partie isobarique du TAG) sur un ensemble de molécules dérivables. Cette greffe permet à la fois d'introduire des motifs de fragmentations communs (le Dns-Cl est un des meilleur exemple) et spécifiques aux molécules dérivées et d'améliorer leur efficacité d'ionisation, permettant d'accéder à des molécules non-détectables avec les technologies de routine. Certaines étiquettes sont utilisées dans un contexte précis et sont peu versatiles, comme le 3-NPH avec les acides gras ; d'autres, ont justement les capacités inverses, celle de dériver de nombreuses fonctions chimiques, comme le DmPA-Br. L'objectif dans le cas clinique étant d'obtenir une quantification sur le plus grand nombre de molécules possible, il est intéressant de chercher à synthétiser des molécules ayant à la fois les avantages du Dns-Cl et du DmPA-Br. Le BASA est une étiquette chimique synthétisée par l'ICOA d'Orléans, ayant justement ses caractéristiques. Une première évaluation de ses capacités de marquage sur une chimiothèque limitée a permis de mettre en avant de nombreux avantages : des motifs de fragmentations très spécifiques, une versatilité de marquage et surtout, une préférence pour l'ionisation négatives en LC-MS. Le mode NEG mène à des

analyses moins bruitées que le mode POS, ce qui couplé à l'amélioration de l'efficacité d'ionisation, est prometteur pour une étude en milieu biologique.

Pour pérenniser les capacités du BASA, la dérivation isotopique (ICD) semble être une étape toute désignée. La dérivation en parallèle des échantillons par l'étiquette chimique légère (sans enrichissement isotopique) et des contrôles qualité (CQ) par la même étiquette lourde (avec enrichissement isotopique) permettrait d'obtenir des analyses « non-ciblée-quantitatives », nécessaires pour la caractérisation moléculaire de pathologie. Il est aussi possible d'envisager qu'avec l'accès à différents isotopologues d'un même TAG, grâce à des échanges isotopiques Hydrogène/Deutérium par exemple, de dériver le CQ afin d'obtenir des gammes d'étalonnages *in situ*, améliorant la justesse et la reproductibilité des résultats.

La métabolomique reste une science relativement jeune qui est encore en plein essor. Elle a déjà permis de mettre à jour des fonctionnements, des dérèglements et des biomarqueurs de pathologies. En améliorant le nombre d'échantillons/patients analysables lors des campagnes de recrutement, par exemple avec les DBS, et en améliorant notre capacité à quantifier le métabolome, avec une étiquette telle que le BASA couplée à l'ICD ou à des gammes d'étalonnage d'isotopologues, la puissance statistique des analyses *in fine* va être grandement améliorer, transformant la métabolomique à visée clinique en « Métabolomique Clinique » en routine.

BIBLIOGRAPHIE

[1] OMS. « Poser un diagnostic correct, c'est une question de sécurité » : l'OMS met l'accent sur la sécurité du diagnostic lors d'une campagne mondiale sur la sécurité des patientes et patients n.d. https://www.who.int/fr/news/item/17-09-2024-get-it-right-make-it-safe-who-highlights-safe-diagnosis-during-global-campaign-for-patient-safety (accessed October 10, 2024).

[2] webmaster. Accueil. Unité hépatobiliaire et pancréatique de Strasbourg n.d. https://foie-pancreas-strasbourg.eu/ (accessed July 17, 2024).

[3] Froguel P, Bonnefond A. Avancées et promesses de la médecine de précision personnalisée des maladies métaboliques. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 2023;207:199–203. https://doi.org/10.1016/j.banm.2022.11.012.

[4] Bateman S. Médecine personnalisée - Un concept flou, des pratiques diversifiées. Med Sci (Paris) 2014;30:8–13. https://doi.org/10.1051/medsci/201430s202.

[5] Producing personalized statin treatment plans to optimize clinical outcomes using big data and machine learning. Journal of Biomedical Informatics 2022;128:104029. https://doi.org/10.1016/j.jbi.2022.104029.

[6] Golubnitschaja O, Kinkorova J, Costigliola V. Predictive, Preventive and Personalised Medicine as the hardcore of 'Horizon 2020': EPMA position paper. EPMA Journal 2014;5:6. https://doi.org/10.1186/1878-5085-5-6.

[7] Sabot P. Enjeux et limites d'une médecine « *personnalisée* ». Éthique & Santé 2024;21:101–7. https://doi.org/10.1016/j.etiqe.2023.11.004.

[8] Willis JCD, Lord GM. Immune biomarkers: the promises and pitfalls of personalized medicine. Nat Rev Immunol 2015;15:323–9. https://doi.org/10.1038/nri3820.

[9] Drucker E, Krapfenbauer K. Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. EPMA Journal 2013;4:7. https://doi.org/10.1186/1878-5085-4-7.

[10] Carriot N. Caractérisation de la production métabolique de biofilms marins. : Vers une application à l'étude de biofilms complexes in situ. These de doctorat. Toulon, 2022.

[11] Brent R. Genomic Biology. Cell 2000;100:169–83. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81693-1.

[12] Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. Cell 2019;177:70–84. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.032.

[13] Nobrega MA, Pennacchio LA. Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. The Journal of Physiology 2004;554:31–9. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.050948.

[14] Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. WIREs RNA 2017;8:e1364. https://doi.org/10.1002/wrna.1364.

[15] Morozova O, Hirst M, Marra MA. Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. Annual Review of Genomics and Human Genetics 2009;10:135–51. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-145957.

[16] Jiang Z, Zhou X, Li R, Michal JJ, Zhang S, Dodson MV, et al. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. Cell Mol Life Sci 2015;72:3425–39. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1934-y.

[17] Proteomic analysis. Current Opinion in Biotechnology 2000;11:176–9. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00078-1.

[18] Wulfkuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, et al. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. PROTEOMICS 2001;1:1205–15. https://doi.org/10.1002/1615-9861(200110)1:10<1205::AID-PROT1205>3.0.CO;2-X.

[19] Emwas A-HM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. Metabolomics 2013;9:1048–72. https://doi.org/10.1007/s11306-013-0524-y.
[20] KOSTARA C, BAIRAKTARI E, ELISAF M, TSIMIHODIMOS V. NMR-Based Lipidomic Analysis of Red Blood Cells Membranes in Type 2 Diabetes. Diabetes 2018;67:485-P. https://doi.org/10.2337/db18-485-P.
[21] Villas-Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrometry Reviews 2005;24:613–46. https://doi.org/10.1002/mas.20032.
[22] Bhadra S, Rousu J. Analysis of Fluxomic Experiments with Principal Metabolic Flux Mode Analysis. In: Mamitsuka H, editor. Data Mining for Systems Biology: Methods and Protocols, New York, NY: Springer; 2018, p. 141–61. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8561-6_11.
[23] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat Biotechnol 2000;18:1157–61. https://doi.org/10.1038/81137.
[24] van der Greef J, van Wietmarschen H, van Ommen B, Verheij E. Looking back into the future: 30 years of metabolomics at TNO. Mass Spectrometry Reviews 2013;32:399–415. https://doi.org/10.1002/mas.21370.
[25] Williams RJ. Normal Young Men. Perspectives in Biology and Medicine 1957;1:97–104. https://doi.org/10.1353/pbm.1957.0001.
[26] Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography. PNAS 1971;68:2374–6. https://doi.org/10.1073/pnas.68.10.2374.
[27] Nicholson JK, O'Flynn MP, Sadler PJ, Macleod AF, Juul SM, Sönksen PH. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. Biochemical Journal 1984;217:365–75. https://doi.org/10.1042/bj2170365.
[28] Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. Trends in Biotechnology 1998;16:373–8. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1.
[29] Zhao S, Li H, Han W, Chan W, Li L. Metabolomic Coverage of Chemical-Group-Submetabolome Analysis: Group Classification and Four-Channel Chemical Isotope Labeling LC-MS. Anal Chem 2019;91:12108–15. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03431.
[30] Idle JR, Gonzalez FJ. Metabolomics. Cell Metabolism 2007;6:348–51. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.005.
[31] Wishart DS. Advances in metabolite identification. Http://DxDoiOrg/104155/Bio11155 2011. https://doi.org/10.4155/bio.11.155.
[32] Bino RJ, Hall RD, Fiehn O, Kopka J, Saito K, Draper J, et al. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. Trends in Plant Science 2004;9:418–25. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.004.
[33] Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, Darzi AW, Takats Z, Lindon JC. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. Nature 2012;491:384–92. https://doi.org/10.1038/nature11708.
[34] Dixon RA, Gang DR, Charlton AJ, Fiehn O, Kuiper HA, Reynolds TL, et al. Applications of Metabolomics in Agriculture. J Agric Food Chem 2006;54:8984–94. https://doi.org/10.1021/jf061218t.
[35] Miller MG. Environmental Metabolomics: A SWOT Analysis (Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats). J Proteome Res 2007;6:540–5. https://doi.org/10.1021/pr060623x.
[36] Gibney MJ, Walsh M, Brennan L, Roche HM, German B, van Ommen B. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges2. The American Journal of Clinical Nutrition 2005;82:497–503. https://doi.org/10.1093/ajcn.82.3.497.
[37] Alseekh S, Aharoni A, Brotman Y, Contrepois K, D'Auria J, Ewald J, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. Nat Methods 2021;18:747–56. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1.

[38] Frainay C, Schymanski EL, Neumann S, Merlet B, Salek RM, Jourdan F, et al. Mind the Gap: Mapping Mass Spectral Databases in Genome-Scale Metabolic Networks Reveals Poorly Covered Areas. Metabolites 2018;8:51. https://doi.org/10.3390/metabo8030051.
[39] Roca M, Alcoriza MI, Garcia-Cañaveras JC, Lahoz A. Reviewing the metabolome coverage provided by LC-MS: Focus on sample preparation and chromatography-A tutorial. Analytica Chimica Acta 2021;1147:38–55. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.025.
[40] Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Research 2007;35:D521–6. https://doi.org/10.1093/nar/gkl923.
[41] Forshed J, Stolt R, Idborg H, Jacobsson SP. Enhanced multivariate analysis by correlation scaling and fusion of LC/MS and 1H NMR data. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 2007;85:179–85. https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2006.06.012.
[42] Bertrand S, Azzollini A, Nievergelt A, Boccard J, Rudaz S, Cuendet M, et al. Statistical Correlations between HPLC Activity-Based Profiling Results and NMR/MS Microfraction Data to Deconvolute Bioactive Compounds in Mixtures. Molecules 2016;21:259. https://doi.org/10.3390/molecules21030259.
[43] Boiteau RM, Hoyt DW, Nicora CD, Kinmonth-Schultz HA, Ward JK, Bingol K. Structure Elucidation of Unknown Metabolites in Metabolomics by Combined NMR and MS/MS Prediction. Metabolites 2018;8:8. https://doi.org/10.3390/metabo8010008.
[44] Johnson CH, Ivanisevic J, Benton HP, Siuzdak G. Bioinformatics: The Next Frontier of Metabolomics. Anal Chem 2015;87:147–56. https://doi.org/10.1021/ac5040693.
[45] Marco-Ramell A, Palau-Rodriguez M, Alay A, Tulipani S, Urpi-Sarda M, Sanchez-Pla A, et al. Evaluation and comparison of bioinformatic tools for the enrichment analysis of metabolomics data. BMC Bioinformatics 2018;19:1. https://doi.org/10.1186/s12859-017-2006-0.
[46] Gardinassi LG, Xia J, Safo SE, Li S. Bioinformatics Tools for the Interpretation of Metabolomics Data. Curr Pharmacol Rep 2017;3:374–83. https://doi.org/10.1007/s40495-017-0107-0.
[47] Reel PS, Reel S, Pearson E, Trucco E, Jefferson E. Using machine learning approaches for multi-omics data analysis: A review. Biotechnology Advances 2021;49:107739. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107739.
[48] Wörheide MA, Krumsiek J, Kastenmüller G, Arnold M. Multi-omics integration in biomedical research – A metabolomics-centric review. Analytica Chimica Acta 2021;1141:144–62. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.10.038.
[49] Ashrafian H, Sounderajah V, Glen R, Ebbels T, Blaise BJ, Kalra D, et al. Metabolomics: The Stethoscope for the Twenty-First Century. Med Princ Pract 2021;30:301–10. https://doi.org/10.1159/000513545.
[50] Patel MK, Pandey S, Kumar M, Haque MI, Pal S, Yadav NS. Plants Metabolome Study: Emerging Tools and Techniques. Plants (Basel) 2021;10:2409. https://doi.org/10.3390/plants10112409.
[51] Villate A, San Nicolas M, Gallastegi M, Aulas P-A, Olivares M, Usobiaga A, et al. Review: Metabolomics as a prediction tool for plants performance under environmental stress. Plant Science 2021;303:110789. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110789.
[52] Tsugawa H, Rai A, Saito K, Nakabayashi R. Metabolomics and complementary techniques to investigate the plant phytochemical cosmos. Nat Prod Rep 2021;38:1729–59. https://doi.org/10.1039/D1NP00014D.
[53] Tomonaga S, editor. Metabolomic Applications in Animal Science. MDPI - Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020. https://doi.org/10.3390/books978-3-03943-648-4.
[54] Patil YP, Mohite SD, Giri AP, Joshi RP. Insect metabolome: New paradigm of novel metabolites discovery and its potential applications. New Horizons in Natural Compound Research, Academic Press; 2023, p. 293–314. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15232-0.00007-2.
[55] Snart CJP, Hardy ICW, Barrett DA. Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. Entomol Exp Appl 2015;155:1–17. https://doi.org/10.1111/eea.12281.

