



Développement d'une méthode quantitative ciblée en LC-MS/MS des métabolites de la voie des kynurénines chez des patients transplantés rénaux

Justine Massias, Luc Colas, Juan Riveros Velasquez, Axel Raux, Sophie Brouard, Yann Guitton, Bruno Le Bizec

► To cite this version:

Justine Massias, Luc Colas, Juan Riveros Velasquez, Axel Raux, Sophie Brouard, et al.. Développement d'une méthode quantitative ciblée en LC-MS/MS des métabolites de la voie des kynurénines chez des patients transplantés rénaux. JS RFMF 2023, May 2023, Perpignan, France. 2023. hal-04241301

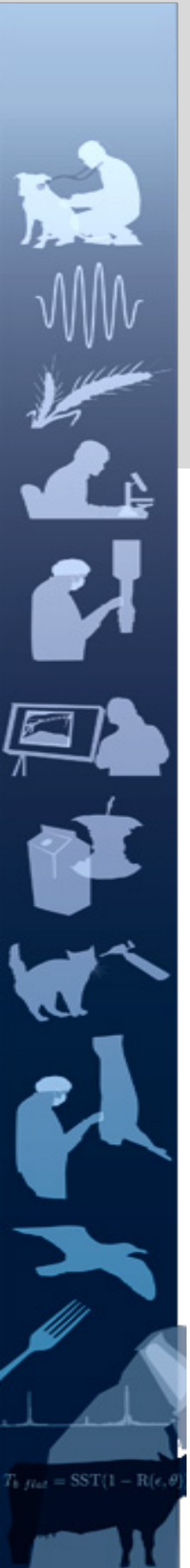
HAL Id: hal-04241301

<https://hal.science/hal-04241301>

Submitted on 25 Oct 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.



DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE QUANTITATIVE CIBLÉE EN LC-MS/MS DES MÉTABOLITES DE LA VOIE DES KYNURÉNINES CHEZ DES PATIENTS TRANSPLANTÉS RÉNAUX

