



HAL
open science

Principes et contributions de la mise en réseau moléculaire en toxicologie clinique et médico-légale]

Romain Pelletier, Brendan Le Daré, Alexis Bourdais, Isabelle Morel, Thomas
Gicquel

► To cite this version:

Romain Pelletier, Brendan Le Daré, Alexis Bourdais, Isabelle Morel, Thomas Gicquel. Principes et contributions de la mise en réseau moléculaire en toxicologie clinique et médico-légale]. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 2023, 35 (3), pp.225-234. 10.1016/j.toxac.2023.05.002 . hal-04195410

HAL Id: hal-04195410

<https://hal.science/hal-04195410>

Submitted on 8 Sep 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Principles and contributions of molecular networking in clinical and forensic toxicology

Romain Pelletier^{a,b}, Brendan Le Daré^{a,c}, Alexis Bourdais^a, Isabelle Morel^{a,b}, Thomas Gicquel^{a,b}

^a: INSERM, Univ Rennes, INRAE, Institut NUMECAN (Nutrition, Métabolismes et Cancer) UMR_A 1341, UMR_S 1241, F-35000, Rennes, France

^b: Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Laboratoire de toxicologie biologique et medico-légale, F-35033 Rennes, France

^c: Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Pharmacie à Usage Intérieur, F-35033 Rennes, France

* Correspondence to:

Romain Pelletier, PharmD, PhD student

romain.pelletier@chu-rennes.fr

Authors' ORCID :

Romain Pelletier: 0000-0002-3848-507X

Brendan Le Daré: 0000-0002-5907-2450

Thomas Gicquel: 0000-0002-2354-1884

Isabelle Morel: 0000-0001-7160-968X

Résumé

La spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) a constitué une grande avancée pour la toxicologie analytique, permettant l'acquisition d'un grand nombre de données avec une grande précision. Cependant le retraitement bio-informatique de ces données est parfois limitant et verrouillé par le logiciel commercial du fournisseur. La construction d'un réseau moléculaire fait appel à des outils bio-informatiques permettant le retraitement des données de spectrométrie de masse à l'aide de logiciels en accès libre et de regrouper de manière visuelle les molécules structurellement proches au sein d'échantillons. A partir des données brutes acquises par HRMS, plusieurs outils permettent ainsi de filtrer puis retraiter ces données enfin d'être lues sur un logiciel graphique. Au-delà de l'annotation facilitée de composés connus au sein d'un échantillon complexe, cette méthodologie permet également d'identifier de nouveaux métabolites de xénobiotiques, ouvrant de nombreuses perspectives en toxicologie clinique et médico-légale. Nous présentons ici la méthodologie à adopter pour la réalisation de réseaux moléculaires ainsi que son apport en toxicologie hospitalière.

Mots-clés : réseau moléculaire, LC-HRMS, toxicologie, métabolisme, NPS

Abstract

High resolution mass spectrometry (HRMS) has been a great advance for analytical toxicology, allowing the acquisition of massive data with high accuracy. However, the bioinformatic reprocessing of these data is sometimes limiting and locked by commercial's software. The construction of a molecular network calls upon bioinformatics tools allowing the reprocessing of mass spectrometry data with open access software and the visual grouping of structurally closed molecules within samples. From the raw data acquired by HRMS, several tools allow to filter and reprocess these data to be read on a graphic software. Beyond the easy annotation of known compounds within a complex sample, this methodology also allows the identification of new metabolites of xenobiotics, opening many perspectives in clinical and forensic toxicology. We present here the methodology to adopt for the realization of molecular networks as well as its contribution in clinical toxicology.

Keywords: molecular networking, LC-HRMS, toxicology, drug metabolism, NPS.

1. Introduction

La spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) est un outil grandissant dans les laboratoires d'analyses médicales. Bien qu'initialement apparue dans les années 1960 dans les laboratoires de chimie [1], cet outil est devenu une technologie de choix pour la toxicologie analytique du fait de l'augmentation progressive de sa précision et de sa sensibilité [2]. A ce jour, les laboratoires de toxicologie constituent ses premiers utilisateurs en biologie médicale, où son usage est devenu conventionnel [3].

La HRMS correspond à l'analyse par spectrométrie de masse à l'aide de matériel de haute résolution, tel qu'un appareil à technologie temps de vol (ou « time of flight » (TOF)) ou à technologie Orbitrap® [2,4]. Afin d'augmenter d'avantage la spécificité des méthodes de détection et par conséquent le niveau de preuve d'identification de composés, des méthodes séparatives couplées à la HRMS comme la chromatographie en phase liquide (LC) ou en phase gazeuse (GC) ont été développées. Ainsi, le couplage LC-HRMS constitue un outil performant de référence en toxicologie analytique permettant l'identification des composés de façon ciblée ou non [5,6].

L'analyse non ciblée d'un échantillon complexe par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution avec fragmentation (LC-HRMS/MS) génère de très nombreuses données. En effet, outre le fait que chaque molécule entrant dans le spectromètre de masse est détectée en haute résolution, cette dernière peut également être fragmentée, conduisant à la détection supplémentaire de ses fragments en haute résolution [7].

Le retraitement des données complexes acquises par ces technologies constitue un levier majeur dans l'interprétation des résultats dans un contexte de rendu de résultats ayant un impact clinique ou médico-légal. Les logiciels fournisseurs permettent dans la plupart des cas un retraitement des données fiables et plutôt facile d'usage par les utilisateurs. Cependant, ces logiciels ne permettent qu'un usage restreint des données, parfois insuffisant lors de cas complexes. Le développement de méthodes bio-informatiques s'est récemment présenté comme une alternative robuste permettant d'exploiter et de retraiter au mieux les données analytiques acquises.

Le réseau moléculaire, ou molecular networking (MN), est un outil bio-informatique permettant d'apparier graphiquement sous forme de cluster les molécules structurellement proches au sein d'un échantillon analysé par spectrométrie de masse en tandem. Le MN représente ainsi visuellement l'appariement spectral et donc structural de composés à partir de données de screening non ciblé. A l'origine développé dans le domaine de la chimie des molécules d'origine naturelle, cet outil voit son application s'étendre au domaine de la toxicologie, et inclut à ce jour l'étude du métabolisme de xénobiotiques, l'analyse de poudres, ou encore les comparaisons qualitatives et semi-quantitatives de composés présents dans plusieurs échantillons, qu'ils soient biologiques ou non [8].

