

## Mémoire

**Auteur :** Dosquet, Marie

**Promoteur(s) :** Damblon, Christian; Matagne, André

**Faculté :** Faculté des Sciences

**Diplôme :** Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

**Année académique :** 2023-2024

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/20540>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---



JUIN 2024

Analyse métabolomique de la douleur chronique  
par RMN bidimensionnelle : Evaluation du logiciel  
COLMAR

DOSQUET Marie

Faculté des sciences

Département des sciences de la vie

Centre de résonance magnétique nucléaire

Mémoire en vue de l'obtention d'un master en biochimie, biologie  
moléculaire et cellulaire à finalité approfondie

Sous la supervision du Pr. Christian Damblon

Mes remerciements vont au Professeur Christian Damblon mon promoteur ainsi qu'à Maxime Kolkman mon encadrant pour leurs nombreux conseils judicieux et leur aide si précieuse tout au long de ce travail, la réalisation de mon mémoire n'aurait pas été possible sans eux. Je tiens également à remercier Marius Wanko pour son soutien et ses encouragements. Je finirai par remercier mes parents et ma sœur pour m'avoir aidé, conseillé et soutenu durant toutes mes études.

## Table des matières

0.	Glossaire.....	
1.	Résumé.....	1
2.	Introduction .....	2
2.1	La douleur chronique .....	2
2.2	La métabolomique.....	3
2.3	La spectrométrie de masse .....	4
2.4	La spectroscopie RMN .....	5
2.5	Combinaison SM et RMN .....	7
2.5.1	L'expérience à une dimension (1D).....	8
2.5.2	Les expériences à deux dimensions (2D).....	10
2.5.2.1	L'expérience de corrélation hétéronucléaire à un quanta (HSQC) .....	11
2.5.2.2	L'expérience de spectroscopie de corrélation totale homonucléaire (TOCSY) .....	12
3.	Objectifs .....	13
4.	Relevé de la littérature .....	14
4.1	Spectroscopies RMN et spectroscopie de masse.....	14
4.2	Douleur chronique.....	15
5.	Matériel & Méthodes .....	16
5.1	Echantillons .....	16
5.1.1	Tube « 10 métabolites » .....	16
5.1.2	Tube « d'échantillons biologiques » .....	16
5.2	Spectromètres .....	17
5.2.1	Spectromètre 400 MHz .....	17
5.2.2	Spectromètre 700 MHz .....	17
5.3	Logiciels informatiques.....	17
5.3.1	TopSpin .....	17
5.3.2	ChenomX.....	17
5.3.3	COLMAR .....	17
6.	Résultats.....	18
6.1	ChenomX.....	18
6.1.1	Présentation du serveur web .....	18
6.1.2	Echantillon « 10 métabolites ».....	18
6.1.3	Echantillons biologiques : Milieu frais .....	19
6.1.4	Echantillons biologiques : Milieu conditionné .....	26
6.1.5	Conclusion .....	29
6.2	COLMAR .....	29
6.2.1	Présentation du serveur web .....	29

6.2.2	Résultats obtenus .....	31
6.2.3	Résultats COLMAR du tube « 10 métabolites » .....	31
6.2.3.1	COLMAR HSQC.....	31
6.2.3.2	COLMAR TOCSY.....	33
6.2.3.3	Combinaison des résultats obtenus avec COLMAR HSQC et TOCSY .....	36
6.2.4	Résultats COLMAR HSQC et TOCSY sur des échantillons de milieu frais - conditionné .....	40
6.2.5	Répétabilité des résultats obtenus par COLMAR sur les échantillons de milieu frais .....	46
6.2.5.1	COLMAR TOCSY.....	46
6.2.5.2	COLMAR HSQC.....	49
6.2.5.3	COLMARc.....	52
6.2.5.4	Résumé des sessions COLMAR HSQC, COLMAR TOCSY et COLMARc .....	54
6.2.5.5	Conclusion des sessions COLMAR HSQC, COLMAR TOCSY et COLMARc .....	55
6.3	Illustration de la robustesse de la RMN .....	55
6.4	Illustration de la dégradation de l'échantillon .....	56
7.	Conclusion.....	57
8.	Bibliographie .....	
9.	Annexes .....	
9.1	Tableau de synthèse du fonctionnement du logiciel COLMAR.....	
9.2	Design du logiciel COLMAR .....	
9.2.1	Sessions HSQC.....	
9.2.2	Session TOCSY .....	
9.2.3	COLMARq .....	
9.3	Design du logiciel ChenomX.....	
9.4	Spectres acquis à partir de l'échantillon de milieu frais .....	
9.4.1	Spectre 1D <sup>1</sup> H.....	
9.4.2	Spectre 2D HSQC .....	
9.4.3	Spectre 2D TOCSY .....	
9.5	Spectres acquis à partir de l'échantillon de milieu conditionné.....	
9.5.1	Spectre 1D <sup>1</sup> H.....	
9.5.2	Spectre HSQC.....	
9.5.3	Spectre TOCSY.....	
9.6	Tableau des concentrations normalisées par le Formate .....	

## 0. Glossaire

- SNC : Système nerveux central
- CFA : Adjuvant complet de Freund
- COLMAR : Constrained linear model analysis and regression
- 1D : Une dimension
- 2D : Deux dimensions
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DSS : Acide 4,4-Diméthyl-4-Silapentane-1-Sulfonique
- ESI : Ionisation par électrospray
- FBS : Sérum foetal de veau
- GC : Chromatographie en phase gazeuse
- HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
- HSQC : Expérience de corrélation hétéronucléaire à un quanta
- LC : Chromatographie en phase liquide
- M/Z : Rapport masse sur charge
- SNR : Rapport signal sur bruit
- PPM : Partie par millions
- RMN : Résonance magnétique nucléaire
- SM : Spectroscopie de masse
- TOCSY : Expérience de spectroscopie de corrélation totale homonucléaire
- TSP : Acide triméthylsilylpropanoïque

## 1. Résumé

Ce travail rédigé par Marie Dosquet en juin 2024 portera sur « Une analyse métabolomique de la douleur chronique par RMN bidimensionnelle : Evaluation du logiciel COLMAR ». Les résultats présents dans ce document ont été obtenus au sein du laboratoire de résonance magnétique nucléaire sous la supervision du Professeur Christian Damblon.

L'objectif de ce mémoire est d'investiguer la possibilité d'utiliser la RMN 2D pour augmenter la résolution des analyses RMN et pour améliorer le nombre de métabolites détectés et quantifiés. Cette méthode sera appliquée à l'étude du métabolisme astrocytaire dans le cadre de la douleur chronique. Afin de détecter et de quantifier les métabolites présents dans les échantillons étudiés, deux logiciels informatiques seront utilisés. Le premier logiciel, ChenomX, analysera uniquement les spectres 1D  $^1\text{H}$  alors que le second logiciel, COLMAR, analysera les spectres 2D HSQC et TOCSY. Les performances de ces deux outils seront évaluées en analysant des échantillons de milieu frais contenant du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), un antifongique, un antibactérien, du FBS (sérum fœtal de veau) et de la proline ainsi que des échantillons de milieu conditionné contenant du milieu frais ayant été en contact avec des cellules du système nerveux central (SNC).

Lors de l'analyse par ChenomX, la majorité des signaux présents dans le spectre 1D  $^1\text{H}$  de l'échantillon étudié ont été attribués à un métabolite. ChenomX permet également de mesurer la concentration des métabolites détectés. Les mesures de concentration réalisées par le logiciel sont presque identiques aux concentrations théoriques. Le Logiciel COLMAR détecte un grand nombre de métabolites. Cependant, tous ces métabolites ne sont pas présents dans l'échantillon étudié. COLMAR considère des artéfacts comme étant de véritables signaux, il détecte un composé malgré le fait que tous les signaux relatifs à ce composé ne sont pas présents dans le spectre, il considère également les artéfacts du pic de l'eau comme étant des signaux de métabolites.

En conclusion, le logiciel ChenomX est la référence actuelle pour la détection de métabolites dans des spectres 1D  $^1\text{H}$ . Les résultats obtenus par COLMAR doivent être confirmés par le logiciel ChenomX ou manuellement en observant sur les spectres HSQC et TOCSY si les corrélations relatives aux métabolites détectés sont bien présentes. COLMAR permet également de mesurer la concentration des métabolites détectés mais la compréhension de son fonctionnement est encore en cours d'analyse. ChenomX peut donc être utilisé seul afin de détecter la présence de métabolites dans un échantillon. Ce logiciel étant purement manuel, un biais humain intervient lors de l'analyse des résultats. C'est pourquoi l'utilisation de COLMAR qui est un logiciel automatique serait préférable. Actuellement, COLMAR ne peut être utilisé seul en raison du nombre élevé de métabolites absents dans l'échantillon qu'il détecte.

## 2. Introduction

### 2.1 La douleur chronique

La douleur chronique peut être définie comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle qui persiste dans le temps (plus de trois mois) après la guérison de la lésion [Świeboda et al., 2013]. Les traitements actuels sont inefficaces [Goldberg & McGee, 2011], ils n'offrent pas un soulagement constant au cours du temps et ils présentent des effets secondaires indésirables tels que la dépendance aux opiacés menant à une espérance de vie réduite [van Rijswijk et al., 2019]. Leur utilisation doit donc être limitée. Actuellement, la douleur chronique touche de plus en plus de personnes dans le monde. En effet, 20 % de la population souffre de cette pathologie [Treede et al., 2015]. La douleur chronique représente donc un problème majeur de santé publique [Goldberg & McGee, 2011].

Afin de pouvoir espérer trouver un traitement permettant la rémission totale des patients souffrant de douleur chronique, il est primordial de comprendre les mécanismes responsables de la mise en place et de la maintenance de la douleur chronique. L'équipe du professeur Emmanuel Hermans de l'UCLouvain a émis l'hypothèse que le système  $X_c$  présent dans les astrocytes au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière avait des implications dans l'établissement de la douleur chronique. Les astrocytes sont des cellules gliales du système nerveux central (SNC) ayant un rôle dans le support et la protection des neurones. Le transporteur membranaire système  $X_c$ , est un anti-porteur cystine-glutamate qui contribue à la modulation de la concentration du neurotransmetteur glutamate dans l'espace synaptique. Le système  $X_c$  est constitué d'une sous-unité à chaîne lourde qui est commune à plusieurs transporteurs d'acides aminés ainsi qu'une sous-unité spécifique à chaîne légère  $xCT$ . Ce transporteur prend en charge simultanément une molécule de cystine et de glutamate dans le sens du gradient de concentration de chacune des molécules. Ainsi, en condition physiologique, la cystine sera captée dans le milieu intra-cellulaire et rentrera dans la cellule alors que le glutamate sera libéré dans l'espace synaptique [Lewerenz et al., 2012]. Lors de la transmission de la douleur, le glutamate est libéré par les terminaisons afférentes. Il active ensuite les récepteurs post-synaptiques pour permettre la continuité du signal vers le cortex. Dans le cas des douleurs chroniques, la libération de glutamate dans l'espace synaptique persiste malgré l'absence de stimulation nociceptive. Le système  $X_c$  est donc impliqué dans le processus de mise en place et de maintenance de douleurs chroniques [Charlier, 2023].

Le professeur Hermans et son équipe ont poursuivi leurs recherches en inactivant ce système  $X_c$ . Il est connu que le système  $X_c$  est lié à la régulation du glutamate dans la synapse. Ainsi, puisque les astrocytes jouent un rôle dans la régulation du métabolisme neuronal en participant à des échanges moléculaires via des transporteurs, l'inactivation du système  $X_c$  pourrait modifier l'environnement



synaptique. Afin de l'inactiver, deux méthodes ont été employées. Premièrement, le système  $X_c$  peut être inhibé à l'aide d'une substance chimique, la sulfasalazine. Celle-ci est utilisée dans le traitement de diverses maladies telles que la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn ou encore la polyarthrite rhumatoïde. Les traitements à la sulfasalazine peuvent provoquer des effets secondaires indésirables comme des étourdissements, des maux de tête, des éruptions cutanées ou une infertilité masculine [Taffet & Das, 1983 ; Plosker and Croom, 2005]. Deuxièmement, l'inactivation peut se faire en utilisant le système Cre-Lox. Il s'agit d'un outil de recombinaison de l'ADN où une enzyme, la recombinaison Cre, reconnaît et coupe des séquences spécifiques de l'ADN, les sites Lox. Lorsque la recombinaison Cre se lie aux sites Lox et catalyse la recombinaison, cela entraîne le réarrangement de l'ADN entre ces deux sites [Araki et al., 2002]. Dans ce cas-ci, le système Cre-Lox va être utilisé pour enlever uniquement le gène codant pour le système  $X_c$  astrocytaire. L'excision de ce gène se réalise par une exposition au tamoxifène. Le système utilisant la Cre recombinaison est régulé de manière inductible par le tamoxifène. La liaison du tamoxifène sur le promoteur permet à la recombinaison Cre de s'activer et de se lier à l'ADN pour exciser la région du gène impliquée dans la formation du système  $X_c$  [Charlier, 2023]. Le promoteur est spécifique aux astrocytes permettant d'éviter l'excision du gène dans d'autres types de cellules. L'administration de tamoxifène conduit donc à l'inactivation du gène xCT qui code pour le système  $X_c$  chez les souris.

Le choix d'utiliser Cre-Lox a pour but de contourner les problèmes majeurs rencontrés lors des knock-out classiques tels que la létalité [Kratochwil and Rijli, 2014]. Le knock-out est une technique utilisée en génétique moléculaire pour inactiver un gène spécifique. Cela est souvent réalisé en introduisant des mutations ou en éliminant complètement le gène ciblé dans un organisme ou une cellule. Le but principal d'un knock-out est d'étudier le rôle d'un gène particulier en observant les effets de son absence sur le phénotype de l'organisme. Afin de pouvoir comparer le métabolisme d'une souris saine et d'une souris ayant perdu son système  $X_c$ , une étude métabolomique va être réalisée.

## 2.2 La métabolomique

La métabolomique est une discipline scientifique qui vise à identifier et quantifier les métabolites, définis comme des molécules organiques de masse moléculaire inférieure à 1500 Daltons. L'analyse des métabolites permet d'étudier le métabolisme, c'est-à-dire l'ensemble des réactions chimiques (production d'énergie, synthèse de biomolécules, dégradation de nutriments, ...) dans un organisme vivant. En combinaison avec d'autres données -omiques telles que la transcriptomique (étude de l'ARN messager) ou la protéomique (étude des protéines), la métabolomique permet d'obtenir une compréhension plus approfondie des processus biologiques. En effet, une variation du métabolome suite à une perturbation comportementale ou pathologique s'effectue rapidement. Par exemple, la consommation d'alcool par un individu entraîne une modification directe du métabolisme. Il est donc

possible de prélever un échantillon de sang ou d'urine et de le soumettre à une analyse métabolomique immédiate.

Cette technique peut avoir une approche ciblée, où des métabolites spécifiques sont suivis afin d'étudier une voie métabolomique spécifique, ou une approche non ciblée, consistant à déterminer les signaux distinctifs entre 2 populations (avec  $X_c$  /sans  $X_c$ ) [Roessner & Bowne, 2009]. Ces signaux permettant une distinction statistique entre 2 populations sont appelés des « biomarqueurs ».

La métabolomique trouve des applications dans de nombreux domaines tels que la biologie végétale pour notamment analyser le phénotype des plantes en relation avec leur environnement, la toxicologie afin de détecter des biomarqueurs de toxicité lors de traitements médicaux, la médecine (personnalisée) dans le but de diagnostiquer diverses pathologies de manière non invasive et précoce ainsi que dans le cadre d'études épidémiologiques à grande échelle [Canlet et al., 2012]. Les analyses métabolomiques sont donc souvent effectuées sur des mélanges complexes tels que l'urine, le sang, un extrait de plante, des cellules ou un tissu. Malgré son potentiel prometteur, la métabolomique nécessite encore des développements supplémentaires [Canlet et al., 2012], notamment l'amélioration des logiciels permettant une attribution automatique des signaux. L'identification et la quantification des métabolites de ces mélanges complexes se font principalement par deux techniques spectroscopiques analytiques : la spectroscopie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

### 2.3 La spectrométrie de masse

La SM est une méthode analytique employée pour la détermination de la masse des molécules ainsi que l'identification de composés inconnus dans un échantillon, Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Cette méthode consiste à ioniser l'échantillon en phase gazeuse, à éventuellement lui faire subir une fragmentation et à caractériser les ions par leurs rapports  $m/z$  [Kaklamanos et al., 2020]. Ces rapports fournissent des informations à la fois qualitatives (composition de l'échantillon) et quantitatives (l'intensité du signal  $m/z$  obtenu est corrélée à la concentration du composé) [Finehout & Lee, 2004]. La SM est souvent associée à une étape de chromatographie pour la séparation des molécules de l'échantillon. En effet, dans un mélange, il peut exister plusieurs molécules différentes ayant la même masse. La chromatographie permet la séparation de ces différentes molécules, ce qui évite l'envoi simultané de toutes les molécules vers le détecteur de masse. L'échantillon doit être ionisé avant l'analyse en SM [Leban, 2013]. Il existe diverses méthodes d'ionisation, certaines nécessitant des manipulations supplémentaires de l'échantillon pouvant entraîner une altération de ce dernier [Kaklamanos et al., 2020]. L'ionisation est spécifique à chaque molécule, ce qui entraîne des intensités

différentes en fonction du taux d'ionisation. Il est donc essentiel d'utiliser une référence distincte pour chacun des composés analysés.

## 2.4 La spectroscopie RMN

En RMN, chaque molécule est généralement caractérisée par plusieurs signaux (par opposition à la SM qui définit chaque ion par un seul pic). Chacun de ces signaux est déterminé par une fréquence (déplacement chimique), une forme (multiplicité) et une intégrale (surface sous le signal) (Figure 1). L'intensité relative dépend du nombre de protons par signal observé. Le déplacement chimique est relatif à la densité électronique autour du proton observé.

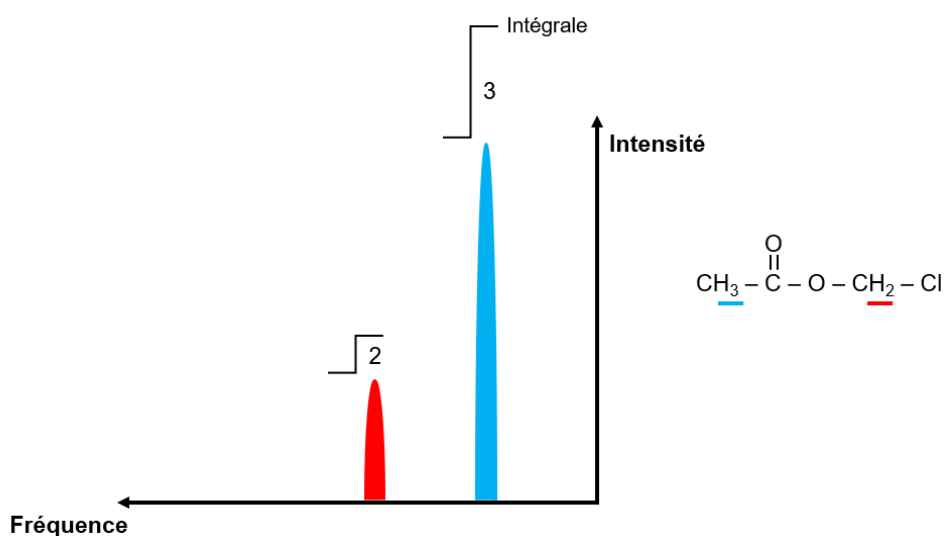


Figure 1 : Représentation du déplacement chimique ( $\delta$ ) et de l'intégrale du nombre de protons d'une molécule en RMN. Le signal le plus proche du noyau chlore ( $\text{CH}_2$ ) sera positionné à une fréquence plus élevée que le signal du  $\text{CH}_3$ . Le  $\text{CH}_3$  aura une intégration de 3 protons et le  $\text{CH}_2$  aura une intégration de 2 protons.

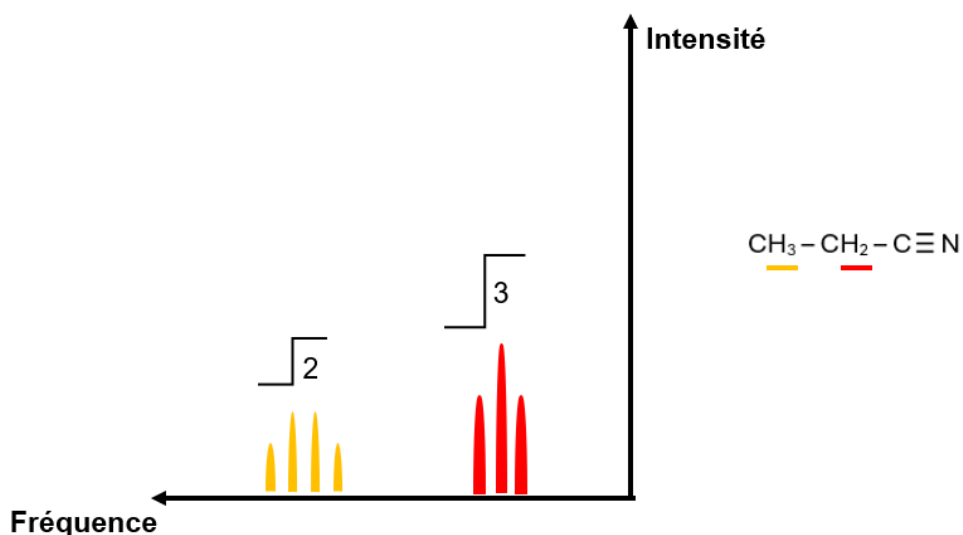


Figure 2 : Représentation de la multiplicité en RMN. En RMN, la multiplicité est calculée à l'aide de la formule « Multiplicité =  $2 \cdot n \cdot S + 1$  » où  $n$  correspond au nombre de noyaux voisins en interaction avec le noyau observé et  $S$  correspond au nombre de spin (nombre de spin du H vaut  $\frac{1}{2}$ ). Le  $\text{CH}_3$  ayant deux protons voisins, son signal sera donc un triplet ( $2+1$ ) alors que le  $\text{CH}_2$  sera représenté par un quadruplet puisqu'il possède 3 protons voisins ( $3+1$ ). L'intensité relative des signaux obéit au triangle de Pascal.

Cette technique spectroscopique permet d'observer les isotopes qui possèdent un moment magnétique (spin) comme les protons  $^1\text{H}$  et les Carbones  $^{13}\text{C}$ . Comme dit précédemment, en RMN, chaque molécule est en général caractérisée par plusieurs signaux. Chaque signal apparaît sous une forme spécifique aux interactions entretenues avec les noyaux environnants. Certains signaux peuvent donc se présenter comme un ensemble de pics (doublets, triplets...). Ce phénomène est appelé multiplicité, où le nombre de pics obtenu dépend du nombre de noyaux voisins en interaction avec le noyau observé (n) et du nombre de spin (S) « Multiplicité =  $2 \cdot n \cdot S + 1$  » (Figure 2).

L'analyse de spectres RMN requiert l'ajout de deux composés de référence dans le mélange : une référence de déplacement chimique et un étalon. La référence est un composé possédant des méthyles ( $\text{CH}_3$ ) liés à un silicium et dont le signal est défini comme étant 0 ppm. Deux molécules solubles dans l'eau peuvent être utilisées comme référence : le DSS (acide 4,4-Diméthyl-4-Silapentane-1-Sulfonique) et le TSP (acide triméthylsilylpropanoïque) (Figure 3). Le DSS est un composé totalement ionisé qui interagit fortement avec les protéines. Le TSP, est un composé qui ne se lie pas aux protéines mais qui est partiellement ionisé et qui dépend donc du pH de l'échantillon. L'étalon est un composé utilisé pour la quantification. Ce composé doit posséder un signal facilement identifiable, et isolé, et doit être ajouté en quantité connue. Nous utiliserons soit le pic isolé à 0 ppm de notre référence comme étalon, soit le signal du formate (Figure 3) situé à 8,4 ppm.

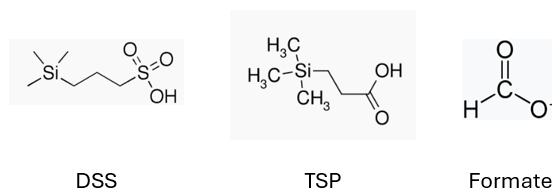


Figure 3 : Structures chimiques du DSS, TSP et Formate. Le DSS et le TSP possèdent trois  $\text{CH}_3$  identiques portés par le silicium, ils seront donc représentés par un singulet positionné à 0 ppm. Le formate contient un pic isolé à 8,4 ppm et est utilisé comme étalon.

$$\left. \begin{aligned} I_A &= [A] \cdot n_{\text{H}_A} \cdot \text{FA} \\ I_{\text{DSS}} &= [\text{DSS}] \cdot n_{\text{H}_{\text{DSS}}} \cdot \text{FA} \end{aligned} \right\} [A] = [\text{DSS}] \cdot \frac{n_{\text{H}_{\text{DSS}}}}{n_{\text{H}_A}} \cdot \frac{I_A}{I_{\text{DSS}}}$$

Figure 4 : Equation de l'intégrale d'un composé A ainsi que celle du DSS permettant d'obtenir la concentration du composé A où  $I_A$  et  $I_{\text{DSS}}$  représentent l'intégrale du composé A et du DSS,  $n_{\text{H}_A}$  et  $n_{\text{H}_{\text{DSS}}}$  représentent le nombre de protons présents dans le composé A et dans le DSS,  $[A]$  et  $[\text{DSS}]$  représentent la concentration de A et la concentration du DSS, FA représente le facteur d'appareillage.

Dans les spectres RMN 1D, tous les protons auront la même intégrale pour autant qu'ils aient la même concentration. Ceci s'explique par le fait que l'intégrale d'un signal dépend de la concentration du composé étudié, du nombre de protons du signal observé ainsi que du facteur d'appareillage qui représente une valeur inconnue. En procédant à un rapport de l'équation du DSS avec celle des

échantillons étudiés, il est possible d'éliminer le facteur d'appareillage (mesure relative) reprenant les constantes spécifiques à l'expérience et au spectromètre, permettant le calcul de la concentration des métabolites (*Figure 4*).

## 2.5 Combinaison SM et RMN

En conclusion, ces deux techniques présentent des avantages synergiques, faisant d'elles des outils complémentaires incontournables. La SM est connue pour sa sensibilité (nécessite peu de matériel,  $15 \cdot 10^{-3}$  mg/mL) ainsi que sa résolution élevée (capacité à distinguer deux signaux de masses différentes). Cependant, elle permet difficilement d'observer les perturbations de concentration. La SM requiert une différence de concentration d'au moins 30 % (contre 10% en RMN) [Wishart et al., 2022] entre deux signaux pour être interprétée. La variation due à la condition biologique doit être supérieure à celle inhérente à la méthode elle-même (étapes d'ionisation, de chromatographie, ...).

De nos jours, l'utilisation de la SM est de plus en plus étendue grâce aux progrès technologiques, particulièrement en ce qui concerne l'instrumentation, la technologie informatique et les logiciels associés [Finehout & Lee, 2004]. Finalement, il est important de souligner que la SM est une technique plus résolutive que la RMN. Elle permettra facilement de distinguer deux signaux de  $m/z$  proches l'un de l'autre.

La RMN, quant à elle, est une technique non destructive qui nécessite peu de préparation de l'échantillon et qui ne requiert pas de séparation car toutes les molécules sont détectées avec la même sensibilité quelle que soit leur nature chimique [Reo, 2002]. La RMN est très reproductible (lorsque le même protocole est utilisé, les résultats obtenus seront similaires [Martineau et al., 2020]) et robuste (en utilisant des spectromètres différents, les résultats obtenus seront équivalents). Cependant, la RMN est limitée par sa faible sensibilité [Wishart, 2008] et son manque de résolution.

Actuellement, aucune des deux méthodes SM et RMN ne permet une analyse complète du métabolome, c'est-à-dire de l'ensemble des métabolites présents dans un organisme à un moment donné. Cela est dû à de multiples facteurs tels que les limitations de sensibilité, la perte de métabolites lors de la préparation et l'analyse de l'échantillon. L'utilisation combinée de la spectroscopie RMN et de la SM permettent de maximiser et de faciliter l'identification des métabolites ainsi que la découverte de biomarqueurs. L'utilisation parallèle des méthodes RMN et SM peut donc améliorer considérablement la qualité des études métabolomiques [Bingol et al., 2015]. La RMN peut présenter des limites dans la distinction des métabolites ayant des structures similaires telles que la Créatine et la Phosphocréatine. Cependant, il est possible de différencier ces métabolites grâce à leurs rapports de  $m/z$  distincts. A contrario, la SM ne sera pas capable de différencier le Glucose et le Fructose en raison de leur masse

identique. La RMN sera capable de le faire en raison des différences dans les spectres RMN des deux composés (Figure 5). La combinaison RMN/MS permettra donc de les distinguer [Bingol, 2018]. De plus, la RMN combinée à la MS a permis de réaliser une caractérisation structurale de nouveaux métabolites [Letertre et al., 2021].

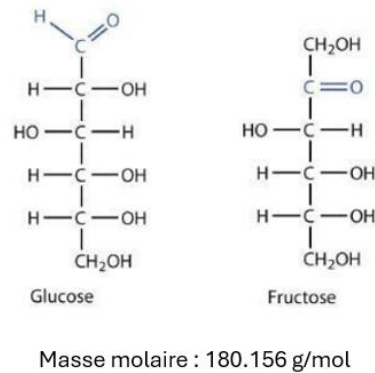


Figure 5 : Structures chimiques du Glucose et du Fructose. Ces deux sucres présentent la même masse molaire et ne sont donc pas distingués lors d'une analyse par spectrométrie de masse. Leur structure chimique étant différente, ces composés pourront être distingués lors d'une analyse par résonance magnétique nucléaire.

### 2.5.1 L'expérience à une dimension (1D)

La RMN  $^1\text{H}$  à une dimension (1D) est une technique couramment utilisée en métabolomique car elle est simple, rapide et permet d'obtenir facilement des signaux quantitatifs (Figures 6 et 7).