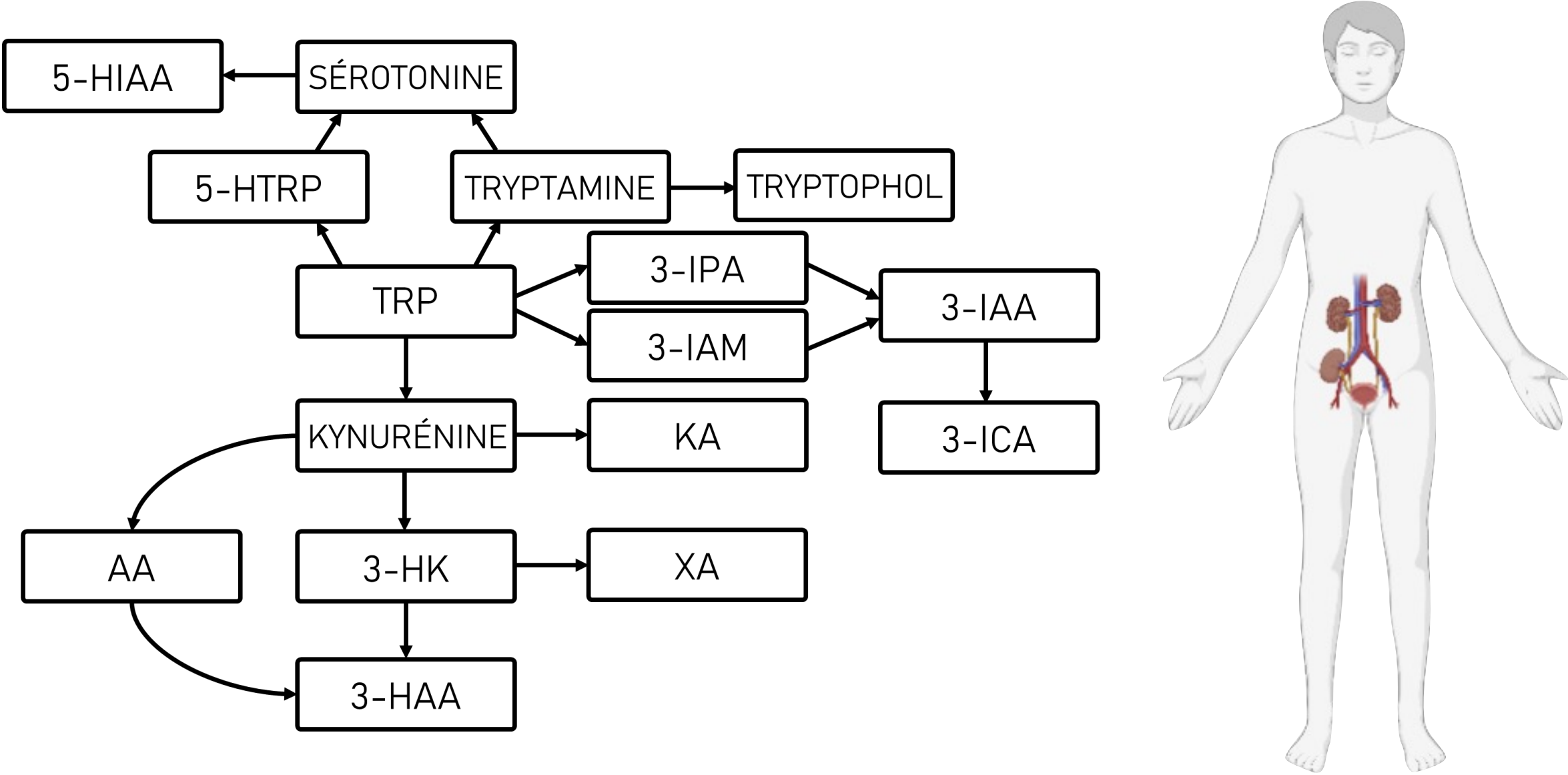
Justine MASSIAS¹, Luc COLAS^{2,3}, Juan RIVEROS VELASQUEZ², Axel RAUX¹, Sophie BROUARD², Yann GUITTON¹, Bruno LEBIZEC¹



¹Oniris, INRAE, LABERCA, 44300 Nantes, France
²Nantes Université, CHU Nantes, INSERM, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, ITUN2, F-44000, Nantes, France
³CHU Nantes, Nantes Université, Plateforme Transversale d'Allergologie, Clinique Dermatologique, Nantes, France

Introduction

L'enrichissement en métabolites de la voie des kynurénines chez des patients transplantés rénaux qui présentent une tolérance opérationnelle spontanée à leur greffon après une transplantation rénale a été démontré par une étude métabolomique non supervisée sur des urines humaines. L'activation de la voie IDO1 particulièrement associée à la tolérance immunitaire serait responsable de cet enrichissement. A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles concernant le lien entre la tolérance allo-immune et les changements métaboliques de la voie des kynurénines suite à l'activation de la voie IDO1. Afin de mieux investiguer ces changements métaboliques, une méthode quantitative ciblée en LC-MS/MS est développée dans le but de quantifier 16 métabolites de la voie des kynurénines sur des matrices humaines d'intérêt (sérum, plasma, urines).