L'objectif de cet article est de détailler une méthodologie employée permettant de retraiter les données complexes acquises par spectrométrie de masse haute résolution à l'aide du MN.

2. Méthodologie

Nous utilisons plusieurs étapes nécessaires à la réalisation d'un réseau moléculaire, présentées en Figure 1. Tout d'abord, les échantillons (biologiques ou non) sont extraits, séparés chromatographiquement et analysés en spectrométrie de masse (technologie Orbitrap® ou Q-TOF®). Différents logiciels permettent ensuite d'exploiter et de filtrer les données qui seront transférées sur la plateforme Global Natural Products Social Networking (GNPS), à l'origine du MN. Enfin, une étape de retraitement graphique du MN est réalisée par le logiciel Cytoscape®.

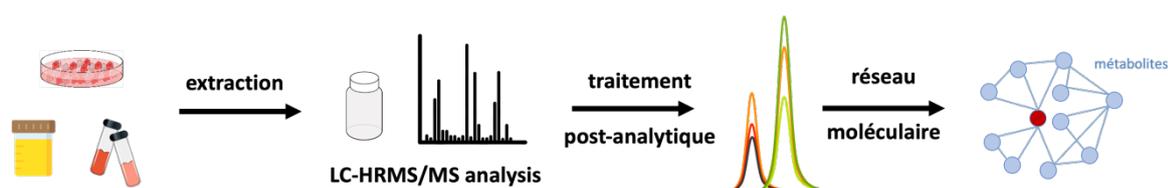


Figure 1. Étapes clés menant à la génération d'un MN suite à l'analyse d'un échantillon LC-HRMS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

2.1. Échantillons

Les échantillons analysés peuvent être d'origine biologique ou non. Cela permet notamment de comparer différentes matrices, comme par exemple une poudre avec un prélèvement biologique

[9]. Cet outil permet également l'utilisation de matrices complexes comme les surnageants de cultures cellulaires ou encore les microsomes hépatiques, très utilisés dans l'étude de métabolisme *in vitro* de xénobiotiques [10].

L'analyse par LC-HRMS des matrices complexes se fera généralement après extraction, par des techniques type extraction liquide-liquide en présence d'étalons internes afin de purifier l'échantillon et de pouvoir visualiser dans le réseau les étalons internes utilisés. De manière générale, tout type d'échantillon pouvant bénéficier d'une extraction et par conséquent d'une analyse par LC-HRMS est éligible à un retraitement par MN.

2.2. Séparation chromatographique

Le MN fait généralement suite à une acquisition en LC-HRMS/MS à l'aide des fragments MS². Cependant, rien n'empêche d'utiliser des données provenant d'une chromatographie en phase gazeuse ou des données de basse résolution.

La séparation chromatographique reste un élément à privilégier pour l'identification d'un composé du fait de l'apport d'un temps de rétention, élément supplémentaire de comparaison et de discrimination entre les molécules analysées. Par conséquent, cette étape de chromatographie s'avère capitale dans la réalisation d'un réseau moléculaire, puisqu'elle permet d'augmenter de manière robuste le niveau de preuve dans la caractérisation des composés visualisés. En particulier, le type de colonne utilisé et la qualité de la séparation chromatographique constituent des éléments d'importance dans la séparation d'isomères et diastéréoisomères ayant des spectres de fragmentation identiques. Dans ce contexte, plus la méthode séparative sera performante, plus l'interprétation des informations issues du MN sera pertinente.

2.3. Analyse par spectrométrie de masse

L'acquisition des données se fait généralement selon une méthode de screening non ciblée, mais peut bénéficier de listes d'inclusions comportant les molécules d'intérêt. Dans ce contexte, l'utilisation d'une méthode capable de détecter le plus d'ions possibles et de les fragmenter constitue une des pierres angulaires de la réalisation d'un MN. Il a été montré la possibilité d'acquérir ces données sur différents type de spectromètres de masse, pour la plupart de haute

résolution ; c'est notamment le cas pour la technologie Orbitrap, mais aussi la technologie QTOF (Sciex, Waters, ...), Ion trap ou encore FT-ICR [8].

Pour gagner en sensibilité, la gamme de masse à détecter peut-être restreinte, empêchant ainsi la détection de molécules non pertinentes. Également, le mode d'ionisation (positif ou négatif) influera la détection des composés selon leurs propriétés physiques [11–13].

Pris ensemble, ces réflexions mettent en exergue la nécessité d'optimisation et d'ajustement continue des paramètres instrumentaux d'acquisition des données en vue de réaliser un MN, puisque les paramètres d'inclusion, d'ionisation ou encore de fragmentation seront propres à la molécule d'intérêt. Pour aller plus loin, un MN sera ainsi représentatif d'un ensemble de paramètres précis adaptés à la molécule à analyser, et la reproductibilité d'un MN sera alors conditionnée par la reproduction exacte de l'ensemble de ces paramètres.

2.4. Méthodologie bio-informatique

2.4.1 Conversion des données

Les données fournisseurs (ex: ThermoScientific®, Waters®...) ne sont pas toujours exploitables à l'aide de logiciels non commerciaux. Ainsi, la conversion des données brutes peut être nécessaire pour pouvoir les retraiter à l'aide de logiciels en accès libre.

Proteowizard® (proteowizard.sourceforge.io) est un logiciel permettant la conversion des données HRMS (ex : .raw) [14,15]. Il permet notamment de filtrer les données, par exemple selon la polarité (positive ou négative) de l'électrospray mais aussi de réduire la durée ou la gamme de masse à analyser par rapport aux données acquises. Les données spectrales brutes (format .raw) sont ainsi converties en un format libre (le plus connu .mzML) permettant un retraitement plus simple des données.

2.4.2 Retraitement des données

Les données issues de la HRMS étant très complexes, une étape de retraitement des données est indispensable dans le but de ne garder que les pics chromatographiques pertinents dans l'analyse. Cette étape peut se faire à l'aide de différents logiciels en accès libre, tel que MzMine® [16].