[56] Martin C, Verheggen F. All equal in the face of death! – Characterization of the volatile cadaveric compounds of fresh stage human corpses. Forensic Chemistry 2023;35:100516. https://doi.org/10.1016/j.forc.2023.100516.
[57] Jones OAH, Maguire ML, Griffin JL, Dias DA, Spurgeon DJ, Svendsen C. Metabolomics and its use in ecology. Austral Ecology 2013;38:713–20. https://doi.org/10.1111/aec.12019.
[58] Amato P, Besaury L, Joly M, Penaud B, Deguillaume L, Delort A-M. Metatranscriptomic exploration of microbial functioning in clouds. Sci Rep 2019;9:4383. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41032-4.
[59] Gougeon L, Da Costa G, Le Mao I, Ma W, Teissedre P-L, Guyon F, et al. Wine Analysis and Authenticity Using 1H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines. Food Anal Methods 2018;11:3425–34. https://doi.org/10.1007/s12161-018-1310-2.
[60] Tumas J, Kvederaviciute K, Petrulionis M, Kurlinkus B, Rimkus A, Sakalauskaite G, et al. Metabolomics in pancreatic cancer biomarkers research. Med Oncol 2016;33:133. https://doi.org/10.1007/s12032-016-0853-6.
[61] Zhang T, Wu X, Ke C, Yin M, Li Z, Fan L, et al. Identification of Potential Biomarkers for Ovarian Cancer by Urinary Metabolomic Profiling. J Proteome Res 2013;12:505–12. https://doi.org/10.1021/pr3009572.
[62] Kelly RS, Vander Heiden MG, Giovannucci E, Mucci LA. Metabolomic Biomarkers of Prostate Cancer: Prediction, Diagnosis, Progression, Prognosis, and Recurrence. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 2016;25:887–906. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-1223.
[63] Long J, Yang Z, Wang L, Han Y, Peng C, Yan C, et al. Metabolite biomarkers of type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: a systematic review and meta-analysis. BMC Endocr Disord 2020;20:174. https://doi.org/10.1186/s12902-020-00653-x.
[64] Filla LA, Edwards JL. Metabolomics in diabetic complications. Mol BioSyst 2016;12:1090–105. https://doi.org/10.1039/C6MB00014B.
[65] Menni C, Fauman E, Erte I, Perry JRB, Kastenmüller G, Shin S-Y, et al. Biomarkers for Type 2 Diabetes and Impaired Fasting Glucose Using a Nontargeted Metabolomics Approach. Diabetes 2013;62:4270–6. https://doi.org/10.2337/db13-0570.
[66] Han W, Sapkota S, Camicioli R, Dixon RA, Li L. Profiling novel metabolic biomarkers for Parkinson's disease using in-depth metabolomic analysis. Movement Disorders 2017;32:1720–8. https://doi.org/10.1002/mds.27173.
[67] Bogdanov M, Matson WR, Wang L, Matson T, Saunders-Pullman R, Bressman SS, et al. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease. Brain 2008;131:389–96. https://doi.org/10.1093/brain/awm304.
[68] LeWitt PA, Li J, Lu M, Guo L, Auinger P, On behalf of the Parkinson Study Group–DATATOP Investigators. Metabolomic biomarkers as strong correlates of Parkinson disease progression. Neurology 2017;88:862–9. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003663.
[69] Kang J, Lu J, Zhang X. Metabolomics-based promising candidate biomarkers and pathways in Alzheimer's disease. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences 2015;70:277–82. https://doi.org/10.1691/ph.2015.4859.
[70] Wilkins JM, Trushina E. Application of Metabolomics in Alzheimer's Disease. Front Neurol 2018;8. https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00719.
[71] Lin C-N, Huang C-C, Huang K-L, Lin K-J, Yen T-C, Kuo H-C. A metabolomic approach to identifying biomarkers in blood of Alzheimer's disease. Annals of Clinical and Translational Neurology 2019;6:537–45. https://doi.org/10.1002/acn3.726.
[72] Kumar A, Ghosh D, Singh RL. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Metabolomics: Clinical Implication and Therapeutic Approach. Journal of Biomarkers 2013;2013:538765. https://doi.org/10.1155/2013/538765.
[73] Blasco H, Nadal-Desbarats L, Pradat P-F, Gordon PH, Madji Hounoum B, Patin F, et al. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: combining metabolomic and clinical parameters to define disease progression. European Journal of Neurology 2016;23:346–53. https://doi.org/10.1111/ene.12851.

[74] Blasco H, Patin F, Descat A, Garçon G, Corcia P, Gelé P, et al. A pharmaco-metabolomics approach in a clinical trial of ALS: Identification of predictive markers of progression. PLOS ONE 2018;13:e0198116. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198116.
[75] Gowda GN, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. Expert Review of Molecular Diagnostics 2008;8:617–33. https://doi.org/10.1586/14737159.8.5.617.
[76] Pereira PR, Carrageta DF, Oliveira PF, Rodrigues A, Alves MG, Monteiro MP. Metabolomics as a tool for the early diagnosis and prognosis of diabetic kidney disease n.d. https://doi.org/10.1002/med.21883.
[77] Lanznaster D, de Assis DR, Corcia P, Pradat P-F, Blasco H. Frontiers | Metabolomics Biomarkers: A Strategy Toward Therapeutics Improvement in ALS n.d. https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01126.
[78] Sun Y, Kong L, Zhang A-H, Han Y, Sun H, Yan G-L, et al. Frontiers | A Hypothesis From Metabolomics Analysis of Diabetic Retinopathy: Arginine-Creatine Metabolic Pathway May Be a New Treatment Strategy for Diabetic Retinopathy n.d. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.858012.
[79] Antunes LCM, Han J, Ferreira RBR, Lolić P, Borchers CH, Finlay BB. Effect of Antibiotic Treatment on the Intestinal Metabolome. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2011;55:1494–503. https://doi.org/10.1128/aac.01664-10.
[80] Pu J, Liu Y, Gui S, Tian L, Yu Y, Wang D, et al. Effects of pharmacological treatment on metabolomic alterations in animal models of depression. Transl Psychiatry 2022;12:1–10. https://doi.org/10.1038/s41398-022-01947-5.
[81] Lan K, Xie G, Jia W. Towards Polypharmacokinetics: Pharmacokinetics of Multicomponent Drugs and Herbal Medicines Using a Metabolomics Approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013;2013:819147. https://doi.org/10.1155/2013/819147.
[82] Lan K, Jia W. An Integrated Metabolomics and Pharmacokinetics Strategy for Multi-Component Drugs Evaluation. Current Drug Metabolism 2010;11:105–14. https://doi.org/10.2174/138920010791110926.
[83] Bedia C. Metabolomics in environmental toxicology: Applications and challenges. Trends in Environmental Analytical Chemistry 2022;34:e00161. https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00161.
[84] Deng P, Li X, Petriello MC, Wang C, Morris AJ, Hennig B. Application of metabolomics to characterize environmental pollutant toxicity and disease risks. Reviews on Environmental Health 2019;34:251–9. https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0030.
[85] Bonvallot N, David A, Chalmel F, Chevrier C, Cordier S, Cravedi J-P, et al. Metabolomics as a powerful tool to decipher the biological effects of environmental contaminants in humans. Current Opinion in Toxicology 2018;8:48–56. https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.12.007.
[86] Gallagher K, Catesson A, Griffin JL, Holmes E, Williams HRT. Metabolomic Analysis in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. Journal of Crohn's and Colitis 2021;15:813–26. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa227.
[87] Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. Frontiers in Microbiology 2016;7:1144. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01144.
[88] Martin F-P, Collino S, Rezzi S, Kochhar S. Metabolomic Applications to Decipher Gut Microbial Metabolic Influence in Health and Disease. Front Physiol 2012;3. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00113.
[89] Baraldi E, Carraro S, Giordano G, Reniero F, Perilongo G, Zacchello F. Metabolomics: moving towards personalized medicine. Ital J Pediatr 2009;35:30. https://doi.org/10.1186/1824-7288-35-30.
[90] Jacob M, Lopata AL, Dasouki M, Abdel Rahman AM. Metabolomics toward personalized medicine. Mass Spectrometry Reviews 2019;38:221–38. https://doi.org/10.1002/mas.21548.

[91] Trivedi DK, Hollywood KA, Goodacre R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. New Horizons in Translational Medicine 2017;3:294. https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2017.06.001.
[92] Zhang X, Li Q, Xu Z, Dou J. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: a systematic review. RSC Advances 2020;10:3092–104. https://doi.org/10.1039/C9RA08985C.
[93] Han W, Li L. Evaluating and minimizing batch effects in metabolomics. Mass Spectrometry Reviews 2022;41:421–42. https://doi.org/10.1002/mas.21672.
[94] Bosman P, Pichon V, Acevedo AC, Chardin H, Combes A. Development of analytical methods to study the salivary metabolome: impact of the sampling. Anal Bioanal Chem 2022;414:6899–909. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04255-5.
[95] Gika HG, Theodoridis GA, Wingate JE, Wilson ID. Within-Day Reproducibility of an HPLC−MS-Based Method for Metabonomic Analysis: Application to Human Urine. J Proteome Res 2007;6:3291–303. https://doi.org/10.1021/pr070183p.
[96] Stevens VL, Hoover E, Wang Y, Zanetti KA. Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. Metabolites 2019;9:156. https://doi.org/10.3390/metabo9080156.
[97] Duportet X, Aggio RBM, Carneiro S, Villas-Bôas SG. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. Metabolomics 2012;8:410–21. https://doi.org/10.1007/s11306-011-0324-1.
[98] Fonseca TAH, Von Rekowski CP, Araújo R, Oliveira MC, Justino GC, Bento L, et al. The Impact of the Serum Extraction Protocol on Metabolomic Profiling Using UPLC-MS/MS and FTIR Spectroscopy. ACS Omega 2023;8:20755–66. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01370.
[99] Ejigu BA, Valkenborg D, Baggerman G, Vanaerschot M, Witters E, Dujardin J-C, et al. Evaluation of Normalization Methods to Pave the Way Towards Large-Scale LC-MS-Based Metabolomics Profiling Experiments. OMICS: A Journal of Integrative Biology 2013;17:473–85. https://doi.org/10.1089/omi.2013.0010.
[100] Kohl SM, Klein MS, Hochrein J, Oefner PJ, Spang R, Gronwald W. State-of-the art data normalization methods improve NMR-based metabolomic analysis. Metabolomics 2012;8:146–60. https://doi.org/10.1007/s11306-011-0350-z.
[101] Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. J Am Soc Mass Spectrom 2016;27:1897–905. https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y.
[102] Kennedy AD, Wittmann BM, Evans AM, Miller LAD, Toal DR, Lonergan S, et al. Metabolomics in the clinic: A review of the shared and unique features of untargeted metabolomics for clinical research and clinical testing. Journal of Mass Spectrometry 2018;53:1143–54. https://doi.org/10.1002/jms.4292.
[103] Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). Metabolomics 2007;3:211–21. https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2.
[104] Rathahao-Paris E, Alves S, Junot C, Tabet J-C. High resolution mass spectrometry for structural identification of metabolites in metabolomics. Metabolomics 2015;12:10. https://doi.org/10.1007/s11306-015-0882-8.
[105] Kohler I, Verhoeven A, Derks RJ, Giera M. Analytical pitfalls and challenges in clinical metabolomics. Bioanalysis 2016;8:1509–32. https://doi.org/10.4155/bio-2016-0090.
[106] Zhan X. Metabolomics: Methodology and Applications in Medical Sciences and Life Sciences. BoD – Books on Demand; 2021.
[107] Zhou J, Yin Y. Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. Analyst 2016;141:6362–73. https://doi.org/10.1039/C6AN01753C.