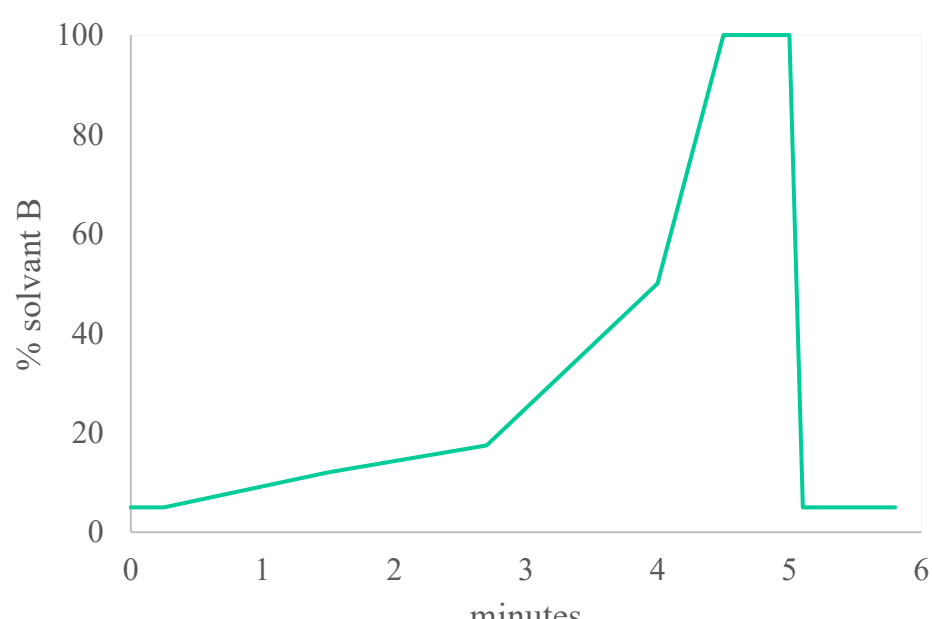


Méthode LC-MS/MS

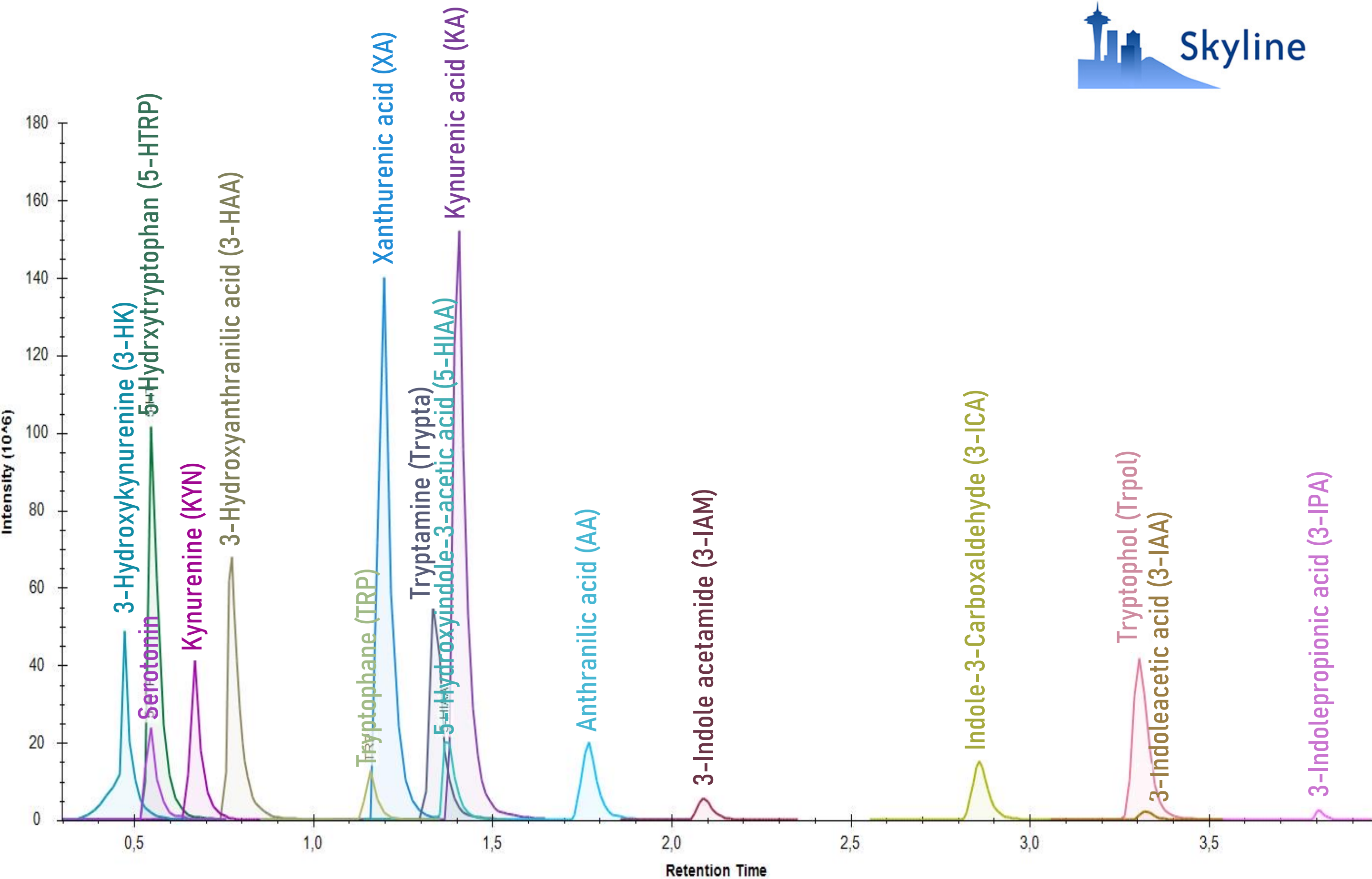


QTRAP® 6500+ System SCIEX
Ion source : ESI+
Curtain Gas = 35 psi
IonSpray Voltage : 3000 V
Température : 550°C
Ion Source Gas 1 : 50 psi
Ion Source Gas 2 : 60 psi

Colonne ACQUITY UPLC® BEH (2,1 x 500 mm; 1,7µm)
T° colonne = 40°C
Débit : 0,6 mL/min
Solvant A : Eau ultra pure + 0,2% acide acétique
Solvant B : Acétonitrile + 0,2% d'acide acétique



Chromatogramme obtenu avec Skyline après injection des 16 standards



Références :

• Colas L, Royer AL, Massias J, Raux A, Chesneau M, Kerleau C, Guerif P, Giral M, Guitton Y, Brouard S; DIVAT Consortium. Urinary metabolomic profiling from spontaneous tolerant kidney transplanted recipients shows enrichment in tryptophan-derived metabolites. EBioMedicine. 2022 Mar;77:103844. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103844. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35241402; PMCID: PMC9034456.
• Lefèvre A, Mavel S, Nadal-Desbarats L, Galineau L, Attucci S, Dufour D, Sokol H, Emond P. Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. Talanta. 2019 Apr 1;195:593-598. doi: 10.1016/j.talanta.2018.11.094. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30625588.