La première étape de ce processus consiste à fixer des seuils de détection en dessous desquels les pics acquis en MS1 et en MS2 ne sont pas pris en compte. Ces seuils doivent être constamment adaptés selon la complexité des matrices utilisées (ex : solution pure, extraits de poudre, sang, bile, urine, milieux de culture cellulaire...). Cette étape est suivie de la génération d'un chromatogramme épuré, à partir des fichiers .mzML et des seuils établis précédemment. La deuxième étape est une étape de déconvolution, permettant par un procédé mathématique d'extraire et d'épurer un signal produit à partir d'une matrice complexe. Cette étape permet de ne garder que les pics d'éluion gaussiens sur un chromatogramme, et de séparer d'éventuels isomères entre eux (Figure 2).

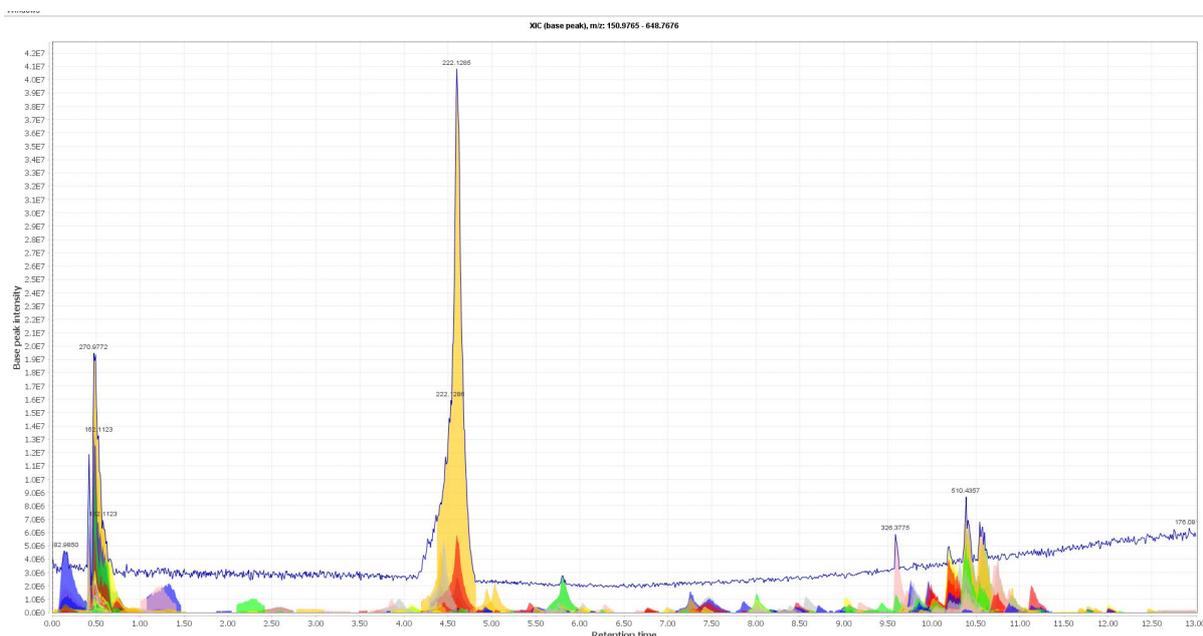


Figure 2 : Exemple d'un chromatogramme ayant subi une déconvolution et correspondant à l'analyse d'un échantillon urinaire contenant de la 2-FDCK ($[M+H]^+ = 222.1285 m/z$). La ligne bleue représente la ligne basale du chromatogramme avant déconvolution. Les pics de couleur représentent chacun un pic considéré comme pertinent et donc à inclure dans les étapes ultérieures de l'analyse.

La troisième étape, de « désisotopage », permet de regrouper les différents isotopes d'un composé donné.

Enfin, une étape de filtration de données est nécessaire pour ne garder que les informations d'intérêt nécessaires à la genèse du MN par la plateforme GNPS [8]. En effet, seuls les pics MS1 ayant des données de MS2 vont être exportés vers GNPS pour la formation du MN [8] (cf partie 2.4.).

In fine, toutes ces étapes permettent de générer deux fichiers : (i) un fichier « réseau » (.mgf) contenant les spectres de fragmentation et nécessaires à GNPS pour la création du MN, et (ii) un tableur (fichier .csv) contenant l'ensemble des informations chromatographiques et spectrales.

2.5. Utilisation de GNPS

GNPS (<http://gnps.ucsd.edu/>) est une plateforme internet dédiée à la déréplication et l'interprétation des données MS2 [8]. Elle regroupe différents outils permettant (i) l'annotation automatique des composés connus et répertoriés dans des bases de données, (ii) la génération de réseaux moléculaires à partir de n'importe quelle analyse MS2 ou encore (iii) la comparaison entre les spectres MS2 expérimentaux et les spectres MS2 simulés (*in silico*) [17]. Également, GNPS héberge un répertoire public de dépôt de données (MassIVE, Mass spectrometry Interactive Virtual Environment) qui peuvent être annotées par la communauté des utilisateurs. Cependant, ces bases de données sont souvent établies à partir de produits d'origine naturelle, et donc peu appropriées à la toxicologie clinique ou médicolégale.

Dans le contexte toxicologique, l'intérêt de GNPS réside dans les algorithmes utilisés qui permettent de générer des clusters regroupant des molécules structurellement proches. D'un point de vue méthodologique, les fichiers de sortie de MzMine® peuvent ainsi être chargés sur la plateforme web GNPS pour générer un MN. Au cours de cette étape en ligne, plusieurs paramètres peuvent être ajustés, tels que la taille minimum de constitution des clusters, la tolérance de masse des ions précurseurs et des ions fragments utilisés pour la recherche dans la bibliothèque spectrale MS/MS ou encore la détermination du cosine score (indice de corrélation attribué entre chaque paire de spectres reflétant la similarité structurelle entre deux composés et exprimé entre 0 et 1).

Le logiciel Metgem® est une alternative à GNPS pour générer et visualiser des réseaux moléculaires. Ce logiciel a été mis au point dans le but de simplifier les procédés nécessaires à la genèse d'un réseau moléculaire sans avoir besoin d'un outil en ligne comme GNPS, dont l'analyse peut être chronophage et fastidieuse [18].