[108] Cajka T, Hricko J, Rudl Kulhava L, Paucova M, Novakova M, Fiehn O, et al. Exploring the Impact of Organic Solvent Quality and Unusual Adduct Formation during LC-MS-Based Lipidomic Profiling. Metabolites 2023;13:966. https://doi.org/10.3390/metabo13090966.
[109] Wei Y, Jasbi P, Shi X, Turner C, Hrovat J, Liu L, et al. Early Breast Cancer Detection Using Untargeted and Targeted Metabolomics. J Proteome Res 2021;20:3124–33. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00019.
[110] Baek J, He C, Afshinnia F, Michailidis G, Pennathur S. Lipidomic approaches to dissect dysregulated lipid metabolism in kidney disease. Nat Rev Nephrol 2022;18:38–55. https://doi.org/10.1038/s41581-021-00488-2.
[111] Roberts LD, McCombie G, Titman CM, Griffin JL. A matter of fat: An introduction to lipidomic profiling methods. Journal of Chromatography B 2008;871:174–81. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.002.
[112] Vance DE, Vance JE. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier; 1996.
[113] Anand PK. Lipids, inflammasomes, metabolism, and disease. Immunological Reviews 2020;297:108–22. https://doi.org/10.1111/imr.12891.
[114] Varela-López A, Giampieri F, Bullón P, Battino M, Quiles JL. Role of Lipids in the Onset, Progression and Treatment of Periodontal Disease. A Systematic Review of Studies in Humans. International Journal of Molecular Sciences 2016;17:1202. https://doi.org/10.3390/ijms17081202.
[115] Stability of lipids in plasma and serum: Effects of temperature-related storage conditions on the human lipidome n.d. https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2021.10.002.
[116] Vieira SA, Zhang G, Decker EA. Biological Implications of Lipid Oxidation Products. Journal of the American Oil Chemists' Society 2017;94:339–51. https://doi.org/10.1007/s11746-017-2958-2.
[117] Villaseñor A. Analytical approaches for studying oxygenated lipids in the search of potential biomarkers by LC-MS 2021.
[118] Creek DJ, Dunn WB, Fiehn O, Griffin JL, Hall RD, Lei Z, et al. Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence? Metabolomics 2014;10:350–3. https://doi.org/10.1007/s11306-014-0656-8.
[119] Rochat B. Proposed Confidence Scale and ID Score in the Identification of Known-Unknown Compounds Using High Resolution MS Data. J Am Soc Mass Spectrom 2017;28:709–23. https://doi.org/10.1007/s13361-016-1556-0.
[120] Postle AD. Lipidomics : Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care n.d.
[121] Wood PL. Lipidomics of Alzheimer's disease: current status. Alzheimer's Research & Therapy 2012;4:1–10. https://doi.org/10.1186/alzrt103.
[122] Ding M, Rexrode KM. A Review of Lipidomics of Cardiovascular Disease Highlights the Importance of Isolating Lipoproteins. Metabolites 2020;10:163. https://doi.org/10.3390/metabo10040163.
[123] Zhao Y-Y, Nosratola D. V, Lin R-C. Chapter Six - Lipidomics: New Insight Into Kidney Disease. Advances in Clinical Chemistry, n.d. https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.002.
[124] Coumoul X. Exposome : concepts et ambitions. Environnement, Risques & Santé 2023;22:287–91. https://doi.org/10.1684/ers.2023.1742.
[125] Ecole des Hautes Etudes de Santé Publique de Rennes. L'Exposome | Ecole des hautes études en santé publique (EHESP) n.d. https://www.ehesp.fr/recherche/domaines-et-champs-de-recherche/exposome/ (accessed January 10, 2025).
[126] Motairek I, Makhlouf MHE, Rajagopalan S, Al-Kindi S. The Exposome and Cardiovascular Health. Canadian Journal of Cardiology 2023;39:1191–203. https://doi.org/10.1016/j.cjca.2023.05.020.
[127] Barouki R, Samson M, Blanc EB, Colombo M, Zucman-Rossi J, Lazaridis KN, et al. The exposome and liver disease - how environmental factors affect liver health. J Hepatol 2023;79:492–505. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.02.034.

[128] Lefèvre-Arbogast S, J C, F M, R B, X C, Gw M, et al. Assessing the contribution of the chemical exposome to neurodegenerative disease. Nature Neuroscience 2024;27. https://doi.org/10.1038/s41593-024-01627-1.
[129] Sun J, Fang R, Wang H, Xu D-X, Yang J, Huang X, et al. A review of environmental metabolism disrupting chemicals and effect biomarkers associating disease risks: Where exposomics meets metabolomics. Environment International 2022;158:106941. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106941.
[130] González-Domínguez R, Jáuregui O, Queipo-Ortuño MI, Andrés-Lacueva C. Characterization of the Human Exposome by a Comprehensive and Quantitative Large-Scale Multianalyte Metabolomics Platform. Anal Chem 2020;92:13767–75. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02008.
[131] Flasch M, Fitz V, Rampler E, Ezekiel CN, Koellensperger G, Warth B. Integrated Exposomics/Metabolomics for Rapid Exposure and Effect Analyses. JACS Au 2022;2:2548–60. https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00433.
[132] Hou K, Wu Z-X, Chen X-Y, Wang J-Q, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. Sig Transduct Target Ther 2022;7:1–28. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4.
[133] Neveu V, Nicolas G, Amara A, Salek RM, Scalbert A. The human microbial exposome: expanding the Exposome-Explorer database with gut microbial metabolites. Sci Rep 2023;13:1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-022-26366-w.
[134] Merra G, Gualtieri P, La Placa G, Frank G, Della Morte D, De Lorenzo A, et al. The Relationship between Exposome and Microbiome. Microorganisms 2024;12:1386. https://doi.org/10.3390/microorganisms12071386.
[135] Walker DI, Valvi D, Rothman N, Lan Q, Miller GW, Jones DP. The metabolome: A key measure for exposome research in epidemiology. Curr Epidemiol Rep 2019;6:93–103.
[136] Li X, Niu H, Huang Z, Zhang M, Xing M, Chen Z, et al. Deciphering the Role of the Gut Microbiota in Exposure to Emerging Contaminants and Diabetes: A Review. Metabolites 2024;14:108. https://doi.org/10.3390/metabo14020108.
[137] FLEXiGUT: Rationale for exposomics associations with chronic low-grade gut inflammation. Environment International 2022;158:106906. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106906.
[138] Vashi N, Justice MJ. Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies. Mamm Genome 2019;30:90–110. https://doi.org/10.1007/s00335-019-09793-5.
[139] Ou L, Przybilla MJ, Whitley CB. Metabolomics profiling reveals profound metabolic impairments in mice and patients with Sandhoff disease. Molecular Genetics and Metabolism 2019;126:151–6. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.09.005.
[140] Jia J, Zhang H, Liang X, Dai Y, Liu L, Tan K, et al. Application of Metabolomics to the Discovery of Biomarkers for Ischemic Stroke in the Murine Model: a Comparison with the Clinical Results. Mol Neurobiol 2021;58:6415–26. https://doi.org/10.1007/s12035-021-02535-2.
[141] Hurtado MO, Kohler I, de Lange ECM. Next-Generation Biomarker Discovery in Alzheimer's Disease Using Metabolomics – from Animal to Human Studies. Bioanalysis 2018;10:1525–46. https://doi.org/10.4155/bio-2018-0135.
[142] Kuick R, Misek DE, Monsma DJ, Webb CP, Wang H, Peterson KJ, et al. Discovery of cancer biomarkers through the use of mouse models. Cancer Letters 2007;249:40–8. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.032.
[143] Bissig K-D, Wieland SF, Tran P, Isogawa M, Le TT, Chisari FV, et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. J Clin Invest 2010;120:924–30. https://doi.org/10.1172/JCI40094.
[144] Armitage EG, Southam AD. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. Metabolomics 2016;12:146. https://doi.org/10.1007/s11306-016-1093-7.
[145] Rodrigues C. Posology optimization of antiepileptic drugs in children using adult and pediatric pharmacokinetic data | Policy Commons n.d.

[146] Mitchell BL, Yasui Y, Li CI, Fitzpatrick AL, Lampe PD. Impact of Freeze-thaw Cycles and Storage Time on Plasma Samples Used in Mass Spectrometry Based Biomarker Discovery Projects. Cancer Inform 2005;1:117693510500100110. https://doi.org/10.1177/117693510500100110.
[147] Ji X, Wang M, Li L, Chen F, Zhang Y, Li Q, et al. The Impact of Repeated Freeze–Thaw Cycles on the Quality of Biomolecules in Four Different Tissues. Biopreservation and Biobanking 2017;15:475–83. https://doi.org/10.1089/bio.2017.0064.
[148] Pal VK, Kannan K. Stability of volatile organic compound metabolites in urine at various storage temperatures and freeze-thaw cycles for 8 months. Environmental Pollution 2024;345:123493. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123493.
[149] Kozikowski BA, Burt TM, Tirey DA, Williams LE, Kuzmak BR, Stanton DT, et al. The Effect of Freeze/Thaw Cycles on the Stability of Compounds in DMSO. SLAS Discovery 2003;8:210–5. https://doi.org/10.1177/1087057103252618.
[150] Pinto J, Domingues MRM, Galhano E, Pita C, Almeida M do C, Carreira IM, et al. Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. Analyst 2014;139:1168–77. https://doi.org/10.1039/C3AN02188B.
[151] Chen D, Han W, Huan T, Li L, Li L. Effects of Freeze–Thaw Cycles of Blood Samples on High-Coverage Quantitative Metabolomics. Anal Chem 2020;92:9265–72. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01610.
[152] Chen D, Chan W, Zhao S, Li L, Li L. High-Coverage Quantitative Metabolomics of Human Urine: Effects of Freeze–Thaw Cycles on the Urine Metabolome and Biomarker Discovery. Anal Chem 2022;94:9880–7. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01816.
[153] Stevens VL, Hoover E, Wang Y, Zanetti KA. Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. Metabolites 2019;9:156. https://doi.org/10.3390/metabo9080156.
[154] The Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium, Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Nat Protoc 2011;6:1060–83. https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335.
[155] Duportet X, Aggio RBM, Carneiro S, Villas-Bôas SG. The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. Metabolomics 2012;8:410–21. https://doi.org/10.1007/s11306-011-0324-1.
[156] Wong MWK, Braidy N, Pickford R, Sachdev PS, Poljak A. Comparison of Single Phase and Biphasic Extraction Protocols for Lipidomic Studies Using Human Plasma. Front Neurol 2019;10. https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00879.
[157] Want EJ, O'Maille G, Smith CA, Brandon TR, Uritboonthai W, Qin C, et al. Solvent-Dependent Metabolite Distribution, Clustering, and Protein Extraction for Serum Profiling with Mass Spectrometry. Anal Chem 2006;78:743–52. https://doi.org/10.1021/ac051312t.
[158] Lee DY, Kind T, Yoon Y-R, Fiehn O, Liu K-H. Comparative evaluation of extraction methods for simultaneous mass-spectrometric analysis of complex lipids and primary metabolites from human blood plasma. Anal Bioanal Chem 2014;406:7275–86. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8124-x.
[159] Rico E, González O, Blanco ME, Alonso RM. Evaluation of human plasma sample preparation protocols for untargeted metabolic profiles analyzed by UHPLC-ESI-TOF-MS. Anal Bioanal Chem 2014;406:7641–52. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8212-y.
[160] DGOS. Programme national de dépistage néonatal. Ministère du travail, de la santé et des solidarités n.d. https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/maladies-rares/DNN (accessed September 11, 2024).
[161] Munck A, Gauthereau V, Czernichow P. Organisation du dépistage néonatal en France. Med Sci (Paris) 2021;37:457–60. https://doi.org/10.1051/medsci/2021063.
[162] CNCDN - Centre National de Coordination de Dépistage Néonatal. CNCDN - Centre National de Coordination de Dépistage Néonatal n.d. https://depistage-neonatal.fr/ (accessed October 10, 2024).

[163] Hewawasam E, Liu G, Jeffery DW, Gibson RA, Muhlhausler BS. Estimation of the Volume of Blood in a Small Disc Punched From a Dried Blood Spot Card. European Journal of Lipid Science and Technology 2018;120:1700362. https://doi.org/10.1002/ejlt.201700362.
[164] Li F, Zulkoski J, Fast D, Michael S. Perforated Dried Blood Spots: A Novel Format for Accurate Microsampling. Bioanalysis 2011;3:2321–33. https://doi.org/10.4155/bio.11.219.
[165] Kojima A, Nishitani Y, Sato M, Kageyama S, Dohi M, Okano M. Comparison of urine analysis and dried blood spot analysis for the detection of ephedrine and methylephedrine in doping control. Drug Testing and Analysis 2016;8:189–98. https://doi.org/10.1002/dta.1803.
[166] Siebenhaar M, Küllmer K, de Barros Fernandes NM, Hüllen V, Hopf C. Personalized monitoring of therapeutic salicylic acid in dried blood spots using a three-layer setup and desorption electrospray ionization mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 2015;407:7229–38. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8887-8.
[167] Mainero Rocca L, L'Episcopo N, Gordiani A, Staderini A. Direct multiclass desorption electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for the analysis of sleep inducers and ototoxic drugs in dried blood spots. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2022;36:e9265. https://doi.org/10.1002/rcm.9265.
[168] Martial LC, Aarnoutse RE, Mulder M, Schellekens A, Brüggemann RJM, Burger DM, et al. Dried Blood Spot sampling in psychiatry: Perspectives for improving therapeutic drug monitoring. European Neuropsychopharmacology 2017;27:205–16. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.01.009.
[169] McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. Demography 2007;44:899–925. https://doi.org/10.1353/dem.2007.0038.
[170] Sebaa R, AlMogren M, Alseraty W, Abdel Rahman AM. Untargeted Metabolomics Identifies Biomarkers for MCADD Neonates in Dried Blood Spots. International Journal of Molecular Sciences 2023;24:9657. https://doi.org/10.3390/ijms24119657.
[171] Massaro AN, Wu YW, Bammler TK, MacDonald JW, Mathur A, Chang T, et al. Dried blood spot compared to plasma measurements of blood-based biomarkers of brain injury in neonatal encephalopathy. Pediatr Res 2019;85:655–61. https://doi.org/10.1038/s41390-019-0298-7.
[172] Barr DB, Kannan K, Cui Y, Merrill L, Petrick LM, Meeker JD, et al. The use of dried blood spots for characterizing children's exposure to organic environmental chemicals. Environmental Research 2021;195:110796. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110796.
[173] l'Assurance Maladie. Comment se préparer à l'ECBU et lire ses résultats ? n.d. https://www.ameli.fr/pau/assure/sante/examen/analyse/preparer-ecbu-lire-resultats (accessed September 21, 2024).
[174] CHU Montréal. Test d'urine : Collecte de 24 heures : Analyse du cortisol ou de l'oxalate | CHUM n.d. https://www.chumontreal.qc.ca/fiches-sante/test-durine-collecte-24-heures-analyse-cortisol-ou-loxalate (accessed September 21, 2024).
[175] Fernández-Peralbo MA, Luque de Castro MD. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2012;41:75–85. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.011.
[176] Olivier C, Allen B, Luies L. Optimising a urinary extraction method for non-targeted GC–MS metabolomics. Sci Rep 2023;13:17591. https://doi.org/10.1038/s41598-023-44690-7.
[177] Cook JD, Strauss KA, Caplan YH, LoDico CP, Bush DM. Urine pH: the Effects of Time and Temperature after Collection*. Journal of Analytical Toxicology 2007;31:486–96. https://doi.org/10.1093/jat/31.8.486.
[178] Aslan G, Afsar B, Sag AA, Camkiran V, Erden N, Yilmaz S, et al. The Effect of Urine pH and Urinary Uric Acid Levels on the Development of Contrast Nephropathy. Kidney and Blood Pressure Research 2019;45:131–41. https://doi.org/10.1159/000504547.
[179] Vree TB, Hekster YA, Hafkenscheid JCM, van Dalen R, Friesen WT, Roy M. The Influence of Urine Flow on Renal Clearance of Creatinine in Patients with Normal and Impaired Kidney