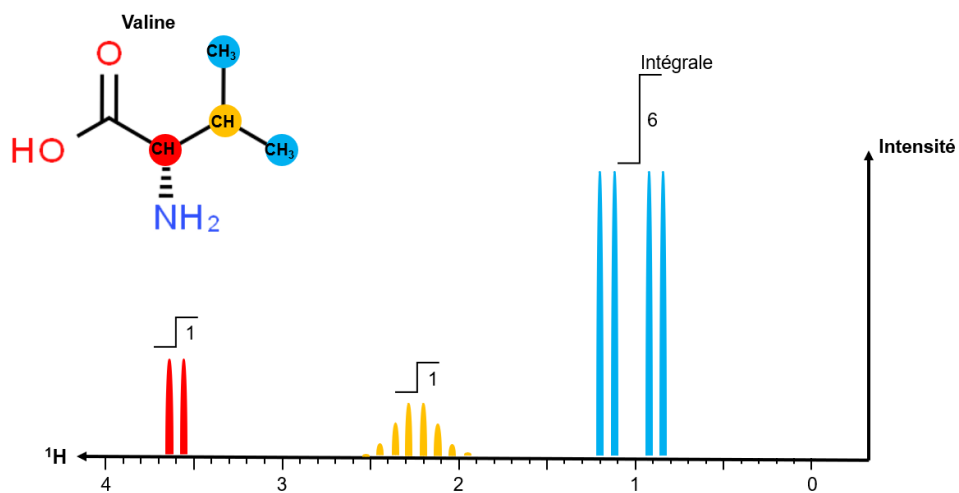


Figure 6 : Représentation des intégrales des signaux de la Valine. Les intégrales dépendent du nombre de protons portés par chaque atome de Carbone.

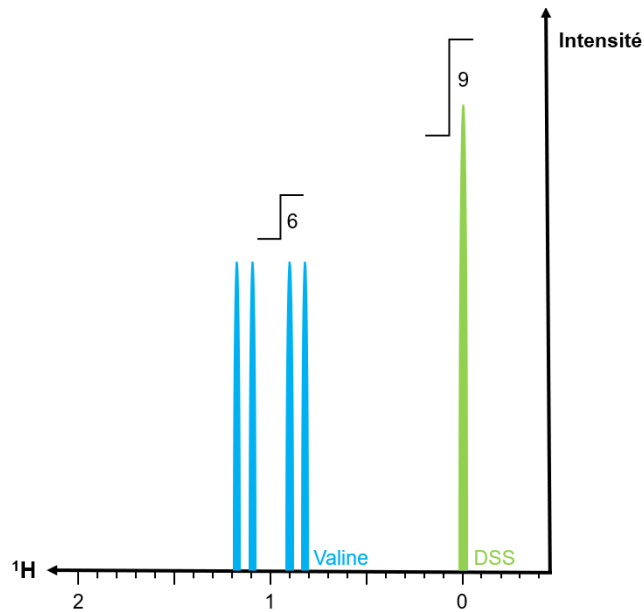


Figure 7 : Représentation de l'intégrale d'un signal de la Valine ainsi que celle du DSS. L'intensité du signal de la Valine est comparé à l'intensité du DSS (étalon) pour permettre la mesure de la concentration de la Valine par rapport à la concentration en étalon.

Le traitement des spectres  $^1\text{H}$  1D se fait de manière automatique ou manuelle en utilisant notamment le logiciel TopSpin permettant le traitement des données spectrales. L'attribution des signaux obtenus sur les spectres aux métabolites présents dans l'échantillon peut se faire par d'autres logiciels, dont le plus répandu est le logiciel commercial de déconvolution spectrale ChenomX NMR Suite 10.0 (ChenomX Inc., Edmonton, Canada). ChenomX est un logiciel utilisé pour faire correspondre manuellement les signaux spectraux d'un échantillon avec ceux d'une base de données afin de déterminer la présence d'un composé spécifique. L'alignement correct des pics indique la présence du composé recherché. ChenomX permet également de déterminer la concentration des métabolites présents (Figures 8 et 9).

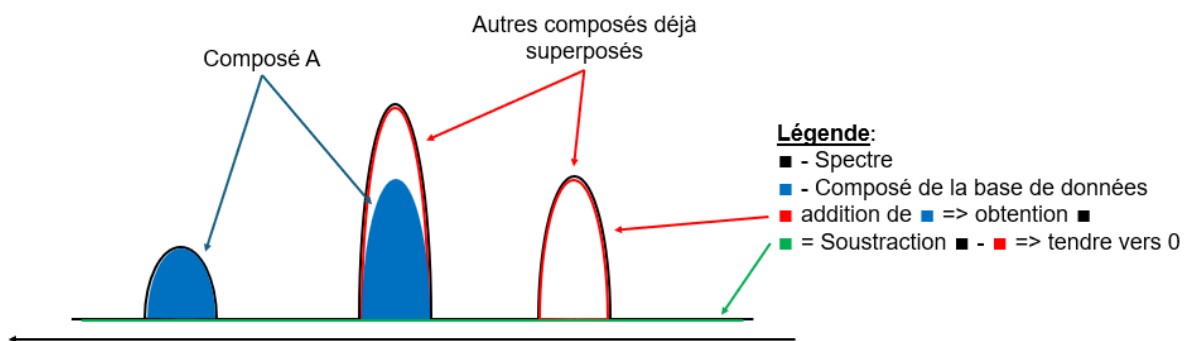


Figure 8 : Schéma illustrant le mode de fonctionnement du logiciel ChenomX. Les signaux bleus indiquent les signaux correspondant au composé dans la base de données, tandis que les signaux noirs représentent le spectre à analyser. La superposition des signaux bleus et noirs est nécessaire pour confirmer l'identification du composé dans l'échantillon étudié. La ligne rouge correspond à la somme des signaux bleus (plusieurs signaux peuvent être positionnés au même endroit) et doit donc se superposer à la ligne noire. La ligne verte doit tendre vers 0 pour une bonne analyse.

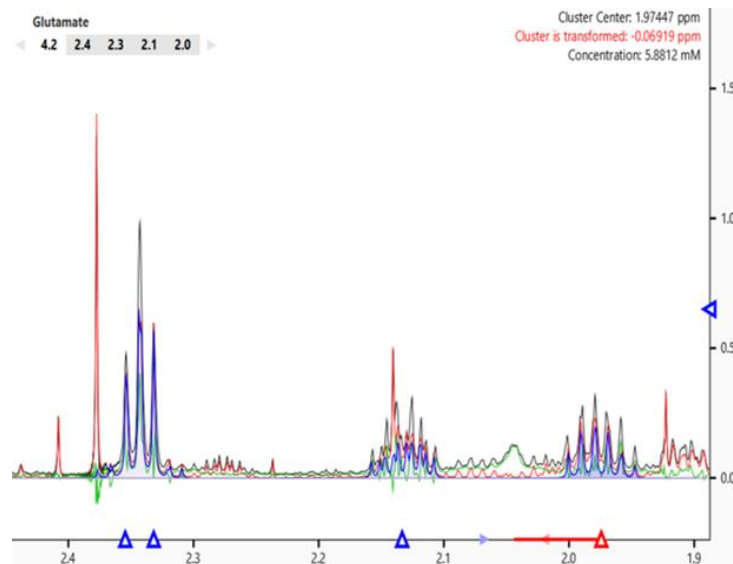


Figure 9 : Figure illustrant le mode de fonctionnement du logiciel ChenomX. Les signaux bleus indiquent les signaux correspondant au composé dans la base de données (Glutamate dans ce cas-ci), tandis que les signaux noirs représentent le spectre à analyser. La superposition des signaux bleus et noirs confirme que le Glutamate est présent dans l'échantillon étudié. La ligne rouge correspond à la somme des signaux bleus (plusieurs signaux peuvent être positionnés au même endroit) et doit donc se superposer à la ligne noire. La ligne verte doit tendre vers 0 pour une bonne analyse.

Si ces logiciels apportent une aide non-négligeable dans l'identification des signaux, il faut toutefois noter que la quantification des signaux est fortement entachée d'un biais humain. De plus, l'expérience RMN proton 1D offre peu de résolution à cause de la superposition de différents signaux (Figure 10), ce qui limite fortement le nombre de métabolites identifiés [Dumez, 2022 ; Marchand et al., 2017]. Pour améliorer la résolution, il est possible d'utiliser des spectres 2D.

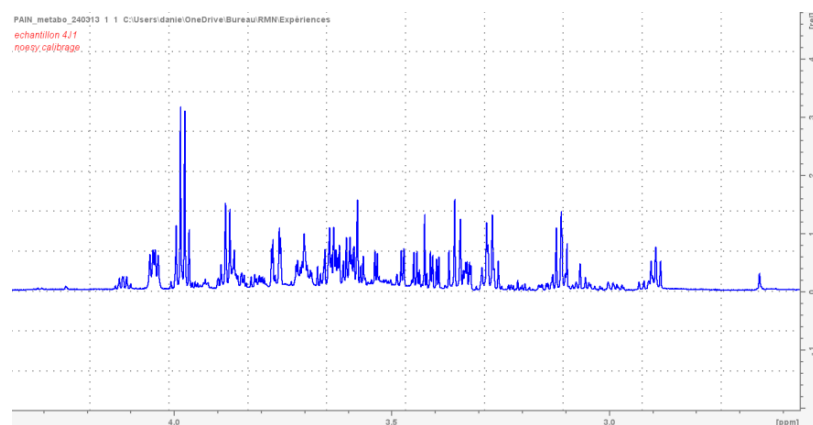


Figure 10 : Figure représentant un ensemble de signaux localisés au même endroit. Les signaux des différents composés se chevauchent presque entièrement, ce qui suggère qu'ils pourraient ne pas être distingués lors d'une analyse spectrale. Par conséquent, il se pourrait qu'un seul composé au lieu de deux soit considéré.

### 2.5.2 Les expériences à deux dimensions (2D)

Afin de contrer le problème de superposition rencontré en 1D, des expériences à deux dimensions (2D) peuvent être utilisées. Les expériences bidimensionnelles se caractérisent par deux



axes de fréquence et les signaux définis par les fréquences de deux noyaux différents sont nommés « corrélations ».

L'ajout d'une seconde dimension permet soit d'améliorer la résolution en évitant des superpositions qui subviennent dans le spectre 1D, soit de faciliter l'identification des métabolites grâce aux corrélations qui connectent des signaux issus d'une seule et même molécule. Il est également possible d'automatiser le traitement des spectres obtenus en utilisant les logiciels COLMAR ou MVApack, qui permettent une identification automatique des signaux. Les résultats ne seront donc peu ou pas entachés du biais humain.

Les expériences 2D présentent, tout de même, quelques inconvénients. Premièrement, le temps d'acquisition est long. Ceci s'explique par le fait que pour obtenir un spectre 2D, de nombreux spectres 1D doivent être acquis. Deuxièmement, la quantification absolue est rendue difficile car l'intensité du signal ne dépend plus uniquement de la concentration (comme pour l'expérience 1D  $^1\text{H}$ ) mais également d'autres paramètres propres à chaque corrélation (constante de couplage, relaxation). Il est possible d'avoir une quantification relative en suivant l'évolution de la concentration d'un métabolite au cours du temps ou en comparant des spectres acquis dans des conditions similaires, mais comparer deux métabolites entre eux est une tâche compliquée [Martineau et al., 2020].

Deux expériences 2D sont envisagées pour la métabolomique, l'HSQC et le TOCSY.

### 2.5.2.1 L'expérience de corrélation hétéronucléaire à un quanta (HSQC)

L'HSQC est une expérience bidimensionnelle hétéronucléaire dont les axes représentent les fréquences proton et les fréquences Carbone. Chaque corrélation C-H est caractérisée par un déplacement chimique relatif à l'Hydrogène ( $^1\text{H}$ ) ainsi qu'au Carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) (Figure 11).

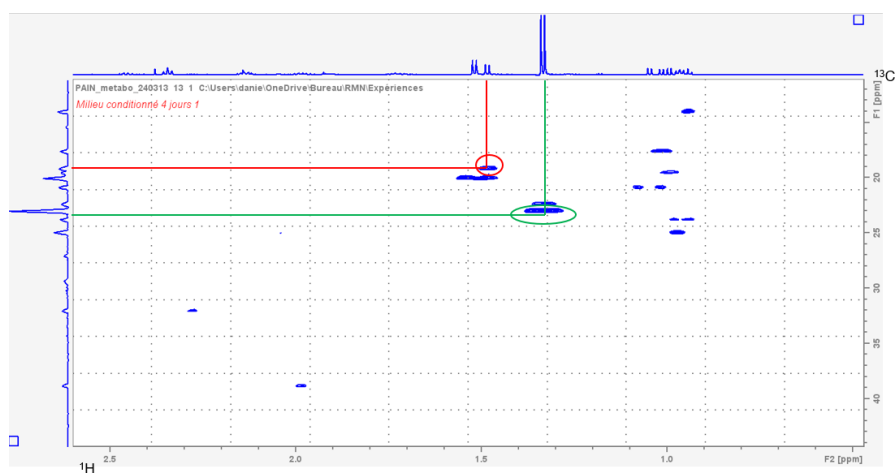


Figure 11 : Représentation d'une portion du spectre RMN 2D HSQC d'un échantillon de milieu frais dans lequel des astrocytes ont mûri pendant quatre jours, enregistré à 700 MHz. Diverses corrélations C-H caractérisées par une liaison entre un signal du spectre  $^1\text{H}$  et du spectre  $^{13}\text{C}$  sont observables (Spectre complet en annexe Figure 81).

L'ajout d'une seconde dimension permet d'améliorer la résolution. De fait, des signaux se superposant dans l'expérience 1D pourront être caractérisés par deux fréquences Carbone différentes et ne seront plus superposés (Figure 12). Cette expérience permet donc de distinguer les signaux plus aisément [Worley & Powers, 2015]. Outre la durée de l'expérience, l'HSQC présente deux autres inconvénients. Le premier est l'impossibilité de connecter plusieurs signaux entre eux et donc de savoir si ces noyaux appartiennent à un même système de spin (ensemble de protons connectés les uns aux autres). Le second inconvénient est la faible abondance isotopique du Carbone, qui est de 1%. Autrement dit, sur cent molécules contenant une liaison CH, seule une d'entre elles contiendra un atome de  $^{13}\text{C}$  et sera observable. L'expérience HSQC est donc beaucoup moins sensible que l'expérience proton 1D.

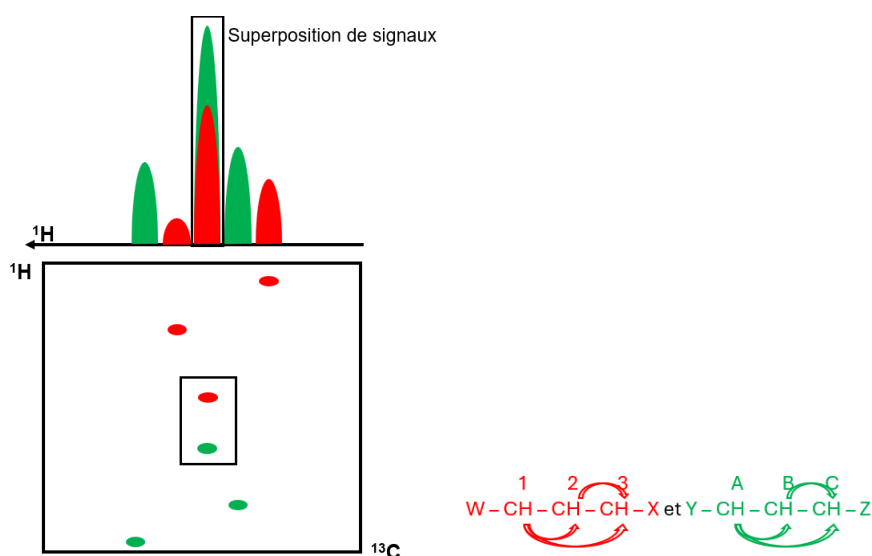


Figure 12 : Schéma illustrant le gain de résolution obtenu par l'expérience 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC. Deux composés différents sont présents dans l'échantillon (vert et rouge), et ces deux composés ont chacun un signal positionné au même endroit. Les deux signaux respectifs de ces composés se superposent donc sur le spectre 1D  $^1\text{H}$ . L'expérience 2D HSQC, qui inclut une dimension Carbone, permet de distinguer les deux signaux car ils ont des déplacements chimiques différents sur cette dimension. L'analyse HSQC a donc permis de séparer les signaux des deux composés, les rendant visibles individuellement.

### 2.5.2.2 L'expérience de spectroscopie de corrélation totale homonucléaire (TOCSY)

Le TOCSY, ou spectroscopie de corrélation totale homonucléaire H-H, permet de déterminer les corrélations entre les atomes d'Hydrogène au sein d'une même molécule (Figures 13 et 14), ce qui n'était pas possible avec le spectre 1D  $^1\text{H}$  [Dumez, 2022]. Le TOCSY est donc un outil précieux en spectroscopie RMN pour l'identification des signaux provenant d'une même molécule et en conséquence le TOCSY contribue grandement à la détermination de la structure moléculaire et donc à l'identification de composés. Son utilisation combinée avec d'autres techniques de RMN telles que l'HSQC permet d'obtenir une vision globale et détaillée de la structure et de la composition d'un composé chimique.

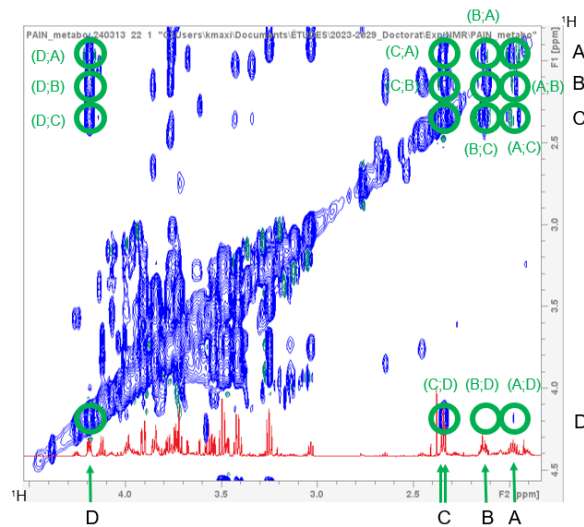


Figure 13 : Représentation d'une portion du spectre de RMN 2D TOCSY d'un échantillon de milieu frais dans lequel des astrocytes ont mûri pendant quatre jours, enregistré à 700 MHz. L'expérience TOCSY permet d'analyser la connectivité des protons dans un système de spin en observant les interactions entre ces différents Hydrogènes. Dans ce cas-ci, le spectre TOCSY montre que les signaux encerclés en vert correspondent à un même système de spin. Il est possible de corrélater ces résultats avec le spectre 1D protons, montrant que les signaux pointés par une flèche appartiennent également à ce même système de spin (Spectre complet en annexe Figure 82).

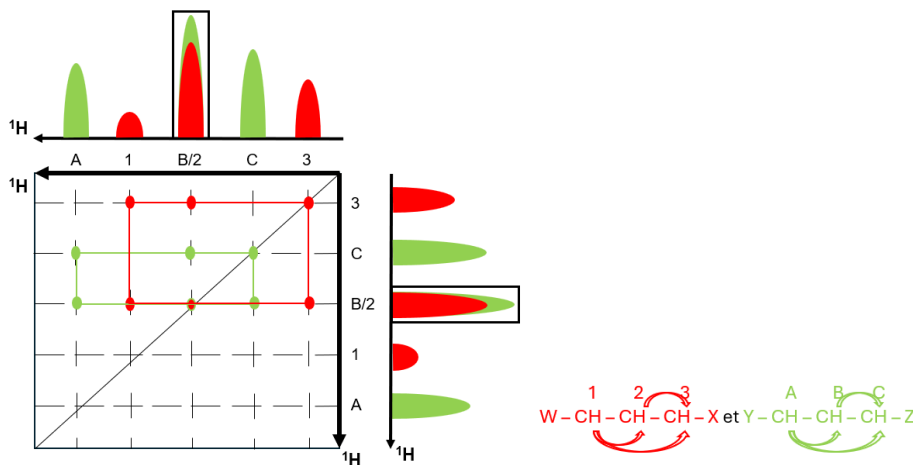


Figure 14 : Schéma représentant les expériences 1D  $^1\text{H}$  et 2D TOCSY, montrant deux molécules avec un unique système de spin (vert et rouge). L'utilisation de l'expérience 1D proton ne permet pas de différencier les signaux des deux molécules. En revanche, l'introduction d'une dimension proton supplémentaire permettra de distinguer clairement les signaux de chacune des molécules.

### 3. Objectifs

Notre but est d'investiguer la possibilité d'utiliser la RMN 2D pour augmenter la résolution des analyses RMN et pour améliorer le nombre de métabolites identifiés et quantifiés. Nous appliquerons notre méthode à l'étude du métabolisme astrocytaire dans le cadre de la douleur chronique, le but étant d'observer les éventuelles modifications du métabolisme astrocytaire entre des individus dont le système  $X_c$  est désactivé comparés à ceux dont le système  $X_c$  est toujours activé. Cette analyse permettra de quantifier les métabolites perturbés (biomarqueurs) associés à la douleur chronique. Pour parvenir

à cet objectif, nous travaillerons en plusieurs étapes. Tout d'abord, nous procéderons à l'obtention des spectres de nos échantillons en utilisant les spectromètres 400 et 700 MHz. Différentes expériences seront menées, incluant l'utilisation de spectres 1D  $^1\text{H}$ , suivie par le développement de méthodes 2D visant à résoudre les problèmes rencontrés en 1D. Les expériences HSQC (H-C) et TOCSY (H-H) seront employées. Les spectres obtenus seront traités avec le logiciel TopSpin, qui permet l'acquisition, le traitement et l'analyse des données spectrales. Une fois tous les spectres acquis et traités, nous évaluerons les performances des logiciels ChenomX (1D) et COLMAR (2D) en analysant un échantillon contenant dix métabolites connus, afin de valider leur utilisation. Nous procéderons ensuite à l'analyse d'un échantillon contenant du milieu frais DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), un antifongique, un antibactérien, du FBS (sérum fœtal de veau), de la proline en utilisant le logiciel ChenomX. Après avoir validé ces logiciels, nous les utiliserons pour analyser des échantillons biologiques provenant du laboratoire du professeur Hermans à l'UCLouvain contenant uniquement du milieu frais ou du milieu frais ayant été en présence de cellules du SNC (astrocytes) de souris saines pendant quatre jours. Tous les composés identifiés par COLMAR seront ensuite vérifiés à l'aide de ChenomX pour définir au mieux les composés des divers échantillons.

#### 4. Relevé de la littérature

##### 4.1 Spectroscopies RMN et spectroscopie de masse

La métabolomique est une discipline scientifique qui repose sur des méthodes analytiques telles que la RMN et la SM [Dumez, 2022]. L'utilisation combinée de ces techniques permet d'améliorer l'analyse métabolomique [Martineau et al., 2020]. Comme expliqué précédemment, la SM peut parvenir à discriminer plusieurs molécules lorsque la RMN n'y parvient pas et inversement (cas de la créatine et phosphocréatine ou du glucose et du fructose). Diverses combinaisons de plusieurs expériences RMN (1D/2D,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) ou de plateformes MS (par exemple LC/GC, ESI+/-) [Harvey et al, 2015] ainsi que la combinaison de ces deux techniques (LC-MS-RMN, HPLC-RMN-MS, HPLC-MS/MS, LC-RMN) peuvent donc être exploitées [Marshall & Powers, 2017 ; Gebretsadik et al, 2019 ; Van Der Hooft et al., 2012]. Au cours des vingt dernières années, un total de 19548 articles dans la littérature scientifique a utilisé la SM tandis que 8463 ont utilisé la RMN d'après des recherches menées sur PubMed. La SM est ainsi plus fréquemment employée dans le cadre des études métabolomiques. Ce phénomène s'explique principalement par le coût élevé des spectromètres RMN, qui s'élève à environ 1 million d'euros, ainsi que par les limitations de résolution associées à cette technique. Les expériences de RMN 1D présentent des superpositions de signaux rendant difficile voire impossible la distinction des signaux. Des expériences à deux dimensions (2D) telle que l'HSQC [Guennec et al., 2014] est utilisée pour résoudre les problèmes de chevauchements rencontrés en analyse 1D (augmentation de la résolution).

L'expérience 2D TOCSY permet de distinguer les signaux appartenant à un même système de spin [Bingol, Li, et al., 2015 ; Bingol et al., 2016]. Cependant, ces expériences 2D sont extrêmement longues. Des concepts supplémentaires ont alors été introduits pour accélérer les expériences, notamment en réduisant le nombre de points mesurés nécessaires pour reconstruire la dimension indirecte [Kazimierczuk & Orekhov, 2011, Holland et al., 2011], en réduisant le délai qui sépare les acquisitions consécutives [Schulze-Sünninghausen et al., 2014 ; Kupče & Freeman, 2007 ; Kupče & Claridge, 2017 ; Motiram-Corral et al., 2018] et l'encodage spatial [Kazimierczuk & Orekhov, 2011; Holland et al., 2011]. Il est également possible de faire de l'échantillonnage non uniforme (NUS) [Kazimierczuk & Orekhov, 2011; Holland et al., 2011 ; Gołowicz et al., 2020] pour les expériences 2D généralement utilisées pour l'analyse des mélanges [Guennec et al., 2014; Martineau et al., 2013; Schlippenbach et al., 2018]. Jusqu'à présent, 123 articles traitant d'études métabolomiques faisant intervenir des expériences RMN 2D ont été publiés sur PubMed. Il serait donc intéressant d'exploiter des logiciels d'analyse automatiques tels que COLMAR permettant l'attribution des signaux observés dans les spectres 2D à des métabolites afin de pouvoir déterminer la composition d'un échantillon.

#### 4.2 Douleur chronique

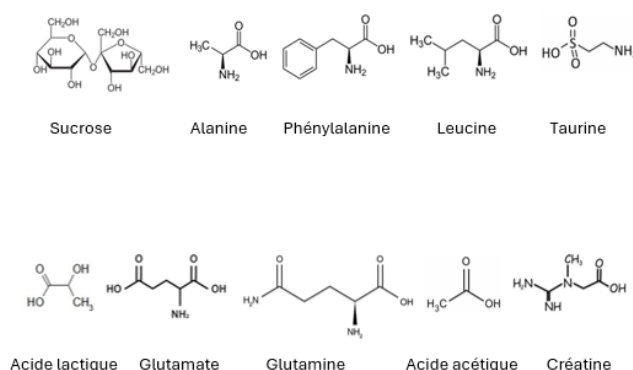
Dans le cadre de l'étude de la douleur chronique, l'équipe du professeur Hermans (UCLouvain) a proposé l'hypothèse d'inhibition du système  $X_C$ . Cette inhibition pourrait constituer une approche pharmacologique prometteuse pour prévenir l'établissement de la chronicité de la douleur. Pour tester cette hypothèse, un modèle *in vivo* utilisant des souris contrôles ( $X_C +/+$ ) et des souris transgéniques qui n'expriment pas le système  $X_C$  ( $X_C -/-$ ) a été mis en place [Beckers et al., 2022]. Le modèle expérimental consistait à injecter de l'adjuvant complet de Freund (CFA) dans la patte postérieure gauche des souris. Le CFA est composé de bactéries *Mycobacterium tuberculosis* inactivées par la chaleur attirant des macrophages et d'autres cellules vers le site d'injection. Ce modèle a ainsi induit des douleurs inflammatoires persistantes. Pour vérifier que l'inflammation était due à la substance chimique injectée et non à la piqûre, une solution saline a été injectée dans la patte postérieure gauche des souris en tant que témoins. Une autre méthode pour créer une douleur chronique d'origine inflammatoire était d'ouvrir la souris et de partiellement léser son nerf sciatique. Un témoin a également été créé avec une souris qui a été ouverte mais dont le nerf n'a pas été lésé. Cela a permis de confirmer que la douleur était bien causée par la lésion du nerf sciatique. Ensuite, des études comportementales ont été réalisées pour évaluer le comportement des souris en réponse à la douleur [Charlier, 2022 ; Beckers et al, résultats non publiés].

## 5. Matériel & Méthodes

### 5.1 Echantillons

#### 5.1.1 Tube « 10 métabolites »

450  $\mu\text{L}$  d'un échantillon contenant dix métabolites (Sucrose, Alanine, Phénylalanine, Leucine, Taurine, Lactate, Glutamate, Glutamine, Acétate, Créatine) (*Figure 15*) dissous dans de l' $\text{H}_2\text{O}$  ont été mélangés avec 50  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 400 mM, pH 7,4 dissout dans du  $\text{D}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{L}$  de DSS 0,6 mM qui est une référence de déplacement chimique et un étalon permettant de calibrer les signaux, ainsi que 0,12 mg de  $\text{NaN}_3$  3 mM (azoture de sodium). Le tout a été transféré dans un tube RMN.



*Figure 15 : Structures chimiques du Sucrose, Alanine, Phénylalanine, Leucine, Taurine, Lactate, Glutamate, Glutamine, Acétate, Créatine.*

#### 5.1.2 Tube « d'échantillons biologiques »

Des milieux de cultures d'astrocytes dérivés de souris saines et de souris dont le système Xc a été désactivé ont été analysées par RMN. Pour ce faire, les cellules ont d'abord été cultivées dans du milieu frais, et le milieu a été prélevé après quatre jours. Trois cultures indépendantes ont été faites, toutes possédant la même composition initiale. Une solution tampon a été préparée en ajoutant une solution tampon phosphate ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) 100 mM, pH 7,4 à 1 mL de  $\text{D}_2\text{O}$ . Une solution de Formate de Calcium (étalon) 21,13 mM a été créée. Une solution de TSP (référence de déplacement chimique) 29,34 mM a été réalisée. A partir de ces trois solutions, un mélange « stock » a été réalisé en diluant 500  $\mu\text{L}$  de chacune des trois solutions avec 3,5 mL de  $\text{D}_2\text{O}$ . Deux sortes d'échantillons ont été préparés à l'aide de ce mélange.

- A. 140  $\mu\text{L}$  du mélange « stock » ont été ajoutés à 400  $\mu\text{L}$  de milieu frais (provenant du laboratoire du Professeur Hermans, UCLouvain).
- B. 140  $\mu\text{L}$  du mélange « stock » ont été ajoutés à 400  $\mu\text{L}$  de milieu frais dans lequel des astrocytes ont mûri durant quatre jours (provenant du laboratoire du Professeur Hermans, UCLouvain).

## 5.2 Spectromètres

### 5.2.1 Spectromètre 400 MHz

Certaines expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Ascend™ 9.4 Tesla, équipé d'une sonde Broad-band et d'un SampleCase. Les séquences TOCSY et HSQC proviennent de la bibliothèque Bruker.

### 5.2.2 Spectromètre 700 MHz

Certaines expériences ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Advance III 700 MHz, équipé d'une sonde refroidie à l'hélium liquide (Cryoprobe™), d'un SampleJet et d'un aimant de 16.4 Tesla. Le spectromètre de 700 MHz permet une augmentation de la résolution et de la sensibilité. Les séquences TOCSY et HSQC proviennent de la bibliothèque Bruker.

## 5.3 Logiciels informatiques

Les spectres RMN 1D ont été analysés à l'aide du logiciel ChenomX, et les spectres 2D ont été analysés à l'aide du logiciel COLMAR. Les résultats fournis par COLMAR ont été comparés et validés par les résultats fournis par le logiciel ChenomX. Cette méthodologie a permis d'attribuer les signaux obtenus sur les spectres RMN aux composés présents dans les différents échantillons.