2.6. Retraitement graphique des données

Afin de visualiser les données générées par GNPS, les fichiers d'exportation provenant de MzMine® et de GNPS doivent être importés dans le logiciel Cytoscape® (San Diego, CA, USA) [19]. Ces fichiers contiennent sous forme de tableurs des informations concernant le temps de rétention de chaque molécule, sa masse exacte, l'intensité de chaque composé (correspondant à l'aire du pic chromatographique), ainsi que son spectre de fragmentation.

Au sein du logiciel Cytoscape®, les nœuds (« nodes ») représentent chaque ion et sont liés/regroupés (« link ») en clusters lorsqu'ils sont spectralement proches. Ils sont identifiés avec leur masse exacte chargée (ex : protonée $[M+H]^+$ en ionisation positive). Les liens entre les nœuds sont caractérisés par leur décalage de masse exacte (Figure 3), et sont créés selon le cosine score renseigné dans GNPS. Pour obtenir des résultats assurant une similarité structurale et une spécificité suffisante, il est conseillé d'utiliser un cosine score supérieur à 0,6 [20] voire 0,7 [21].

De manière intéressante, la différence de masse entre deux composés peut correspondre à des réactions de biotransformation connues (Tableau 1), et permet d'avancer des hypothèses quant à l'identification des molécules présentes au sein d'un même cluster. Sur l'exemple ci-dessous (Figure 3), on peut remarquer une différence de masse de 42.0105 m/z entre l'héroïne et la 6-monoacetylmorphine (6-MAM), correspondant à la perte d'un groupement acetyl. Le lien séparant héroïne et 6-MAM indique donc 42.0105. De même, un 2^{ème} groupement acetyl est perdu lors du métabolisme de la 6-MAM en morphine ($\Delta m = 42.0105$). Par ailleurs, et à titre d'exemple, la kétamine n'étant pas structurellement proche de l'héroïne et de ses métabolites, et n'ayant pas de similarité spectrale avec ces molécules, elle ne fait donc pas partie du même cluster.

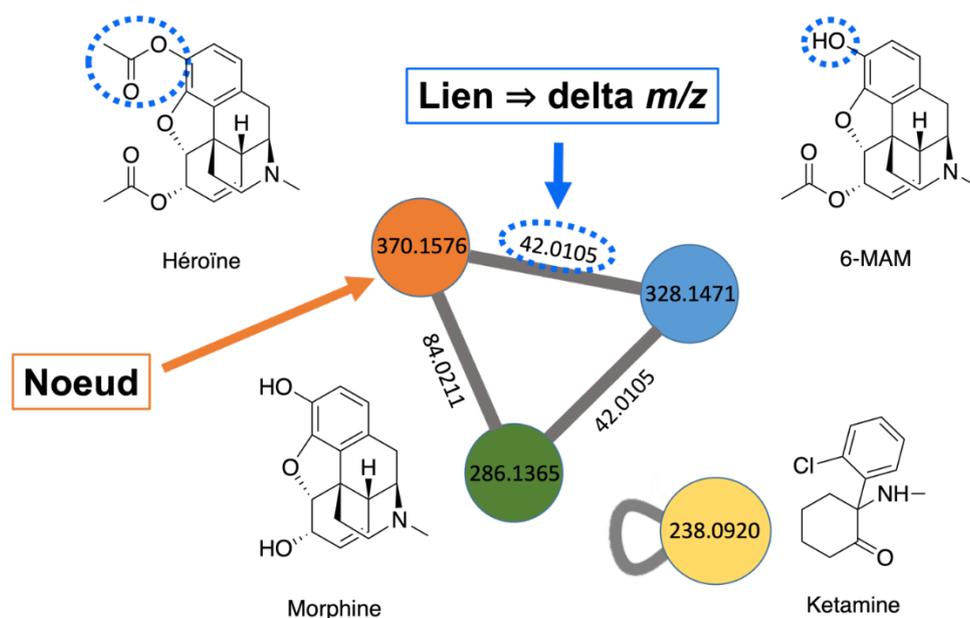


Figure 3 : Nomenclature du réseau moléculaire

Tableau 1. Réactions de biotransformations majeures associées à leur différence de masse

Réaction de biotransformation	Différences de masse (Da)
Dihydrogénation	+ 2.0157
Décarbonation	- 12.0000
Méthylation	+ 14.0156
Hydrolyse	+ 18.0106
Déacétylation	- 42.0106
Sulfatation	+ 79.9568
Glucuronidation	+ 176.032

Cette approche a déjà été utilisée pour identifier de nouveaux métabolites de médicaments ou drogues dans des matrices biologiques humaines (sang et urine principalement) [21–23].

En cas de comparaison de plusieurs échantillons, chaque nœud représente de manière semi-quantitative les aires des pics du composé, réparties entre les différents échantillons représentés par leurs couleurs différentes (Figure 4).

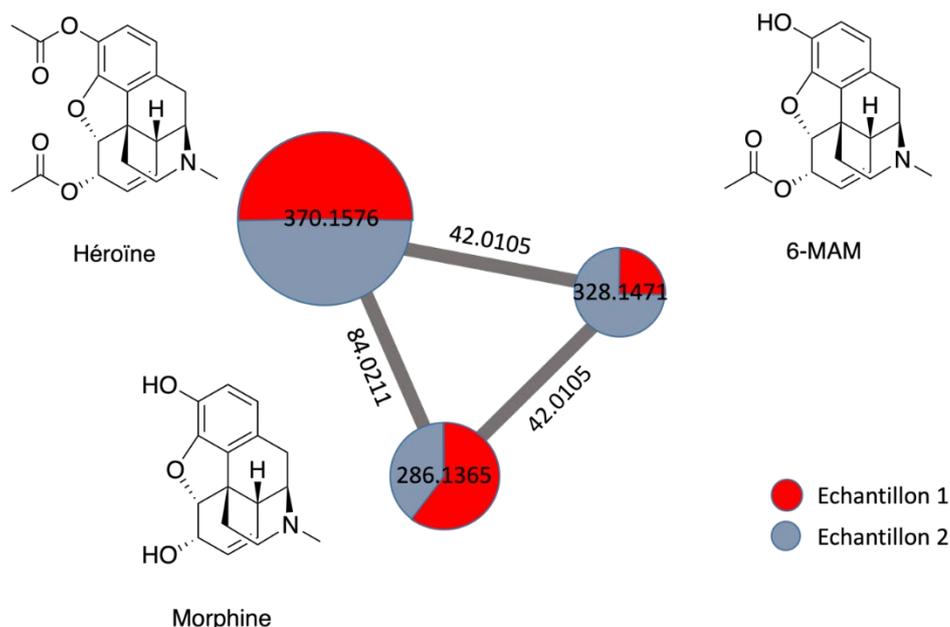


Figure 4. Comparaison inter-échantillon des intensités de nœud au sein d'un cluster