Function. Drug Intelligence & Clinical Pharmacy 1981;15:194–8. https://doi.org/10.1177/106002808101500305.
[180] Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2012;41:75–85. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.011.
[181] Gardner A, Carpenter G, So P-W. Salivary Metabolomics: From Diagnostic Biomarker Discovery to Investigating Biological Function. Metabolites 2020;10:47. https://doi.org/10.3390/metabo10020047.
[182] Hyvärinen E, Savolainen M, Mikkonen JJW, Kullaa AM. Salivary Metabolomics for Diagnosis and Monitoring Diseases: Challenges and Possibilities. Metabolites 2021;11:587. https://doi.org/10.3390/metabo11090587.
[183] Quintana M, Palicki O, Lucchi G, Ducoroy P, Chambon C, Salles C, et al. Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. Journal of Proteomics 2009;72:822–30. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.05.004.
[184] Alajbeg IZ, Lapić I, Rogić D, Vuletić L, Andabak Rogulj A, Illeš D, et al. Within-Subject Reliability and between-Subject Variability of Oxidative Stress Markers in Saliva of Healthy Subjects: A Longitudinal Pilot Study. Disease Markers 2017;2017:2697464. https://doi.org/10.1155/2017/2697464.
[185] Bellagambi FG, Lomonaco T, Salvo P, Vivaldi F, Hangouët M, Ghimenti S, et al. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2020;124:115781. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115781.
[186] Gardner A, Parkes HG, Carpenter GH, So P-W. Developing and Standardizing a Protocol for Quantitative Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR) Spectroscopy of Saliva. J Proteome Res 2018;17:1521–31. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00847.
[187] Dame ZT, Aziat F, Mandal R, Krishnamurthy R, Bouatra S, Borzouie S, et al. The human saliva metabolome. Metabolomics 2015;11:1864–83. https://doi.org/10.1007/s11306-015-0840-5.
[188] Aro K, Kaczor-Urbanowicz K, Carreras-Presas CM. Salivaomics in oral cancer. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery 2019;27:91. https://doi.org/10.1097/MOO.0000000000000502.
[189] Panyard DJ, Kim KM, Darst BF, Deming YK, Zhong X, Wu Y, et al. Cerebrospinal fluid metabolomics identifies 19 brain-related phenotype associations. Commun Biol 2021;4:1–11. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01583-z.
[190] Yan J, Kuzhiumparambil U, Bandodkar S, Dale RC, Fu S. Cerebrospinal fluid metabolomics: detection of neuroinflammation in human central nervous system disease. Clinical & Translational Immunology 2021;10:e1318. https://doi.org/10.1002/cti2.1318.
[191] Niemantsverdriet E, Struyfs H, Duits F, Teunissen CE, Engelborghs S. Techniques, Contraindications, and Complications of CSF Collection Procedures. In: Deisenhammer F, Sellebjerg F, Teunissen CE, Tumani H, editors. Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology, Cham: Springer International Publishing; 2015, p. 35–57. https://doi.org/10.1007/978-3-319-01225-4_4.
[192] Mason S, Solomons R. CSF Metabolomics of Tuberculous Meningitis: A Review. Metabolites 2021;11:661. https://doi.org/10.3390/metabo11100661.
[193] French CD, Willoughby RE, Pan A, Wong SJ, Foley JF, Wheat LJ, et al. NMR metabolomics of cerebrospinal fluid differentiates inflammatory diseases of the central nervous system. PLOS Neglected Tropical Diseases 2018;12:e0007045. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007045.
[194] Trezzi J-P, Galozzi S, Jaeger C, Barkovits K, Brockmann K, Maetzler W, et al. Distinct metabolomic signature in cerebrospinal fluid in early parkinson's disease. Movement Disorders 2017;32:1401–8. https://doi.org/10.1002/mds.27132.
[195] Rosenling T, Stoop MP, Smolinska A, Muilwijk B, Coulier L, Shi S, et al. The Impact of Delayed Storage on the Measured Proteome and Metabolome of Human Cerebrospinal Fluid. Clinical Chemistry 2011;57:1703–11. https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.167601.

[196] Hörmann P, Barkovits K, Marcus K, Hiller K. Co-extraction for Metabolomics and Proteomics from a Single CSF Sample. In: Santamaría E, Fernández-Irigoyen J, editors. Cerebrospinal Fluid (CSF) Proteomics: Methods and Protocols, New York, NY: Springer; 2019, p. 337–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9706-0_21.
[197] Hooshmand K, Xu J, Simonsen AH, Wretlind A, de Zawadzki A, Sulek K, et al. Human Cerebrospinal Fluid Sample Preparation and Annotation for Integrated Lipidomics and Metabolomics Profiling Studies. Mol Neurobiol 2024;61:2021–32. https://doi.org/10.1007/s12035-023-03666-4.
[198] Tang Q, Jin G, Wang G, Liu T, Liu X, Wang B, et al. Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. Front Cell Infect Microbiol 2020;10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00151.
[199] Thomas V, Clark J, Doré J. Fecal Microbiota Analysis: An Overview of Sample Collection Methods and Sequencing Strategies. Future Microbiology 2015;10:1485–504. https://doi.org/10.2217/fmb.15.87.
[200] De Spiegeleer M, De Graeve M, Huysman S, Vanderbeke A, Van Meulebroek L, Vanhaecke L. Impact of storage conditions on the human stool metabolome and lipidome: Preserving the most accurate fingerprint. Analytica Chimica Acta 2020;1108:79–88. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.02.046.
[201] Isokääntä H, Silva LP da, Karu N, Kallonen T, Aatsinki A-K, Hankemeier T, et al. Comparative metabolomics and microbiome analysis of Ethanol vs. OMNImet/gene®•GUT fecal stabilization 2023:2023.08.29.555241. https://doi.org/10.1101/2023.08.29.555241.
[202] Gratton J, Phetcharaburanin J, Mullish BH, Williams HRT, Thursz M, Nicholson JK, et al. Optimized Sample Handling Strategy for Metabolic Profiling of Human Feces. Anal Chem 2016;88:4661–8. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04159.
[203] Haute Autorité de Santé. Cancer colorectal : modalités de dépistage et de prévention chez les sujets à risque élevé et très élevé. Haute Autorité de Santé n.d. https://www.has-sante.fr/jcms/c_2772744/fr/cancer-colorectal-modalites-de-depistage-et-de-prevention-chez-les-sujets-a-risque-eleve-et-tres-eleve (accessed September 11, 2024).
[204] Salazar N, Ponce-Alonso M, Garriga M, Sanchez-Carrillo S, Hernández-Barranco AM, Redruello B, et al. Fecal Metabolome and Bacterial Composition in Severe Obesity: Impact of Diet and Bariatric Surgery. Gut Microbes 2022;14:2106102. https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2106102.
[205] Pezzali JG, Shoveller AK, Ellis J. Examining the Effects of Diet Composition, Soluble Fiber, and Species on Total Fecal Excretion of Bile Acids: A Meta-Analysis. Front Vet Sci 2021;8. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.748803.
[206] Mathay C, Hamot G, Henry E, Georges L, Bellora C, Lebrun L, et al. Method Optimization for Fecal Sample Collection and Fecal DNA Extraction. Biopreservation and Biobanking 2015;13:79–93. https://doi.org/10.1089/bio.2014.0031.
[207] Tarazona Carrillo K, Nam SL, de la Mata AP, de Bruin OM, Doukhanine E, Harynuk J. Optimization of fecal sample homogenization for untargeted metabolomics. Metabolomics 2023;19:74. https://doi.org/10.1007/s11306-023-02036-4.
[208] Karu N, Deng L, Slae M, Guo AC, Sajed T, Huynh H, et al. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. Analytica Chimica Acta 2018;1030:1–24. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.031.
[209] Karu N, Deng L, Slae M, Guo AC, Sajed T, Huynh H, et al. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. Analytica Chimica Acta 2018;1030:1–24. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.031.
[210] Chen L, Zhernakova DV, Kurilshikov A, Andreu-Sánchez S, Wang D, Augustijn HE, et al. Influence of the microbiome, diet and genetics on inter-individual variation in the human plasma metabolome. Nat Med 2022;28:2333–43. https://doi.org/10.1038/s41591-022-02014-8.

[211] Costanzo M, Caterino M, Sotgiu G, Ruoppolo M, Franconi F, Campesi I. Sex differences in the human metabolome. Biol Sex Differ 2022;13:30. https://doi.org/10.1186/s13293-022-00440-4.
[212] Agueusop I, Musholt PB, Klaus B, Hightower K, Kannt A. Short-term variability of the human serum metabolome depending on nutritional and metabolic health status. Sci Rep 2020;10:16310. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72914-7.
[213] Ganti S, Taylor SL, Abu Aboud O, Yang J, Evans C, Osier MV, et al. Kidney Tumor Biomarkers Revealed by Simultaneous Multiple Matrix Metabolomics Analysis. Cancer Research 2012;72:3471–9. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3105.
[214] Zhang Y, Ni M, Tao Y, Shen M, Xu W, Fan M, et al. Multiple-matrix metabolomics analysis for the distinct detection of colorectal cancer and adenoma. Metabolomics 2024;20:1–16. https://doi.org/10.1007/s11306-024-02114-1.
[215] Paepe ED. A validated multi-matrix platform for metabolomic fingerprinting of human urine, feces and plasma using ultra-high performance liquid-chromatography coupled to hybrid orbitrap high-resolution mass spectrometry. Analytica Chimica Acta n.d.
[216] Martias C, Baroukh N, Mavel S, Blasco H, Lefèvre A, Roch L, et al. Optimization of Sample Preparation for Metabolomics Exploration of Urine, Feces, Blood and Saliva in Humans Using Combined NMR and UHPLC-HRMS Platforms. Molecules 2021;26:4111. https://doi.org/10.3390/molecules26144111.
[217] Martias C, Baroukh N, Mavel S, Blasco H, Lefèvre A, Roch L, et al. Optimization of Sample Preparation for Metabolomics Exploration of Urine, Feces, Blood and Saliva in Humans Using Combined NMR and UHPLC-HRMS Platforms. Molecules 2021;26:4111. https://doi.org/10.3390/molecules26144111.
[218] Marion D. An Introduction to Biological NMR Spectroscopy *. Molecular & Cellular Proteomics 2013;12:3006–25. https://doi.org/10.1074/mcp.O113.030239.
[219] Cala O, Guillière F, Krimm I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. Anal Bioanal Chem 2014;406:943–56. https://doi.org/10.1007/s00216-013-6931-0.
[220] Carlomagno T. Ligand-Target Interactions: What Can We Learn from NMR? Annual Review of Biophysics 2005;34:245–66. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144419.
[221] Griffiths J. A Brief History of Mass Spectrometry. Anal Chem 2008;80:5678–83. https://doi.org/10.1021/ac8013065.
[222] Chimactiv - Ressources pédagogiques numériques interactives dans l'analyse chimique de milieux complexes n.d. http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/bases/rmn/theorie-illustree/2 (accessed December 7, 2021).
[223] Bouchaud J-P, Lhuillier C. Quantum Boltzmann equation for atomic hydrogen. Journal de Physique n.d.;46:1101–12.
[224] Cavanagh J, Fairbrother WJ, III AGP, Skelton NJ. Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice. Academic Press; 1996.
[225] Yon M. Micro-imagerie par résonance magnétique de matériaux solides en rotation à l'angle magique. phdthesis. Université d'Orléans, 2017.
[226] Letertre MPM, Giraudeau P, de Tullio P. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Clinical Metabolomics and Personalized Medicine: Current Challenges and Perspectives. Front Mol Biosci 2021;8:698337. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.698337.
[227] CNRS. La France à la pointe sur les techniques analytiques | CNRS 2023. https://www.cnrs.fr/fr/actualite/la-france-la-pointe-sur-les-techniques-analytiques (accessed July 17, 2024).
[228] Kovtunov KV, Pokochueva EV, Salnikov OG, Cousin SF, Kurzbach D, Vuichoud B, et al. Hyperpolarized NMR Spectroscopy: d-DNP, PHIP, and SABRE Techniques. Chemistry – An Asian Journal 2018;13:1857–71. https://doi.org/10.1002/asia.201800551.
[229] Plainchont B, Berruyer P, Dumez J-N, Jannin S, Giraudeau P. Dynamic Nuclear Polarization Opens New Perspectives for NMR Spectroscopy in Analytical Chemistry. Anal Chem 2018;90:3639–50. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05236.