### 5.3.1 TopSpin

Les spectres 1D et 2D ont été traités avec le logiciel TopSpin Bruker (Bruker inc.). La transformée de Fourier est suivie d'une correction de phase de manière automatique ou manuelle et d'une correction de la ligne de base.

### 5.3.2 ChenomX

Les données des spectres 1D ont été analysées à l'aide du logiciel ChenomX NMR Suite 10.0 (ChenomX Inc., Edmonton, Canada) [Jung et al., 2016].

### 5.3.3 COLMAR

Les données spectrales 2D ont été traitées à l'aide du logiciel COLMAR développé par l'équipe du Professeur Rafael Brüschweiler et disponible gratuitement en ligne à l'adresse suivante : <https://spin.ccic.osu.edu/index.php/colmar> [Bingol et al., 2016 ; Li et al., 2022].

## 6. Résultats

### 6.1 ChenomX

#### 6.1.1 Présentation du serveur web

ChenomX est un logiciel conçu pour l'analyse des spectres 1D  $^1\text{H}$  (*Interface de ChenomX en annexe, Figure 79*). Il est utilisé comme référence pour l'attribution et la quantification des métabolites présents dans un échantillon en fonction des signaux observés sur le spectre. Une limitation majeure de ChenomX est son fonctionnement manuel, ce qui peut introduire un biais dans l'interprétation des données. Lorsqu'un composé est présent dans la base de données du logiciel, des signaux spécifiques sont associés à ce composé et doivent correspondre aux signaux observés sur le spectre  $^1\text{H}$  pour confirmer la présence de ce composé dans l'échantillon analysé.

#### 6.1.2 Echantillon « 10 métabolites »

La composition de l'échantillon étant connue, les métabolites ont été identifiés et associés à leurs signaux respectifs, permettant au logiciel ChenomX de fournir une estimation de leur concentration (*Figure 16*). La différence entre les concentrations théoriques de la Glutamine, du Lactate et les concentrations mesurées par ChenomX est significative, suggérant une possible dégradation de la Glutamine. Pour le Lactate, la seule raison qui expliquerait la différence entre la concentration théorique et la concentration mesurée par ChenomX serait une erreur lors de la pesée du composé (l'échantillon a été préparé par un autre laboratoire).

Composés identifiés	Concentrations théoriques (mM)	Concentrations obtenues par ChenomX (mM)
Sucrose	1,882	1,891
Lactate	0,818	1,715
Acétate	0,818	0,792
Glutamate	0,409	0,514
Taurine	0,409	0,380
Leucine	0,409	0,379
Glutamine	0,409	0,076
Phénylalanine	0,082	0,076
Alanine	0,082	0,059
Créatine	0,082	0,056
DSS	0,055	0,055

Figure 16 : Tableau des composés détectés par ChenomX ainsi que leur concentration. La première colonne indique les composés détectés par ChenomX, la deuxième colonne indique la concentration théorique de chaque composé et la dernière colonne indique la concentration mesurée par ChenomX.



Le premier composé détecté par ChemomX est le lactate, dont le pic dans la base de données et le signal du spectre  $^1\text{H}$  se superposent parfaitement. Le lactate est donc présent dans les échantillons biologiques (Figure 17). Les signaux de la base de données peuvent être déplacés sur le spectre. Cette fonctionnalité était attendue puisqu'en RMN, les signaux d'un même composé appartenant à des échantillons différents ne seront pas toujours positionnés à un même déplacement chimique en raison de l'environnement chimique du composé analysé. Certains métabolites sont plus difficiles à analyser que d'autres. Les composés les moins concentrés (< 80  $\mu\text{L}$ ) sont plus difficilement détectable (Figure 18).

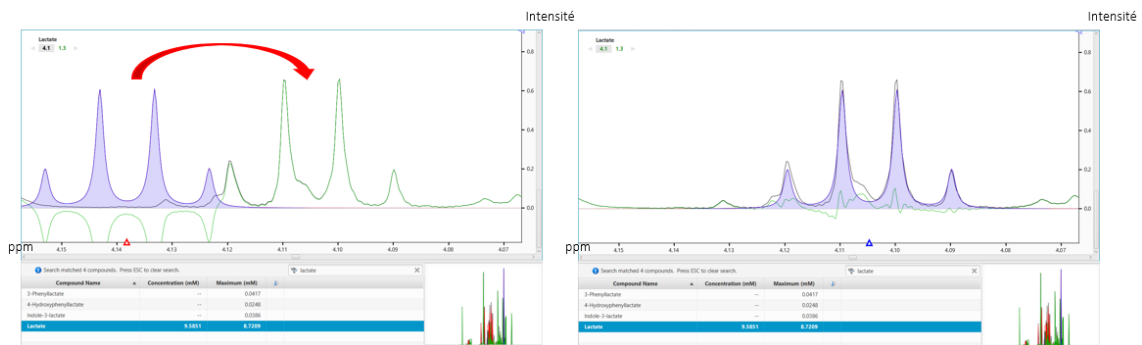


Figure 17 : Analyse du lactate à l'aide du logiciel ChemomX. La Figure de gauche montre le signal de la base de données (bleu) ainsi que le signal du spectre (noir). En déplaçant le signal de la base de données sur celui du spectre (flèche rouge), il est visible sur la Figure de droite que les deux signaux correspondent parfaitement. La ligne verte représente la soustraction du signal du spectre avec le signal de la base de données. Lorsque ces deux signaux sont superposés, cette ligne verte va tendre vers 0.

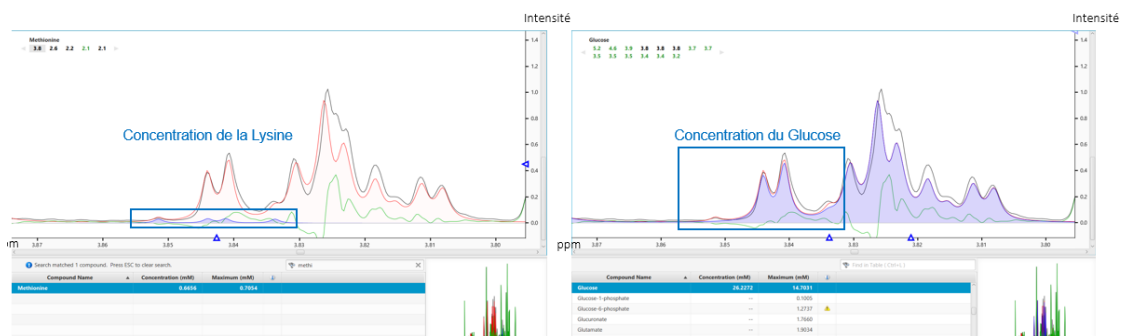


Figure 18 : Analyse de la Lysine et du Glucose à l'aide de ChemomX. La Lysine a une concentration plus faible que celle du Glucose, elle est donc plus difficile à détecter.

### 6.1.3 Échantillons biologiques : Milieu frais

Dans un premier temps, les spectres des échantillons contenant uniquement du milieu frais ont été soumis à une analyse. Il convient de noter que la composition précise du milieu utilisé est incertaine. L'échantillon de milieu frais est composé de DMEM (composition connue), de FBS (composition inconnue), de Proline, ainsi que d'un antibiotique et d'un antifongique (absents dans la base de données de ChemomX et de COLMAR). Il est donc envisageable de détecter les constituants présents dans le DMEM (Figure 19).

Acides aminés	Concentration (mM)	Autres	Concentration (mM)
Arginine	0,4	Choline	0,03
Cystine	0,15	Acide folique	0,009
Glutamine	3,97	Glucose	5,55
Glycine	0,4	I-Inositol	0,04
Histidine	0,2	Niacinamide	0,03
Isoleucine	0,8	Pantothénate	0,008
Leucine	0,8	Phénol rouge	0,04
Lysine	0,8	Pyridoxine	0,02
Méthionine	0,2	Pyruvate	1
Phénylalanine	0,4	Riboflavine	0,001
Sérine	0,4	Thiamine	0,01
Thréonine	0,8		
Tryptophane	0,08		
Tyrosine	0,4		
Valine	0,8		

Figure 19 : Composition du DMEM.

Le DMEM contient 27 composés. Parmi ces 27 composés, 20 sont détectés par ChenomX (Figure 20).

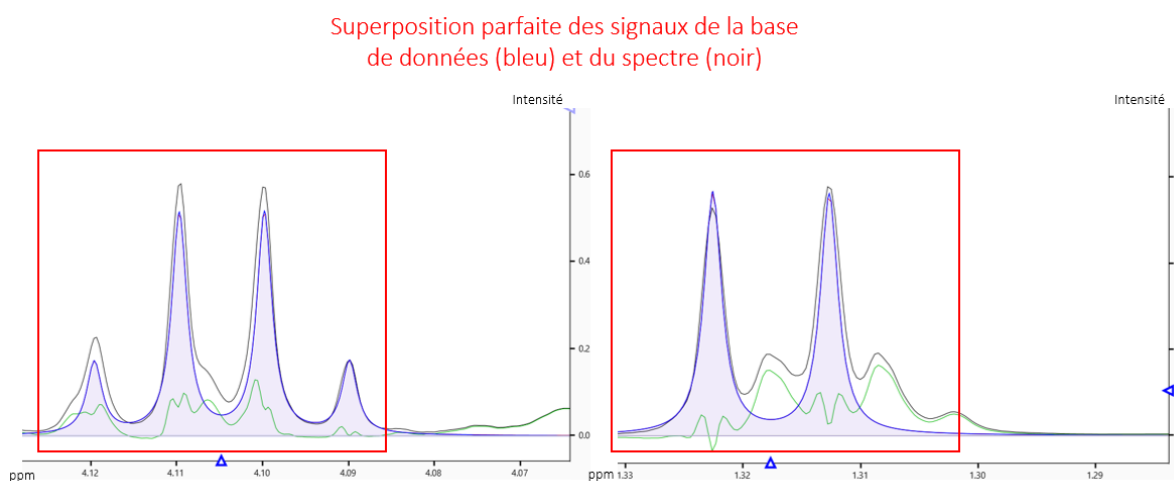


Figure 20 : Figure illustrant la présence du Lactate dans l'échantillon analysé via le logiciel ChenomX. Les signaux de la base de données (bleu) se superposent parfaitement aux signaux du spectre de l'échantillon (noir).

Parmi les 7 composés restants, 3 ne sont pas répertoriés dans la base de données de ChenomX. 4 sont répertoriés dans la base de données de ChenomX mais les signaux de ces composés présents dans la base de données ne correspondent pas aux signaux du spectre analysé. L'Histidine peut être prise comme exemple (Figure 21).

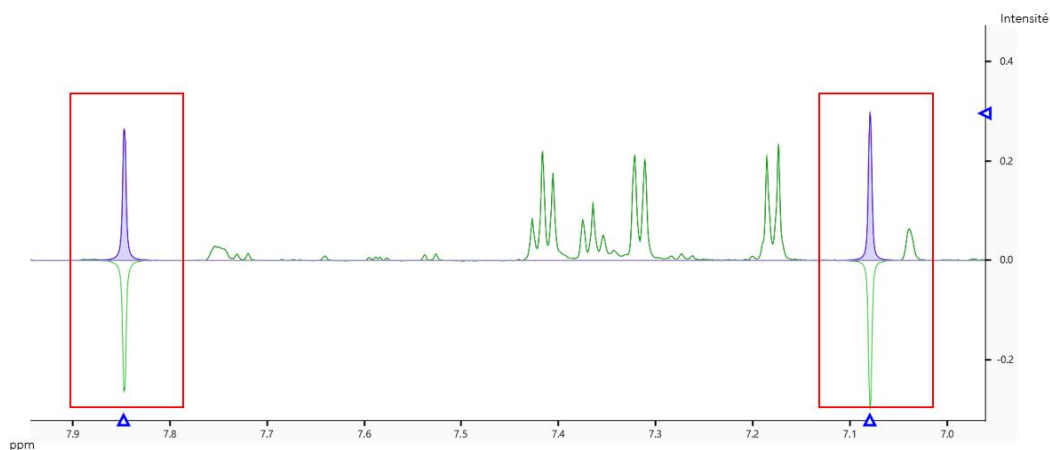


Figure 21 : Figure illustrant l'absence de l'Histidine dans l'échantillon analysé via le logiciel ChenomX. L'image illustre deux signaux de l'Histidine présents dans la base de données (bleu) mais absents dans le spectre analysé.

ChenomX ne détecte pas l'Histidine, les signaux du spectre se trouvent en dehors de la zone définie par la base de données. Les signaux du spectre et de la base de données ne se superposent donc pas. Cette non-concordance pourrait provenir du fait que la base de données de ChenomX a été conçue à un pH de 7,4. Si le pH de l'échantillon analysé n'est pas à cette valeur, les signaux se trouveront à des déplacements chimiques différents.

Les spectres HSQC et TOCSY de l'Histidine ont été analysés (Figures 22 et 23).

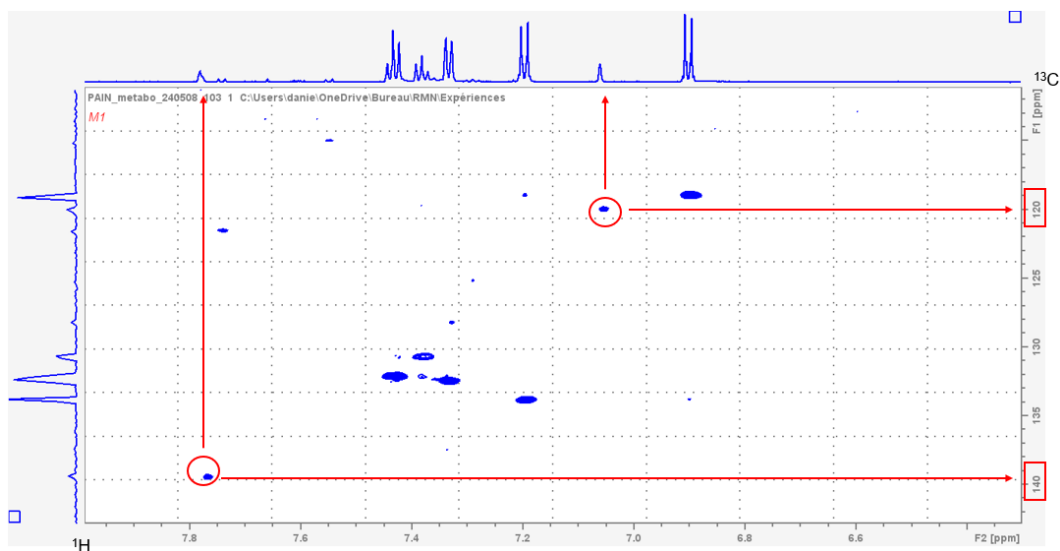


Figure 22 : Figure illustrant la présence des signaux de corrélations C-H appartenant à l'Histidine dans le spectre HSQC de milieu frais (Spectre complet en annexe Figure 81). Deux signaux de corrélations C-H apparaissent à 7,1 et 7,8 ppm.

L'analyse du spectre HSQC indique la présence de corrélations C-H. Les déplacements chimiques en Carbone, à savoir 120 et 140 ppm, sont caractéristiques de l'Histidine.

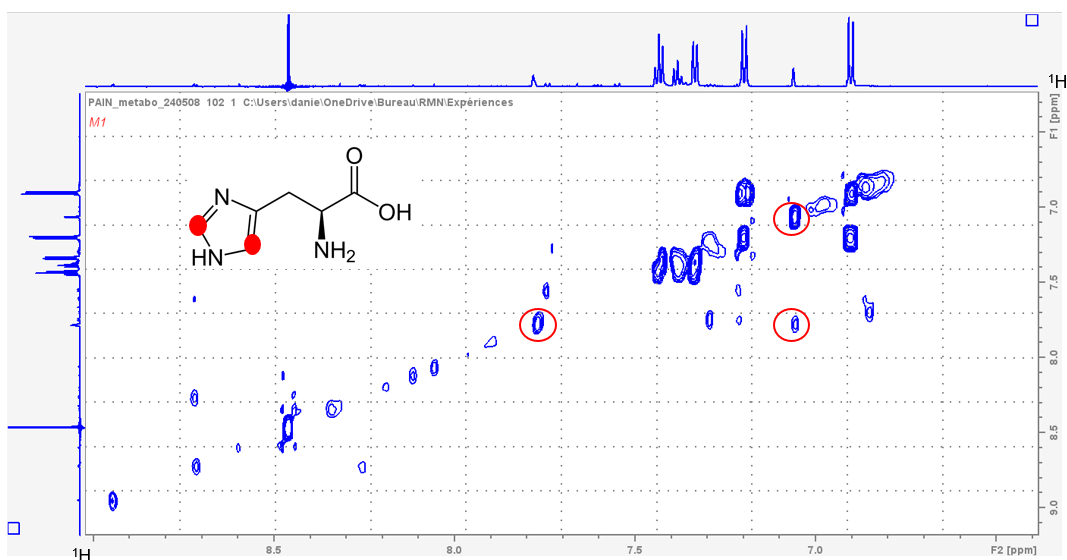


Figure 23 : Figure illustrant la présence des signaux de corrélations H-H appartenant à l’Histidine dans le spectre TOCSY de l’échantillon de milieu frais (Spectre complet en annexe Figure 82).

Le spectre TOCSY indique la présence de corrélations H-H, les protons positionnés à 7,1 et 7,8 ppm sont liés entre eux. Ces deux Hydrogènes appartiennent donc à l’Histidine.

L’Histidine n’a pas été détectée par ChenomX, or en analysant les spectres HSQC (C-H) et TOCSY (H-H), des corrélations sont présentes. Le spectre HSQC montre deux signaux situés à 7,1 et 7,8 ppm sur la dimension proton, 120 et 140 ppm sur la dimension Carbone. Ces valeurs (120 et 140 ppm) sont caractéristiques de l’Histidine. Le spectre TOCSY indique une corrélation entre ces deux signaux. L’Histidine est donc logiquement présente dans l’échantillon de milieu frais.

Une fois que les signaux ont été attribués à des métabolites, ChenomX mesure leur concentration. Les valeurs de concentration mesurées par ChenomX ont été comparées aux valeurs théoriques (Figure 24).

La différence de concentration obtenue est faible pour tous les métabolites sauf pour la Glutamine. Ce résultat était attendu puisque la glutamine se dégrade au cours du temps. Les mesures de concentration faites par ChenomX sont donc fiables.

Composés DMEM	Concentrations théoriques (mM)	Concentrations mesurées (mM)	Différence de concentrations ([théoriques] - [mesurées]) (mM)
Arginine	0,4	0,330	0,070
Cystine	0,15	0,074	0,076
Glutamine	3,97	0,324	3,646
Glycine	0,4	0,375	0,025
Histidine	0,2	0,433	0,233
Isoleucine	0,8	0,772	0,028
Leucine	0,8	0,765	0,035
Lysine	0,8	0,685	0,115
Méthionine	0,2	0,188	0,012
Phénylalanine	0,4	0,311	0,089
Sérine	0,4	0,305	0,095
Thréonine	0,8	0,465	0,335
Tryptophane	0,08	0,047	0,033
Tyrosine	0,4	0,366	0,034
Valine	0,8	0,814	-0,014
Choline	0,03	0,039	-0,009
Glucose	5,55	5,283	0,267
I-Inositol	0,04	0,144	-0,104
Niacinamide	0,03	0,034	-0,004
Pantothénate	0,008	0,016	-0,008
Pyruvate	1	0,815	0,185

Figure 24 : Tableau reprenant le nom des composés présents dans le DMEM et détectés par ChenomX, la concentration théorique, la concentration mesurée par ChenomX et la différence de concentration (Concentrations théoriques – Concentrations mesurées) de ces composés.

L'entièreté du spectre de l'échantillon de milieu frais a ensuite été analysé par ChenomX. En plus des 20 métabolites présents dans le DMEM, ce logiciel a détecté 12 métabolites supplémentaires. (Figure 25). Ces métabolites supplémentaires proviendraient d'un autre constituant du milieu frais, à savoir du FBS.

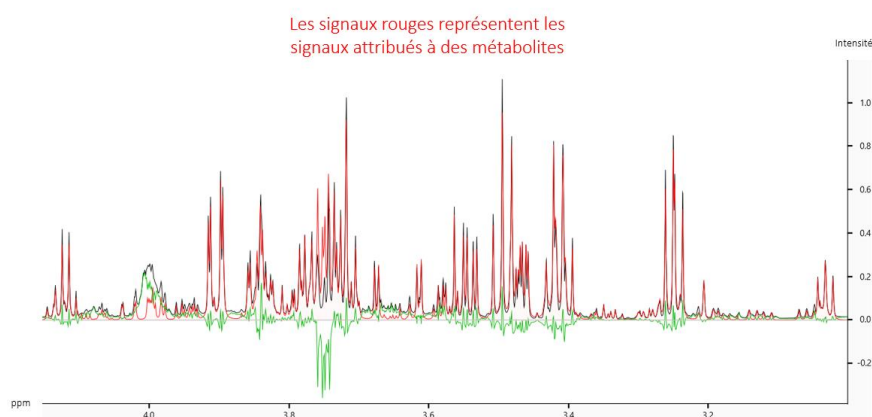


Figure 25 : Figure représentant le spectre 1D <sup>1</sup>H du milieu frais analysé par ChenomX. La couleur rouge représente les signaux attribués à des métabolites. La couleur verte représente les signaux non attribués à des métabolites.

La quasi-totalité des signaux du spectre de l'échantillon de milieu frais ont été attribués à des métabolites (Figure 26).

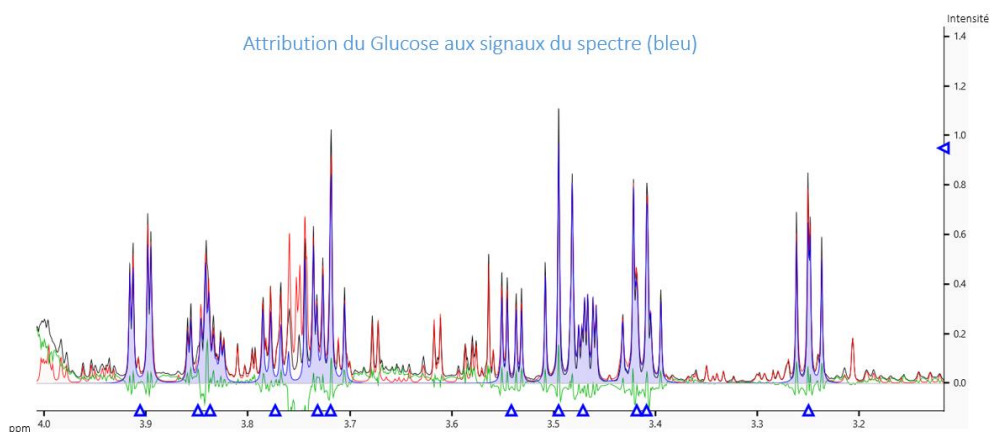


Figure 26 : Figure représentant la détection du Glucose (bleu) par ChenomX dans l'échantillon de milieu frais.

Un signal du spectre (1,5 ppm) n'a pas été attribué par ChenomX (Figure 27).

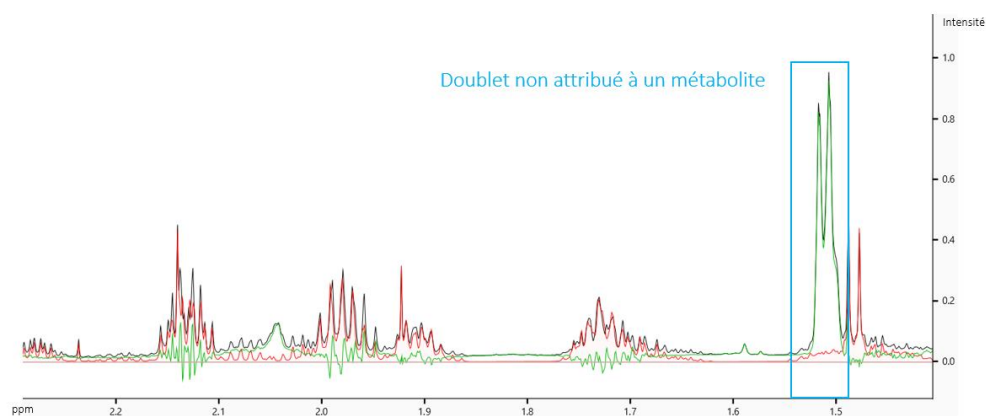


Figure 27 : Figure illustrant un signal (doublet) positionné à 1,5 ppm non attribué (par ChenomX) à un métabolite.

Afin de tenter de déterminer à quel composé appartient ce signal, une analyse des spectres HSQC et TOCSY a été réalisée (Figures 28 et 29).

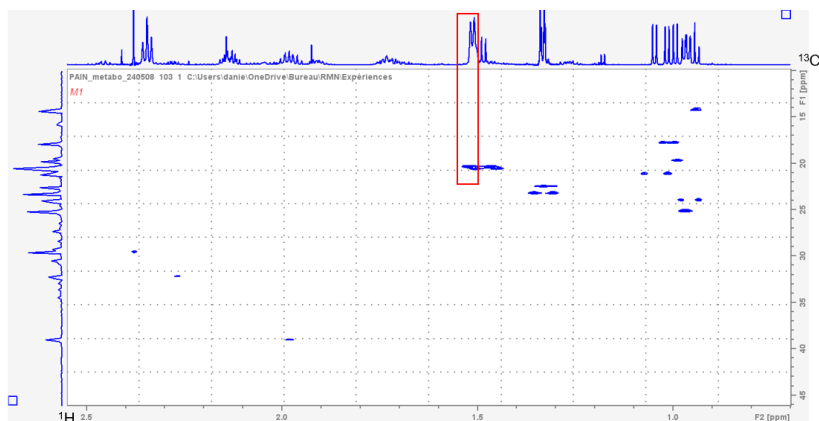


Figure 28 : Figure illustrant une portion du spectre HSQC du milieu frais. Le signal à 1,5 ppm sur le spectre 1D  $^1\text{H}$  présente une corrélation C-H sur le spectre HSQC (Spectre complet en annexe Figure 81).

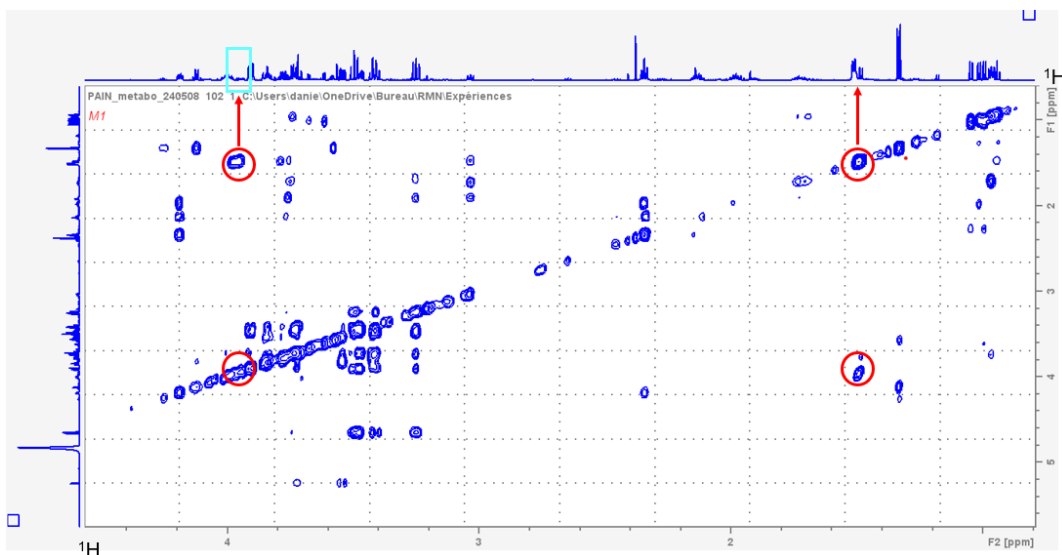


Figure 29 : Figure illustrant une portion du spectre TOCSY de l'échantillon de milieu frais. Les signaux encerclés en rouge sont corrélés les uns aux autres (Spectre complet en annexe Figure 82).

Le spectre HSQC a révélé la présence d'une corrélation C-H. Le composé non détecté par ChenomX possède donc au moins un proton porté par un Carbone. Le spectre TOCSY montre des corrélations H-H. Le composé inconnu contient au moins deux protons voisins qui interagissent entre eux. Ces protons sont positionnés à 1,5 et 4 ppm, le spectre analysé par ChenomX présente un signal non attribué à 4 ppm (Figure 30). Cela confirme donc que le composé contient deux signaux (à 1,5 ppm et à 4 ppm) appartenant au même système de spin (ensemble de protons connectés les uns aux autres). L'analyse des spectres HSQC et TOCSY ne permet pas de déterminer à quel métabolite correspondent ces signaux.

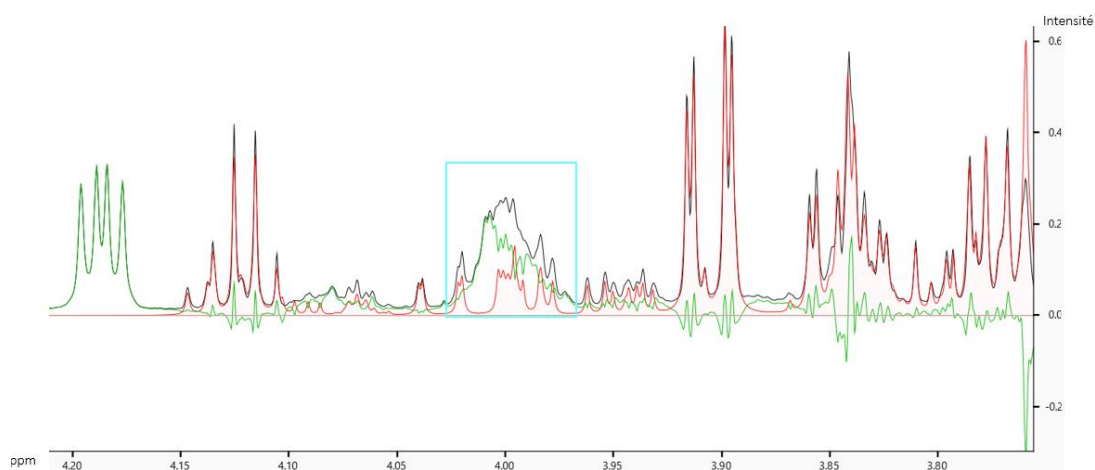


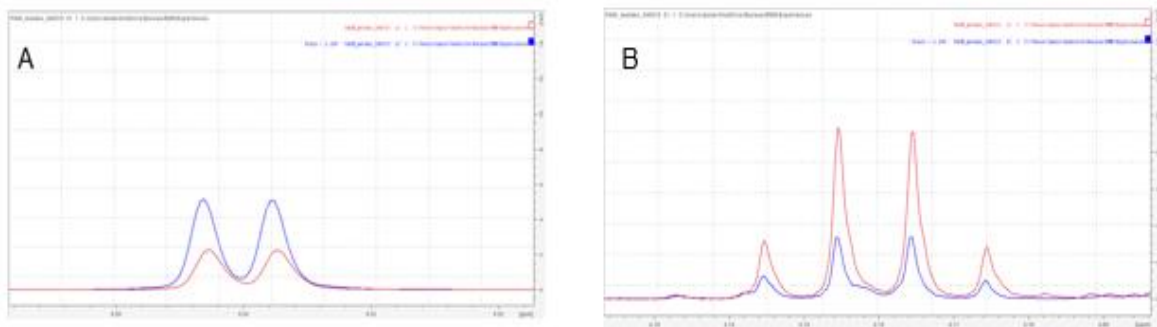
Figure 30 : Figure illustrant le signal à 4 ppm non attribué (par ChenomX) à un métabolite sur le spectre de l'échantillon de milieu frais.