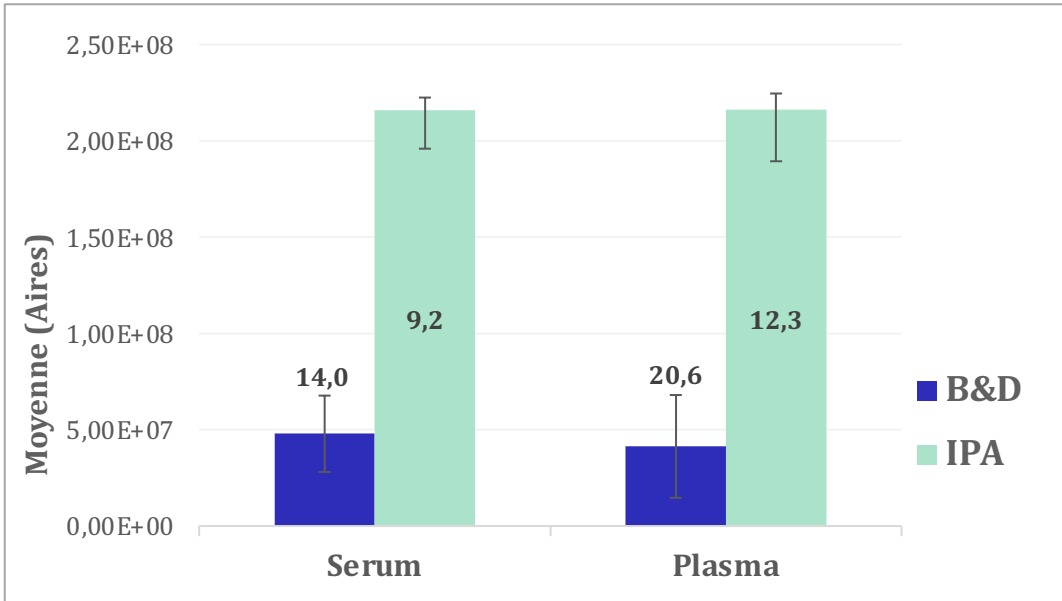
Préparation d'échantillons

SÉRUM & PLASMA



- 30 µL d'échantillon de plasma/sérum + 150 µL d'isopropanol
- Centrifugation 500g à 4°C pendant 20 min
- Récupération du surnageant
- Centrifugation 500g à 4°C pendant 20 min
- 100 µL du surnageant dans un vial + 10 µL de iSTD à 1 ng/µL
- Evaporation sous azote & Reprise dans 100 µL H2O/ACN

Essai préliminaire : Comparaison de la méthode d'extraction par Bligh & Dyer (B&D) et celle par Isopropanol (IPA) – Exemple du Tryptophane (TRP)

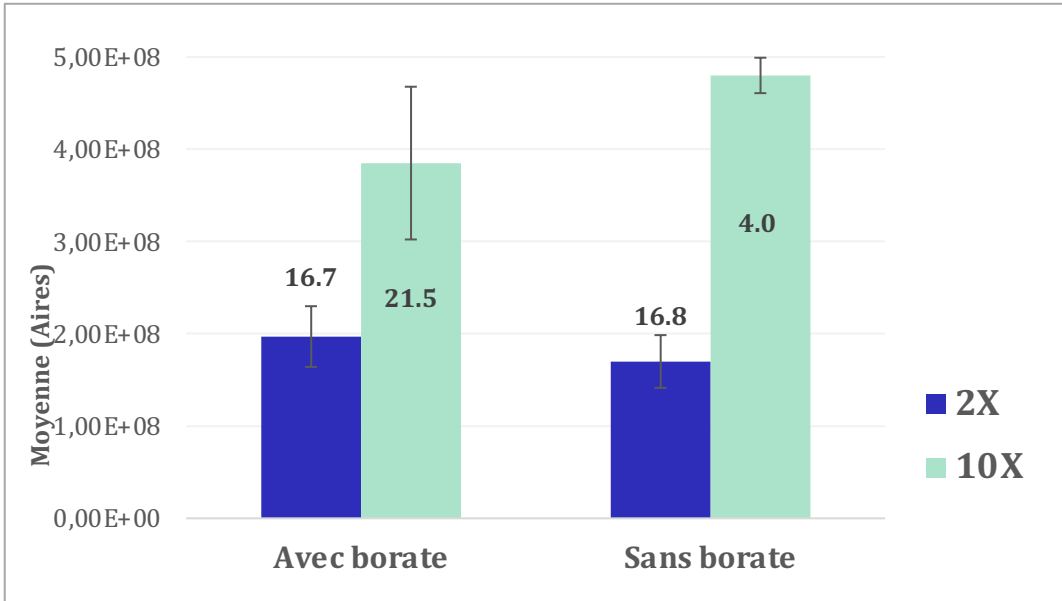


URINES



- 30 µL d'urines, dilution x10 H2O ultrapure dans tube Eppendorf à filtre 10 kDa
- Centrifugation 12 000g à 4°C pendant 10 min
- Evaporation sous azote de 10 µL de iSTD à 1ng/µL dans un vial
- Ajout de 100 µL du surnageant dans le vial

Essai préliminaire : Comparaison des préparations d'échantillons d'urines à différentes dilutions avec et sans borate* – Exemple du Tryptophane (TRP)



*L'ajout de l'acide borique dans les urines permet une durée de conservation plus longue des urines à température ambiante