[230] Ribay V, Praud C, Letertre MPM, Dumez J-N, Giraudeau P. Hyperpolarized NMR metabolomics. Current Opinion in Chemical Biology 2023;74:102307. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102307.
[231] Giraudeau P, Shrot Y, Frydman L. Multiple Ultrafast, Broadband 2D NMR Spectra of Hyperpolarized Natural Products. J Am Chem Soc 2009;131:13902–3. https://doi.org/10.1021/ja905096f.
[232] Biedenbänder T, Aladin V, Saeidpour S, Corzilius B. Dynamic Nuclear Polarization for Sensitivity Enhancement in Biomolecular Solid-State NMR. Chem Rev 2022;122:9738–94. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00776.
[233] Jannin S, Dumez J-N, Giraudeau P, Kurzbach D. Application and methodology of dissolution dynamic nuclear polarization in physical, chemical and biological contexts. Journal of Magnetic Resonance 2019;305:41–50. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.06.001.
[234] Huang K, Thomas N, Gooley PR, Armstrong CW. Systematic Review of NMR-Based Metabolomics Practices in Human Disease Research. Metabolites 2022;12:963. https://doi.org/10.3390/metabo12100963.
[235] Chien Y-H, Chiang S-C, Zhang XK, Keutzer J, Lee N-C, Huang A-C, et al. Early Detection of Pompe Disease by Newborn Screening Is Feasible: Results From the Taiwan Screening Program. Pediatrics 2008;122:e39–45. https://doi.org/10.1542/peds.2007-2222.
[236] Blasco H, Garrigue M-A, De Vos A, Antar C, Labarthe F, Maillot F, et al. Filter paper saturated by urine sample in metabolic disorders detection by proton magnetic resonance spectroscopy. Anal Bioanal Chem 2010;396:1205–11. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3280-0.
[237] Veyrat-Durebex C, Benz-de-Bretagne I, Clavier V, Bruno C, Andres CR, Antar C, et al. Quality consideration for the validation of urine TMA and TMAO measurement by nuclear magnetic resonance spectroscopy in Fish Odor Syndrome. Anal Biochem 2021;630:114330. https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114330.
[238] DeFeo EM, Wu C-L, McDougal WS, Cheng LL. A decade in prostate cancer: from NMR to metabolomics. Nature Reviews Urology 2011;8:301–11. https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.53.
[239] Giskeødegård GF, Madssen TS, Euceda LR, Tessem M-B, Moestue SA, Bathen TF. NMR-based metabolomics of biofluids in cancer. NMR in Biomedicine 2019;32:e3927. https://doi.org/10.1002/nbm.3927.
[240] Abbaspour F, Mohammadi N, Amiri H, Cheraghi S, Ahadi R, Hormozi-Moghaddam Z. Applications of magnetic resonance spectroscopy in diagnosis of neurodegenerative diseases: A systematic review n.d. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30521.
[241] Cardoza LA, Korir AK, Otto WH, Wurrey CJ, Larive CK. Applications of NMR spectroscopy in environmental science. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 2004;45:209–38. https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2004.06.002.
[242] Bastawrous M, Jenne A, Tabatabaei Anaraki M, Simpson AJ. In-Vivo NMR Spectroscopy: A Powerful and Complimentary Tool for Understanding Environmental Toxicity. Metabolites 2018;8:35. https://doi.org/10.3390/metabo8020035.
[243] Littlewood AB. Gas Chromatography: Principles, Techniques, and Applications. Elsevier; 2013.
[244] Glicksberg L, Kerrigan S. Derivatization. In: Levine BS, KERRIGAN S, editors. Principles of Forensic Toxicology, Cham: Springer International Publishing; 2020, p. 163–75. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1_12.
[245] Temerdashev A, Nesterenko P, Dmitrieva E, Zhurkina K, Feng Y-Q. GC-MS/MS Determination of Steroid Hormones in Urine Using Solid-Phase Derivatization as an Alternative to Conventional Methods. Molecules 2022;27:5796. https://doi.org/10.3390/molecules27185796.
[246] Lough WJ, Wainer IW. High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice. CRC Press; 1995.
[247] Chen L, Dean B, Liang X. A technical overview of supercritical fluid chromatography-mass spectrometry (SFC-MS) and its recent applications in pharmaceutical research and

development. Drug Discovery Today: Technologies 2021;40:69–75. https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.10.002.
[248] Le Faouder P, Soullier J, Tremblay-Franco M, Tournadre A, Martin J-F, Guitton Y, et al. Untargeted Lipidomic Profiling of Dry Blood Spots Using SFC-HRMS. Metabolites 2021;11:305. https://doi.org/10.3390/metabo11050305.
[249] Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S. Capillary Electrophoresis: Principles and Practice. Springer Berlin Heidelberg; 2011.
[250] Alinat E. Développement de nouvelles stratégies utilisant l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation physico-chimique des nitrocelluloses en vue de leur identification dans des prélèvements pré-ou post-attentat. phdthesis. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014.
[251] Boix C, Ibáñez M, Sancho JV, Rambla J, Aranda JL, Ballester S, et al. Fast determination of 40 drugs in water using large volume direct injection liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Talanta 2015;131:719–27. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.005.
[252] Reemtsma T, Alder L, Banasiak U. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 2013;1271:95–104. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.023.
[253] Haijes HA, Willemsen M, Van der Ham M, Gerrits J, Pras-Raves ML, Prinsen HCMT, et al. Direct Infusion Based Metabolomics Identifies Metabolic Disease in Patients' Dried Blood Spots and Plasma. Metabolites 2019;9:12. https://doi.org/10.3390/metabo9010012.
[254] Plekhova V, De Windt K, De Spiegeleer M, De Graeve M, Vanhaecke L. Recent advances in high-throughput biofluid metabotyping by direct infusion and ambient ionization mass spectrometry. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2023;168:117287. https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117287.
[255] Huber CG, Krajete A. Comparison of direct infusion and on-line liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of nucleic acids. Journal of Mass Spectrometry 2000;35:870–7. https://doi.org/10.1002/1096-9888(200007)35:7<870::AID-JMS11>3.0.CO;2-D.
[256] Delvaux A, Rathahao-Paris E, Alves S. Different ion mobility-mass spectrometry coupling techniques to promote metabolomics. Mass Spectrometry Reviews 2022;41:695–721. https://doi.org/10.1002/mas.21685.
[257] Crowell KL, Baker ES, Payne SH, Ibrahim YM, Monroe ME, Slysz GW, et al. Increasing confidence of LC–MS identifications by utilizing ion mobility spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry 2013;354–355:312–7. https://doi.org/10.1016/j.ijms.2013.06.028.
[258] Bruker. timsTOF Pro 2 n.d. https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/timstof/timstof-pro-2.html (accessed April 28, 2024).
[259] Drakopoulou SK, Kritikou AS, Baessmann C, Thomaidis NS. Untargeted 4D-metabolomics using Trapped Ion Mobility combined with LC-HRMS in extra virgin olive oil adulteration study with lower-quality olive oils. Food Chemistry 2024;434:137410. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137410.
[260] Drakopoulou SK, Damalas DE, Baessmann C, Thomaidis NS. Trapped Ion Mobility Incorporated in LC–HRMS Workflows as an Integral Analytical Platform of High Sensitivity: Targeted and Untargeted 4D-Metabolomics in Extra Virgin Olive Oil. J Agric Food Chem 2021;69:15728–37. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04789.
[261] Hou Z, Sun A, Li Y, Song X, Liu S, Hu X, et al. What Are the Reliable Plasma Biomarkers for Mild Cognitive Impairment? A Clinical 4D Proteomics Study and Validation. Mediators of Inflammation 2024;2024:7709277. https://doi.org/10.1155/2024/7709277.
[262] Yang J, Liu Q, Yu B, Han B, Yang B. 4D-quantitative proteomics signature of asthenozoospermia and identification of extracellular matrix protein 1 as a novel biomarker for sperm motility. Molecular Omics 2022;18:83–91. https://doi.org/10.1039/D1MO00257K.

[263] Hoffmann E de, Charette J, Stroobant V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. Wiley; 1996.
[264] Hoffmann E de, Stroobant V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons; 2013.
[265] Rondeau D. Spectrométrie de masse organique - Analyseurs et méthodes en tandem ou MS. Techniques d'analyse 2017. https://doi.org/10.51257/a-v1-p2647.
[266] Barbier Saint-Hilaire P. Utilisation de la métabolomique pour l'étude de l'encéphalopathie hépatique et développement de nouvelles approches pour l'acquisition de données par spectrométrie de masse. Université Paris-Saclay, 2019.
[267] Zhu X, Chen Y, Subramanian R. Comparison of Information-Dependent Acquisition, SWATH, and MSAll Techniques in Metabolite Identification Study Employing Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. Anal Chem 2014;86:1202–9. https://doi.org/10.1021/ac403385y.
[268] Guo J, Huan T. Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. Anal Chem 2020;92:8072–80. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05135.
[269] El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. Applied Spectroscopy Reviews 2009;44:210–30. https://doi.org/10.1080/05704920902717872.
[270] Awad H, Khamis MM, El-Aneed A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. Applied Spectroscopy Reviews 2015;50:158–75. https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046.
[271] Fischer S, Clara S. Optimizing the Agilent Multimode Source n.d.:8.
[272] Ionization Options (APPI, APCI) | SHIMADZU EUROPA n.d. https://www.shimadzu.eu/ionization-options-appi-apci (accessed December 7, 2021).
[273] Bajic S. Waters UniSpray Ionization Source (White Paper). n.d.
[274] Manicke NE, Dill AL, Ifa DR, Cooks RG. High resolution tissue imaging on an orbitrap mass spectrometer by desorption electro-spray ionization mass spectrometry (DESI-MS). J Mass Spectrom 2010;45:223–6. https://doi.org/10.1002/jms.1707.
[275] Calligaris D, Caragacianu D, Liu X, Norton I, Thompson CJ, Richardson AL, et al. Application of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging in breast cancer margin analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:15184–9. https://doi.org/10.1073/pnas.1408129111.
[276] Woolman M, Tata A, Bluemke E, Dara D, Ginsberg HJ, Zarrine-Afsar A. An Assessment of the Utility of Tissue Smears in Rapid Cancer Profiling with Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry (DESI-MS). J Am Soc Mass Spectrom 2017;28:145–53. https://doi.org/10.1007/s13361-016-1506-x.
[277] Pirro V, Jarmusch AK, Alfaro CM, Hattab EM, Cohen-Gadol AA, Cooks RG. Utility of neurological smears for intrasurgical brain cancer diagnostics and tumour cell percentage by DESI-MS. Analyst 2017;142:449–54. https://doi.org/10.1039/C6AN02645A.
[278] Holm NB, Deryabina M, Knudsen CB, Janfelt C. Tissue distribution and metabolic profiling of cyclosporine (CsA) in mouse and rat investigated by DESI and MALDI mass spectrometry imaging (MSI) of whole-body and single organ cryo-sections. Anal Bioanal Chem 2022;414:7167–77. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04269-z.
[279] Li L-H, Hsieh H-Y, Hsu C-C. Clinical Application of Ambient Ionization Mass Spectrometry. Mass Spectrom (Tokyo) 2017;6:S0060. https://doi.org/10.5702/massspectrometry.S0060.
[280] Creative Proteomics. Triple Quadrupole Mass Spectrometry. Creative Proteomics n.d. https://www.creative-proteomics.com/technology/triple-quadrupole-mass-spectrometry.htm (accessed October 18, 2022).
[281] Nikolaev EN, Kostyukevich YI, Vladimirov GN. Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations. Mass Spectrometry Reviews 2016;35:219–58. https://doi.org/10.1002/mas.21422.