Le logiciel ChenomX est un outil permettant l'attribution de la majorité des signaux d'un spectre 1D  $^1\text{H}$ .

#### 6.1.4 Echantillons biologiques : Milieu conditionné

Une analyse ChenomX a également été réalisée sur des échantillons contenant du milieu frais dans lequel des cellules du SNC ont été cultivées pendant quatre jours (milieu conditionné). L'évaluation de l'analyse de ce spectre est toujours complexe en raison de la présence du FBS, dont la composition reste inconnue.

Les métabolites présents et déjà détectés dans l'échantillon de milieu frais ont également été détectés dans cet échantillon conditionné. Le Glucose et le Lactate sont deux exemples significatifs. Le Glucose est détecté à la fois dans l'échantillon de milieu frais et dans l'échantillon de milieu conditionné. Les signaux du glucose diminuent dans le spectre de l'échantillon contenant des astrocytes, ce qui est raisonnable, car ces cellules consomment du Glucose pour leur métabolisme. En revanche, les signaux du lactate augmentent car les astrocytes en produisent lors de leur développement (*Figure 31*). Des fluctuations sont observées à divers endroits dans le spectre (une étude quantitative sera réalisée plus loin dans le travail).



*Figure 31 : La Figure A illustre le pic du Glucose à 5,2 ppm. Le spectre bleu correspond au milieu de culture frais, tandis que le spectre rouge correspond à l'échantillon de milieu ayant été exposé aux astrocytes. Le signal bleu est de concentration plus élevée que le signal rouge en raison de la consommation du Glucose par les cellules du SNC. La Figure B illustre le pic du Lactate à 4,1 ppm. La courbe rouge est en supériorité par rapport à la courbe bleue en raison de la production de Lactate par les cellules du SNC.*

Afin de valider les résultats obtenus par ChenomX, les spectres 1D  $^1\text{H}$ , 2D HSQC et TOCSY ont été analysés manuellement.

Le spectre 1D  $^1\text{H}$  a été analysé par ChenomX, le logiciel fournit les valeurs de déplacement chimique proton. Avec ces informations, le spectre TOCSY a pu être analysé afin d'observer si les signaux détectés sur le spectre 1D possédaient bien des corrélations H-H aux bons déplacements chimiques. L'analyse du spectre TOCSY a permis de valider les résultats obtenus par ChenomX (*Figures 32 et 33*).



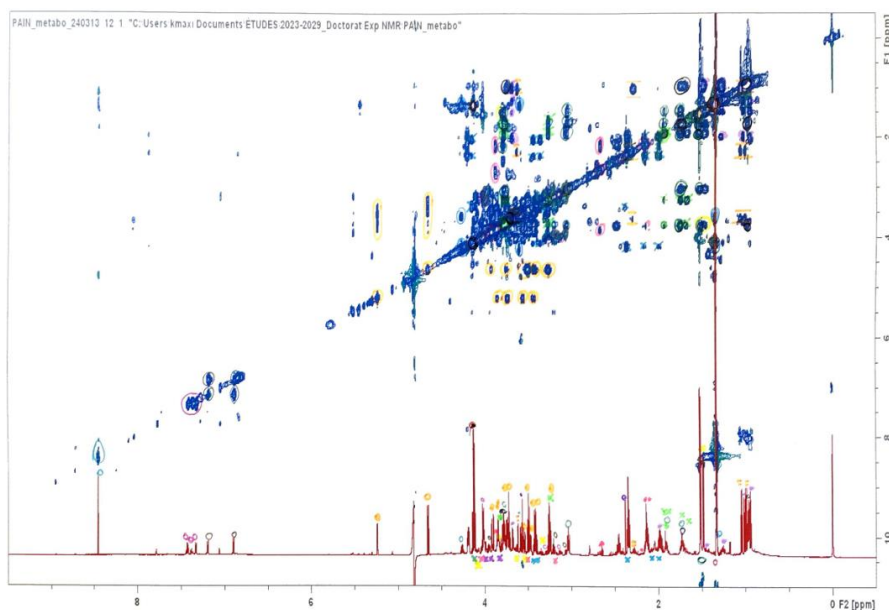


Figure 32 : Figure représentant l'attribution manuelle des métabolites aux signaux observés dans les spectres  $^1\text{H}$  et TOCSY de l'échantillon de milieu conditionné. L'identification des composés est rendue difficile en raison de la superposition de signaux sur le spectre 1D  $^1\text{H}$  et du nombre de métabolites présents dans l'échantillon.

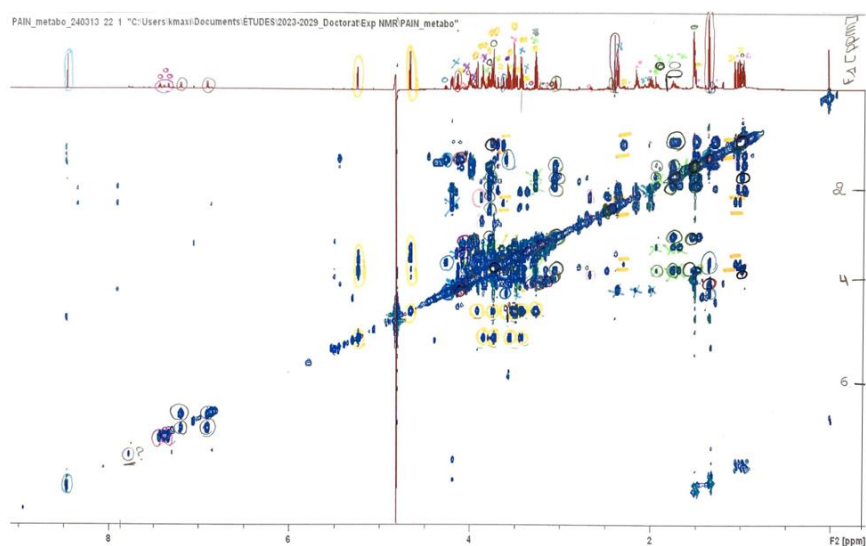


Figure 33 : Figure représentant l'attribution manuelle des métabolites aux signaux observés dans les spectres  $^1\text{H}$  et TOCSY de l'échantillon de milieu frais. L'identification des composés est rendue difficile à cause de la superposition de signaux sur le spectre 1D  $^1\text{H}$  et du nombre de métabolites présents dans l'échantillon. L'échelle a été écrite à la main en raison de la superposition des spectres 1D et 2D, des signaux du spectre TOCSY étaient cachés par le spectre proton, le spectre TOCSY a donc dû être décalé.

Le spectre HSQC a également été attribué manuellement. Pour rappel, dans l'HSQC, les signaux obtenus sont des pics de corrélations C-H. ChemomX fournit le déplacement chimique en proton mais pas en Carbone. Afin de déterminer la valeur des déplacements chimiques en Carbone, la base de données du logiciel COLMAR a été utilisée, des logiciels de prédictions calculant les déplacements chimiques et des tables de références en déplacements chimiques auraient pu être utilisés (Figures 34 et 35).

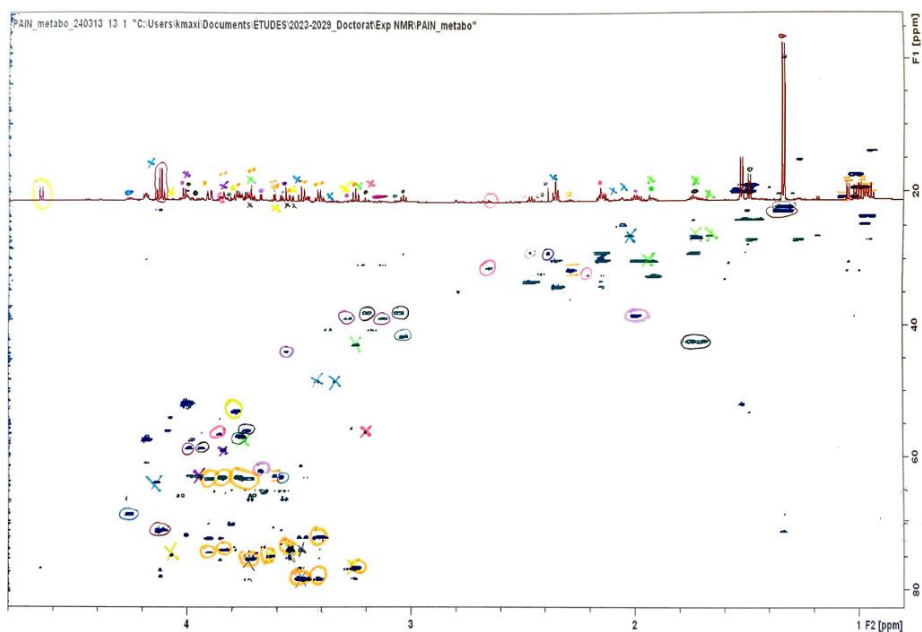


Figure 34 : Figure représentant l'attribution manuelle des métabolites aux signaux observés dans les spectres  $^1\text{H}$  et HSQC de l'échantillon de milieu conditionné. L'identification des composés est rendue difficile en raison de la superposition de signaux sur le spectre 1D  $^1\text{H}$  et du nombre de métabolites présents dans l'échantillon.

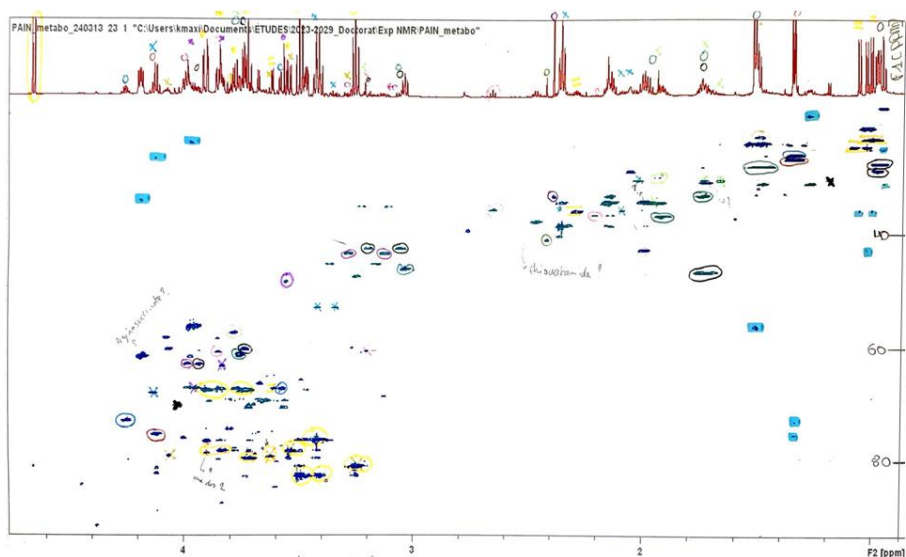


Figure 35 : Figure représentant l'attribution manuelle des métabolites aux signaux observés dans les spectres  $^1\text{H}$  et HSQC de l'échantillon de milieu conditionné. L'identification des composés est rendue difficile à cause de la superposition de signaux sur le spectre 1D  $^1\text{H}$  et du nombre de métabolites présents dans l'échantillon. L'échelle a été écrite à la main en raison de la superposition des spectres 1D et 2D, des signaux du spectre TOCSY étaient cachés par le spectre proton, le spectre TOCSY a donc dû être décalé.

Comme expliqué précédemment, ChenomX n'a pas attribué tous les signaux du spectre 1D  $^1\text{H}$  à un métabolite (signal à 1,5 ppm). L'analyse des spectres HSQC et TOCSY ont également été analysés manuellement afin de tenter d'obtenir un maximum d'informations sur ces signaux (présence du signal dans le spectre 1D  $^1\text{H}$ , y-a-t-il des corrélations C-H dans le spectre HSQC et des corrélations H-H dans le spectre TOCSY ?).

Chaque métabolite détecté par ChenomX dans le spectre 1D  $^1\text{H}$  a été analysé dans les spectres 2D HSQC et TOCSY. Cette analyse fut longue et fastidieuse. C'est pourquoi, il serait intéressant d'utiliser un logiciel d'analyse des spectres automatique tel que COLMAR.

#### 6.1.5 Conclusion

En résumé, le logiciel ChenomX est un outil indispensable dans le domaine de l'identification et la quantification des métabolites. Il permet d'attribuer chaque pic à son métabolite dans un échantillon complexe de composition connue, à condition que ce dernier soit répertorié dans la base de données de ChenomX. Cependant, son utilisation se complique en présence d'échantillons dont la composition est inconnue, nécessitant une approche exhaustive pour l'analyse des 338 composés répertoriés dans la base de données ChenomX, ce qui implique une analyse longue et compliquée. De plus, le logiciel présente des limitations telles que la nécessité d'une manipulation manuelle et la restriction aux spectres 1D  $^1\text{H}$ , pouvant entraîner une superposition de signaux pouvant rendre difficile voire impossible l'identification des métabolites. Afin de résoudre ces problèmes, il est possible de faire recours aux expériences RMN 2D. Ces spectres pourront être analysés à l'aide d'un second logiciel, COLMAR.

## 6.2 COLMAR

### 6.2.1 Présentation du serveur web

COLMAR est un logiciel d'identification et de quantification automatique des métabolites dans un mélange complexe. Il est dédié à l'analyse de spectres bidimensionnels en spectroscopie RMN. Il est capable de prendre en charge les spectres HSQC et TOCSY. Le processus d'analyse se déroule en plusieurs étapes : le téléchargement des spectres, la détermination des pics, la référencement, la calibration des axes et ensuite l'attribution des pics aux signaux de la base de données. COLMAR propose différentes interfaces, qui seront nommées COLMAR TOCSY, COLMAR HSQC et COLMARc tout au long de ce travail (*Interface de COLMAR en annexe, Figures 75 à 78*). Ces différents outils fonctionnent de manière spécifique. COLMAR TOCSY analyse le spectre TOCSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) et présente le spectre HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) pour valider les résultats obtenus. COLMAR HSQC analyse le spectre HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) et présente le spectre TOCSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) pour valider les résultats obtenus. COLMARc permet une quantification et une analyse de cohortes de spectres HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) et présente le spectre TOCSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) pour valider les résultats obtenus. Pour rappel, le TOCSY est une expérience de corrélation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (2D) permettant d'observer tous les signaux appartenant à un même système de spin. L'expérience HSQC est une expérience de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  permettant de distinguer deux signaux superposés dans une expérience 1D (augmentation de la résolution) (*Figure 36*).

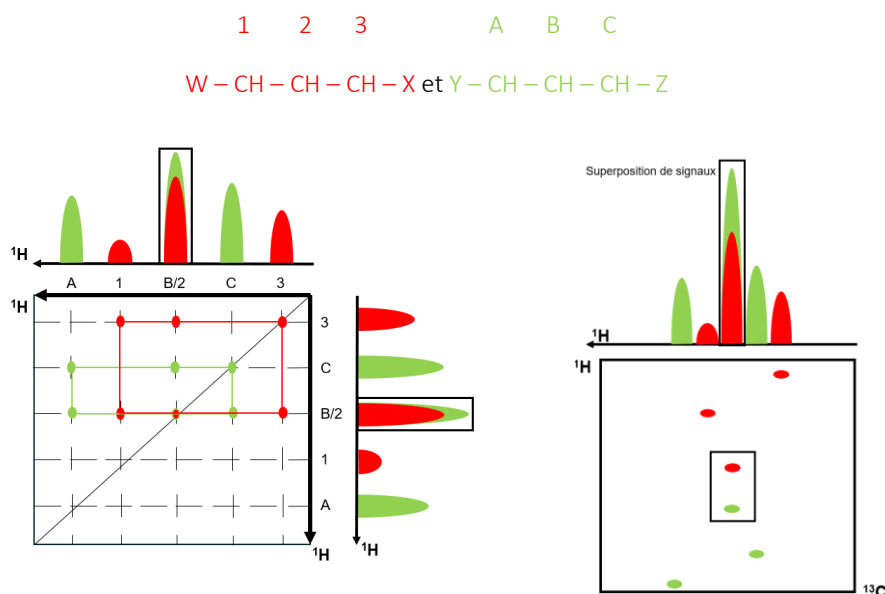


Figure 36 : Figures illustrant un spectre TOCSY (gauche) et HSQC (droite).

Avant de pouvoir télécharger les spectres sur COLMAR, ceux-ci doivent être traités à l'aide du logiciel TopSpin. La transformée de Fourier va être réalisée, les spectres vont être phasés et la ligne de base va être mise à 0. Ensuite, la position des pics va être définie (peak picking), le logiciel va positionner des ronds noirs là où des signaux sont présents. Le modèle mathématique des pics va être ajusté en faisant passer une fonction (gaussienne) dans ceux-ci afin qu'ils correspondent aux signaux de la base de données (peak fitting), le logiciel positionne des ronds bleus sur les pics dont la fonction a été ajoutée. Le logiciel permet également d'utiliser la fonction Voigt (combinaison des fonctions gaussienne et lorentzienne), les résultats étaient identiques à ceux obtenus en utilisant la fonction gaussienne. Des composés de références tels que le Glucose, le DSS, l'Alanine, la Leucine, le Lactate vont être positionnés sur le spectre (référencement spectral), COLMAR ajoute des ronds bleus, orange, verts, gris et roses sur les signaux appartenant à ces composés. Le spectre va être déplacé afin que ces signaux se superposent aux ronds colorés imposés par COLMAR. Il est également possible de régler des paramètres tels que l'ajustement du niveau de bruit, l'élimination du signal de l'eau.

La méthodologie d'identification des métabolites par COLMAR se base sur le « database matching ». COLMAR fonctionne en comparant les signaux du spectre RMN expérimental avec une base de données contenant les spectres de référence de métabolites connus. Ces données de référence sont préalablement enregistrées dans la base de données du logiciel, et sont utilisées pour identifier les métabolites qui correspondent le mieux aux signaux observés dans l'échantillon étudié. Seuls les spectres RMN des composés étudiés en solution aqueuse (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O) à un pH de 7,4 ont été intégrés dans la base de données COLMAR [Bingol et al., 2016].

## 6.2.2 Résultats obtenus

Après l'identification des pics et la calibration de plusieurs paramètres tels que la modélisation mathématique des pics par l'application d'une fonction (gaussienne) permettant l'ajustement aux signaux de la base de données (peak picking) ainsi que le référencement spectral, le logiciel génère un tableau composé de plusieurs sections (*Figure 37*). L'« identification » se réfère à l'identifiant du composé choisi, le "nom" correspond au nom du métabolite assigné, le "matching\_ratio" est défini comme le nombre de pics attribués au composé dans le spectre divisé par le nombre total de pics théoriques du composé (par exemple, pour la Taurine, qui contient deux pics attribués par COLMAR et qui contient également théoriquement deux pics, le matching\_ratio est de 1 « 2/2 »), la "déviations moyenne" est le décalage de la position entre le signal du spectre et le signal de la base de données, enfin l'« unicité » représente le nombre de pics partagés entre plusieurs composés (par exemple, pour la Taurine, elle ne partage aucun de ces deux pics avec un autre composé, ainsi son unicité sera de 2/2. La Créatine partage ses deux signaux avec la Créatine phosphate, leur unicité sera de 0/2)

Identification	Nom	Matching_ratio	Déviations moyenne ( <sup>13</sup> C)	Déviations moyenne ( <sup>1</sup> H)	Unicité
1	Acétate	1,00	0,01	0,004	0/1
2	Créatine	1,00	0,01	0,008	0/2
3	Créatine phosphate	1,00	0,09	0,020	0/2
4	Taurine	1,00	0,07	0,008	2/2
5	DSS	0,75	0,05	0,008	0/3

Figure 37 : Fraction du tableau de sortie du logiciel COLMAR obtenu après l'attribution des signaux de l'échantillon « 10 métabolites ».

## 6.2.3 Résultats COLMAR du tube « 10 métabolites »

### 6.2.3.1 COLMAR HSQC

Une session COLMAR HSQC a été réalisée à l'aide du spectre de l'échantillon contenant 10 métabolites connus (*Figure 38*). Sur les 10 composés présents dans l'échantillon, 7 d'entre eux ont été détectés (*Figure 39*), il en manque donc 3. Les métabolites présents dans l'échantillon mais non détectés par COLMAR, peuvent s'expliquer par la faible concentration (<80µM) de ces trois métabolites (Glutamine, Alanine, Phénylalanine). Par ailleurs, la créatine phosphate absente dans l'échantillon est détectée par COLMAR. Ce résultat peut s'expliquer par la similitude des structures chimiques de la créatine (présente dans le milieu étudié) et de la créatine phosphate. Le logiciel n'a donc pas su distinguer les deux. Le DSS est également détecté par COLMAR. Ce résultat était attendu puisqu'il a été rajouté comme référence et comme étalon dans l'échantillon. Tous ces métabolites avaient également été détectés lors de l'analyse par ChenomX à l'exception de la Créatine phosphate dont les pics ne correspondaient pas à ceux de la base de données et le Sucrose qui n'est pas répertorié dans la base de données ChenomX.

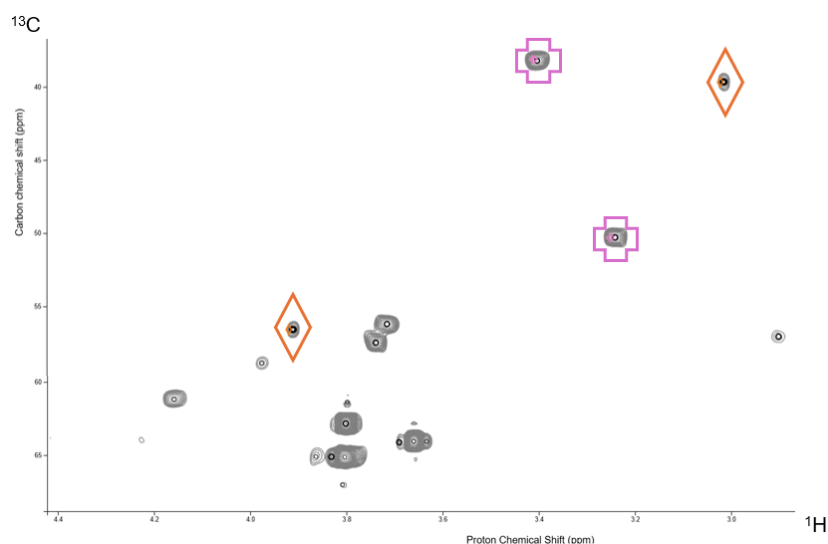


Figure 38 : Spectre HSQC contenant des signaux attribués. Les formes de couleurs différentes illustrent les signaux des composés présents dans l'échantillon « 10 métabolites ». Les signaux associés à une même forme et une même couleur correspondent à un même métabolite (les losanges orange correspondent aux signaux de la Créatine alors que les croix mauves correspondent à la Taurine).

Identification	Nom	Matching_ratio	Déviaton moyenne ( $^{13}\text{C}$ )	Déviaton moyenne ( $^1\text{H}$ )	Unicité
1	Acétate	1,00	0,01	0,004	0/1
2	Créatine	1,00	0,01	0,008	2/2
3	Créatine phosphate	1,00	0,09	0,020	2/2
4	DSS	0,75	0,05	0,008	0/3
5	Glutamate	1,00	0,15	0,011	0/3
6	Lactate	1,00	0,18	0,022	0/2
7	Leucine	1,00	0,04	0,019	0/5
8	Taurine	1,00	0,07	0,008	0/2
9	Sucrose	1,00	0,15	0,014	0/11

Figure 39 : Tableau reprenant les 7 composés (Acétate, Créatine, Glutamate, Lactate, Leucine, Taurine, Sucrose) détectés par une COLMAR HSQC sur les 10 recherchés. Seule la Phosphocréatine ne fait pas partie de l'échantillon. Le DSS est la référence et l'étalon utilisé, il est donc attendu qu'il soit présent dans la composition de l'échantillon.

Une session COLMAR HSQC a ensuite été réalisée en utilisant le spectre HSQC qui est obligatoire pour cette session et le spectre TOCSY, qui lui est optionnel, de l'échantillon contenant 10 métabolites connus. Les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus précédemment en utilisant exclusivement le spectre HSQC.

Ces résultats démontrent donc que le spectre additionnel TOCSY n'est pas utilisé pour détecter des métabolites. Aucune des opérations de peak picking, peak fitting, référencement spectral et recherches dans la base de données n'est effectuée. Le TOCSY sera tout de même affiché en vue d'une validation manuelle. COLMAR indiquera sur le TOCSY les endroits où devraient se trouver les pics de corrélation H-H sur base des signaux détectés dans l'HSQC (Figure 40).

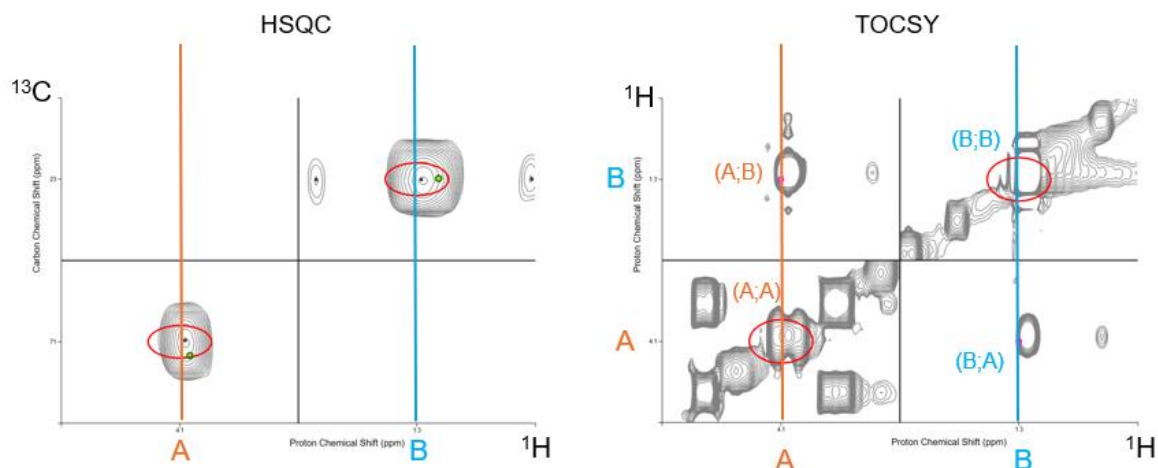


Figure 40 : Figures représentant les spectres HSQC et TOCSY du Lactate. COLMAR a détecté les deux signaux du Lactate sur le spectre HSQC. Le spectre HSQC montre les deux signaux contenant un rond orange (pic de corrélation C-H auquel un métabolite a été attribué), un rond vert (pic de corrélation C-H appartenant au Lactate), un rond rouge (pic de la base de données). Le spectre TOCSY indique les endroits où devraient se trouver les pics de corrélations H-H ((A;B) et (B;A), (A;A) et (B;B)).

Sur tous les spectres analysés, à un déplacement chimique de 4-5 ppm, une ligne verticale intense correspondant au signal de l'eau est observée (Figure 41). L'expérience HSQC ne détecte que les corrélations entre les atomes de Carbone et les atomes d'Hydrogène directement liés. Comme l'eau ne contient pas de Carbone, elle ne devrait pas être détectée. Malgré cela, le signal de l'eau est si intense qu'il apparaît dans le spectre lorsque de l'eau est présente dans l'échantillon. L'apparition du signal de l'eau est perçue comme une erreur mais ce signal est tellement intense que l'erreur est non négligeable. Bien que des ajustements spécifiques sur le spectromètre puissent réduire ce signal, il est difficile d'éliminer complètement la présence du signal de l'eau.

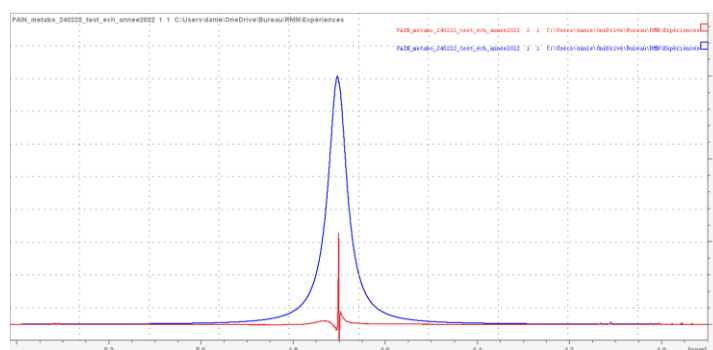


Figure 41 : Superposition d'un spectre contenant le signal de l'eau inchangé (bleu) et d'un spectre enregistré avec une technique de suppression de l'eau (rouge). Le pic bleu correspond au signal de l'eau avant tout ajustement. Le signal rouge, moins large et moins intense que le bleu, montre le pic de l'eau après avoir été modifié afin de le diminuer au maximum.

### 6.2.3.2 COLMAR TOCSY

Une session COLMAR TOCSY a été réalisée à l'aide du spectre de l'échantillon contenant 10 métabolites connus (Figure 42). Le logiciel a détecté 106 composés, dont seulement 9 sont réellement

présents dans l'échantillon. Il y a donc 97 métabolites détectés par COLMAR mais absents dans l'échantillon.