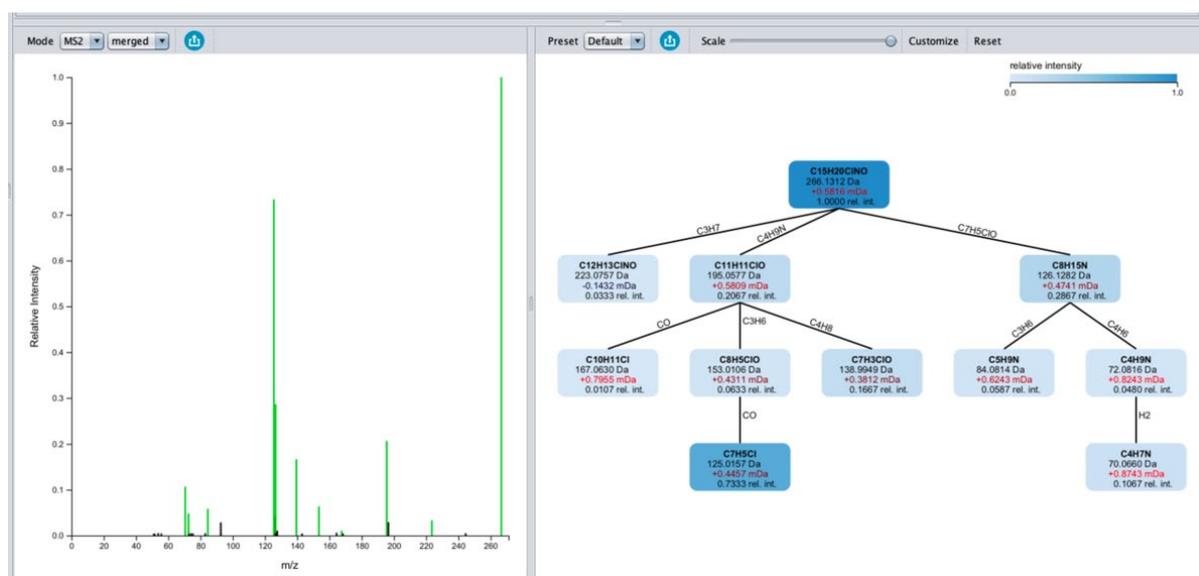
Enfin, l'utilisation de Cytoscape® permet également de comparer les intensités relatives des différents nœuds en jouant sur leurs tailles. Ainsi, plus un composé présente une réponse d'ionisation intense, plus il sera visuellement gros au sein du réseau moléculaire. Dans le cadre de la découverte de nouveaux métabolites, la taille des nœuds permet d'apporter des arguments pour ou contre la proposition de ces composés comme marqueurs pertinents de consommation. Sur la Figure 4, l'héroïne a une intensité importante dans le cluster par rapport à la 6-MAM et la morphine. Cependant l'héroïne est autant présente dans l'échantillon 1 (en rouge) que l'échantillon 2 (en bleu) (Figure 4). Ainsi, la taille des nœuds est proportionnelle à l'intensité de détection du composé par rapport aux autres. La proportion de ce composé au sein des échantillons est représenté par le diagramme circulaire (en camembert) au sein du nœud.

2.7. Identification structurale des métabolites

La première étape d'identification structurale des composés présents au sein d'un cluster est basée sur l'identification de réactions de biotransformation connues entre les composés (Tableau 1). Cependant, une proposition de structure fiable doit également se baser sur l'analyse des spectres de fragmentation, qui fournissent complémentaiement des informations structurales importantes sur la molécule à identifier. Dans ce contexte, et afin d'améliorer le niveau de confiance dans les identifications proposées, il est possible de recourir à l'utilisation de logiciels générant des arbres de fragmentation tel que le logiciel SIRIUS 4.0®

(bio.informatik.uni-jena.de/Sirius) [24,25]. Cet outil permet notamment de déduire des informations chimiques et spectrales sur le composé d'intérêt même si elles ne sont pas contenues dans une base de données structurales (Figure 5). Au sein d'un même cluster, les nœuds identifiés peuvent consécutivement être utilisés comme points de départ pour identifier d'autres nœuds par propagation de l'information au sein du MN.