[282] Marshall AG, Hendrickson CL. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations. International Journal of Mass Spectrometry 2002;215:59–75. https://doi.org/10.1016/S1387-3806(01)00588-7.
[283] Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry | Johnson Lab n.d. https://jlab.chem.yale.edu/research/techniques/fourier-transform-ion-cyclotron-resonance-mass-spectrometry (accessed December 7, 2021).
[284] Creative Proteomics. Several types of mass analyzer. Creative Proteomics Blog 2017. https://www.creative-proteomics.com/blog/several-types-of-mass-analyzer/ (accessed August 10, 2024).
[285] Cox KA, Cleven CD, Cooks RG. Mass shifts and local space charge effects observed in the quadrupole ion trap at higher resolution. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 1995;144:47–65. https://doi.org/10.1016/0168-1176(95)04152-B.
[286] Roberts LD. Defining the metabolic effect of peroxisome proliferator-activated receptor δ activation. Thesis. University of Cambridge, 2010. https://doi.org/10.17863/CAM.16521.
[287] Waters. SELECT SERIES MRT: Redefining Next|Gen High Res Mass Spectrometry | Waters Blog. Https://WwwWatersCom/Blog/ 2021. https://www.waters.com/blog/new-select-series-mrt-redefines-performance-with-next-generation-high-resolution-mass-spectrometry/ (accessed April 14, 2024).
[288] Cooper-Shepherd DA, Wildgoose J, Kozlov B, Johnson WJ, Tyldesley-Worster R, Palmer ME, et al. Novel Hybrid Quadrupole-Multireflecting Time-of-Flight Mass Spectrometry System. J Am Soc Mass Spectrom 2023;34:264–72. https://doi.org/10.1021/jasms.2c00281.
[289] Zubarev RA, Makarov A. Orbitrap Mass Spectrometry. Anal Chem 2013;85:5288–96. https://doi.org/10.1021/ac4001223.
[290] Perry RH, Cooks RG, Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. Mass Spectrometry Reviews 2008;27:661–99. https://doi.org/10.1002/mas.20186.
[291] Creative Proteomics. Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. Creative Proteomics n.d. https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm (accessed October 18, 2022).
[292] Creative Proteomics. Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer. Creative Proteomics n.d. https://www.creative-proteomics.com/support/orbitrap-fusion-lumos-tribrid-mass-spectrometer.htm (accessed October 18, 2022).
[293] Lim H-K, Chen J, Sensenhauser C, Cook K, Subrahmanyam V. Metabolite identification by data-dependent accurate mass spectrometric analysis at resolving power of 60 000 in external calibration mode using an LTQ/Orbitrap. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2007;21:1821–32. https://doi.org/10.1002/rcm.3024.
[294] Michalski A, Damoc E, Lange O, Denisov E, Nolting D, Müller M, et al. Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes *. Molecular & Cellular Proteomics 2012;11. https://doi.org/10.1074/mcp.O111.013698.
[295] ProtéoToul. Thermo LTQ Orbitrap Velos ETD – ProteoToul n.d. https://proteotoul.ipbs.fr/mass-spectrometers/thermo-ltq-orbitrap-velos-etd/ (accessed June 14, 2024).
[296] Medhe S. Mass Spectrometry: Detectors Review. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering 2018;3:51–8. https://doi.org/10.11648/j.cbe.20180304.11.
[297] Barnes JH, Hieftje GM. Recent advances in detector-array technology for mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry 2004;238:33–46. https://doi.org/10.1016/j.ijms.2004.08.004.
[298] Bu X, Regalado EL, Hamilton SE, Welch CJ. The emergence of low-cost compact mass spectrometry detectors for chromatographic analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2016;82:22–34. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.025.

[299] Wiedenbeck M, Bugoi R, Duke MJM, Dunai T, Enzweiler J, Horan M, et al. GGR Biennial Critical Review: Analytical Developments Since 2010. Geostandards and Geoanalytical Research 2012;36:337–98. https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2012.00218.x.
[300] Exosens. CHANNELTRON :ELECTRON MULTIPLIER HANDBOOK FOR MASS SPECTROMETRY APPLICATIONS 2001.
[301] Zhao Y. The Study of Microchannel Plate Gain Using SIMION. Open Journal of Modelling and Simulation 2019;8:1–17. https://doi.org/10.4236/ojmsi.2020.81001.
[302] Technology Networks. Types of Ion Detector for Mass Spectrometry. Analysis & Separations from Technology Networks n.d. http://www.technologynetworks.com/analysis/articles/types-of-ion-detector-for-mass-spectrometry-347890 (accessed April 15, 2024).
[303] Guo J, Yu H, Xing S, Huan T. Addressing big data challenges in mass spectrometry-based metabolomics. Chemical Communications 2022;58:9979–90. https://doi.org/10.1039/D2CC03598G.
[304] Chen Y, Li E-M, Xu L-Y. Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. Metabolites 2022;12:357. https://doi.org/10.3390/metabo12040357.
[305] Stancliffe E, Schwaiger-Haber M, Sindelar M, Murphy MJ, Soerensen M, Patti GJ. An Untargeted Metabolomics Workflow that Scales to Thousands of Samples for Population-Based Studies. Anal Chem 2022;94:17370–8. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01270.
[306] Gloaguen Y. Supporting analysis, visualisation and biological interpretation of metabolomics datasets. PhD. University of Glasgow, 2017.
[307] Spicer R, Salek RM, Moreno P, Cañueto D, Steinbeck C. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. Metabolomics 2017;13:106. https://doi.org/10.1007/s11306-017-1242-7.
[308] Misra BB. New software tools, databases, and resources in metabolomics: updates from 2020. Metabolomics 2021;17:49. https://doi.org/10.1007/s11306-021-01796-1.
[309] Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. Anal Chem 2012;84:5035–9. https://doi.org/10.1021/ac300698c.
[310] Katajamaa M, Miettinen J, Orešič M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. Bioinformatics 2006;22:634–6. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk039.
[311] Schmid R, Heuckeroth S, Korf A, Smirnov A, Myers O, Dyrlund TS, et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. Nat Biotechnol 2023;41:447–9. https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2.
[312] Ruttkies C, Schymanski EL, Wolf S, Hollender J, Neumann S. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. Journal of Cheminformatics 2016;8:1–16. https://doi.org/10.1186/s13321-016-0115-9.
[313] Ruttkies C, Neumann S, Posch S. Improving MetFrag with statistical learning of fragment annotations. BMC Bioinformatics 2019;20:1–14. https://doi.org/10.1186/s12859-019-2954-7.
[314] Böcker S, Letzel MC, Lipták Z, Pervukhin A. SIRIUS: decomposing isotope patterns for metabolite identification†. Bioinformatics 2009;25:218–24. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn603.
[315] Dührkop K, Fleischauer M, Ludwig M, Aksenov AA, Melnik AV, Meusel M, et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. Nat Methods 2019;16:299–302. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8.
[316] Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GeertenW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J Biomol NMR 1995;6. https://doi.org/10.1007/BF00197809.
[317] Jacob D, Deborde C, Lefebvre M, Maucourt M, Moing A. NMRProcFlow: a graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. Metabolomics 2017;13:36. https://doi.org/10.1007/s11306-017-1178-y.

[318] Giacomoni F, Le Corguillé G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Pétéra M, et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics 2015;31:1493–5. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813.
[319] Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. Nucleic Acids Research 2009;37:W652–60. https://doi.org/10.1093/nar/gkp356.
[320] Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. Nucleic Acids Research 2021;49:W388–96. https://doi.org/10.1093/nar/gkab382.
[321] Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G. XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. Anal Chem 2012;84:5035–9. https://doi.org/10.1021/ac300698c.
[322] Willcott MR. MestRe Nova. J Am Chem Soc 2009;131:13180–13180. https://doi.org/10.1021/ja906709t.
[323] de Figueiredo M, Rudaz S, Boccard J. Workflow for Knowledge Discovery from Metabolomic Data Using Chemometrics. In: Ivanisevic J, Giera M, editors. A Practical Guide to Metabolomics Applications in Health and Disease: From Samples to Insights into Metabolism, Cham: Springer International Publishing; 2023, p. 161–83. https://doi.org/10.1007/978-3-031-44256-8_7.
[324] Meister I, Boccard J, Rudaz S. Extracting Knowledge from MS Clinical Metabolomic Data: Processing and Analysis Strategies. In: Giera M, Sánchez-López E, editors. Clinical Metabolomics: Methods and Protocols, New York, NY: Springer US; 2025, p. 539–54. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4116-3_29.
[325] Santamaria G, Pinto FR. Bioinformatic Analysis of Metabolomic Data: From Raw Spectra to Biological Insight. BioChem 2024;4:90–114. https://doi.org/10.3390/biochem4020005.
[326] Sun J, Xia Y. Pretreating and normalizing metabolomics data for statistical analysis. Genes & Diseases 2024;11:100979. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.04.018.
[327] Paul A, de Boves Harrington P. Chemometric applications in metabolomic studies using chromatography-mass spectrometry. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2021;135:116165. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116165.
[328] Tsugawa H, Ikeda K, Takahashi M, Satoh A, Mori Y, Uchino H, et al. A lipidome atlas in MS-DIAL 4. Nat Biotechnol 2020;38:1159–63. https://doi.org/10.1038/s41587-020-0531-2.
[329] Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. Nat Methods 2015;12:523–6. https://doi.org/10.1038/nmeth.3393.
[330] Wang C, Timári I, Zhang B, Li D-W, Leggett A, Amer AO, et al. COLMAR Lipids Web Server and Ultrahigh-Resolution Methods for Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance- and Mass Spectrometry-Based Lipidomics. J Proteome Res 2020;19:1674–83. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00845.
[331] Xia J, Bjorndahl TC, Tang P, Wishart DS. MetaboMiner – semi-automated identification of metabolites from 2D NMR spectra of complex biofluids. BMC Bioinformatics 2008;9:507. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-507.
[332] Lefort G, Liaubet L, Canlet C, Tardivel P, Père M-C, Quesnel H, et al. ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D 1H NMR spectra. Bioinformatics 2019;35:4356–63. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz248.
[333] Tardivel PJC, Canlet C, Lefort G, Tremblay-Franco M, Debrauwer L, Concordet D, et al. ASICS: an automatic method for identification and quantification of metabolites in complex 1D 1H NMR spectra. Metabolomics 2017;13:109. https://doi.org/10.1007/s11306-017-1244-5.
[334] ChenomX. Chenomx Inc | Metabolite Discovery and Measurement n.d. https://www.chenomx.com/ (accessed September 12, 2024).

[335] Blaženović I, Kind T, Ji J, Fiehn O. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. Metabolites 2018;8:31. https://doi.org/10.3390/metabo8020031.
[336] Li Y, Fiehn O. Flash entropy search to query all mass spectral libraries in real time. Nat Methods 2023;20:1475–8. https://doi.org/10.1038/s41592-023-02012-9.
[337] Petras D, Phelan VV, Acharya D, Allen AE, Aron AT, Bandeira N, et al. GNPS Dashboard: collaborative exploration of mass spectrometry data in the web browser. Nature Methods 2021. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01339-5.
[338] Aron AT, Gentry EC, McPhail KL, Nothias L-F, Nothias-Esposito M, Bouslimani A, et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. Nat Protoc 2020;15:1954–91. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5.
[339] Cottret L, Frainay C, Chazalviel M, Cabanettes F, Gloaguen Y, Camenen E, et al. MetExplore: collaborative edition and exploration of metabolic networks. Nucleic Acids Research 2018;46:W495–502. https://doi.org/10.1093/nar/gky301.
[340] Cottret L, Wildridge D, Vinson F, Barrett MP, Charles H, Sagot M-F, et al. MetExplore: a web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks. Nucleic Acids Research 2010;38:W132–7. https://doi.org/10.1093/nar/gkq312.
[341] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. Genome Res 2003;13:2498–504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303.
[342] Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics 2011;27:431–2. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq675.
[343] Silva RR da, Wang M, Nothias L-F, Hooft JJJ van der, Caraballo-Rodríguez AM, Fox E, et al. Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation n.d. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006089.
[344] van Iersel MP, Kelder T, Pico AR, Hanspers K, Coort S, Conklin BR, et al. Presenting and exploring biological pathways with PathVisio. BMC Bioinformatics 2008;9:399. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-399.
[345] Kutmon M, Iersel MP van, Bohler A, Kelder T, Nunes N, Pico AR, et al. PathVisio 3: An Extendable Pathway Analysis Toolbox. PLOS Computational Biology 2015;11:e1004085. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004085.
[346] Karp PD, Billington R, Caspi R, Fulcher CA, Latendresse M, Kothari A, et al. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. Briefings in Bioinformatics 2019;20:1085–93. https://doi.org/10.1093/bib/bbx085.
[347] Karp PD, Ouzounis CA, Moore-Kochlacs C, Goldovsky L, Kaipa P, Ahrén D, et al. Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. Nucleic Acids Research 2005;33:6083–9. https://doi.org/10.1093/nar/gki892.
[348] Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. Nucleic Acids Res 2018;46:D608–17. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089.
[349] Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. Nucleic Acids Research 2022;50:D622–31. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062.
[350] Montenegro-Burke JR, Guijas C, Siuzdak G. METLIN: A Tandem Mass Spectral Library of Standards. In: Li S, editor. Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics, New York, NY: Springer US; 2020, p. 149–63. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_9.
[351] MetaboHub. MetaboHUB | Infrastructure française en métabolomique et fluxomique. Metabohub n.d. http://www.metabohub.fr/ (accessed August 21, 2024).
[352] Paulhe N, Canlet C, Damont A, Peyriga L, Durand S, Deborde C, et al. PeakForest: a multi-platform digital infrastructure for interoperable metabolite spectral data and metadata management. Metabolomics 2022;18:40. https://doi.org/10.1007/s11306-022-01899-3.