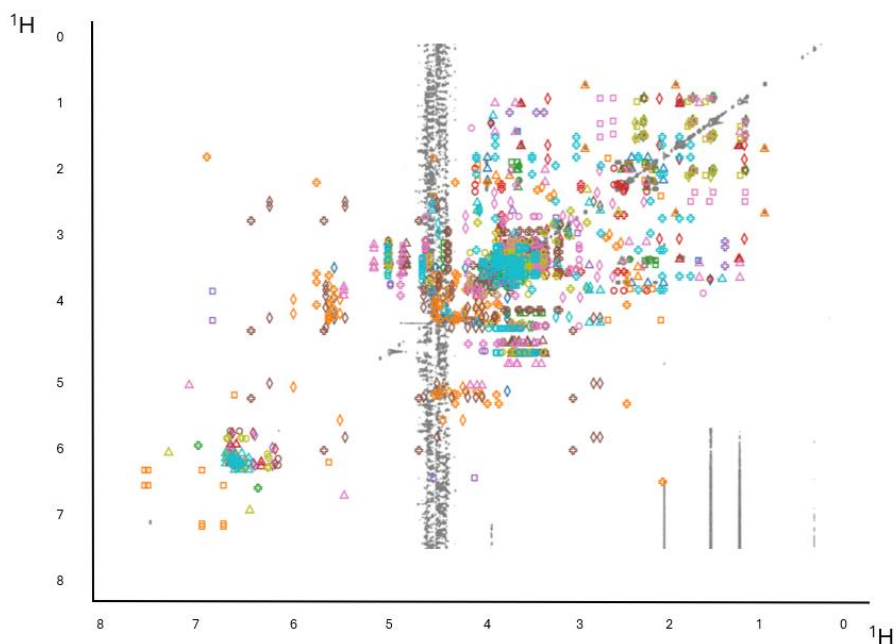


Figure 42 : Spectre obtenu à partir des expériences TOCSY contenant des signaux attribués ainsi que le signal de l'eau représenté par une ligne centrale verticale. Les formes de couleurs différentes illustrent les signaux des différents composés présents dans l'échantillon « 10 métabolites ». Les signaux associés à une même forme (losange, croix, triangle, carré, rond) et une même couleur (orange, brun, rose, rouge, mauve, vert, jaune, bleu) correspondent à un même métabolite.

Après l'analyse des 105 composés, il a été constaté que le `matching_ratio` de ces composés n'était pas respecté (Figure 43). Lors de l'encodage des paramètres de la session COLMAR TOCSY, le `matching_ratio` avait été fixé à 0,6. Tous les composés dont ce paramètre était inférieur à cette valeur ne devaient pas figurer dans la liste de sortie. Lorsque les composés dont le `matching_ratio` n'est pas respecté sont éliminés manuellement, il en reste 18 (N\_Acetyl\_Alanine, Benzyl\_alcool, DSS, Fructose\_1,6\_biphosphate, Glutamate, Glutamine, Lactate, Leucine, Phénylacétylglycine, Phénylalanine, 3\_Phospholécyrate, Phénytylamine, Taurine, Sucrose, Déhydroascorbate, 3\_Hydroxypropionate, Hexadécanedioate, Aspartame). Parmi ces 18 composés, 8 (DSS, Glutamate, Glutamine, Lactate, Leucine, Phénylalanine, Taurine, Sucrose) sont réellement présents dans l'échantillon et détectés par ChenomX. La détection des 10 composés absents dans l'échantillon s'explique par le fait que COLMAR détecte un métabolite alors que tous les signaux relatifs à ce métabolite ne sont pas présents dans le spectre, ou qu'il attribue un composé à des artéfacts (Figure 44).



ID	Name	Matching_ratio
1	N_Acetyl_L_Glutamine	0,167
2	Adenosine_3_monophosphate	0,300
3	Adipic_acid	0,500
4	Alanine	0,500
5	L_Arabitol	0,350
6	Adonitol	0,500
7	N_Acetyl_L_alanine	1,000
8	ATP	0,300
9	Benzyl_alcohol	1,000
10	Butyric_acid	0,333
11	L_Canavanine	0,333
12	CoA	0,077
13	CoA	0,038
14	Cotinine	0,125
15	Creatine	0,500
16	DSS	1,000
17	Cis_1,2_dihydronaphtalene_1,2_diol	0,091
18	dTMP	0,045

Figure 43 : Fraction du tableau de sortie d'une session COLMAR TOCSY montrant différents composés ainsi que leur matching\_ratio. Les composés ayant un matching\_ratio supérieur à 0,6 sont encadrés en rouge.

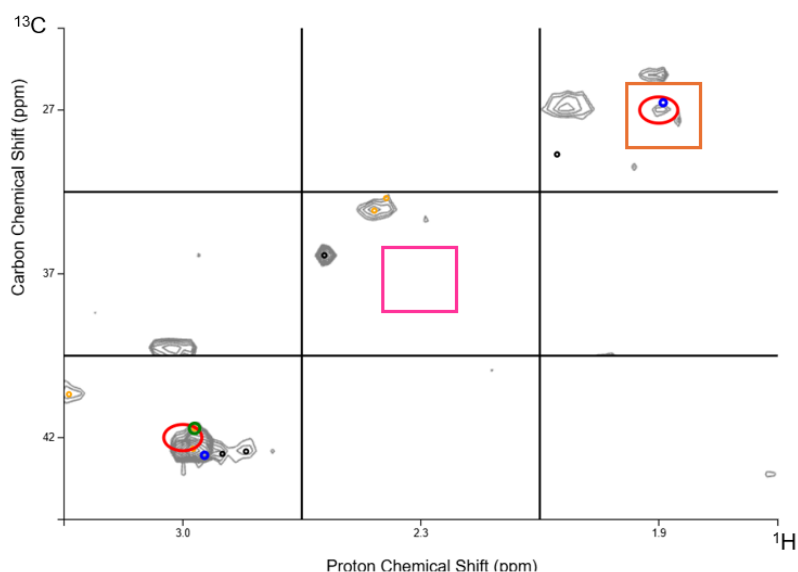


Figure 44 : Figure illustrant la détection de l'Aminobutyrate par COLMAR HSQC. Ce métabolite contient 3 signaux or COLMAR HSQC n'en détecte que 2 (1,9 ppm et 3 ppm), il manque un signal à 2,3 ppm (encadré en rose). Parmi les 2 signaux détectés par COLMAR HSQC, un d'eux n'est pas un véritable signal mais bien un artéfact (encadré en orange).

Une seconde session COLMAR TOCSY a été effectuée en utilisant les spectres TOCSY (obligatoire) et HSQC (optionnel) de l'échantillon « 10 métabolites ». Les résultats sont identiques à ceux obtenus précédemment en utilisant uniquement le spectre TOCSY. Le logiciel exploite uniquement les données spectrales issues de l'expérience TOCSY et ne tient pas compte des informations provenant de l'expérience HSQC si ce n'est que pour valider la détection réalisée par le TOCSY.

### 6.2.3.3 Combinaison des résultats obtenus avec COLMAR HSQC et TOCSY

COLMAR TOCSY permet une détection de beaucoup de composés. La plupart de ces composés sont en réalité absents dans l'échantillon mais tout de même détectés par COLMAR TOCSY. De plus, le matching ratio n'est pas respecté. Bien que le TOCSY soit capable d'identifier davantage de métabolites, il ne parvient pas à détecter les dix composés du tube plus celui du DSS. Les expériences HSQC permettent d'identifier moins de métabolites dans leur ensemble dont la plupart sont des composés réellement présents dans l'échantillon et détectés par COLMAR. Dans le but d'identifier un maximum de métabolites présents dans l'échantillon, des sessions COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY doivent être effectués en parallèle et les données obtenues devront être comparées. L'analyse des spectres TOCSY ou HSQC individuellement révélera des métabolites communs ainsi que des métabolites spécifiques à chacun.

Une session COLMAR HSQC a été réalisée avec un matching\_ratio de 0,6. 8 composés réellement présents dans l'échantillon incluant le DSS ont été détectés. 1 composé absent dans l'échantillon, la Créatine phosphate, a été détectée. 3 composés réellement présents dans l'échantillon, l'Alanine, la Phénylalanine et la Glutamine, n'ont pas été détectés (*Figure 45*). La raison de l'identification de la Créatine phosphate provient du fait que COLMAR ne fait pas la distinction entre la Créatine (réellement présente dans l'échantillon) et la Créatine phosphate. Ce résultat est différent de l'analyse faite avec ChenomX. Ce logiciel analyse des spectres 1D avec une haute résolution linéaire (0.5 Hz/pt), la distinction de deux signaux distants de 7 Hz est donc réalisable. COLMAR analyse des spectres 2D avec une résolution linéaire en  $^1\text{H}$  de 4 Hz/pt et en  $^{13}\text{C}$  de 30 Hz/pt. La non-détection de l'Alanine, la Phénylalanine et la Glutamine s'explique par le fait que ces trois métabolites se trouvent à une faible concentration (<80  $\mu\text{M}$ ) dans l'échantillon.

Matching ratio = 0,6

HSQC	Présents dans l'échantillon	Absents dans l'échantillon
Détectés par COLMAR	8	1
Non détectés par COLMAR	3	-

*Figure 45 : Tableau issu d'une session COLMAR HSQC avec un matching\_ratio imposé à 0,6. Ce tableau représente les 8 composés réellement présents dans l'échantillon et détectés par COLMAR, le composé absent dans l'échantillon mais détecté par COLMAR et les 3 composés réellement présents dans l'échantillon et non détectés par COLMAR.*

Une session COLMAR HSQC a été menée en utilisant un matching\_ratio de 1. 7 métabolites réellement présents dans l'échantillon ont été détectés. 1 métabolite absent dans l'échantillon, la Créatine phosphate a été détecté. 4 métabolites réellement présents dans l'échantillon, l'Alanine, la Phénylalanine, la Glutamine et le DSS n'ont pas été détectés (*Figure 46*). Ces résultats confirment que le

logiciel révèle une limitation de sa capacité à différencier la Créatine de la Créatine phosphate, qu'il ne parvient pas à détecter les composés les moins concentrés (<80 µM) et que le DSS n'a pas été détecté, ce qui indique un `matching_ratio` inférieur à 1 pour ce composé.

Matching ratio = 1

HSQC	Présents dans l'échantillon	Absents dans l'échantillon
Détectés par COLMAR	7	1
Non détectés par COLMAR	4	-

Figure 46 : Tableau issu d'une session COLMAR HSQC avec un `matching_ratio` imposé à 1. Ce tableau représente les 7 composés réellement présents dans l'échantillon et détectés par COLMAR, le composé absent dans l'échantillon mais détecté par COLMAR et les 4 composés réellement présents dans l'échantillon et non détectés par COLMAR.

Une session COLMAR TOCSY a été effectuée en utilisant un `matching_ratio` de 0,6. 10 métabolites réellement présents dans l'échantillon, y compris le DSS, ont été détectés. 95 composés absents dans le tube « 10 métabolites » ont également été détectés. 1 composé réellement présent dans l'échantillon n'a pas été détecté. Parmi les 95 composés, tous n'avaient pas un `matching_ratio` égal ou supérieur à 0,6. En éliminant tous les composés ayant un `matching_ratio` inférieur à 0,6. 18 métabolites (N\_Acétyle Alanine, Benzyle alcool, DSS, Fructose\_1,6\_biphosphate, Glutamine, Glutamate, Lactate, Leucine, Phénylacétylglycine, Phénylalanine, Phosphoglycérate, Phénytylamine, Taurine, Sucrose, Déhydroascorbate, Hydroxypropionate, Hexadécane dioate, Aspartame) ont été retenus (Figure 47). Parmi ces 18 métabolites détectés par COLMAR TOCSY, 8 sont présents dans l'échantillon. Comme expliqué et illustré précédemment à la Figure 44, les 10 composés détectés par COLMAR TOCSY mais absents dans l'échantillon peuvent s'expliquer par le fait que COLMAR TOCSY détecte un métabolite alors que tous les signaux relatifs à ce métabolite ne sont pas présents dans le spectre ou par le fait que COLMAR considère des artefacts comme étant de véritables signaux. Actuellement, la raison pour laquelle le `matching_ratio` n'est pas respecté lors de l'utilisation de COLMAR TOCSY reste inconnue. 1 composé, l'Acétate, présent dans l'échantillon à une concentration détectable, n'a pas été détecté. Il est surprenant que COLMAR n'ait pas détecté l'Acétate étant donné sa présence dans l'échantillon et dans la base de données du logiciel. Cela pourrait provenir du fait que lors de l'étape de référencement, le spectre est décalé, entraînant un déplacement des signaux qui ne correspondent plus aux signaux de la base de données de COLMAR.

Matching ratio = 0,6

TOCSY	Présents dans l'échantillon	Absents dans l'échantillon
Détectés par COLMAR	10	95
Non détectés par COLMAR	1	-

Figure 47 : Tableau issu d'une session COLMAR TOCSY avec un matching\_ratio imposé à 0,6. Ce tableau représente les 10 composés réellement présents dans l'échantillon et détectés par COLMAR, les 95 composé absent dans l'échantillon mais détectés par COLMAR et le composé réellement présent dans l'échantillon et non détecté par COLMAR.

Une session COLMAR TOCSY a été effectuée avec un matching\_ratio de 1. 6 composés réellement présents dans l'échantillon ont été détectés. 5 composés absents dans l'échantillons ont été détectés. 5 composés réellement présents dans l'échantillon n'ont pas été détectés. Le matching\_ratio n'est toujours pas respecté, 6 des 11 composés réellement présents dans l'échantillon et détectés par COLMAR ont un matching\_ratio de 1 (Figure 48).

Matching ratio = 1

TOCSY	Présents dans l'échantillon	Absents dans l'échantillon
Détectés par COLMAR	6	5
Non détectés par COLMAR	5	-

Figure 48 : Tableau issu d'une session COLMAR TOCSY avec un matching\_ratio imposé à 1. Ce tableau représente les 6 composés réellement présents dans l'échantillon et détectés par COLMAR, les 5 composés absents dans l'échantillon mais détectés par COLMAR et les 5 composés réellement présents dans l'échantillon et non détectés par COLMAR.

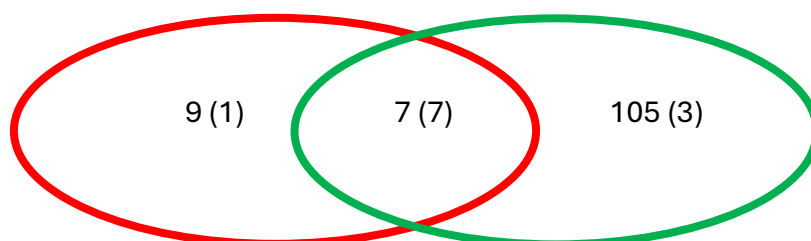
En conclusion, les attributions erronées de composés faites par COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY sont notamment dues à l'identification de signaux appartenant aux artéfacts du signal de l'eau comme étant des signaux de composés. L'idéal est donc de réussir à réduire au maximum le signal de l'eau. L'élimination manuelle des pics de l'eau est possible lors des sessions COLMAR HSQC et TOCSY, mais cette méthode n'est pas automatique. De plus, le logiciel attribue des composés à du bruit plutôt qu'à de vrais signaux, il est donc conseillé de diminuer le niveau de bruit manuellement grâce à la commande présente dans les paramètres du logiciel lorsqu'une session a été réalisée.

Les sessions HSQC et TOCSY ont ensuite été comparées (Figure 49).

Matching ratio = 0,6

HSQC	Présents dans l'échantillon	Absents dans l'échantillon
Détectés par COLMAR	8	1
Non détectés par COLMAR	3	-

TOCSY	Présents dans l'échantillon	Absents dans l'échantillon
Détectés par COLMAR	10	95
Non détectés par COLMAR	1	-



Matching ratio = 1

HSQC	Présents dans l'échantillon	Absents dans l'échantillon
Détectés par COLMAR	7	1
Non détectés par COLMAR	4	-

TOCSY	Présents dans l'échantillon	Absents dans l'échantillon
Détectés par COLMAR	6	5
Détectés par COLMAR	5	-

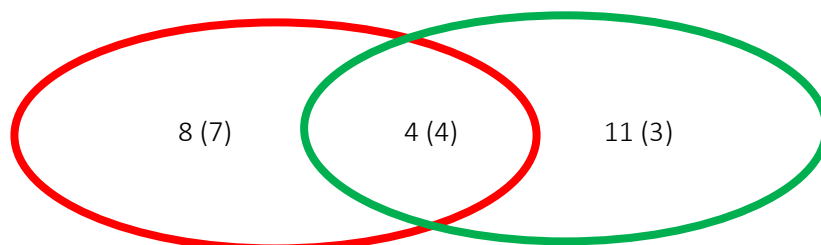


Figure 49 : Représentation schématique des résultats du tube "10 métabolites" obtenus par COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY. Le rond rouge contient les résultats obtenus par COLMAR HSQC, le rond vert contient les résultats obtenus par COLMAR TOCSY, l'intersection des deux couleurs contient les résultats communs obtenus par COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY. Les chiffres entre parenthèses représentent les métabolites qui ont également été détectés par ChenomX ou qui sont présents dans le DMEM.

L'analyse de ces résultats a révélé que tous les métabolites communs détectés par COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY sont présents dans l'échantillon étudié. Après avoir effectué une session COLMAR HSQC (ou TOCSY), une deuxième session COLMAR TOCSY (ou HSQC) peut être réalisée pour confirmer l'identification des métabolites réalisée lors de la première session COLMAR.

#### 6.2.4 Résultats COLMAR HSQC et TOCSY sur des échantillons de milieu frais - conditionné

Après avoir pris connaissance du fonctionnement du logiciel COLMAR sur le tube « 10 métabolites », des tests ont été réalisés sur les échantillons biologiques « milieu frais et milieu conditionné ». Dans un premier temps, l'objectif est de procéder à l'identification des métabolites contenus dans ces milieux, afin d'ensuite détecter d'éventuelles variations entre eux.

Des sessions COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY ont été effectuées. Étant donné l'incertitude concernant la composition des milieux, les composés détectés par le logiciel COLMAR ont été soumis à une analyse par le logiciel ChenomX afin de vérifier leur identification.

Tout comme pour l'analyse des composés du tube « 10 métabolites », une session COLMAR HSQC a été réalisée sur le tube contenant du milieu frais avec un `matching_ratio` de 0,6. Pour rappel, ce milieu est composé de DMEM dont les composants sont connus, de FBS dont la composition est inconnue, d'un antifongique (Amphotéricine B) et d'un antibiotique (Pénicilline-Streptomycine) qui ne sont pas répertoriés dans la base de données du logiciel COLMAR. Chaque composé détecté par ce logiciel a ensuite été vérifié avec le logiciel ChenomX pour confirmer ou non sa présence dans l'échantillon. L'identification manuelle des composés de ce milieu complexe a été difficile à effectuer en raison du nombre de métabolites présents dans l'échantillon et donc de la superposition des signaux dans le spectre 1D  $^1\text{H}$  (Figure 50).

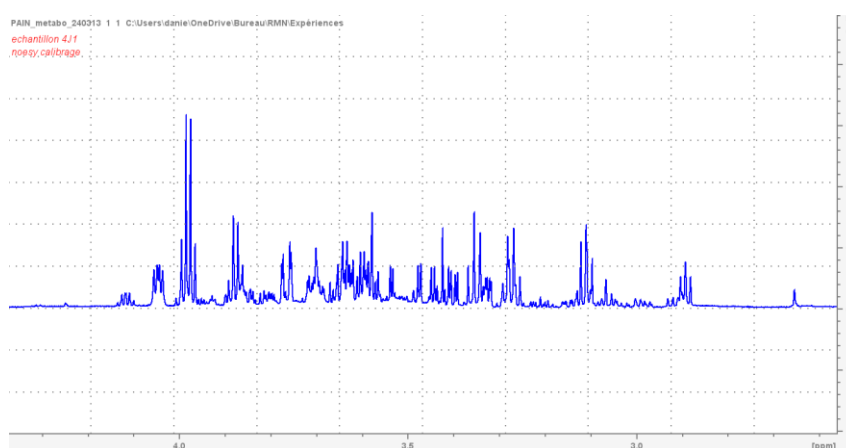


Figure 50 : Figure représentant la superposition des signaux devant être analysés (Spectre complet en annexe Figure 83).

20 composés détectés par ChenomX et présents dans le DMEM ont été détectés par COLMAR HSQC. Parmi ces 20 composés, 8 ne sont pas répertoriés dans la base de données de ChenomX. Les 12 composés restants tels que le Glycérol, l'Ornithine, le Fucose, ... sont présents dans la base de données

de ChenomX mais absents dans le milieu frais (Figure 51). COLMAR HSQC a détecté ces composés même si tous leurs pics ne sont pas présents dans le spectre. Si tous les signaux correspondant à un composé ne sont pas détectés, cela signifie que le métabolite n'est probablement pas présent dans l'échantillon, mais COLMAR HSQC ne l'interprète pas de cette manière (Figure 52). 21 composés non détectés par ChenomX et absents dans le DMEM ont été détectés par COLMAR. 18 composés détectés par ChenomX et présents dans le DMEM n'ont pas été détectés par COLMAR HSQC.

#### Milieu frais

HSQC	Détectés par ChenomX et présents dans le DMEM	Non détectés par ChenomX et absents dans le DMEM
Détectés par COLMAR	20	21
Non détectés par COLMAR	18	-

Figure 51 : Tableau issu d'une session COLMAR HSQC avec un matching\_ratio imposé à 0,6. Ce tableau représente les 20 composés détectés par ChenomX et présents dans le DMEM (probablement présents dans l'échantillon) et détectés par COLMAR HSQC, les 21 composé non détectés par ChenomX et absents dans le DMEM (probablement absents dans l'échantillon) mais détectés par COLMAR HSQC et les 18 composés détectés par ChenomX et présents dans le DMEM (probablement présents dans l'échantillon) mais non détectés par COLMAR HSQC.

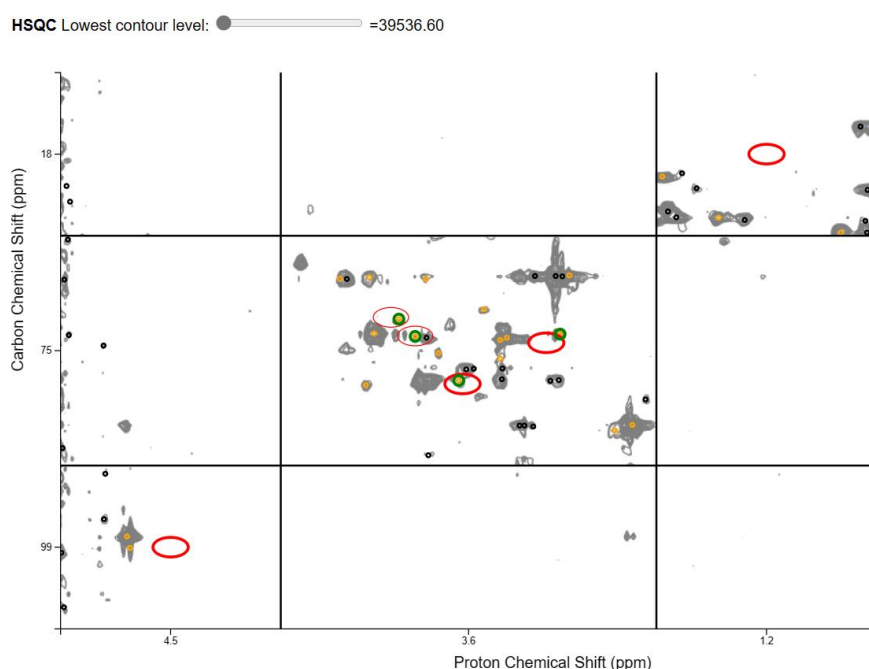


Figure 52 : Figure représentant un zoom sur les signaux du Fucose. COLMAR HSQC a détecté le Fucose comme un composé présent dans l'échantillon. COLMAR HSQC a positionné un rond orange (signal auquel il a attribué un composé), un rond vert (signal appartenant au Fucose) et un rond rouge (signal positionné dans la zone définie par la base de données). COLMAR HSQC a donc détecté 4 signaux appartenant au Fucose. Il manque des signaux (représentés par un cercle rouge sans éléments à l'intérieur).

Une session COLMAR TOCSY a été réalisée avec un `matching_ratio` imposé à 0,6. 21 composés détectés par ChenomX et présents dans le DMEM (vraisemblablement présents dans le milieu) ont été détectés par COLMAR TOCSY. 119 composés non détectés par ChenomX et absents dans le DMEM ont été détectés par COLMAR TOCSY. 17 composés détectés par ChenomX et présents dans le DMEM n'ont pas été détectés par COLMAR TOCSY. Parmi ces 17 composés, 5 ne sont pas répertoriés dans la base de données du logiciel COLMAR (*Figure 53*). Tout comme pour la session COLMAR HSQC, les 12 composés restants ne sont pas détectés par COLMAR TOCSY soit parce que les signaux relatifs à ces métabolites sont absents dans le spectre analysé, soit parce que ces signaux ne se trouvent pas dans la zone détectée par la base de données de COLMAR.

Les 119 composés détectés par COLMAR TOCSY mais non détectés par ChenomX s'expliquent par le fait que COLMAR considère des artéfacts comme des signaux, et par le fait que COLMAR détecte un composé même si tous les signaux propres à ce composé ne sont pas présents dans le spectre.

#### Milieu frais

TOCSY	Détectés par ChenomX et présents dans le DMEM	Non détectés par ChenomX et absents dans le DMEM
Détectés par COLMAR	21	119
Non détectés par COLMAR	17	-

*Figure 53 : Tableau issu d'une session COLMAR HSQC avec un `matching_ratio` imposé à 0,6. Ce tableau représente les 21 composés détectés par ChenomX et présents dans le DMEM (probablement présents dans l'échantillon) et détectés par COLMAR TOCSY, les 119 composé non détectés par ChenomX et absent dans le DMEM (probablement absents dans l'échantillon) mais détectés par COLMAR TOCSY et les 17 composés détectés par ChenomX et présents dans le DMEM (probablement présents dans l'échantillon) mais non détectés par COLMAR TOCSY.*

Pour valider les métabolites détectés par COLMAR, ces mêmes métabolites doivent être détectés par ChenomX et les corrélations relatives à chacun des métabolites doivent être présentes dans les spectres HSQC (C-H) et TOCSY (H-H).

Les mêmes analyses ont été réalisées sur l'échantillon de milieu conditionné.

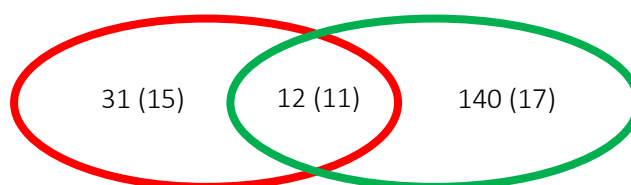
L'analyse des résultats démontre que COLMAR TOCSY détecte un nombre élevé de métabolites absents dans l'échantillon étudié. Lors de l'analyse de l'échantillon du milieu conditionné par COLMAR TOCSY et COLMAR HSQC, 17 métabolites ont été détectés dont 11 ont également été détectés par ChenomX et sont présents dans le DMEM (*Figure 54*). Ces résultats confirment qu'après avoir effectué une session COLMAR HSQC (ou TOCSY), une deuxième session COLMAR TOCSY (ou HSQC) peut être réalisée pour confirmer l'identification des métabolites réalisée lors de la première session COLMAR.



Milieu frais

HSQC	DéTECTÉS par ChenomX et présents dans le DMEM	Non détectés par ChenomX et absents dans le DMEM
DéTECTÉS par COLMAR	20	21
Non détectés par COLMAR	18	-

TOCSY	DéTECTÉS par ChenomX et présents dans le DMEM	Non détectés par ChenomX et présents dans le DMEM
DéTECTÉS par COLMAR	21	119
Non détectés par COLMAR	17	-



Milieu conditionné

HSQC	DéTECTÉS par ChenomX et présents dans le DMEM	Non détectés par ChenomX et présents dans le DMEM
DéTECTÉS par COLMAR	14	15
Non détectés par COLMAR	24	-

TOCSY	DéTECTÉS par ChenomX et présents dans le DMEM	Non détectés par ChenomX et présents dans le DMEM
DéTECTÉS par COLMAR	21	142
Non détectés par COLMAR	17	-

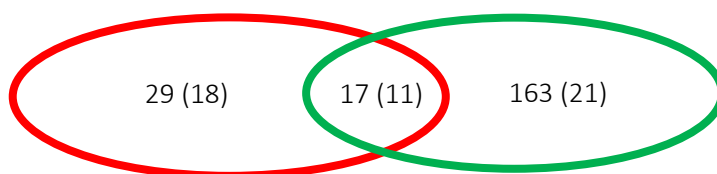


Figure 54 : Diagramme synthétisant les résultats de l'analyse du l'échantillon de milieu frais et conditionné effectuée par COLMAR HSQ, COLMAR TOCSY et validés par ChenomX. Le rond rouge contient les résultats obtenus par COLMAR HSQC, le rond vert contient les résultats obtenus par COLMAR TOCSY, l'intersection des deux couleurs contient les résultats communs obtenus par COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY. Les chiffres entre parenthèses représentent les métabolites qui ont également été détectés par ChenomX ou qui sont présents dans le DMEM.

Les données issues de l'analyse comparative entre le milieu frais et le milieu conditionné indiquent une variation de la concentration de plusieurs métabolites. Les concentrations de chaque composé obtenues par ChenomX ont été normalisées sur base de la concentration (1,096 mM) du Formate (étalon) ajouté dans les échantillons (*Voir tableau en annexe, Figure 86*). Des moyennes des concentrations de chaque métabolite présent dans les trois échantillons de milieu frais a été réalisée. La moyenne des concentrations de chaque métabolite présent de le milieu conditionné a également été calculée malgré le fait que le nombre de cellules par boîte n'a pas pu être relevé en raison d'une contamination des cultures. La moyenne obtenue pour chaque métabolite présent dans les échantillons de milieu conditionné a été soustraite à la moyenne obtenue pour chaque métabolite présent dans les échantillons de milieu frais. La concentration moyenne de certains métabolites augmente tandis qu'elle diminue pour d'autres métabolites (*Figure 55*). L'écart-type des concentrations de chaque métabolite présent dans le milieu frais a été calculée. La détermination de la concentration des composés a été réalisée par ChenomX et non pas par COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY car ils ne sont pas conçus pour donner une mesure de la concentration. Le logiciel COLMAR propose d'effectuer des sessions COLMARc qui permettront de mesurer la concentration. Cet outil sera décrit plus loin dans ce document.

Il a été constaté au travers de ce tableau que le Glucose est le métabolite le plus consommé et le Lactate est le métabolite le plus produit. Ces résultats étaient attendus puisque lors de la glycolyse, le Glucose sera transformé en Pyruvate. Le Pyruvate est ensuite converti en Lactate qui sera finalement utilisé par les neurones comme substrat énergétique [*Roumes et al., 2020*]. La Choline, l'Ethanol, le Fructose, le Glutamate, la Glycine, la Leucine, la Lysine, la Méthionine, la Niacinamide, la Sérine, le Succinate et la Tyrosine sont des métabolites dont la variation de la concentration n'est pas significative (valeurs des écart-types de ces métabolites sont inférieures aux valeurs obtenues lors de la différence de concentrations). L' Alanine, l' Arginine, la Bétaïne, la Créatine, la Cystine, la Glutamine, le Pantothénate, la Phénylalanine, la Proline et le Tryptophane sont les métabolites produits en présences d'astrocytes. L' Acétate, l' Acétone, l' Isoleucine, le Myo-inositol, le Pyruvate, la Thréonine et la Valine sont les métabolites consommés en présences d'astrocytes. Ces résultats seront interprétés plus en détail par l'équipe du Professeur Hermans.