A



B

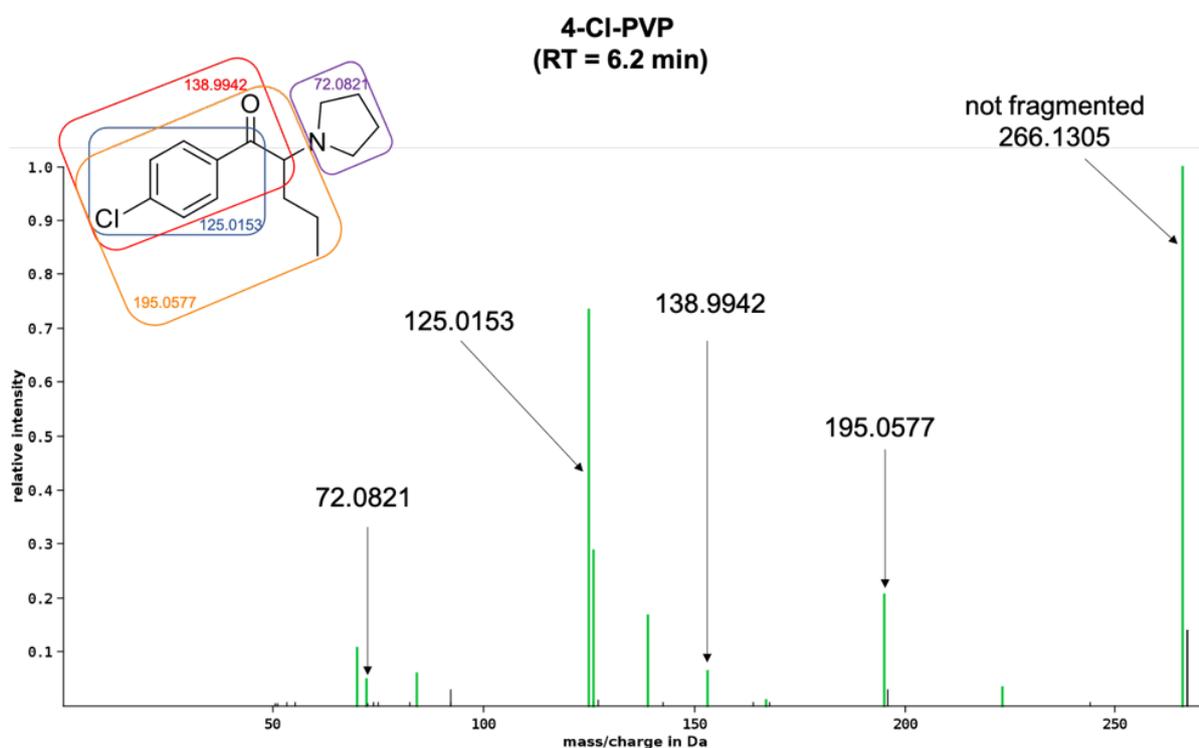


Figure 5. Exemple d'étude du spectre de fragmentation de la 4-Cl-PVP (A) par le logiciel SIRIUS 4.0® et (B) en analyse structurale consécutive [10].

D'un point de vue méthodologique, une approche d'identification par niveau de confiance peut également être proposée comme rapporté par Schymanski *et al.* (2014) [26] (Tableau 2).

Tableau 2 : Niveau de confiance dans l'identification d'un composé au sein d'un réseau moléculaire selon la classification de Schymanski *et al.* (2014).

Niveau 1	Identification confirmée par l'utilisation d'un standard
Niveau 2	Identification probable de la structure : <ul style="list-style-type: none">• A) Par concordance trouvée avec une librairie spectrale• B) Par diagnostic à partir des spectres de fragmentation
Niveau 3	Structure potentielle proposée avec incertitude sur la localisation précise d'un groupement chimique
Niveau 4	Identification de la formule brute du composé
Niveau 5	Identification de la masse exacte du composé

3. Utilisations du réseau moléculaire en toxicologie

3.1. Identifications de composés

La plateforme GNPS permet la comparaison des spectres à une base de données et d'identifier ainsi les molécules. Cependant, ces bibliothèques de données sont autoalimentées par les échantillons fournis par les utilisateurs, et sont principalement utilisées pour identifier des produits d'origine naturelle. Les principaux xénobiotiques à identifier en toxicologie (drogues, médicaments, nouveaux produits de synthèse) ne sont donc pas présents dans ces bases, et la comparaison à une base de données personnelle est alors possible et recommandée lors de la production du MN.

Dans ce contexte, il est possible de s'aider des bases de données existantes au sein des logiciels des fournisseurs du spectromètre de masse, qui peuvent contenir un grand nombre de composés d'intérêt pour la toxicologie. Également, les bases de données de spectre de masse en accès libre en ligne tel que MzCloud (<https://www.mzcloud.org/>) peuvent constituer des ressources précieuses à l'obtention des premières identifications. Y figurent notamment les spectres de masse de nombreux médicaments mais aussi quelques nouveaux produits de synthèse incluant des dérivés de la famille des cathinones, des dérivés de la phenethylamine, des nouveaux opiacés de synthèse ou encore des nouveaux cannabinoïdes de synthèse.

3.2 Exploration du métabolisme

L'utilisation la plus innovante du réseau moléculaire en toxicologie est l'exploration du métabolisme d'une molécule. Du fait que les métabolites soient généralement structurellement et spectralement proches de la molécule mère, cette technologie permet de regrouper visuellement ces molécules, et donc d'identifier des métabolites connus ou non au sein d'un même cluster. Les différences de masses mises en évidence entre les composés d'un même cluster permettent d'identifier de potentielles réactions de biotransformation connues, et de proposer l'identification de métabolites par propagation de l'information (Tableau 1) [8,27,28].

Le MN peut également être utile pour l'exploration du métabolisme à l'aide de modèles : acellulaires comme les microsomes mais aussi cellulaires comme des lignées hépatiques douées de métabolisme (ex : hépatocytes humains en culture primaire ou cellules HepaRG® différenciées). La facilité d'utilisation de ces modèles et la possibilité de comparer plusieurs échantillons permet de réaliser des études à différents temps et différentes doses [10,29]. Elles permettent également d'étudier les différentes voies de métabolisme en présence d'inhibiteurs enzymatiques dans le milieu de culture, aidant à l'identification des systèmes enzymatiques impliqués dans les réactions de biotransformation [20]. En termes de modèle *in vivo*, certaines études rapportent l'utilisation de souris, ou encore d'échantillons biologiques humains tels que le sang, la bile, ou l'urine [10,20,29]. Enfin, le caractère visuel du MN permet de comparer rapidement l'intensité des pics des différents composés et de proposer des marqueurs pertinents de consommation ou d'exposition à un xénobiotique.

3.3. Comparaison multi-échantillons

Le MN est un outil très utile pour la comparaison qualitative et semi-quantitative de plusieurs échantillons. Une fonction d'alignement des données entre échantillons peut être réalisée par le logiciel MzMine® afin de s'affranchir des faibles variations de temps de rétention et masses entre les analyses. Un même composé présent dans plusieurs matrices peut alors être représenté sous forme de camembert au sein du réseau moléculaire, où chaque portion représente l'intensité des pics chromatographiques du composé dans chaque échantillon (Figure 3). Deux grandes applications de cette méthodologie sont particulièrement intéressantes en toxicologie.