[353] Hoch JC, Baskaran K, Burr H, Chin J, Eghbalnia HR, Fujiwara T, et al. Biological Magnetic Resonance Data Bank. Nucleic Acids Research 2023;51:D368–76. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1050.
[354] Smelter A, Astra M, Moseley HNB. A fast and efficient python library for interfacing with the Biological Magnetic Resonance Data Bank. BMC Bioinformatics 2017;18:175. https://doi.org/10.1186/s12859-017-1580-5.
[355] Jorge TF, Mata AT, António C. Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 2016;374:20150370. https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0370.
[356] Jia Z, Qiu Q, He R, Zhou T, Chen L. Identification of Metabolite Interference Is Necessary for Accurate LC-MS Targeted Metabolomics Analysis. Anal Chem 2023;95:7985–92. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00804.
[357] Yamamoto T, Sato K, Yamaguchi M, Mitamura K, Taga A. Development of simultaneous quantitative analysis of tricarboxylic acid cycle metabolites to identify specific metabolites in cancer cells by targeted metabolomic approach. Biochemical and Biophysical Research Communications 2021;584:53–9. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.072.
[358] Ryals J, Lawton K, Stevens D, Milburn M. Metabolon, Inc. Pharmacogenomics 2007;8:863–6. https://doi.org/10.2217/14622416.8.7.863.
[359] Metabolon. Metabolon – Small Molecules, Big Insights. Metabolon n.d. https://www.metabolon.com/ (accessed July 17, 2024).
[360] Nightingale Health. Large-scale metabolic biomarker profiling for researchers | Nightingale Health n.d. https://research.nightingalehealth.com/ (accessed July 17, 2024).
[361] biocrates - Targeted metabolomics kits and services 2020. https://biocrates.com/ (accessed December 8, 2021).
[362] IROA Technologies. Metabolic Profiling Kit | Kits for Metabolic Profiling. IROA TECHNOLOGIES n.d. https://www.iroatech.com/kits-for-metabolic-profiling/ (accessed October 10, 2024).
[363] Kranenburg RF, Verduin J, Stuyver LI, de Ridder R, van Beek A, Colmsee E, et al. Benefits of derivatization in GC–MS-based identification of new psychoactive substances. Forensic Chemistry 2020;20:100273. https://doi.org/10.1016/j.forc.2020.100273.
[364] Ljoncheva M, Heath E, Heath D, Džeroski S, Kosjek T. Contaminants of emerging concern: Silylation procedures, evaluation of the stability of silyl derivatives and associated measurement uncertainty. Science of The Total Environment 2023;899:165669. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165669.
[365] Han Y, Qu X, Geng H, Wang L, Zhu Z, Zhang Y, et al. Isotope-Coded On-Tissue Derivatization for Quantitative Mass Spectrometry Imaging of Short-Chain Fatty Acids in Biological Tissues. Anal Chem 2023;95:17622–8. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03308.
[366] Willacey C, Naaktgeborena M, Moreno EL. LC–MS/MS analysis of the central energy and carbon metabolites inbiological samples following derivatization bydimethylaminophenacyl bromide. Journal of Chromatography A 2019. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460413.
[367] Szarka S, Prokai-Tatrai K, Prokai L. Application of Screening Experimental Designs to Assess Chromatographic Isotope Effect upon Isotope-Coded Derivatization for Quantitative Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Anal Chem 2014;86:7033–40. https://doi.org/10.1021/ac501309s.
[368] Su xiaoling, Wang N, Cheng D. Dansylation isotope labeling liquid chromatography mass spectrometry for parallel profiling of human urinary and fecal submetabolomes. Analytica Chimica Acta 2016:100–9. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.027.
[369] Zhang J, Yang S, Wang J, Xu Y, Zhao H, Lei J, et al. Integrated LC-MS metabolomics with dual derivatization for quantification of FFAs in fecal samples of hepatocellular carcinoma patients. Journal of Lipid Research 2021;62. https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100143.
[370] Qu M, Ma S, Huang Y, Yuan H, Zhang S, Ouyang G, et al. LC-MS/MS-based non-isotopically paired labeling (NIPL) strategy for the qualification and quantification of monosaccharides. Talanta 2021;231:122336. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122336.

[371] Majumdar A, Siva Venkatesh IP, Basu A. Short-Chain Fatty Acids in the Microbiota–Gut–Brain Axis: Role in Neurodegenerative Disorders and Viral Infections. ACS Chem Neurosci 2023;14:1045–62. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.2c00803.
[372] Wenzel TJ, Gates EJ, Ranger AL, Klegeris A. Short-chain fatty acids (SCFAs) alone or in combination regulate select immune functions of microglia-like cells. Molecular and Cellular Neuroscience 2020;105:103493. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103493.
[373] Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. Frontiers in Endocrinology 2020;11.
[374] Silva JPB, Navegantes-Lima KC, Oliveira ALB, Rodrigues DVS, Gaspar SLF, Monteiro VVS, et al. Protective Mechanisms of Butyrate on Inflammatory Bowel Disease. Current Pharmaceutical Design 2018;24:4154–66. https://doi.org/10.2174/1381612824666181001153605.
[375] Chen H, Meng L, Shen L. Multiple roles of short-chain fatty acids in Alzheimer disease. Nutrition 2022;93:111499. https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111499.
[376] MacFabe DF. Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders. Microbial Ecology in Health and Disease 2015;26:28177. https://doi.org/10.3402/mehd.v26.28177.
[377] MacFabe DF. Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. Microbial Ecology in Health and Disease 2012;23:19260. https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.19260.
[378] Meng X, Pang H, Sun F, Jin X, Wang B, Yao K, et al. Simultaneous 3-Nitrophenylhydrazine Derivatization Strategy of Carbonyl, Carboxyl and Phosphoryl Submetabolome for LC-MS/MS-Based Targeted Metabolomics with Improved Sensitivity and Coverage. Anal Chem 2021;93:10075–83. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00767.
[379] Willacey C, Karu N, Harms A. Metabolic profiling of material-limited cell samples by dimethylaminophenacyl bromide derivatization with UPLC-MS/MS analysis. Miccrochemical Journal 2020;159. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105445.
[380] Déserts médicaux : L'État doit enfin prendre des mesures courageuses ! Sénat 2023. https://www.senat.fr/rap/r19-282/r19-282.html (accessed May 28, 2024).
[381] Trifonova OP, Maslov DL, Balashova EE, Lokhov PG. Evaluation of Dried Blood Spot Sampling for Clinical Metabolomics: Effects of Different Papers and Sample Storage Stability. Metabolites 2019;9:277. https://doi.org/10.3390/metabo9110277.
[382] Prentice P, Turner C, Wong MC, Dalton RN. Stability of metabolites in dried blood spots stored at different temperatures over a 2-year period. Bioanalysis 2013;5:1507–14. https://doi.org/10.4155/bio.13.121.
[383] Dijkstra AM, de Blaauw P, van Rijt WJ, Renting H, Maatman RGHJ, van Spronsen FJ, et al. Important Lessons on Long-Term Stability of Amino Acids in Stored Dried Blood Spots. International Journal of Neonatal Screening 2023;9:34. https://doi.org/10.3390/ijns9030034.
[384] Loeber JG, Platis D, Zetterström RH, Schielen PJCI. Dépistage néonatal en Europe - Évolution au cours de la dernière décennie et analyse de la situation actuelle par la Société internationale de dépistage néonatal. Med Sci (Paris) 2021;37:441–56. https://doi.org/10.1051/medsci/2021059.
[385] DGOS. Programme national de dépistage néonatal. Ministère de la Santé et de la Prévention 2023. https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/maladies-rares/DNN (accessed October 5, 2023).
[386] Lefèvre A, Mavel S, Nadal-Desbarats L, Galineau L, Attucci S, Dufour D, et al. Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. Talanta 2019;195:593–8. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.094.
[387] J&#233, r&#233, Monteiro M, Lef&#232 A, vre, Dufour-Rainfray D, et al. Multi-Compartment SCFA Quantification in Human. American Journal of Analytical Chemistry 2024;15:177–200. https://doi.org/10.4236/ajac.2024.156012.
[388] Lebelo K, Malebo N, Mochane MJ, Masinde M. Chemical Contamination Pathways and the Food Safety Implications along the Various Stages of Food Production: A Review. International

Journal of Environmental Research and Public Health 2021;18:5795. https://doi.org/10.3390/ijerph18115795.
[389] Chen L, Pan H, Zhai G, Luo Q, Li Y, Fang C, et al. Widespread occurrence of in-source fragmentation in the analysis of natural compounds by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2023;37:e9519. https://doi.org/10.1002/rcm.9519.
[390] Giera M, Aisporna A, Uritboonthai W, Siuzdak G. The hidden impact of in-source fragmentation in metabolic and chemical mass spectrometry data interpretation. Nat Metab 2024;6:1647–8. https://doi.org/10.1038/s42255-024-01076-x.
[391] Flowers L, Grice EA. The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward. Cell Host & Microbe 2020;28:190–200. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.017.
[392] Elpa DP, Chiu H-Y, Wu S-P, Urban PL. Skin Metabolomics. Trends in Endocrinology & Metabolism 2021;32:66–75. https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.11.009.
[393] Protti M, Mandrioli R, Mercolini L. Tutorial: Volumetric absorptive microsampling (VAMS). Analytica Chimica Acta 2019;1046:32–47. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.004.
[394] Couacault P, Avella D, Londoño-Osorio S, Lorenzo AS, Gradillas A, Kärkkäinen O, et al. Targeted and untargeted metabolomics and lipidomics in dried blood microsampling: Recent applications and perspectives. Analytical Science Advances 2024;5:e2400002. https://doi.org/10.1002/ansa.202400002.
[395] Malsagova K, Kopylov A, Stepanov A, Butkova T, Izotov A, Kaysheva A. Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects. Diagnostics 2020;10:248. https://doi.org/10.3390/diagnostics10040248.
[396] Canning J, Strawbridge RJ, Miedzybrodzka Z, Marioni RE, Melbye M, Porteous DJ, et al. Methods applied to neonatal dried blood spot samples for secondary research purposes: a scoping review. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 2022;0:1–24. https://doi.org/10.1080/10408363.2024.2360996.
[397] Zhuang Y-J, Mangwiro Y, Wake M, Saffery R, Greaves RF. Multi-omics analysis from archival neonatal dried blood spots: limitations and opportunities. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 2022;60:1318–41. https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0311.
[398] Drolet J, Tolstikov V, Williams BA, Greenwood BP, Hill C, Vishnudas VK, et al. Integrated Metabolomics Assessment of Human Dried Blood Spots and Urine Strips. Metabolites 2017;7:35. https://doi.org/10.3390/metabo7030035.
[399] Ottosson F, Russo F, Abrahamsson A, MacSween N, Courraud J, Nielsen ZK, et al. Effects of Long-Term Storage on the Biobanked Neonatal Dried Blood Spot Metabolome. J Am Soc Mass Spectrom 2023;34:685–94. https://doi.org/10.1021/jasms.2c00358.
[400] Zhuang Y-J, Mangwiro Y, Wake M, Saffery R, Greaves RF. Multi-omics analysis from archival neonatal dried blood spots: limitations and opportunities. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 2022;60:1318–41. https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0311.
[401] Beger RD, Goodacre R, Jones CM, Lippa KA, Mayboroda OA, O'Neill D, et al. Analysis types and quantification methods applied in UHPLC-MS metabolomics research: a tutorial. Metabolomics 2024;20:95. https://doi.org/10.1007/s11306-024-02155-6.
[402] Cholette F, Mesa C, Harris A, Ellis H, Cachero K, Lacap P, et al. Dried blood spot specimens for SARS-CoV-2 antibody testing: A multi-site, multi-assay comparison. PLOS ONE 2021;16:e0261003. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261003.
[403] Denery JR, Nunes AAK, Dickerson TJ. Characterization of Differences between Blood Sample Matrices in Untargeted Metabolomics. Anal Chem 2011;83:1040–7. https://doi.org/10.1021/ac102806p.
[404] Saito K, Ueno S, Nakayama A, Nitta S, Arai K, Hasunuma T, et al. Overall Similarities and a Possible Factor Affecting Plasma Metabolome Profiles Between Venous and Capillary Blood Samples From 20 Healthy Human Males. Journal of Pharmaceutical Sciences 2019;108:3737–44. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.026.

[405] Bates-Fraser LC, Moertl KM, Stopforth CK, Bartlett DB, Ondrak KS, Jensen BC, et al. A practical approach for complete blood count analysis following acute exercise: Capillary vs. venous blood sampling. Advanced Exercise and Health Science 2024;1:43–50. https://doi.org/10.1016/j.aehs.2024.01.002.
[406] Souza HMR de, Scalco FB, Garrett R, Marques FF de C. Development of a kit for urine collection on filter paper as an alternative for Pompe disease screening and monitoring by LC-HRMS. Anal Methods 2023;15:3932–9. https://doi.org/10.1039/D3AY00587A.
[407] Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M. Dried saliva spot as a sampling technique for saliva samples. Biomedical Chromatography 2014;28:875–7. https://doi.org/10.1002/bmc.3193.
[408] Elliott I, Dittrich S, Paris D, Sengduanphachanh A, Phoumin P, Newton PN. The use of dried cerebrospinal fluid filter paper spots as a substrate for PCR diagnosis of the aetiology of bacterial meningitis in the Lao PDR. Clinical Microbiology and Infection 2013;19:E466–72. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12260.
[409] Cirillo A, Schoumacher M, De Tullio P. Dried blood spot sampling: a new tool for NMR-based metabolomics approach, 2022.
[410] McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Roddey JC, Hagler DJ, Holland D, Karow DS, et al. Alzheimer Disease: Quantitative Structural Neuroimaging for Detection and Prediction of Clinical and Structural Changes in Mild Cognitive Impairment. Radiology 2009;251:195–205. https://doi.org/10.1148/radiol.2511080924.
[411] Li K, Liu X, Yip R, Yankelevitz DF, Henschke CI, Geng Y, et al. Early prediction of severity in coronavirus disease (COVID-19) using quantitative CT imaging. Clinical Imaging 2021;78:223–9. https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2021.02.003.
[412] Duckett LJ. Quantitative Research Excellence: Study Design and Reliable and Valid Measurement of Variables. J Hum Lact 2021;37:456–63. https://doi.org/10.1177/08903344211019285.
[413] Crawford MJ, Weaver T, Rutter D, Sensky T, Tyrer P. Evaluating new treatments in psychiatry: the potential value of combining qualitative and quantitative research methods. International Review of Psychiatry 2002;14:6–11. https://doi.org/10.1080/09540260120114005.
[414] Goodwin LD, Goodwin WL. Qualitative Vs. Quantitative Research or Qualitative and Quantitative Research? Nursing Research 1984;33:378.
[415] Farias FAC de, Dagostini CM, Bicca Y de A, Falavigna VF, Falavigna A. Remote Patient Monitoring: A Systematic Review. Https://HomeLiebertpubCom/Tmj 2020. https://doi.org/10.1089/tmj.2019.0066.
[416] El-Rashidy N, El-Sappagh S, Islam SMR, M. El-Bakry H, Abdelrazek S. Mobile Health in Remote Patient Monitoring for Chronic Diseases: Principles, Trends, and Challenges. Diagnostics 2021;11:607. https://doi.org/10.3390/diagnostics11040607.
[417] Blaak E e., Canfora E e., Theis S, Frost G, Groen A k., Mithieux G, et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. Beneficial Microbes 2020;11:411–55. https://doi.org/10.3920/BM2020.0057.
[418] Lei E, Vacy K, Boon WC. Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. Neurochemistry International 2016;95:75–84. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.02.014.
[419] Murugesan S, Nirmalkar K, Hoyo-Vadillo C, García-Espitia M, Ramírez-Sánchez D, García-Mena J. Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2018;37:621–5. https://doi.org/10.1007/s10096-017-3143-0.
[420] Unger MM, Spiegel J, Dillmann K-U, Grundmann D, Philippeit H, Bürmann J, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. Parkinsonism & Related Disorders 2016;32:66–72. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.08.019.
[421] Doifode T, Giridharan VV, Generoso JS, Bhatti G, Collodel A, Schulz PE, et al. The impact of the microbiota-gut-brain axis on Alzheimer's disease pathophysiology. Pharmacological Research 2021;164:105314. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105314.