Tous les composés détectés par COLMAR HSQC, COLMAR TOCSY et détectés par ChenomX semblent être présents dans les échantillons de milieu frais et conditionné. Le Lactate est détectable dans le milieu conditionné mais absent dans le milieu frais. Cette observation est attribuable à la production de lactate par les cellules en cours de développement. Étant donné que le milieu frais ne renferme pas de cellules, la présence de lactate est impossible.

Composés	Concentration moyenne des échantillons de milieu frais (mM)	Ecart-type des échantillons de milieu frais (mM)	Concentration moyenne des échantillons de milieu conditionné (mM)	Différence des concentrations moyennes de milieu conditionné et milieu frais (mM)
Acétate	0,107	0,005	0,080	-0,027
Acétone	0,016	0,001	0,010	-0,006
Alanine	0,27	0,01	0,58	0,31
Arginine	0,21	0,01	0,27	0,05
Bétaïne	0,0105	0,0007	0,0122	0,0018
Choline	0,023	0,002	0,025	0,002
Créatine	0,015	0,001	0,017	0,003
Cystine	0,045	0,002	0,052	0,007
Ethanol	0,036	0,005	0,040	0,004
Fructose	0,29	0,04	0,31	0,01
Glucose	3,42	0,05	2,26	-1,16
Glutamate	1,5	0,1	1,3	-0,1
Glutamine	0,21	0,01	0,58	0,37
Glycine	0,25	0,04	0,25	0,01
Isoleucine	0,49	0,02	0,43	-0,06
Lactate	1,03	0,06	3,09	2,06
Leucine	0,44	0,05	0,41	-0,03
Lysine	0,43	0,01	0,42	-0,01
Méthionine	0,126	0,003	0,125	-0,001
Myo-Inositol	0,09	0,02	0,08	-0,05
Niacinamide	0,022	0,001	0,021	-0,001
Pantothénate	0,0100	0,0002	0,0121	0,0021
Phénylalanine	0,201	0,002	0,205	0,004
Proline	0,29	0,01	0,30	0,05
Pyruvate	0,48	0,05	0,25	-0,23
Sérine	0,22	0,02	0,21	-0,01
Succinate	0,0495	0,003	0,0163	-0,0332
Thréonine	0,4	0,1	0,4	-0,01
Tryptophane	0,028	0,002	0,029	0,005
Tyrosine	0,26	0,02	0,26	0,01
Valine	0,528	0,005	0,519	-0,008

Figure 55 : Tableau reprenant les concentrations moyennes, l'écart-type et la différence de concentration moyenne de chaque métabolite présent dans les milieux frais et conditionnés. La première colonne reprend les composés présents dans les échantillons analysés. Les deuxième et quatrième colonnes reprennent les moyennes de concentration de chaque métabolite (la deuxième colonne est obtenue en additionnant les colonnes 2,3 et 4 du tableau précédent et en divisant le résultat obtenu par trois, la troisième colonne est obtenue en additionnant les colonnes 5,6 et 7 du tableau précédent et en divisant le résultat obtenu par trois). La troisième colonne représente l'écart-type mesuré sur les triplicats de milieu frais. La dernière colonne reprend la différence de concentration pour chaque métabolite (cette colonne est obtenue en soustrayant la colonne 3 par la colonne 2 de ce tableau). Les métabolites écrits en bleu sont ceux produits, les métabolites écrits en vert sont ceux consommés et les métabolites écrits en mauve sont ceux dont la variation de la concentration n'est pas significative.

## 6.2.5 Répétabilité des résultats obtenus par COLMAR sur les échantillons de milieu frais

### 6.2.5.1 COLMAR TOCSY

Trois sessions COLMAR TOCSY ont été réalisées, dans lesquelles le signal de l'eau a été supprimé manuellement, sur des échantillons de milieu frais (trois cultures différentes mais contenant les mêmes composants) (Figure 56).

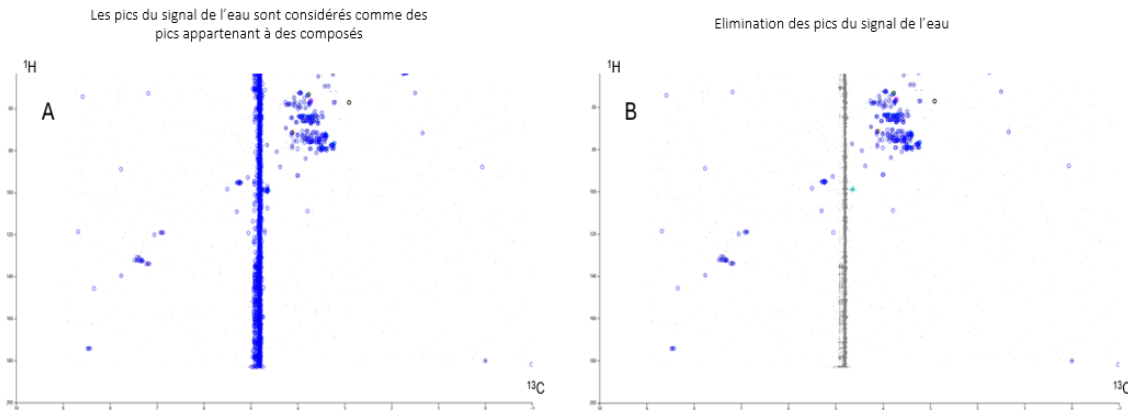


Figure 56 : Figure représentant la suppression du signal de l'eau sur les spectres HSQC fournis à COLMAR HSQC. La Figure A montre que les artéfacts du signal de l'eau sont considérés comme des signaux appartenant à des métabolites. La Figure B montre que tous ses pics ont été supprimés.

Beaucoup de métabolites ont été détectés par COLMAR TOCSY avec respectivement, 173, 181 et 166 métabolites détectés dans les trois échantillons analysés.

Parmi tous ces composés, 76 sont en communs dans les trois échantillons (Figure 57).

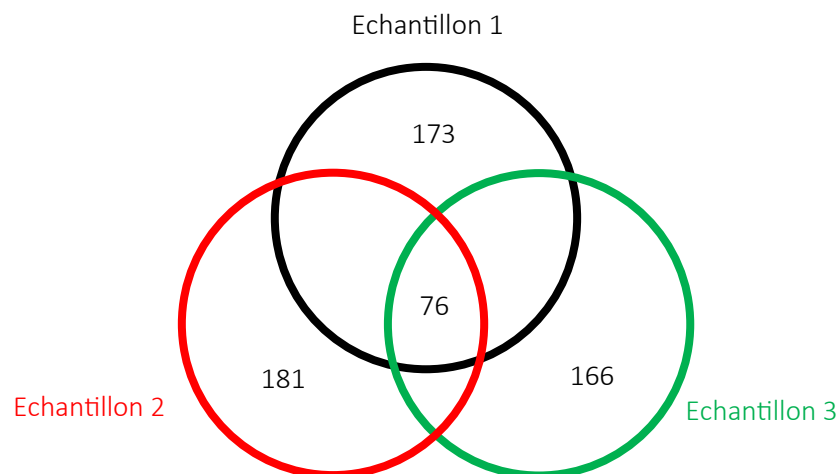


Figure 57 : Diagramme reprenant le nombre de composés détecté par COLMAR TOCSY dans les trois échantillons de milieu frais. COLMAR TOCSY a détecté 173 composés dans l'échantillon 1, il en a détecté 181 dans l'échantillon 2 et 166 dans l'échantillon 3. 76 composés communs ont été détectés dans les trois échantillons.

Parmi ces 76 composés, tous n'avaient pas un `matching_ratio` supérieur à 0,6 (paramètre imposé lors de l'analyse du spectre par COLMAR TOCSY). 33 composés ont été détectés avec un `matching_ratio` supérieur à 0,6. Ces 33 composés ont été pris en compte lors du traitement des résultats (Figure 58).

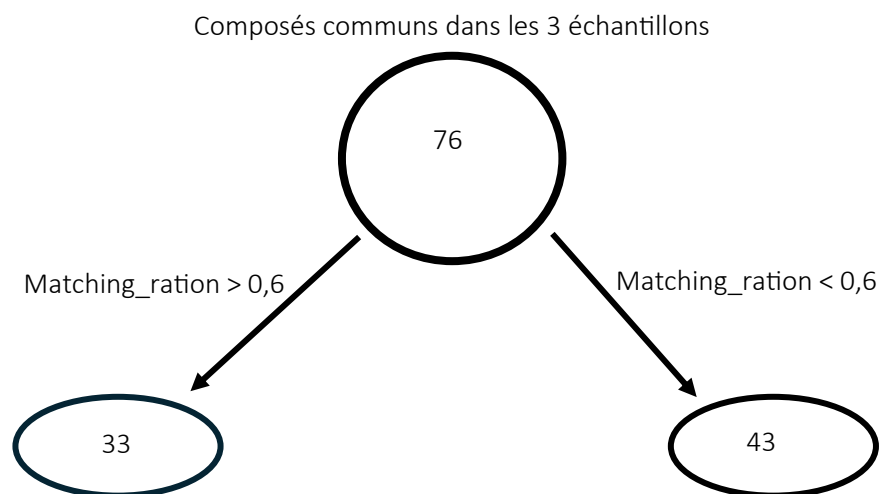


Figure 58 : Schéma reprenant les 33 métabolites détectés par COLMAR TOCSY avec un `matching_ratio` supérieur à 0,6 et les 43 métabolites détectés par COLMAR TOCSY avec un `matching_ratio` inférieur à 0,6.

Parmi les 33 composés restants, 27 ont un `matching_ratio` supérieur à 0,6 pour un ou deux échantillon(s) mais pas pour les autres. C'est-à-dire que pour un même métabolite, le `matching_ratio` peut être supérieur à 0,6 dans l'échantillon 1 mais pas dans les échantillons 2 et 3 (Figure 59). Cette variation pourrait venir du décalage des spectres lors de l'étape de référencement. Les spectres ont été décalés afin que les signaux des composés de références (DSS, Alanine, Leucine, Glucose, Lactate) se situent parfaitement dans les zones définies par la base de données du logiciel COLMAR. Les trois spectres étudiés ne sont pas décalés de manière identique, un même signal ne se superposera donc pas parfaitement dans les 3 spectres. Un même signal peut correspondre à la zone de la base de données du logiciel COLMAR pour un spectre mais pas pour les deux autres spectres. Si les signaux relatifs à un composé se trouvent dans la zone de la base de données, COLMAR TOCSY détectera ce composé comme étant présent dans l'échantillon étudié. Un plus grand nombre de signaux concordant avec les zones de la base de données du logiciel COLMAR entrainera un `matching_ratio` plus élevé. COLMAR détecte un signal sur certains spectres et pas sur d'autres alors que ces signaux sont identiques. La seule explication plausible à ce phénomène serait une erreur informatique (Figure 60).

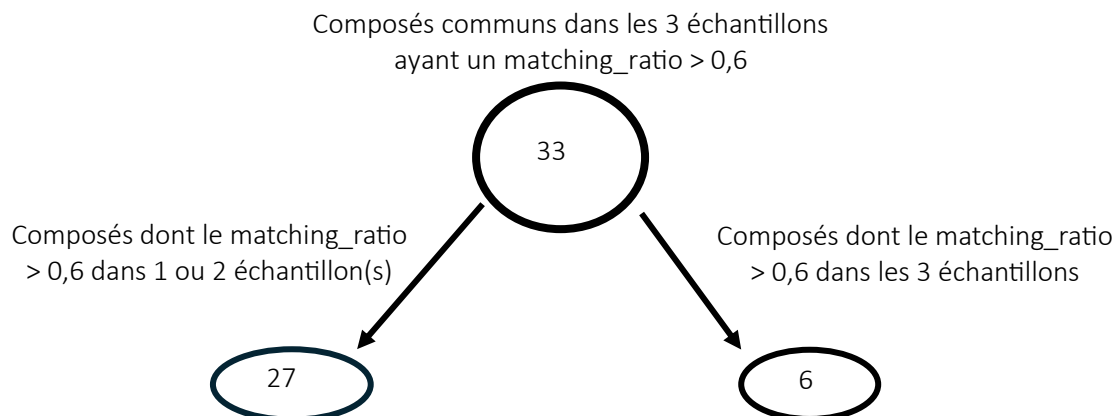


Figure 59 : Schéma reprenant les 6 métabolites détectés par COLMAR TOCSY dans les 3 échantillons et ayant un matching\_ratio supérieur à 0,6 dans tous les échantillons ainsi que les 27 métabolites détectés par COLMAR TOCSY dans les trois échantillons mais dont le matching\_ratio des composés est supérieur à 0,6 dans un ou deux des échantillons étudiés.

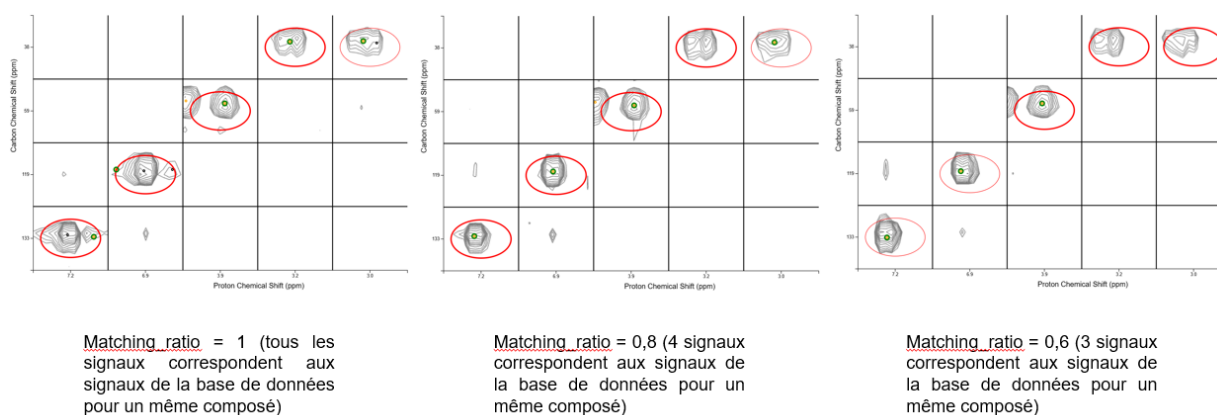


Figure 60 : Figures représentant les 5 signaux relatifs à la Tyrosine ainsi que leur matching\_ratio. Le premier spectre correspond au premier échantillon. Dans ce spectre, tous les signaux (rond orange, signal auquel COLMAR TOCSY a attribué un composé et vert, signal appartenant à la Tyrosine) ont été détectés par COLMAR TOCSY et correspondent aux signaux de la base de données (entourés en rouge). Ce composé a donc un matching\_ratio de 1 dans ce cas. La deuxième Figure correspond au deuxième échantillon. Dans ce spectre, 4 signaux ont été détectés par COLMAR TOCSY et correspondent aux signaux de la base de données. Ce composé a donc un matching\_ratio de 0,8 (4/5). La troisième Figure correspond au troisième échantillon. Dans ce spectre, 3 signaux ont été détectés par COLMAR TOCSY et correspondent aux signaux de la base de données, ce composé a un matching\_ratio de 0,6 (3/5). Certains signaux des spectres des échantillons 2 et 3 n'ont pas été détectés par COLMAR TOCSY.

Parmi les 33 composés, 15 ont été détectés par ChenomX et sont présents dans le DMEM (Figure 61). Les 18 autres composés ne se trouvent pas dans la base de données de ChenomX ou les signaux des spectres ne correspondaient pas aux signaux de la base de données de ChenomX.

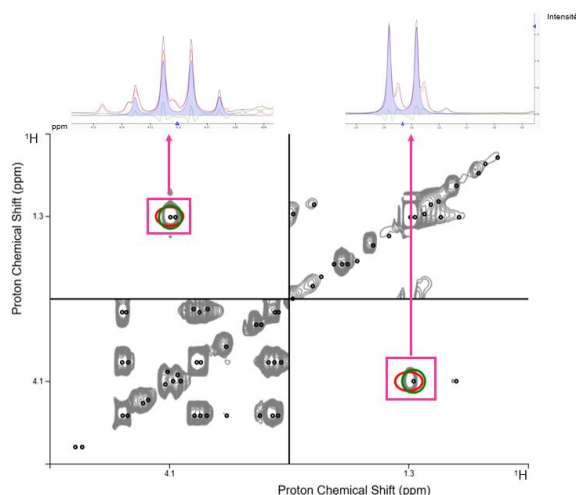


Figure 61 : Figure illustrant la détection du Lactate par COLMAR TOCSY ainsi que par ChenomX. Les signaux du spectre 1D  $^1\text{H}$  situés à 1,3 et 4,1 ppm (signaux bleus) présentent des corrélations H-H dans le spectre 2D TOCSY (encadrés en rose).

Dans ce cas-ci, COLMAR TOCSY a détecté les pics de corrélation H-H étant donné que c'est une analyse TOCSY qui a été réalisée. La Valine est illustrée à titre d'exemple. A 1 ppm, deux signaux se superposent sur le spectre TOCSY mais ces signaux sont distinguables sur le spectre 1D  $^1\text{H}$ , ChenomX a réussi à détecter les deux (Figures 62).

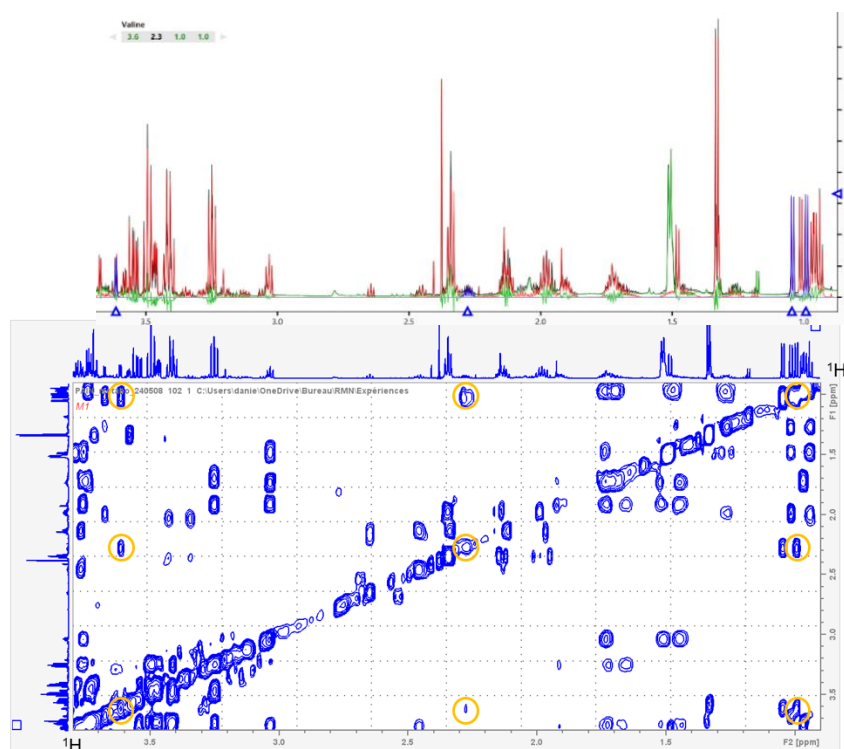


Figure 62 : Figure représentant les six pics de corrélation (mis en évidence par les ronds orange) de la Valine (Spectre complet en annexe Figure 82) ainsi que la détection de la Valine par ChenomX.

#### 6.2.5.2 COLMAR HSQC

Trois sessions COLMAR HSQC ont été réalisées, dans lesquelles le signal de l'eau a été supprimé manuellement, sur des échantillons de milieu frais.

Un nombre de métabolites différent a été détecté par COLMAR HSQC avec respectivement 45, 42 et 46 métabolites détectés dans les trois échantillons analysés. Parmi l'ensemble de ces métabolites, 26 sont communs aux trois échantillons. Dans ces 27 métabolites, 17 ont été détectés par ChenomX et sont présents dans le DMEM (Figures 63 et 64).

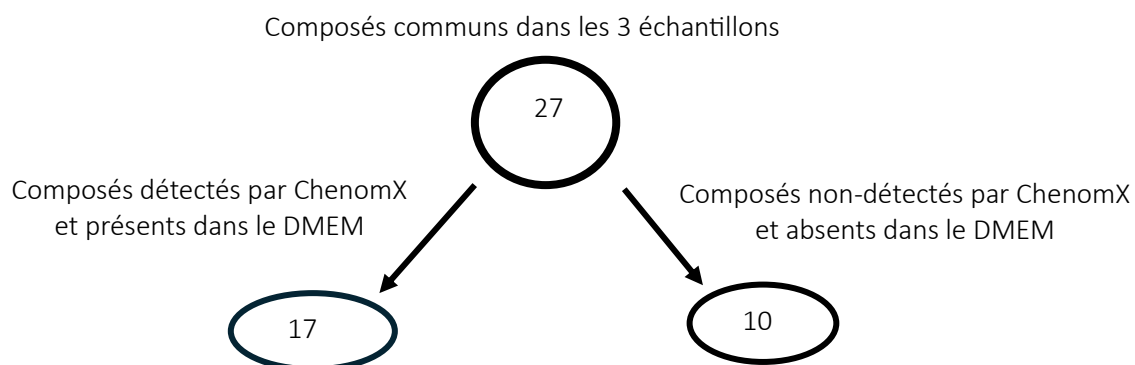


Figure 63 : Figure reprenant les 27 métabolites communs dans les 3 échantillons dont 17 métabolites ont été détectés par ChenomX et sont présents dans le DMEM.

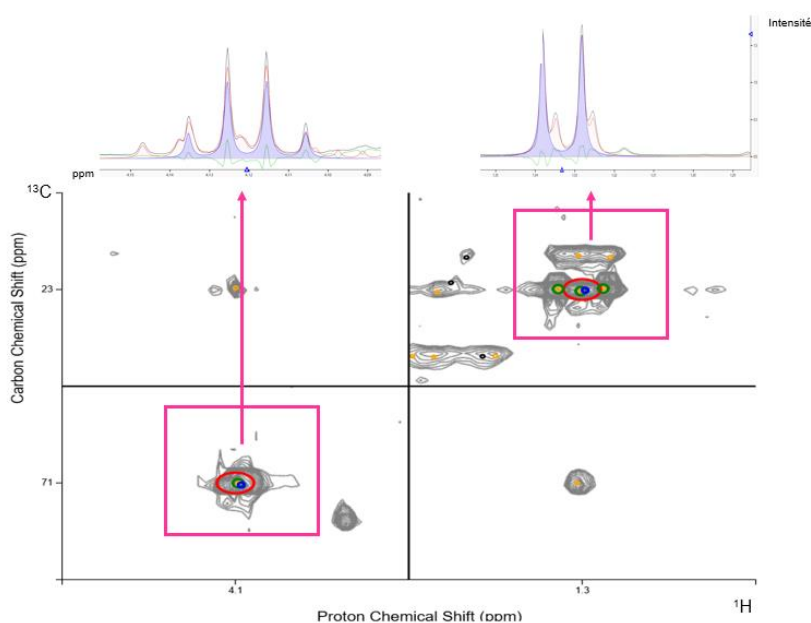


Figure 64 : Figure illustrant la détection du Lactate par COLMAR HSQC ainsi que par ChenomX. Les signaux du spectre 1D  $^1\text{H}$  situés à 1,3 et 4,1 ppm (signaux bleus) présentent des corrélations C-H dans le spectre 2D HSQC (encadrés en rose).

Dans le but de vérifier l'appartenance des 9 métabolites restants au milieu frais, le spectre TOCSY a été analysé via le logiciel TopSpin afin d'observer si les corrélations H-H spécifiques à chaque signal observé dans le spectre HSQC sont présentes. Le Glycérol Figure parmi ces 10 métabolites, il a été pris comme exemple pour illustrer les faits (Figure 65).



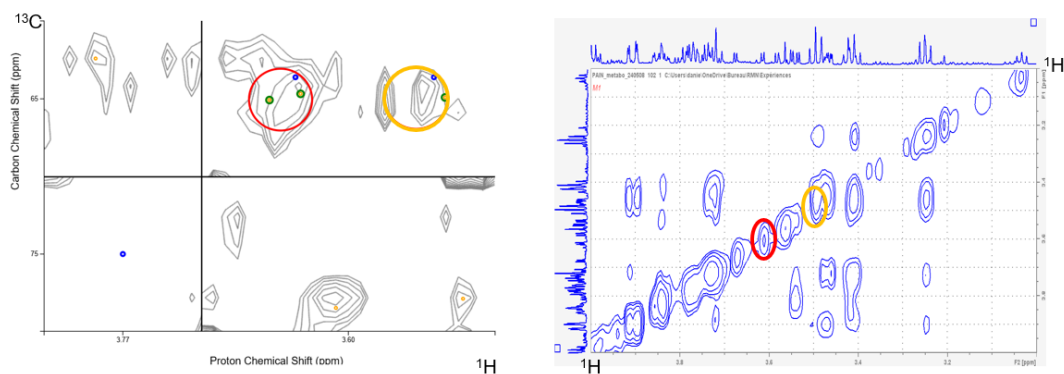


Figure 65 : Figure reprenant les pics de corrélation C-H sur le spectre HSQC et les pics de corrélation H-H sur le spectre TOCSY du Glycérol (Spectre complet en annexe Figure 82). Deux signaux de corrélation C-H ont été observés sur le spectre HSQC du Glycérol. Aucune corrélation H-H n'a été détectées sur le spectre TOCSY à 3,5 (rond orange) et 3,69 ppm (rond rouges). Un signal manque à 3,7 ppm sur le spectre HSQC.

Le Glycérol n'a pas été détecté par le logiciel ChenomX. Ce métabolite est donc probablement absent dans le milieu frais.

Parmi les 10 métabolites restants, le Fructose a été analysé. COLMAR HSQC a détecté 4 signaux sur 6 appartenant au Fructose (ronds orange et verts). Toutes les corrélations H-H attendues pour les signaux observés sur le spectre HSQC ne sont pas présentes (Figure 66).

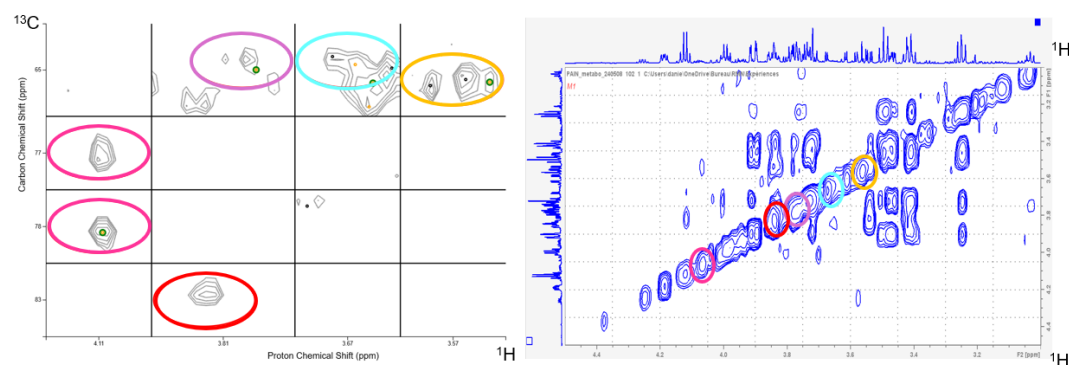


Figure 66 : Figure reprenant les pics de corrélations C-H sur le spectre HSQC et les pics de corrélation H-H sur le spectre TOCSY du Fructose (Spectre complet en annexe Figure 82). Six signaux de corrélation C-H ont été observés sur le spectre HSQC du Fructose, avec deux signaux (entourés en rose et rouge) qui ne correspondaient pas (pas de rond vert et orange sur ces signaux) à la zone déterminée par la base de données (3,83 ppm, 4,11 ppm). Lors de l'analyse du spectre TOCSY, aucune corrélation H-H n'a été détectée.

Le Fructose a été détecté lors de l'analyse par ChenomX mais ne présente pas de corrélations H-H dans le spectre TOCSY. Il n'est donc pas possible d'affirmer avec certitude que le Fructose est présent dans l'échantillon.

Parmi les 9 métabolites restant, le Threitol ne présentait pas de corrélation H-H dans le spectre TOCSY. Ce résultat était attendu puisque ce métabolite ne contient pas de protons voisins pouvant être corrélés (Figure 67). Le Threitol n'a pas été détecté par ChenomX. Les 8 autres métabolites ne présentaient pas toutes les corrélations H-H attendues dans le spectre TOCSY et aucun de ces métabolites n'a été détecté par ChenomX.

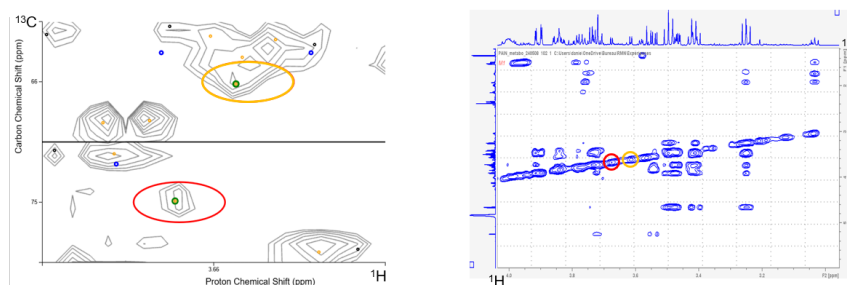


Figure 67 : Figure reprenant le pic de corrélation C-H sur le spectre HSQC du Threitol. Ce métabolite ne contenant pas de protons voisins pouvant interagir entre eux, aucune corrélation H-H ne sera observée dans le spectre TOCSY (Spectre complet en annexe Figure 82).

### 6.2.5.3 COLMARc

COLMARc est un outil permettant la comparaison automatique de différents spectres HSQC ainsi que la quantification des métabolites. Les trois échantillons du milieu frais ont été soumis à une comparaison automatique et les résultats ont été confrontés aux comparaisons manuelles réalisées par COLMAR HSQC. Pour ce faire, les sessions COLMAR HSQC ont été ajoutées dans COLMARc afin qu'il puisse les analyser.

COLMARc a permis de détecter 47 métabolites. Parmi ces métabolites, 25 ont été détectés dans les trois échantillons et correspondent aux métabolites détectés par COLMAR HSQC. 5 métabolites détectés par COLMARc n'ont pas été détectés par COLMAR HSQC.

COLMARc détecte donc les composés communs dans deux ou trois échantillons. Les composés présents uniquement dans un seul échantillon ou n'ayant pas été détectés par COLMAR HSQC ont été soumis à des analyses complémentaires. L'Ornithine est un métabolite détecté par COLMARc et par COLMAR HSQC comme étant présent uniquement dans l'échantillon 3. Le spectre HSQC a été analysé (Figure 68).