Développement & Validation

Injections d'urines, plasma et sérum de sujets sains afin de déterminer la gamme de concentration de chaque métabolite dans les trois matrices

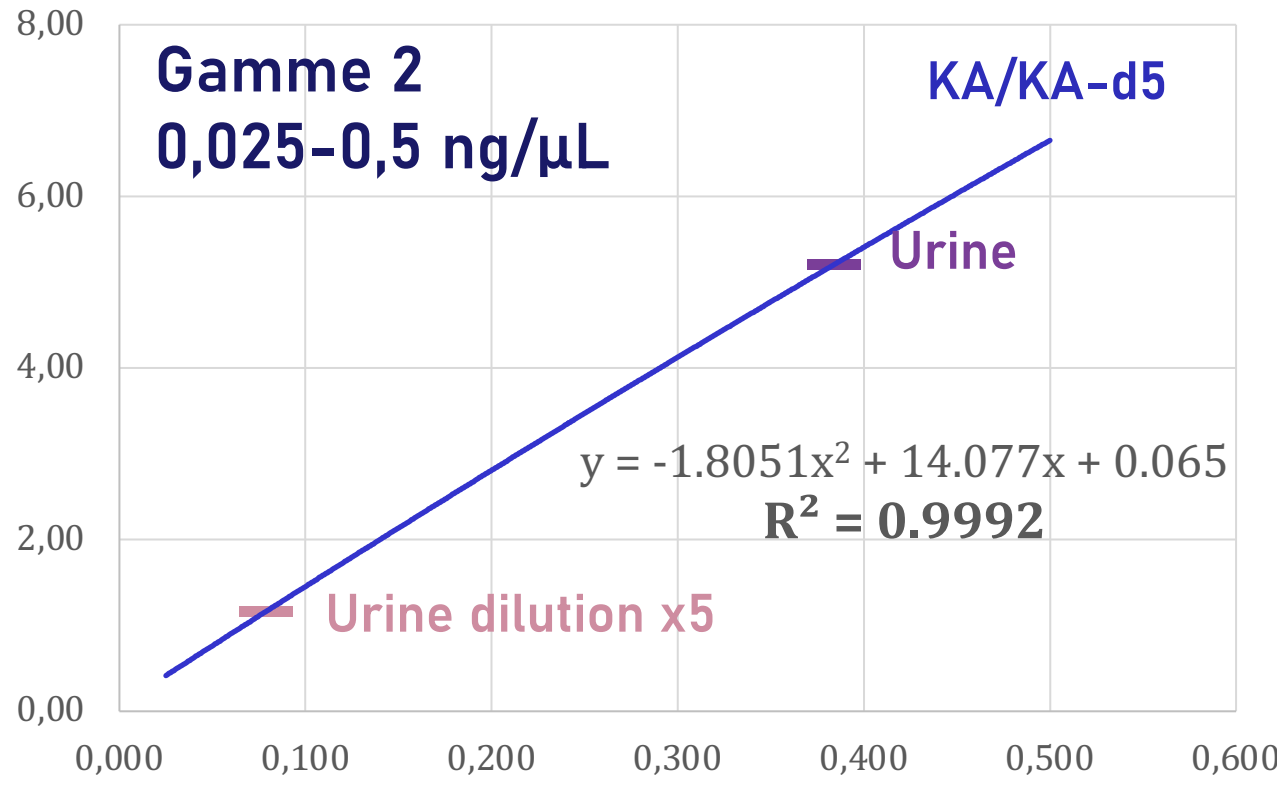
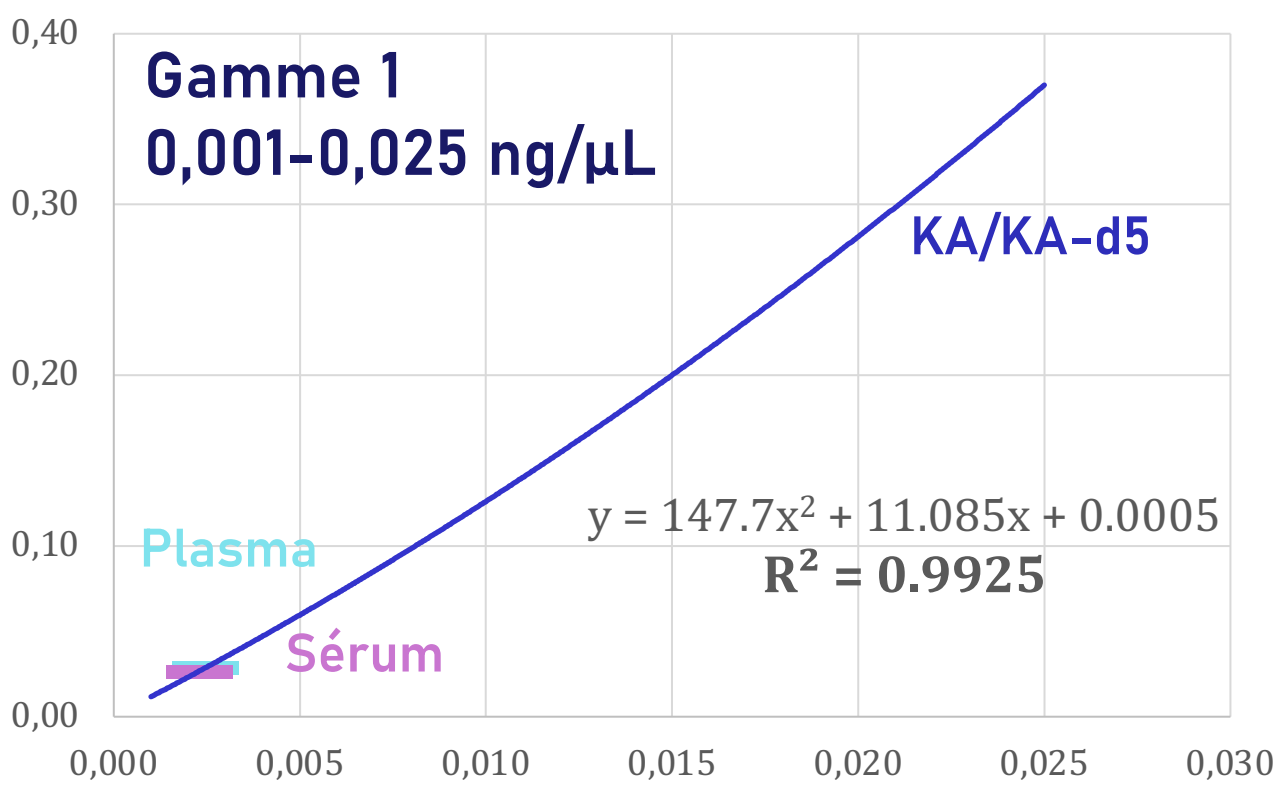
EXEMPLE DE L'ACIDE KYNURÉNIQUE (KA)

Construction de 2 gammes

- ✓ couverture des 3 matrices
- ✓ plus de précision

Validation de méthode

- Spécificité** 2 transitions suivies (ratio)
Standard interne KA-d5
- Linéarité** R² > 0,99
- Précision** CV < 3%
- Justesse**
- Effet matrice**
- Stabilité** 1 mois à -20°C



Conclusion

La méthode de quantification des 16 métabolites nécessite de développer deux gammes étalons afin de couvrir la quantité de chaque métabolite dans les différentes matrices. La validation de cette méthode a été initiée avec l'étude de la répétabilité et la stabilité des échantillons après un mois à -20°C. Après validation, cette méthode permettra un suivi longitudinal de la voie des kynurénines au cours de la transplantation en parallèle d'un calcul du score clinique de risque de perte du greffon développé au sein du CR2TI. In fine, cela permettra de discriminer ou non les patients avec un très faible risque de perte du greffon afin d'adapter leur traitement au cours de leur suivi après la transplantation rénale.