[422] Carretta MD, Quiroga J, López R, Hidalgo MA, Burgos RA. Participation of Short-Chain Fatty Acids and Their Receptors in Gut Inflammation and Colon Cancer. Frontiers in Physiology 2021;12.
[423] Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2007;13:2826–32. https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i20.2826.
[424] Zhang Z, Zhang H, Chen T, Shi L, Wang D, Tang D. Regulatory role of short-chain fatty acids in inflammatory bowel disease. Cell Commun Signal 2022;20:64. https://doi.org/10.1186/s12964-022-00869-5.
[425] Piotrowska M, Binienda A, Fichna J. The role of fatty acids in Crohn's disease pathophysiology – An overview. Molecular and Cellular Endocrinology 2021;538:111448. https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111448.
[426] Hu J, Cheng S, Yao J, Lin X, Li Y, Wang W, et al. Correlation between altered gut microbiota and elevated inflammation markers in patients with Crohn's disease. Front Immunol 2022;13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.947313.
[427] Kopczyńska J, Kowalczyk M. The potential of short-chain fatty acid epigenetic regulation in chronic low-grade inflammation and obesity. Front Immunol 2024;15. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1380476.
[428] Yang T, Wu C, Li Y, Wang C, Mao Z, Huo W, et al. Association of short-chain fatty acids and the gut microbiome with type 2 diabetes: Evidence from the Henan Rural Cohort. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases 2024;34:1619–30. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2024.03.014.
[429] Wallgren-Pettersson C, Jokela M, Lehtokari V-L, Tyynismaa H, Sainio MT, Ylikallio E, et al. Variants in tropomyosins *TPM2* and *TPM3* causing muscle hypertonia. Neuromuscular Disorders 2024;35:29–32. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2023.12.006.
[430] Aaltio J, Euro L, Tynninen O, Vu HS, Ni M, DeBerardinis RJ, et al. Niacin supplementation in a child with novel *MTTN* variant m.5670A>G causing early onset mitochondrial myopathy and NAD+ deficiency. Neuromuscular Disorders 2024;43:14–9. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2024.07.005.
[431] Devins KM, Goldstein AM, French AV. A Rare Ovarian Mixed Sex Cord Stromal Tumor in a Patient with Ollier Disease: A Case Report. Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology 2024. https://doi.org/10.1016/j.jpag.2024.07.009.
[432] Han J, Higgins R, Lim MD, Atkinson K, Yang J, Lin K, et al. Isotope-labeling derivatization with 3-nitrophenylhydrazine for LC/multiple-reaction monitoring-mass-spectrometry-based quantitation of carnitines in dried blood spots. Analytica Chimica Acta 2018;1037:177–87. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.045.
[433] Liebisch G, Ecker J, Roth S, Schweizer S, Öttl V, Schött H-F, et al. Quantification of Fecal Short Chain Fatty Acids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry—Investigation of Pre-Analytic Stability. Biomolecules 2019;9:121. https://doi.org/10.3390/biom9040121.
[434] Barone M, Ramayo-Caldas Y, Estellé J, Tambosco K, Chadi S, Maillard F, et al. Gut barrier-microbiota imbalances in early life lead to higher sensitivity to inflammation in a murine model of C-section delivery. Microbiome 2023;11:140. https://doi.org/10.1186/s40168-023-01584-0.
[435] Tharu R, Ahlawat GM, Kushwaha S, Khanna P. Gut microbiota disparities between active Crohn's disease and healthy controls: A global systematic review. Clinical Epidemiology and Global Health 2024;25:101497. https://doi.org/10.1016/j.cegh.2023.101497.
[436] Peng H, Ouyang L, Li D, Li Z, Yuan L, Fan L, et al. Short-chain fatty acids in patients with schizophrenia and ultra-high risk population. Front Psychiatry 2022;13. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.977538.
[437] Chen H, Meng L, Shen L. Multiple roles of short-chain fatty acids in Alzheimer disease. Nutrition 2022;93:111499. https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111499.

[438] Lagod PP, Naser SA. The Role of Short-Chain Fatty Acids and Altered Microbiota Composition in Autism Spectrum Disorder: A Comprehensive Literature Review. International Journal of Molecular Sciences 2023;24:17432. https://doi.org/10.3390/ijms242417432.
[439] Zhang D, Jian Y-P, Zhang Y-N, Li Y, Gu L-T, Sun H-H, et al. Short-chain fatty acids in diseases. Cell Commun Signal 2023;21:212. https://doi.org/10.1186/s12964-023-01219-9.
[440] Aaltio J, Euro L, Tynninen O, Vu HS, Ni M, DeBerardinis RJ, et al. Niacin supplementation in a child with novel *MTTN* variant m.5670A>G causing early onset mitochondrial myopathy and NAD+ deficiency. Neuromuscular Disorders 2024;43:14–9. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2024.07.005.
[441] Higashi T, Ogawa S. Isotope-coded ESI-enhancing derivatization reagents for differential analysis, quantification and profiling of metabolites in biological samples by LC/MS: A review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2016;130:181–93. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.04.033.
[442] El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Kuroda N. Current trends in isotope-coded derivatization liquid chromatographic-mass spectrometric analyses with special emphasis on their biomedical application. Biomedical Chromatography 2020;34:e4756. https://doi.org/10.1002/bmc.4756.
[443] Shigemura Y, Iwasaki Y, Sato Y, Kato T, Seko T, Ishihara K. Detection of Balenine in Mouse Plasma after Administration of Opah-Derived Balenine by HPLC with PITC Pre-Column Derivatization. Foods 2022;11:590. https://doi.org/10.3390/foods11040590.
[444] Kostyukevich Y, Acter T, Zherebker A, Ahmed A, Kim S, Nikolaev E. Hydrogen/deuterium exchange in mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews 2018;37:811–53. https://doi.org/10.1002/mas.21565.
[445] Damont A, Legrand A, Cao C, Fenaille F, Tabet J-C. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry in the world of small molecules. Mass Spectrometry Reviews 2023;42:1300–31. https://doi.org/10.1002/mas.21765.
[446] Klein S, Heinzle E. Isotope labeling experiments in metabolomics and fluxomics. WIREs Systems Biology and Medicine 2012;4:261–72. https://doi.org/10.1002/wsbm.1167.
[447] Jia R, Bradshaw RT, Calvaresi V, Politis A. Integrative HDX-MS enables quantification of the conformational landscape of the sugar transporter XylE 2022:2022.07.11.499559. https://doi.org/10.1101/2022.07.11.499559.
[448] Ye X, Luke B, Andresson T, Blonder J. 18O Stable Isotope Labeling in MS-based Proteomics. Briefings in Functional Genomics 2009;8:136–44. https://doi.org/10.1093/bfgp/eln055.
[449] Arrivault S, Guenther M, Fry SC, Fuenfgeld MMFF, Veyel D, Mettler-Altmann T, et al. Synthesis and Use of Stable-Isotope-Labeled Internal Standards for Quantification of Phosphorylated Metabolites by LC–MS/MS. Anal Chem 2015;87:6896–904. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01387.
[450] Damont A. ISotopologue mixtures for Quantitative Mass Spectrometry: Application to metabolomics. Agence Nationale de La Recherche n.d. https://anr.fr/Project-ANR-23-CE29-0015 (accessed August 21, 2024).
[451] Giraudeau P. Challenges and perspectives in quantitative NMR. Magnetic Reson in Chemistry 2017;55:61–9. https://doi.org/10.1002/mrc.4475.
[452] Ribay V, Dey A, Charrier B, Praud C, Mandral J, Dumez J, et al. Hyperpolarized ^{13}C NMR Spectroscopy of Urine Samples at Natural Abundance by Quantitative Dissolution Dynamic Nuclear Polarization. Angew Chem Int Ed 2023;62:e202302110. https://doi.org/10.1002/anie.202302110.
[453] Dey A, Charrier B, Ribay V, Dumez J-N, Giraudeau P. Hyperpolarized ^{1}H and ^{13}C NMR Spectroscopy in a Single Experiment for Metabolomics. Anal Chem 2023;95:16861–7. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02614.

Jérémy MONTEIRO

Développement de méthode de quantification pour la métabolomique clinique

Résumé :

En combinant des éléments subjectifs (symptômes) et des données mesurables issues de tests biologiques (comme les analyses sanguines), le médecin établit un diagnostic et prescrit un traitement adapté. L'objectif est d'évoluer vers une médecine personnalisée, où les traitements tiennent compte du phénotype de chaque individu, c'est-à-dire de l'interaction entre son génome, son mode de vie et son environnement. Bien que cette approche existe déjà, elle n'est pas encore généralisée en raison d'un manque de données et de connaissances spécifiques. Pour développer la médecine personnalisée, il est nécessaire d'enrichir les informations biologiques disponibles, notamment via l'intégration des sciences omiques en pratique clinique. La métabolomique, qui étudie les petites molécules dans les systèmes biologiques, est cruciale dans la découverte de biomarqueurs, l'amélioration des diagnostics et la personnalisation des traitements. En comparant les profils métaboliques de personnes en bonne santé et malades, il est possible de détecter des pathologies, suivre leur évolution et évaluer les réponses aux traitements.

L'intégration de la métabolomique en clinique est limitée par la robustesse des analyses et une couverture métabolique restreinte. Cette thèse développe des méthodes utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) pour surmonter ces défis.

L'un des projets de cette thèse évalue les données métaboliques et lipidiques du sang séché sur buvard (DBS), une alternative aux prises de sang en terme d'invasivité, de coût et d'accessibilité. Un autre pan de cette thèse explore l'amélioration de la couverture du métabolome via la dérivation chimique, une réaction chimique pré-analytique, permettant des analyses quantitatives semi-ciblées. Une méthode de quantification des acides gras à chaîne courte (SCFA) a été développée, ainsi qu'une évaluation des capacités d'une nouvelle étiquette chimique, le BASA. Ces avancées visent à intégrer la métabolomique de manière plus systématique en clinique, améliorant diagnostics, traitements et suivi des patients.

Mots clés : *métabolomique, quantification, dérivation, LC-MS, RMN, analyse semi-ciblée*

Summary:

Medicine integrates clinical criteria, biology, and imaging to diagnose and treat patients by combining subjective symptoms with measurable data from biological tests. The goal is to move towards personalized or precision medicine, tailoring treatments to each individual's phenotype, which reflects the interaction between their genome, lifestyle, and environment. Although this approach exists, it is not yet widely applied due to limited data and specificity.

To advance personalized medicine, enhancing biological information is crucial, particularly through the integration of omics sciences. Metabolomics, which studies small molecules (metabolites) in biological systems, plays a key role in biomarker discovery, improved diagnostics, and personalized treatments. By comparing metabolic profiles between healthy and diseased states, metabolomics helps detect diseases, monitor progression, and assess treatment response. However, challenges remain in integrating metabolomics into routine clinical practice, such as ensuring robust analysis and broad metabolic coverage. This thesis addresses these challenges by developing methods using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS).

Blood analysis, commonly used in clinical biology, is invasive and requires visits to collection centers. Dried blood spots (DBS) offer a less invasive, cost-effective alternative, allowing self-collection and postal delivery to laboratories. This thesis evaluated the metabolic and lipid profiles from DBS compared to serum for potential clinical use.

Quantitative and reproducible analyses are essential for clinical integration. While targeted LC-MS methods are robust, they offer limited coverage, and non-targeted methods lack reliability. To address this, a derivatization step was introduced to enhance metabolome coverage and enable semi-targeted quantitative analysis. Key achievements of this thesis include developing a quantification method for short-chain fatty acids (SCFA) across multiple human samples and evaluating a new chemical tag, BASA, to improve metabolomics quantification. These advancements aim to extend metabolomics applications in clinical settings, enhancing diagnosis, treatment, and patient monitoring.

Keywords: *metabolomics, quantification, derivatization, LC-MS, NMR, (Un)Targeted Analysis*