Premièrement, une comparaison de matrices biologiques avec une substance suspectée d'avoir été absorbée (ex : une poudre ou un médicament) permet de confirmer la présence d'une même molécule entre ces différents échantillons [9,28,30].

Deuxièmement, la comparaison d'échantillons biologiques permet de visualiser la distribution d'une molécule mère et ses métabolites dans les différentes matrices comme les prélèvements *post-mortem* (bile, humeur vitrée, cheveux, urine, sang périphérique et central) [31–33].

3.4. Principales difficultés rencontrées

L'utilisation du MN est difficilement compatible avec une activité de routine. En effet, le retraitement bio-informatique des données est chronophage et nécessite de l'expérience pour affiner au mieux les différents paramètres analytiques et bio-informatiques. L'utilisation des différents logiciels est parfois compliquée et fastidieuse, demandant un paramétrage précis pour obtenir des résultats reproductibles et de qualité. De plus, le MN étant basé sur le spectre de fragmentation, des composés ayant peu de fragments ont peu de chance d'être appariés avec des molécules spectralement proches. L'interface des logiciels utilisés est également difficile d'abord. Ces logiciels, pour la totalité en accès libre, sont bien souvent mis au point pour des bio-informaticiens et demandent par conséquent une initiation avant leur manipulation effective. De plus, ces logiciels sont régulièrement mis à jour, nécessitant une nouvelle prise à jour pour bénéficier des nouvelles fonctionnalités. Ainsi, plusieurs jours sont nécessaires à l'élaboration d'un réseau moléculaire pour qu'il puisse remplir sa fonction principale : organiser les données brutes de spectrométrie de masse dans le but de les visualiser de façon didactique.

3.5. Exemples d'application au CHU de Rennes

Au CHU de Rennes, nous avons tout d'abord eu la possibilité d'étudier le métabolisme de plusieurs drogues de synthèse. Parmi elles, nous retrouvons la 3-MeO-PCP, la 4-Cl-PVP, ou encore la 2F-DCK [10,32,34,35]. Cette approche nous a permis de décrire les principaux métabolites de ces molécules, permettant d'étudier les différentes voies de métabolisme et d'en ressortir les principaux marqueurs de consommation. Cela nous a également permis d'étudier la répartition corporelle *post-mortem* de ces drogues à partir de fluides biologiques, tel que la bile, le contenu gastrique, l'humeur vitrée, le sang périphérique ou le sang cardiaque.

Cette approche nous a également permis d'étudier des matrices non biologiques, tels que des produits de saisies contenant des substances illicites, des impuretés et des agents de coupe. Ces informations permettent notamment d'apporter des informations sur la provenance de la

marchandise et/ou leur positionnement dans la chaîne d'approvisionnement [30]. Cette approche est également utile lorsque l'on dispose d'une poudre d'origine inconnue et que l'on souhaite savoir si elle a été ingérée ou non par le patient [9].

Enfin, nous nous sommes également intéressés au métabolisme de médicaments et de candidats-médicaments, dans le but de décrire leur métabolisme [20,29,36].

4. Conclusion

Le MN est un outil bio-informatique innovant, permettant d'organiser et de mieux visualiser des données complexes acquises par spectrométrie de masse. Il constitue un outil très polyvalent de par son application à tout type de matrices et de spectromètres de masse capable de fragmentation. A ce jour, l'identification de substances inconnues, l'étude du métabolisme d'une molécule, et l'identification de nouveaux marqueurs de consommation font partie de ces principales indications en toxicologie. En particulier, le réseau moléculaire semble se positionner comme un des outils les plus pertinents pour l'exploration de cas d'intoxications par des molécules dont le métabolisme est peu connu comme les nouveaux produits de synthèse. L'automatisation des processus par des logiciels fournisseurs et l'usage par plusieurs laboratoires permettra d'ouvrir le champ des possibilités et d'en faciliter son usage.

References

- [1] Maurer HH, Muddiman DC. High-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2012;403:1201–2. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5959-x>.
- [2] Maurer HH, Meyer MR. High-resolution mass spectrometry in toxicology: current status and future perspectives. *Arch Toxicol* 2016;90:2161–72. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1764-1>.
- [3] Fabresse N, Larabi IA, Stratton T, Mistrik R, Pfau G, Lorin de la Grandmaison G, et al. Development of a sensitive untargeted liquid chromatography-high resolution mass spectrometry screening devoted to hair analysis through a shared MS2 spectra database: A step toward early detection of new psychoactive substances. *Drug Test Anal* 2019;11:697–708. <https://doi.org/10.1002/dta.2535>.
- [4] Klingberg J, Keen B, Cawley A, Pasin D, Fu S. Developments in high-resolution mass spectrometric analyses of new psychoactive substances. *Arch Toxicol* 2022;96:949–67. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03224-2>.
- [5] Covey TR, Lee ED, Henion JD. High-speed liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of drugs in biological samples. *Anal Chem* 1986;58:2453–60. <https://doi.org/10.1021/ac00125a022>.
- [6] Bowers LD. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry: state of the art for the drug analysis laboratory. *Clin Chem* 1989;35:1282–7.
- [7] Helfer AG, Michely JA, Weber AA, Meyer MR, Maurer HH. Liquid chromatography-high resolution-tandem mass spectrometry using Orbitrap technology for comprehensive screening to detect drugs and their metabolites in blood plasma. *Anal Chim Acta* 2017;965:83–95. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.002>.
- [8] Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* 2016;34:828–37. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
- [9] Allard S, Le Daré B, Allard P-M, Morel I, Gicquel T. Comparative molecular networking analysis of a *Rauwolfia* plant powder and biological matrices in a fatal ingestion case. *Forensic Toxicol* 2020;38:447–54. <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00531-0>.
- [10] Pelletier R, Le Daré B, Ferron P-J, Le Bouëdec D, Kernalléguen A, Morel I, et al. Use of innovative, cross-disciplinary in vitro, in silico and in vivo approaches to characterize the metabolism of chloro-alpha-pyrrolidinovalerophenone (4-Cl-PVP). *Arch Toxicol* 2022. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03427-7>.
- [11] Bogusz MJ, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail M. Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography–electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2004;807:343–56. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.027>.
- [12] Gutteck U, Rentsch KM. Therapeutic Drug Monitoring of 13 Antidepressant and Five Neuroleptic Drugs in Serum with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2003;41. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2003.240>.
- [13] Wu Y, Yang J, Duan C, Chu L, Chen S, Qiao S, et al. Simultaneous determination of antiretroviral drugs in human hair with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2018;1083:209–21. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.021>.
- [14] Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D, Mallick P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* 2008;24:2534–6. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn323>.
- [15] Holman JD, Tabb DL, Mallick P. Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass

- Spectrometry Data. *Curr Protoc Bioinforma* 2014;46.
<https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1324s46>.
- [16] Olivon F, Grelier G, Roussi F, Litaudon M, Touboul D. MZmine 2 Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability. *Anal Chem* 2017;89:7836–40.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01563>.
- [17] Nothias L-F, Esposito M, Costa J, Paolini J, Touboul D, Litaudon M. Les réseaux moléculaires, une approche bio-informatique globale pour interpréter les données de spectrométrie de masse tandem. *Spectra Anal* 2015:65–70.
- [18] Olivon F, Elie N, Grelier G, Roussi F, Litaudon M, Touboul D. MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Anal Chem* 2018;90:13900–8. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03099>.
- [19] Shannon P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* 2003;13:2498–504.
<https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- [20] Le Daré B, Ferron P-J, Allard P-M, Clément B, Morel I, Gicquel T. New insights into quetiapine metabolism using molecular networking. *Sci Rep* 2020;10:19921.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77106-x>.
- [21] Magny R, Auzeil N, Lefrère B, Mégarbane B, Houzé P, Labat L. Molecular Network-Based Identification of Tramadol Metabolites in a Fatal Tramadol Poisoning. *Metabolites* 2022;12:665. <https://doi.org/10.3390/metabo12070665>.
- [22] Allard S, Allard P-M, Morel I, Gicquel T. Application of a molecular networking approach for clinical and forensic toxicology exemplified in three cases involving 3-MeO-PCP, doxylamine, and chlormequat. *Drug Test Anal* 2019;11:669–77.
<https://doi.org/10.1002/dta.2550>.
- [23] Ferron P-J, Le Daré B, Bronsard J, Steichen C, Babina E, Pelletier R, et al. Molecular Networking for Drug Toxicities Studies: The Case of Hydroxychloroquine in COVID-19 Patients. *Int J Mol Sci* 2021;23:82. <https://doi.org/10.3390/ijms23010082>.
- [24] Ludwig M, Fleischauer M, Dührkop K, Hoffmann MA, Böcker S. De Novo Molecular Formula Annotation and Structure Elucidation Using SIRIUS 4. In: Li S, editor. *Comput. Methods Data Anal. Metabolomics*, vol. 2104, New York, NY: Springer US; 2020, p. 185–207. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_11.
- [25] Böcker S, Dührkop K. Fragmentation trees reloaded. *J Cheminformatics* 2016;8:5.
<https://doi.org/10.1186/s13321-016-0116-8>.
- [26] Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ Sci Technol* 2014;48:2097–8. <https://doi.org/10.1021/es5002105>.
- [27] Quinn RA, Nothias L-F, Vining O, Meehan M, Esquenazi E, Dorrestein PC. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. *Trends Pharmacol Sci* 2017;38:143–54. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.011>.
- [28] Vincenti F, Montesano C, Di Ottavio F, Gregori A, Compagnone D, Sergi M, et al. Molecular Networking: A Useful Tool for the Identification of New Psychoactive Substances in Seizures by LC–HRMS. *Front Chem* 2020;8:572952.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.572952>.
- [29] Pelletier R, Gicquel T, Simoes Eugenio M, Ferron P-J, Morel I, Delehouzé C, et al. A Transversal Approach Combining In Silico, In Vitro and In Vivo Models to Describe the Metabolism of the Receptor Interacting Protein 1 Kinase Inhibitor Sibiriline. *Pharmaceutics* 2022;14:2665. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122665>.
- [30] Le Daré B, Allard S, Couette A, Allard P-M, Morel I, Gicquel T. Comparison of Illicit Drug Seizures Products of Natural Origin Using a Molecular Networking Approach. *Int J Toxicol* 2022:10915818211065160. <https://doi.org/10.1177/10915818211065161>.

- [31] Gicquel T, Pelletier R, Richeval C, Gish A, Hakim F, Ferron P-J, et al. Metabolite elucidation of 2-fluoro-deschloroketamine (2F-DCK) using molecular networking across three complementary in vitro and in vivo models. *Drug Test Anal* 2021. <https://doi.org/10.1002/dta.3162>.
- [32] Pelletier R, Le Daré B, Grandin L, Couette A, Ferron P-J, Morel I, et al. New psychoactive substance cocktail in an intensive care intoxication case elucidated by molecular networking. *Clin Toxicol Phila Pa* 2021:1–4. <https://doi.org/10.1080/15563650.2021.1931693>.
- [33] Berar A, Allain J-S, Allard S, Lefevre C, Baert A, Morel I, et al. Intoxication with 3-MeO-PCP alone. *Medicine (Baltimore)* 2019;98. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018295>.
- [34] Gicquel T, Richeval C, Mesli V, Gish A, Hakim F, Pelletier R, et al. Fatal intoxication related to two new arylcyclohexylamine derivatives (2F-DCK and 3-MeO-PCE). *Forensic Sci Int* 2021;324:110852. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110852>.
- [35] Allard S, Allard P-M, Morel I, Gicquel T. Application of a molecular networking approach for clinical and forensic toxicology exemplified in three cases involving 3-MeO-PCP, doxylamine, and chlormequat. *Drug Test Anal* 2019;11:669–77. <https://doi.org/10.1002/dta.2550>.
- [36] Le Daré B, Allard S, Bouvet R, Baert A, Allard P-M, Morel I, et al. A case of fatal acebutolol poisoning: an illustration of the potential of molecular networking. *Int J Legal Med* 2020;134:251–6. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02062-9>.