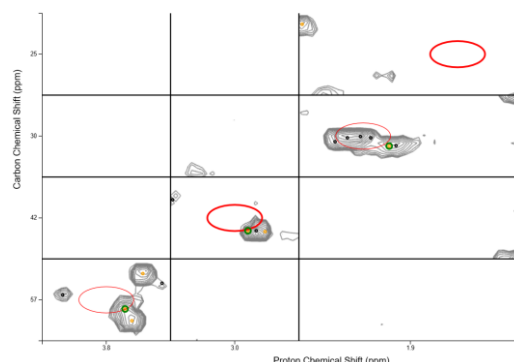


Figure 68 : Figure illustrant le spectre HSQC de l'Ornithine. Trois des quatre signaux appartenant à ce métabolite se trouvent à la limite de la zone définie par la base de données du logiciel COLMAR (cercle rouge). Un signal est en dehors de cette zone.

Parmi les quatre signaux attribués à ce métabolite, trois se trouvent à la limite de la zone définie par la base de données du logiciel COLMAR et un signal se trouve en dehors de cette zone. COLMARc a

tout de même détecté l'Ornithine comme étant présente dans l'échantillon. Ce métabolite est répertorié dans la base de données de ChenomX mais les signaux de la base de données ne correspondaient pas aux signaux du spectre analysé. L'analyse du spectre TOCSY a également révélé certaines corrélations H-H mais pas toutes. Les résultats obtenus par COLMARc HSQC doivent être confirmés par une analyse du spectre TOCSY.

COLMARc permet également de mesurer la concentration des métabolites détectés. Des analyses statistiques vont avoir lieu. Le logiciel fournit le volume des signaux qui peut être transformé en concentration. La mesure de la concentration par COLMARc a été réalisée sur le Lactate ainsi que sur le Glucose (*Figures 69, 70 et 71*).

Concentration (mM)	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Lactate	1,106	0,989	1,002	3,551	2,288	3,453
Glucose	3,463	3,366	3,453	1,913	2,988	1,885
	Triplikat (même solution)			Triplikat avec variation biologique (différentes cultures cellulaires), pas de normalisation par le nombre de cellules		

Figure 69 : Tableau de la mesure des concentrations du Lactate et du Glucose réalisée par ChenomX.

Les concentrations mesurées par ChenomX sont similaires dans les trois premiers échantillons, cela s'explique par le fait que l'échantillon est composé de milieu frais. Les derniers résultats présentent des variations, ceci était attendu puisque l'échantillon est composé de milieu conditionné. Comme expliqué et montré précédemment, les mesures réalisées par ChenomX sont donc fiables.

Concentration (mM)	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Lactate (pic 1)	6,98	6,75	9,2	23,5	11,7	23,8
Lactate (pic 2)	2,59	3,12	5,79	9,23	4,94	11,5
Glucose (pic 1)	6,14	0,34	0,06	0,04	0,04	0,05
Glucose (pic 2)	10,6	0,05	0,06	5,89	7,27	7,61
Glucose (pic 3)	5,85	0,05	8,8	3,46	0,04	3,88
Glucose (pic 4)	8,53	0,05	26	9,03	0,04	0,05
Glucose (pic 5)	6,64	6,87	9,2	4,17	2,8	4,4
Glucose (pic 6)	10,4	9,48	9,08	3,38	6,53	4,45
Glucose (pic 7)	2,6	3,11	0,06	0,04	0,04	1,81
	Triplikat (même solution)			Triplikat avec variation biologique (différentes cultures cellulaires), pas de normalisation par le nombre de cellules		

Figure 70 : Tableau de la mesure des concentrations du Lactate et du Glucose réalisée par COLMARc.

Les concentrations des trois premiers échantillons de milieu frais obtenues par COLMARc devaient être similaires or ce n'est pas le cas, de fortes variations sont observées. Les concentrations mesurées par COLMARc sont donc impossibles à interpréter.

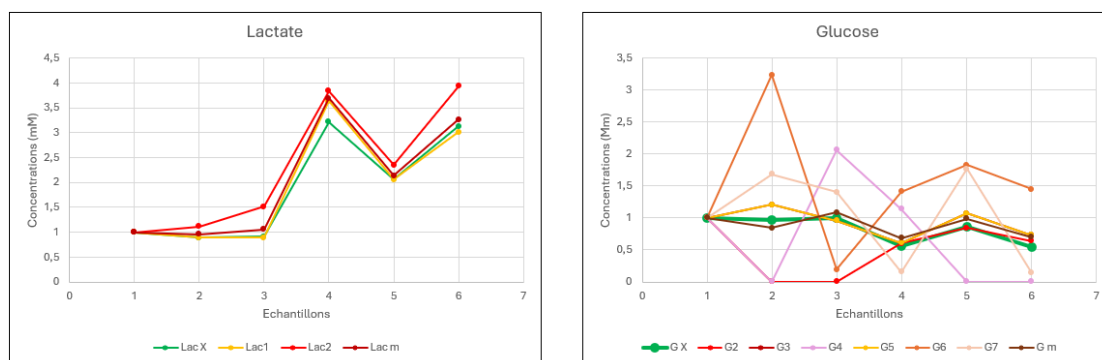


Figure 71 : Graphique représentant les concentrations du Lactate et du Glucose mesurées par ChenomX et COLMARc. La courbe en vert représente les concentrations mesurées par ChenomX dans chaque échantillon. Les courbes de couleur jaune, rouge, orange et beige représentent la concentration de chaque métabolite mesurée par COLMARc dans chacun des échantillons. La courbe brune et mauve représente la moyenne des concentrations mesurées par COLMARc.

Le graphique du Lactate indique que toutes les concentrations mesurées suivent la même tendance. La concentration du Lactate reste constante dans les trois premiers échantillons, ces résultats étaient attendus puisque ces échantillons correspondent au milieu frais. La concentration dans les trois derniers échantillons fluctue en raison de la présence d'astrocytes dans les cultures. Les résultats obtenus avec ChenomX et COLMARc sont similaires.

Le graphique du Glucose indique que les concentrations mesurées par les deux logiciels sont différentes. Les résultats ne suivent plus la même tendance et sont totalement incompréhensibles. Un mail reprenant toute une série de questions a été envoyé aux développeurs du logiciel COLMAR afin de tenter de comprendre comment interpréter les résultats obtenus.

L'utilisation de COLMARc pour déterminer la concentration des métabolites détectés est donc toujours en cours d'évaluation

#### 6.2.5.4 Résumé des sessions COLMAR HSQC, COLMAR TOCSY et COLMARc

En résumé, la validation de la présence d'un métabolite détecté par le logiciel COLMAR dans l'échantillon étudié nécessite plusieurs analyses. Tout d'abord, après la réalisation d'une session COLMAR HSQC et la détection de métabolites par le logiciel, toutes les corrélations H-H des métabolites détectés doivent être visibles sur le spectre TOCSY. Ensuite, ces métabolites doivent être détectés par le logiciel ChenomX, à condition que ces composés soient répertoriés dans sa base de données. Si ces deux analyses sont positives, il est très probable que le métabolite soit présent dans l'échantillon étudié.

Le logiciel COLMAR facilite l'analyse sur ChenomX. Tous les métabolites détectés par COLMAR pourraient être analysés à l'aide du logiciel ChenomX. Autrement, lors d'une analyse d'un spectre par chenomX, tous les métabolites présents dans sa base de données (338) devraient être analysés.

### 6.2.5.5 Conclusion des sessions COLMAR HSQC, COLMAR TOCSY et COLMARc

En conclusion, l'utilisation du logiciel COLMAR semble être bénéfique pour l'attribution des métabolites dans un mélange complexe. Cependant, les résultats obtenus par COLMAR ne sont pas directement exploitables en raison de la présence d'un grand nombre de composés réellement absents dans les échantillons et de la méconnaissance de certains métabolites réellement présents dans les échantillons. Il est également recommandé de vérifier les résultats de COLMAR en utilisant le logiciel ChenomX, mais cette validation n'est pas toujours possible en raison des différences entre les bases de données des deux logiciels. Dès lors, il serait judicieux d'analyser le spectre pour vérifier l'attribution des composés faite par COLMAR. En effet, il faut s'assurer que les pics attribués n'appartiennent pas au signal de l'eau ou que ces pics soient réellement des signaux et non pas des artefacts. Il est également important que COLMAR détecte correctement un composé avec tous ses signaux associés. Malgré ces précautions, des incertitudes persistent concernant COLMAR, il est donc recommandé de contacter les développeurs du logiciel pour obtenir des réponses. En effet, dans le passé, des réponses satisfaisantes ont été obtenues dans des délais raisonnables.

### 6.3 Illustration de la robustesse de la RMN

Comme indiqué précédemment, la RMN est reconnue pour sa robustesse. Afin de vérifier cette assertion, un échantillon identique a été soumis à une analyse par le même spectromètre (700 MHz) à deux reprises, en utilisant les mêmes paramètres. Après avoir analysé les spectres obtenus, il a été constaté qu'ils présentaient une similitude remarquable. Le résiduel obtenu en soustrayant les deux spectres analysés est quasi nul à l'exception du signal de l'eau qui n'a pas été éliminé de la même manière (Figure 72).

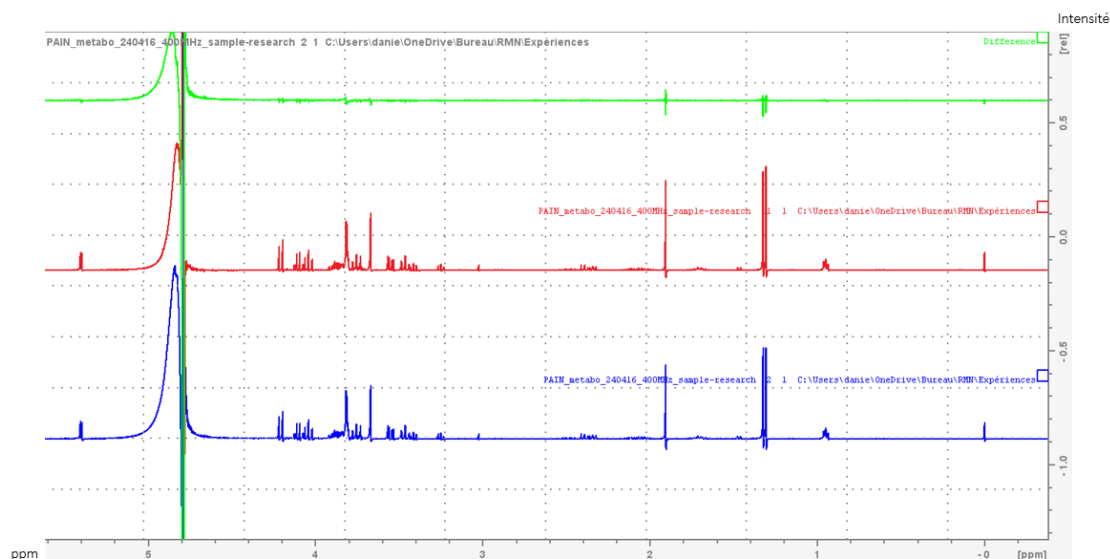


Figure 72 : Figure représentant la robustesse de la RMN. Le spectre bleu et rouge du même échantillon analysé à l'aide du même spectromètre (700 MHz), à des instants distincts, présente une superposition parfaite. Le spectre vert représente le résiduel, c'est-à-dire le spectre obtenu en soustrayant le spectre bleu et rouge.

#### 6.4 Illustration de la dégradation de l'échantillon

Les échantillons biologiques ont été reçus au cours du mois de mars et des expériences ont été immédiatement menées. Par la suite, les échantillons ont été stockés à basse température (3°C). Deux mois plus tard, ces mêmes échantillons ont de nouveau été utilisés pour de nouvelles expériences. Toutefois, il est crucial de vérifier que ces échantillons n'ont pas subi de dégradation au fil du temps. Par conséquent, une expérience similaire à celle effectuée le 13 mars 2024 a été conduite le 8 mai 2024 (Figure 73).

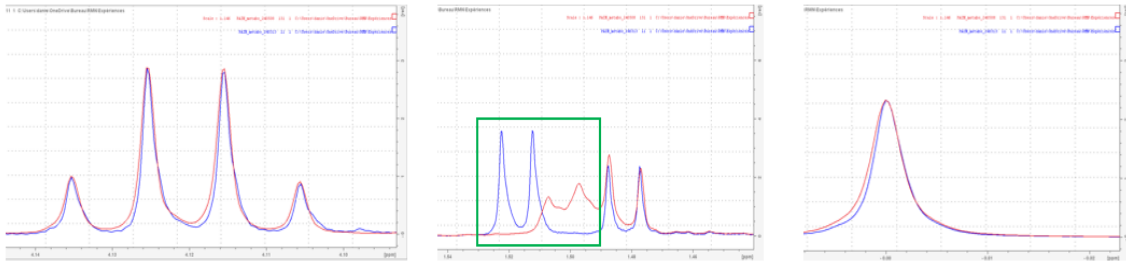


Figure 73 : Illustration de la stabilité d'un échantillon dans le temps. Le spectre rouge a été enregistré le 13 mars 2024 tandis que le bleu a été enregistré le 8 mai 2024. Les signaux de ces spectres sont similaires à certains endroits (Figure de gauche et de droite) et différents à d'autres endroits (Figure du milieu).

Les spectres obtenus présentent une superposition parfaite à des localisations spécifiques, tandis que des variations entre les deux spectres sont observées à d'autres endroits. De plus, des turbidités sont constatées dans le fond du tube (Figure 74), ce qui peut résulter d'une contamination bactérienne ou d'une détérioration de l'échantillon. Il est donc plausible que l'échantillon soit en processus de dégradation. La RMN ne détruit donc pas les échantillons mais il est important de les conserver à basse température (-20°C) de manière à les préserver.

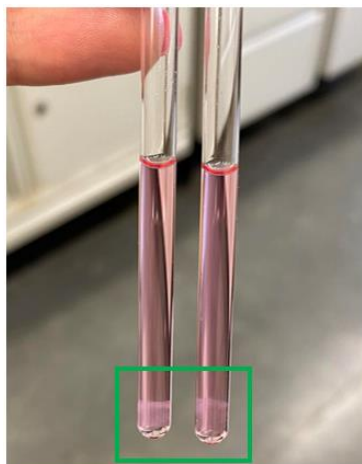


Figure 74 : Photo illustrant une turbidité de l'échantillon dans le fond du tube.

## 7. Conclusion

L'objectif de ce travail était d'évaluer la fiabilité du logiciel COLMAR dans le cadre d'études métaboliques. Deux échantillons ont été analysés : un échantillon nommé « 10 métabolites » dont la composition était connue, ainsi qu'un échantillon « biologique » contenant soit du milieu frais soit du milieu ayant été en contact avec des cellules du SNC pendant 4 jours. L'échantillon « 10 métabolites » a été utilisé pour vérifier la pertinence des résultats obtenus avec les logiciels ChenomX et COLMAR. L'analyse des échantillons « biologiques » s'est révélée plus complexe en raison de leur composition inconnue, à l'exception du DMEM.

Premièrement, COLMAR a été utilisé sur l'échantillon « 10 métabolites ». Des sessions HSQC ont été réalisées, consistant à fournir le spectre HSQC au logiciel qui a détecté certains métabolites présents dans l'échantillon. COLMAR a également détecté des métabolites absents dans l'échantillon. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que COLMAR considère certains pics comme appartenant à un métabolite alors qu'ils sont en réalité des artéfacts du pic de l'eau. Afin de corriger cette erreur, il est nécessaire d'éliminer le signal de l'eau manuellement en utilisant une expérience RMN avec une suppression du signal de l'eau par présaturation. De plus, COLMAR ne permet pas de différencier deux métabolites avec des structures chimiques similaires (Créatine et Phosphocréatine), ce qui conduit à la détection des deux métabolites alors qu'un seul était réellement présent. Des sessions COLMAR TOCSY ont alors été effectuées, constituant à fournir le spectre TOCSY au logiciel qu'il analysera de manière automatique. Les résultats de ces analyses ont révélé un grand nombre de métabolites détectés par COLMAR TOCSY mais absents dans l'échantillon étudié. Ceci peut s'expliquer par le non-respect du `matching_ratio` (le nombre de pics attribué au composé dans le spectre divisé par le nombre total de pics théoriques du composé). La valeur du `matching_ratio` a été imposée à 0,6, mais de nombreux métabolites détectés par COLMAR présentaient un `matching_ratio` inférieur à 0,6. COLMAR a détecté des métabolites même lorsque tous les signaux relatifs à ces métabolites n'étaient pas présents dans le spectre et il a également attribué un signal à un artéfact plutôt qu'à un signal réel. Afin d'optimiser la détection de composés réellement présents dans l'échantillon, il est donc conseillé de réduire au maximum le bruit, en augmentant l'intensité seuil des pics à considérer. Pour maximiser la détection des métabolites réellement présents dans l'échantillon, il est conseillé d'effectuer des sessions COLMAR HSQC, COLMAR TOCSY et de croiser les résultats obtenus car COLMAR TOCSY peut détecter des métabolites non détectés par COLMAR HSQC et inversement. Ces métabolites non détectés par COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY sont analysés par ChenomX afin de pouvoir confirmer ou non leur présence dans l'échantillon analysé.

Deuxièmement, après avoir pris connaissance du fonctionnement du logiciel COLMAR, des mélanges complexes (échantillons biologiques dans notre cas) vont pouvoir être analysés. Des sessions

COLMAR HSQC et COLMAR TOCSY doivent être réalisées sur les échantillons. Le niveau de bruit va être réduit au maximum, le signal de l'eau va être éliminé comme il a été conseillé lors de l'analyse du fonctionnement du logiciel COLMAR (analyse des résultats du tube « 10 métabolites » dans notre cas). Une analyse COLMARc va être réalisée sur les échantillons de mélange complexe, où des répliqués de l'échantillon étudié (trois échantillons provenant du milieu frais dans notre cas) vont être comparés pour identifier les composés communs. COLMARc va permettre une comparaison automatique des échantillons. En parallèle, trois sessions COLMAR HSQC vont être réalisées sur ces mêmes échantillons pour comparer les résultats entre eux. Il a été observé que COLMARc détecte les métabolites communs dans les trois échantillons, ainsi que dans deux échantillons. COLMARc a également détecté des composés présents uniquement dans un échantillon. Tous ces résultats étaient identiques à ceux obtenus par COLMAR HSQC qui ont été analysés manuellement. COLMARc a détecté des métabolites qui n'ont pas été détectés par COLMAR HSQC. Ces résultats se justifient par le fait que lors de l'étape de référencement, les spectres ont été décalés afin que les signaux des composés de références (DSS, Alanine, Leucine, Glucose, Lactate) se situent parfaitement dans les zones définies par la base de données du logiciel COLMAR. Ces décalages peuvent entraîner un déplacement des signaux en dehors de la zone définie par la base de données de COLMAR ou ces signaux peuvent être décalés mais toujours se situer dans la zone définie par la base de données de COLMAR. Ceci explique pourquoi COLMARc a détecté des métabolites dans certains échantillons mais pas dans d'autres. La composition du mélange n'étant pas connue, il est nécessaire de confirmer la présence de ces métabolites dans l'échantillon à l'aide d'analyses manuelles supplémentaires. Les corrélations H-H relatives aux signaux détectés sur le spectre HSQC doivent être présentes dans le spectre TOCSY. Ces métabolites doivent également être détectés par le logiciel ChenomX à condition que ces composés soient répertoriés dans la base de données de ChenomX. Si les métabolites détectés par COLMAR HSQC présentent des corrélations H-H dans le spectre TOCSY et que ces métabolites ont été détectés par ChenomX, alors il est fort probable que ces composés soient présents dans l'échantillon étudié.

Finalement, le logiciel COLMAR est un logiciel offrant une aide non négligeable dans la détection de métabolites présents dans un échantillon étudié, mais ses résultats ne sont pas toujours corrects. COLMAR détecte des métabolites en plus que ChenomX mais ceux-ci ne sont pas toujours réellement présents dans l'échantillon étudié. Des analyses manuelles complémentaires telles que l'observation des corrélations H-H dans le spectre TOCSY pour un signal observé sur le spectre HSQC, l'élimination du signal de l'eau et la réduction du niveau du bruit, sont nécessaires. Ces métabolites sont également analysés avec le logiciel ChenomX. La base de données de COLMAR et de ChenomX étant différentes, tous les métabolites ne peuvent pas être détectés. Certains métabolites sensibles aux variations de pH telles que l'Histidine ou encore la Tyramine non détectés par les logiciels pourraient provenir du fait que



les bases de données de COLMAR et de ChenomX ont été conçues à pH de 7,4. Si le pH des échantillons analysés était différent, les signaux des spectres ne se trouvaient pas dans les zones définies par les bases de données. ChenomX est actuellement le logiciel principal utilisé pour l'attribution de métabolites dans un mélange. Ce logiciel est purement manuel et fait donc intervenir un biais humain. Il serait donc préférable d'utiliser COLMAR qui lui est un logiciel automatique. Actuellement, l'utilisation de COLMAR seul dans l'analyse d'un mélange complexe n'est pas possible en raison du grand nombre de métabolites faux-positifs qu'il détecte.

## 8. Bibliographie

- Araki, K., Araki, M., & Yamamura, K.-I. (2002). *Site-directed integration of the cre gene mediated by Cre recombinase using a combination of mutant lox sites*. <https://academic.oup.com/nar/article/30/19/e103/2376105>
- Beckers, P., Lara, O., Belo do Nascimento, I., Desmet, N., Massie, A., & Hermans, E. (2022). Validation of a System xc<sup>-</sup> Functional Assay in Cultured Astrocytes and Nervous Tissue Samples. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.815771>
- Bingol, K. (2018). Recent advances in targeted and untargeted metabolomics by NMR and MS/NMR methods. In *High-Throughput* (Vol. 7, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ht7020009>
- Bingol, K., Bruschweiler-Li, L., Yu, C., Somogyi, A., Zhang, F., & Bruschweiler, R. (2015). Metabolomics beyond Spectroscopic Databases: A Combined MS/NMR Strategy for the Rapid Identification of New Metabolites in Complex Mixtures. *Analytical Chemistry*, 87(7), 3864–3870. <https://doi.org/10.1021/ac504633z>
- Bingol, K., Li, D. W., Bruschweiler-Li, L., Cabrera, O. A., Megraw, T., Zhang, F., & Bruschweiler, R. (2015). Unified and isomer-specific NMR metabolomics database for the accurate analysis of 13C-1H HSQC spectra. *ACS Chemical Biology*, 10(2), 452–459. <https://doi.org/10.1021/cb5006382>
- Bingol, K., Li, D. W., Zhang, B., & Bruschweiler, R. (2016). Comprehensive metabolite identification strategy using multiple two-dimensional NMR spectra of a complex mixture implemented in the COLMARm web server. *Analytical Chemistry*, 88(24), 12411–12418. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03724>
- Canlet, C., Shintu, L. L., & Elena-Herrmann, B. B. (2012). *NMR metabolomic approaches for plants, toxicology and medicine*. <https://hal.science/hal-00939569>
- Charlier, M (2023). Implication du système Xc<sup>-</sup> dans un contexte de douleurs chroniques d'origine inflammatoire (Mémoire de master en sciences biomédicales, Université Catholique de Louvain).
- Dumez, J. N. (2022). NMR methods for the analysis of mixtures. *Chemical Communications*, 58(100), 13855–13872. <https://doi.org/10.1039/d2cc05053f>
- Finehout, E. J., & Lee, K. H. (2004). An Introduction to Mass Spectrometry Applications in Biological Research. In *Biochemistry and Molecular Biology Education* (Vol. 32, Issue 2, pp. 93–100). <https://doi.org/10.1002/bmb.2004.494032020331>
- Gebretsadik, T. ; Linert, W. ; Thomas, M. ; Berhanu, T. ; Frew, R. LC-RMN pour l'analyse des produits naturels : un voyage d'une curiosité académique à un outil analytique robuste. *Sci* 2021, 3, 6.
- Goldberg, D. S., & McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-770>
- Gołowicz, D., Kasprzak, P., Orekhov, V., & Kazimierczuk, K. (2020). Fast time-resolved NMR with non-uniform sampling. In *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (Vol. 116, pp. 40–55). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2019.09.003>

- Guenneq, A. Le, Giraudeau, P., & Caldarelli, S. (2014a). Evaluation of fast 2D NMR for metabolomics. *Analytical Chemistry*, *86*(12), 5946–5954. <https://doi.org/10.1021/ac500966e>
- Guenneq, A. Le, Giraudeau, P., & Caldarelli, S. (2014b). Evaluation of fast 2D NMR for metabolomics. *Analytical Chemistry*, *86*(12), 5946–5954. <https://doi.org/10.1021/ac500966e>
- Harvey, A., Edrada-Ebel, R. et Quinn, R. La réémergence des produits naturels pour la découverte de médicaments à l'ère de la génomique. *Nat Rev Drug Discov* *14*, 111 à 129 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrd4510>
- Holland, D. J., Bostock, M. J., Gladden, L. F., & Nietlispach, D. (2011). Fast multidimensional NMR spectroscopy using compressed sensing. *Angewandte Chemie - International Edition*, *50*(29), 6548–6551. <https://doi.org/10.1002/anie.201100440>
- Jung, Y. S., Hyeon, J. S., & Hwang, G. S. (2016). Software-assisted serum metabolite quantification using NMR. *Analytica Chimica Acta*, *934*, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.054>
- Kaklamanos, G., Aprea, E., & Theodoridis, G. (2020). Mass spectrometry: principles and instrumentation. In *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications, Second Edition* (pp. 525–552). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813266-1.00011-5>
- Kazimierczuk, K., & Orekhov, V. Y. (2011). Accelerated NMR spectroscopy by using compressed sensing. *Angewandte Chemie - International Edition*, *50*(24), 5556–5559. <https://doi.org/10.1002/anie.201100370>
- Kolkman, M (2023). Implementation and limits of fast 2D-NMR techniques : Ultrafast and Non-Uniform Sampling (Mémoire de master en sciences chimiques, Université de Liège).
- Kupče, Ě., & Claridge, T. D. W. (2017). NOAH: NMR Supersequences for Small Molecule Analysis and Structure Elucidation. *Angewandte Chemie*, *129*(39), 11941–11945. <https://doi.org/10.1002/ange.201705506>
- Kupče, E., & Freeman, R. (2007). Fast multidimensional NMR by polarization sharing. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *45*(1), 2–4. <https://doi.org/10.1002/mrc.1931>
- Leban, M. (2013). Apport des techniques de chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse tandem aux dosages des stéroïdes. In *Medecine Nucleaire* (Vol. 37, Issue 1, pp. 8–13). <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2012.12.001>
- Letertre, M. P. M., Dervilly, G., & Giraudeau, P. (2021). Combined Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry Approaches for Metabolomics. In *Analytical Chemistry* (Vol. 93, Issue 1, pp. 500–518). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04371>
- Lewerenz, J., Maher, P., & Methner, A. (2012). Regulation of xCT expression and system x c- function in neuronal cells. *Amino Acids*, *42*(1), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0862-x>
- Li, D. W., Leggett, A., Bruschweiler-Li, L., & Bruschweiler, R. (2022). COLMARq: A Web Server for 2D NMR Peak Picking and Quantitative Comparative Analysis of Cohorts of Metabolomics Samples. *Analytical Chemistry*, *94*(24), 8674–8682. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00891>

- Marchand, J., Martineau, E., Guitton, Y., Dervilly-Pinel, G., & Giraudeau, P. (2017). Multidimensional NMR approaches towards highly resolved, sensitive and high-throughput quantitative metabolomics. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 43, pp. 49–55). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.004>
- Marshall, D. D., & Powers, R. (2017). Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. In *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (Vol. 100, pp. 1–16). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.01.001>
- Martineau, E., Akoka, S., Boisseau, R., Delanoue, B., & Giraudeau, P. (2013). Fast quantitative <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C two-dimensional NMR with very high precision. *Analytical Chemistry*, 85(9), 4777–4783. <https://doi.org/10.1021/ac4005309>
- Martineau, E., Dumez, J. N., & Giraudeau, P. (2020). Fast quantitative 2D NMR for metabolomics and lipidomics: A tutorial. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 58(5), 390–403. <https://doi.org/10.1002/mrc.4899>
- Motiram-Corral, K., Pérez-Trujillo, M., Nolis, P., & Parella, T. (2018). Implementing one-shot multiple-FID acquisition into homonuclear and heteronuclear NMR experiments. *Chemical Communications*, 54(96), 13507–13510. <https://doi.org/10.1039/c8cc08065h>
- Reo, N. V. (2002). NMR-based metabolomics. *Drug and Chemical Toxicology*, 25(4), 375–382. <https://doi.org/10.1081/DCT-120014789>
- Roessner, U., & Bowne, J. (2009). What is metabolomics all about? In *BioTechniques* (Vol. 46, Issue 5 SPEC. ISSUE, pp. 363–365). <https://doi.org/10.2144/000113133>
- Roumes, H., Pellerin, L., & Bouzier-Sore, A. K. (2020). Neuroprotective role of lactate in neonatal hypoxia-ischemia. *Medecine/Sciences*, 36(11), 973–976. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020179>
- Schlippenbach, T. Von, Oefner, P. J., & Gronwald, W. (2018). Systematic Evaluation of Non-Uniform Sampling Parameters in the Targeted Analysis of Urine Metabolites by <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H 2D NMR Spectroscopy. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22541-0>
- Schulze-Sünninghausen, D., Becker, J., & Luy, B. (2014). Rapid heteronuclear single quantum correlation NMR spectra at natural abundance. *Journal of the American Chemical Society*, 136(4), 1242–1245. <https://doi.org/10.1021/ja411588d>
- Świeboda, P., Filip, R., Prystupa, A., & Drozd, M. (2013). Assessment of pain: types, mechanism and treatment. In *Ann Agric Environ Med* (Vol. 1). [www.aaem.pl](http://www.aaem.pl)
- Taffet, S. L., & Das, K. M. (1983). *Sulfasalazine Adverse Effects and Desensitization*.
- Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B. H., ... Wang, S. J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. In *Pain* (Vol. 156, Issue 6, pp. 1003–1007). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000160>
- Van Der Hooft, J. J. J., De Vos, R. C. H., Mihaleva, V., Bino, R. J., Ridder, L., De Roo, N., Jacobs, D. M., Van Duynhoven, J. P. M., & Vervoort, J. (2012). Structural elucidation and quantification of phenolic

conjugates present in human urine after tea intake. *Analytical Chemistry*, 84(16), 7263–7271. <https://doi.org/10.1021/ac3017339>

van Rijswijk, S. M., van Beek, M. H. C. T., Schoof, G. M., Schene, A. H., Steegers, M., & Schellekens, A. F. (2019). Iatrogenic opioid use disorder, chronic pain and psychiatric comorbidity: A systematic review. In *General Hospital Psychiatry* (Vol. 59, pp. 37–50). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsy.2019.04.008>

Wishart, D. S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.001>

Wishart, D. S., Cheng, L. L., Copié, V., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Hoch, J. C., Gouveia, G. J., Pathmasiri, W., Powers, R., Schock, T. B., Sumner, L. W., & Uchimiya, M. (2022). NMR and Metabolomics—A Roadmap for the Future. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12080678>

Worley, B., & Powers, R. (2015). Generalized adaptive intelligent binning of multiway data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 146, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.05.005>

## 9. Annexes


### 9.1 Tableau de synthèse du fonctionnement du logiciel COLMAR.

	Session TOCSY	Session HSQC	COLMARq
Téléchargement des spectres	Spectre TOCSY (.txt) Opt : + HSQC et/ou HSQC-TOCSY	Spectre HSQC(.txt) Opt : + TOCSY et/ou HSQC-TOCSY	Spectre HSQC(.txt) Opt : + TOCSY Ou sessions COLMARm
Détermination des pics	Peak picking + Peak fitting NB : attention au threshold NB: suppression manuelle des pics	Peak picking + Peak fitting NB : attention au threshold NB: suppression manuelle des pics	<b>Par cohorte!!</b> Peak matching (peak picking et fitting) => suivi au cours des spectres ? Analyse statistique basée sur les pics Test PCA sur les pics matchés
Référencage, Calibration des axes	<b>Optionnel</b> Définir les références Définir un nombre minimum de pics Calculer et appliquer le shift	<b>Optionnel</b> Définir les références Définir un nombre minimum de pics Calculer et appliquer le shift	/
Recherche dans la base de données	Définition $\Delta \delta$ ( <b>0.03</b> ) Définition d'un cutoff de « matching ratio » ( <b>0.6</b> ) Définition de la base de données à utiliser ( $H_2O$ , $CDCl_3$ ou maximum)	Définition $\Delta \delta$ ( <b>0.04 <math>^1H</math> et 0.3 <math>^{13}C</math></b> ) Définition d'un cutoff de « matching ratio » ( <b>0.6</b> ) Définition de la base de données à utiliser ( $H_2O$ ou $CDCl_3$ )	Définition $\Delta \delta$ ( <b>0.04 <math>^1H</math> et 0.4 <math>^{13}C</math></b> ) Définition d'un cutoff de « matching ratio » ( <b>0.6</b> ) Analyse statistique basée sur les composés détectés

Figure 75 : Tableau résumant les procédures réalisées par le logiciel COLMAR afin de générer une liste de composés détectés dans l'échantillon étudié. Les différentes étapes (téléchargement des spectres, détermination des pics, référencage/calibration des axes, recherche dans la base de données) sont communes à toutes les sessions COLMAR (TOCSY, HSQC ou COLMARc) mais ne se réalisent pas de la même manière.

## 9.2 Design du logiciel COLMAR

### 9.2.1 Sessions HSQC

 [General overview video of COLMAR suite of web servers](#)

**STEP 1: Spectra processing**  
Your name and institute\*: user  
HSQC spectrum file (required): Choisir un fichier | Aucun fichier n'a été sélectionné  
TOCSY spectrum file (optional): Choisir un fichier | Aucun fichier n'a été sélectionné  
HSQC-TOCSY spectrum file (optional): Choisir un fichier | Aucun fichier n'a été sélectionné  
User chosen experimental name (optional): noname  
(Notice: spectra files can be nmrpipe (.f2), sparky (.ucsf), Topspin ASCII format (.txt) or Mnova (.csv) format. The server uses the file extension to distinguish file formats!  
 I agree to [terms and conditions](#).

**STEP2: Peak picking and peak fitting**  
Choose peak picking method:  
 Classical  Deep Picker model 2  Deep Picker model 1  
 Deep Picker model 2, after auto PPP adjustment  
Minimal peak height cutoff as times of noise-level: 5.5  
  
Peak fitting is recommended only if compound quantification is planned. It may take up to several hours for a complex spectrum  
Choose peak line shape in peak fitting:  
 Gaussian  Voigt  
Minimal peak height cutoff as times of noise-level: 5.5

**STEP3(optional): Spectral referencing**  
Choose solvent:  water or  chloroform.  
Choose compounds as references:  
 DSS  Alanine  Leucine  Glucose  Lactic Acid  
The server automatically  the reference correction by matching the peaks patterns of selected known compounds against experimental peaks. In this process, match at least 20 out of 20 known peaks.  
 <sup>1</sup>H: 0.00 <sup>13</sup>C: 0.00

**STEP 4: Database query with spectral matching using chemical shift difference cutoffs:**  
<sup>1</sup>H chemical shift cutoff (ppm): 0.04, <sup>13</sup>C chemical shift cutoff (ppm): 0.3, Matching ratio cutoff: 0.6  
Database selection:  
 Hydrophilic metabolite database in water solvent  
 Hydrophobic and lipids metabolite database in organic chloroform solvent  
Query algorithm:  
 Simple, match peak position only  
 Advanced, also require similar peak heights of all matched peaks  
 data for database query and display.

**Load previous session:**  
You previous session id:

Figure 76 : Figure représentant l'interface de COLMAR lors de la réalisation d'une session HSQC. Les quatre étapes requises pour générer une liste de composés détectés par COLMAR sont le téléchargement des spectres (étape 1), la détermination des pics (étape 2), le référencement/calibration des axes (étape 3), la recherche dans la base de données (étape 4). Une session COLMAR HSQC précédemment réalisée peut être revisualisée grâce au code fourni automatiquement lorsqu'une session est réalisée.

### 9.2.2 Session TOCSY

**STEP1: spectra processing:**  
Your name and institute\*: user  
TOCSY spectrum file (required): Choisir un fichier | Aucun fichier n'a été sélectionné  
HSQC spectrum file (optional): Choisir un fichier | Aucun fichier n'a été sélectionné  
(Notice: spectra files can be nmrpipe (.f2), sparky (.ucsf), Topspin ASCII format (.txt) or Mnova (.csv) format. The server use file extension to distinguish file format  
User chosen experimental name (optional): noname

**STEP2: Peak picking and peak fitting**  
Choose peak picking method:  
 Classical  Deep Picker model 2  Deep Picker model 1  
Minimal peak height cutoff as times of noise-level: 5.5  
  
Peak fitting is recommended only if compound quantification is planned.  
Choose peak line shape in peak fitting:  
 Gaussian  Voigt  
Minimal peak height cutoff as times of noise-level: 5.5

**STEP3(optional): Spectral referencing**  
The server can calculate the reference correction by matching the peaks patterns of selected known compounds against experimental peaks automatically. Please first choose solvent type, followed by referencing compounds.  
Choose solvent type:  
 water or  chloroform.  
Choose compounds as references:  
 DSS  Alanine  Leucine  Glucose  Lactic Acid  
Minimal number of matched peaks: 10  
Total number of selected peaks: 40  
  
 <sup>1</sup>H: 0.00 <sup>13</sup>C: 0.00

**STEP4 Database query and match:**  
<sup>1</sup>H chemical shift cutoff in ppm: 0.03  
Matching ratio cutoff: 0.6  
Maximal clique algorithm peak alignment match cutoff in ppm: 0.005  
Maximal clique algorithm symmetric peak match cutoff in ppm: 0.01  
Maximal clique algorithm near-diagonal peak exclusion cutoff in ppm: 0.05  
Matching method:  
 Direct matching  clique matching  
Database selection:  
 aqueous  organic database  max clique analysis

**Load previous session:**  
You previous session id:  example

Figure 77 : Figure représentant l'interface de COLMAR lors de la réalisation d'une session TOCSY. Les quatre étapes requises pour générer une liste de composés détectés par COLMAR sont le téléchargement des spectres (étape 1), la détermination des pics (étape 2), le référencement/calibration des axes (étape 3), la recherche dans la base de données (étape 4). Une session COLMAR TOCSY précédemment réalisée peut être revisualisée grâce au code fourni automatiquement lorsqu'une session est réalisée.

### 9.2.3 COLMARq

**Load previous session:** Your previous COLMARq session id

**STEP 1: load set of spectra**

Your name and institute:

I agree to [terms and conditions](#)

Option 1. Load previously COLMARm sessions:

Option 2. Directly upload HSQC and (optional TOCSY) spectra for processing:

HSQC: Choisir un fichier / Aucun fichier n'a été sélectionné TOCSY: Choisir un fichier / Aucun fichier n'a été sélectionné

Name:

**STEP 2: Global peak matching and analysis**

**Global peak matching of all spectra:**

Choose peak picking method and peak fitting parameters (the web server will run peak picking and fitting if not done yet):

Peak picking method:  Classical  DEEP model 2

DEEP model 2 after auto PPP adjustment

Peak fitting line shape:  Gaussian  Voigt

Minimal peak height cutoff:  times noise level

Max round in peak fitting:

Combine multiplets?

**Peak-based statistical analysis:**

With normalization?

Use spectrum  as standard

Exclude peaks with volumes below  times the default detection limit (= 5.5 \* noise\_level \* effective\_width).

Use only peaks with matching confidence better than

Exclude any peak that is missing in  or more spectra.

Use mean volume ratio of median  % ratios as normalization factor

Set peak volume detection limit to

\*noise\_level \* effective\_peak\_width

**Database query:**

<sup>13</sup>C chemical shift cutoff (ppm):

<sup>1</sup>H chemical shift cutoff (ppm):

Matching ratio cutoff:

include peak height information?

**Compound based statistical analysis**

**Peak based PCA analysis:**

Peak matching reliability cutoff:

Standardize input peak volumes?

Normalize peak Volume?

Fill below detection limit volume?

Figure 78 : Figure représentant l'interface de COLMARc. Les étapes requises pour générer une liste de composés communs détectés par COLMAR ainsi que pour déterminer leur concentration implique le téléchargement des spectres selon deux options. La première option permet l'intégration des sessions HSQC dans COLMARc, tandis que la seconde option consiste à entrer directement les spectres (étape 1). Ensuite, l'alignement des pics de tous les spectres, l'analyse statistique basée sur les pics, la recherche dans la base de données, l'analyse statistique basée sur les composés et l'analyse PCA basée sur le pic sont effectués (étape 2).

### 9.3 Design du logiciel ChenomX

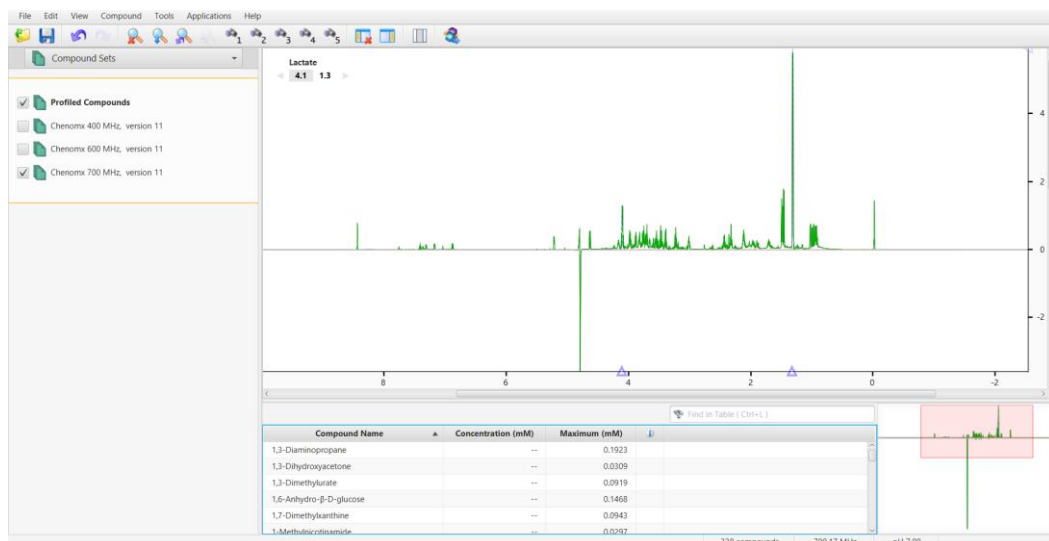


Figure 79 : Figure représentant l'interface du logiciel ChenomX comprenant le spectre à analyser et les métabolites de la base de données.

## 9.4 Spectres acquis à partir de l'échantillon de milieu frais

### 9.4.1 Spectre 1D $^1\text{H}$

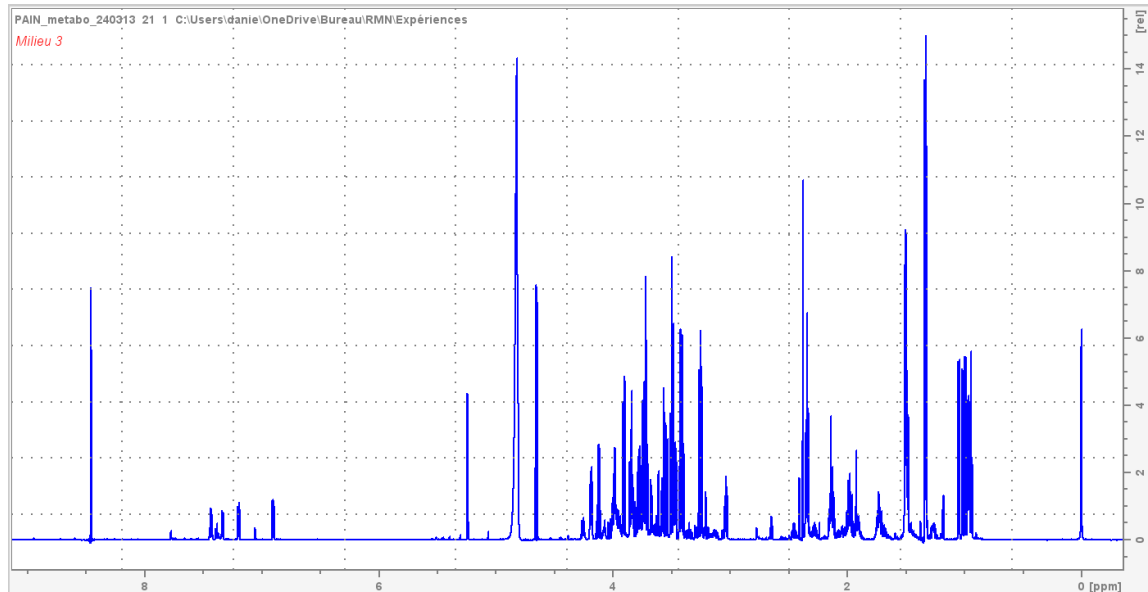


Figure 80 : Figure représentant le spectre 1D  $^1\text{H}$  de l'échantillon de milieu frais.

### 9.4.2 Spectre 2D HSQC

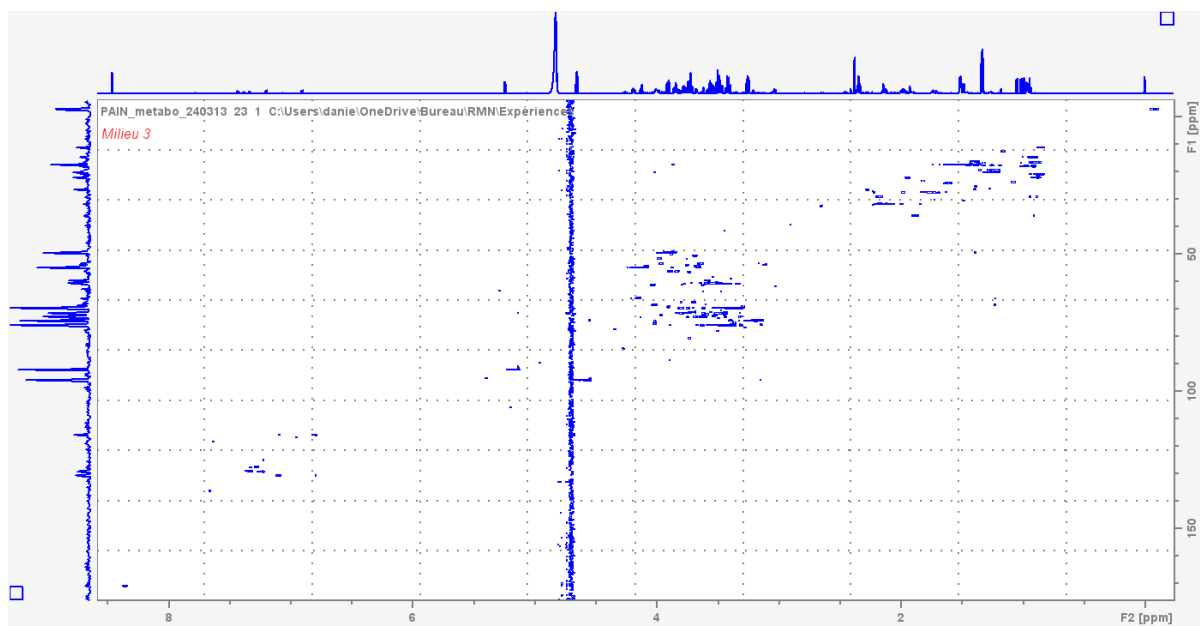


Figure 81 : Figure représentant le spectre HSQC de l'échantillon de milieu frais.



### 9.4.3 Spectre 2D TOCSY

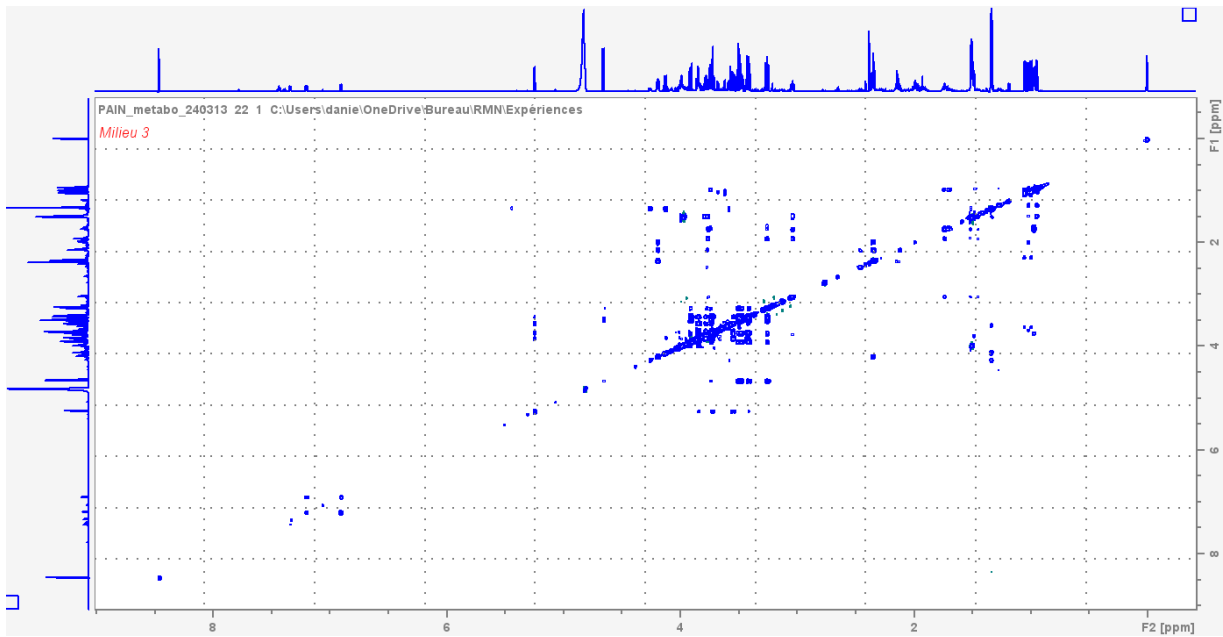


Figure 82 : Figure représentant le spectre TOCSY de l'échantillon de milieu frais.

## 9.5 Spectres acquis à partir de l'échantillon de milieu conditionné

### 9.5.1 Spectre 1D <sup>1</sup>H

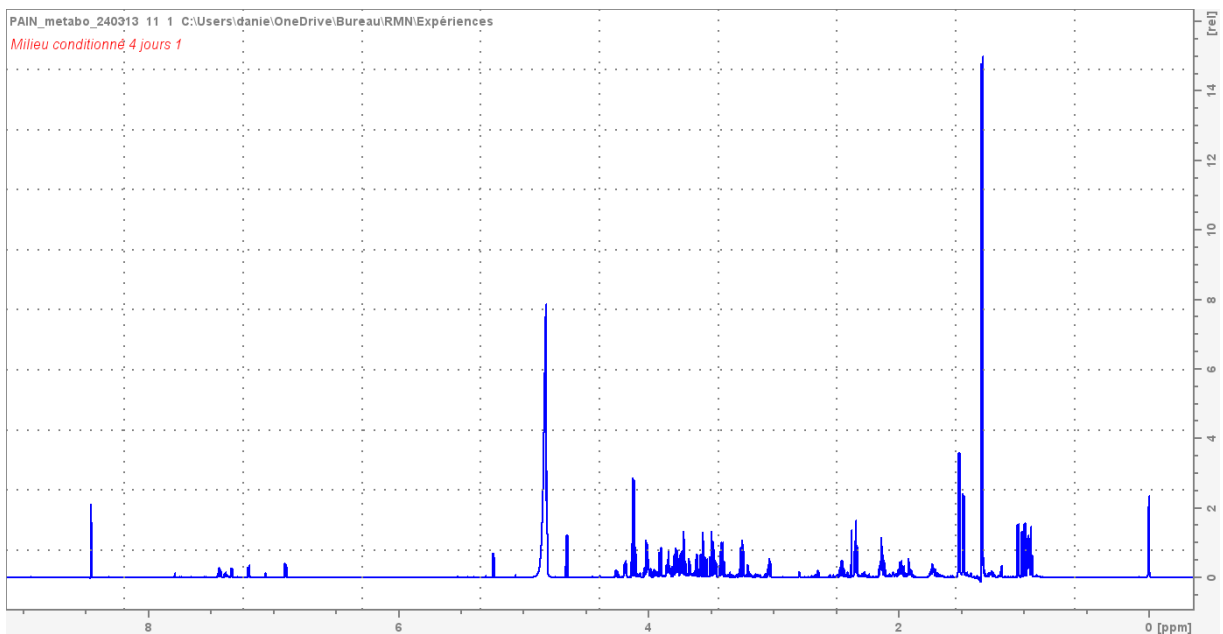


Figure 83 : Figure représentant le spectre 1D <sup>1</sup>H de l'échantillon de milieu conditionné.

### 9.5.2 Spectre HSQC

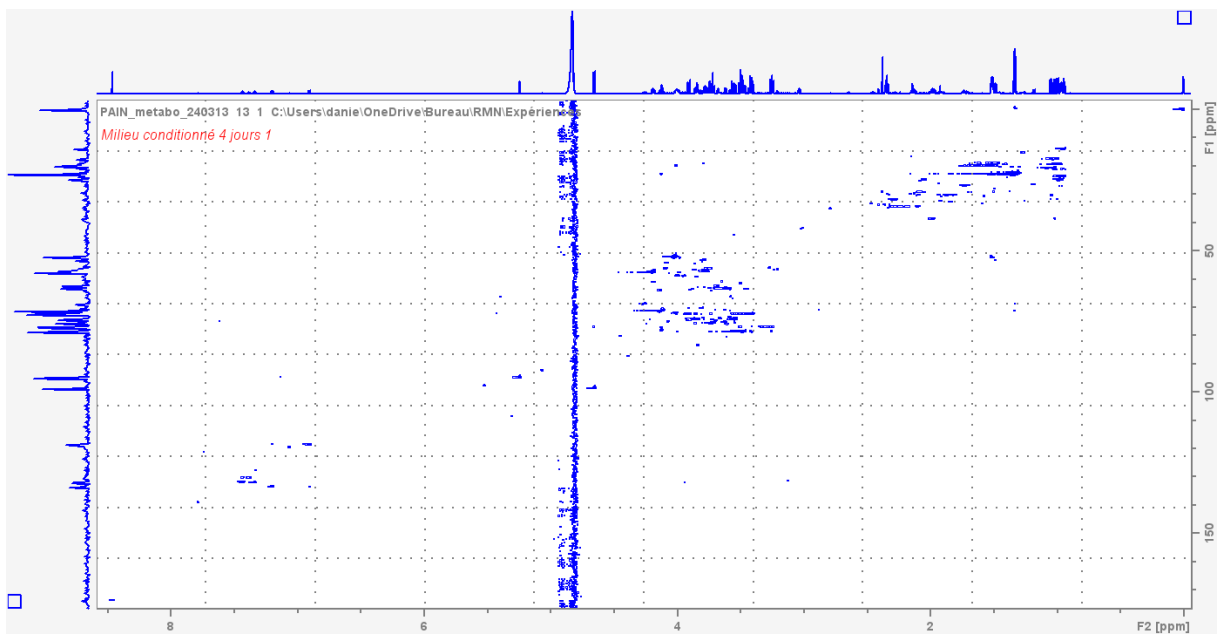


Figure 84 : Spectre de RMN 2D HSQC d'un échantillon de DMEM dans lequel des astrocytes ont mûri pendant quatre jours, enregistré à 700 MHz.

### 9.5.3 Spectre TOCSY

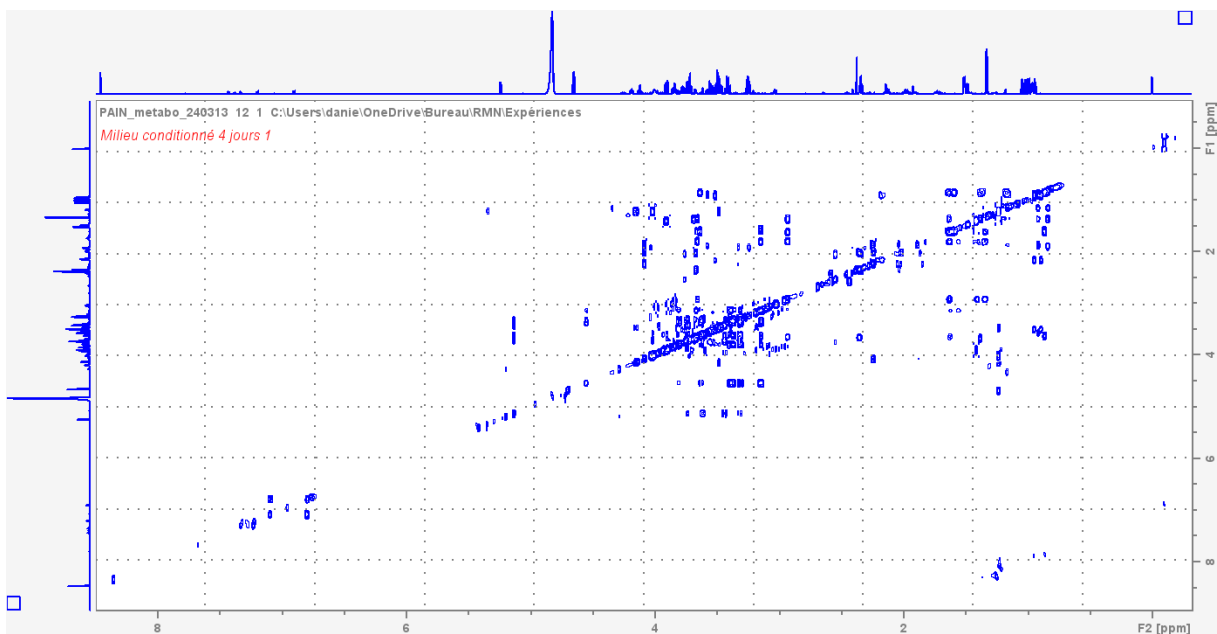


Figure 85 : Spectre de RMN 2D TOCSY d'un échantillon de DMEM dans lequel des astrocytes ont mûri pendant quatre jours, enregistré à 700 MHz.

## 9.6 Tableau des concentrations normalisées par le Formate

Concentrations dans l'échantillon						
Composés	Concentrations 1 <sup>er</sup> échantillon milieu frais (mM)	Concentrations 2 <sup>ème</sup> échantillon milieu frais (mM)	Concentrations 3 <sup>ème</sup> échantillon milieu frais (mM)	Concentrations 1 <sup>er</sup> échantillon milieu conditionné (mM)	Concentrations 2 <sup>ème</sup> échantillon milieu conditionné (mM)	Concentrations 3 <sup>ème</sup> échantillon milieu conditionné 4J3 (mM)
Acétate	0,1132	0,1051	0,1038	0,0791	0,0848	0,0759
Acétone	0,0179	0,0159	0,0161	0,0101	0,0113	0,0105
Alanine	0,2854	0,2562	0,2705	0,5664	0,6064	0,5707
Arginine	0,2166	0,2293	0,2093	0,2816	0,2608	0,2739
Bétaïne	0,0113	0,0101	0,0099	0,0125	0,0122	0,0121
Choline	0,0256	0,0225	0,0229	0,0231	0,0274	0,0252
Créatine	0,0163	0,0146	0,0143	0,0180	0,0175	0,0175
Cystine	0,0483	0,0432	0,0450	0,0531	0,0518	0,0517
Ethanol	0,0414	0,0332	0,0326	0,0408	0,0398	0,0397
Fructose	0,3392	0,2572	0,2911	0,3159	0,3083	0,3072
Glucose	3,4629	3,3659	3,4533	1,9132	2,9876	1,8853
Glutamate	1,5891	1,3875	1,4585	1,2047	1,4075	1,3933
Glutamine	0,2123	0,2069	0,2353	0,6202	0,5780	0,5713
Glycine	0,2459	0,2140	0,2917	0,2628	0,2564	0,2556
Isoleucine	0,5060	0,4675	0,5030	0,4046	0,4866	0,4178
Lactate	1,1055	0,9888	1,0023	3,5509	2,2883	3,4531
Leucine	0,5016	0,4389	0,4078	0,4071	0,4374	0,4106
Lysine	0,4491	0,4337	0,4195	0,4030	0,4465	0,4136
Méthionine	0,1232	0,1274	0,1281	0,1206	0,1335	0,1205
Myo-Inositol	0,0942	0,0706	0,1054	0,0867	0,0846	0,0843
Niacinamide	0,0222	0,0204	0,0229	0,0210	0,0227	0,0183
Pantothénate	0,0102	0,0100	0,0098	0,0123	0,0120	0,0120
Phénylalanine	0,2039	0,2010	0,1990	0,2035	0,2151	0,1965
Proline	0,3122	0,2851	0,2898	0,2963	0,2968	0,3086
Pyruvate	0,5345	0,4412	0,4805	0,2045	0,3339	0,2301
Serine	0,1997	0,2331	0,2464	0,2338	0,2210	0,1851
Succinate	0,0528	0,0468	0,0490	0,0148	0,0196	0,0147
Thréonine	0,3047	0,4378	0,4915	0,4762	0,4198	0,2960
Tryptophane	0,0306	0,0276	0,0270	0,0282	0,0299	0,0284
Tyrosine	0,2401	0,2774	0,2706	0,2639	0,2807	0,2626
Valine	0,5334	0,5238	0,5271	0,5049	0,5639	0,4910

Figure 86 : Tableau de concentrations des métabolites présents dans les milieux frais et conditionnés. La première colonne représente les composés présents dans les milieux frais et conditionnés. Les six autres colonnes représentent la concentration de chaque métabolite présent dans les échantillons analysés.