

Introduction

La transplantation d'organes est un traitement de choix pour plusieurs maladies de stades avancés, en particulier l'insuffisance rénale chronique. Il s'agit cependant d'un processus qui comporte plusieurs risques de complications importantes:

- Rejet du greffon
- Délai de reprise de fonction
- Dommages ischémiques de l'organe
- Toxicité des immunosuppresseurs

Les outils actuels du suivi post-opératoire sont généralement peu spécifiques (dosage de la créatinine en transplantation rénale) ou encore très invasifs (biopsie). Des biomarqueurs non-invasifs, sensibles et spécifiques sont donc pour la détection précoce des complications menant à la dysfonction du greffon sont encore requises.

La métabolomique est une science à haut-débit qui vise à caractériser le métabolome, soit la collection de tous les composés de petits poids moléculaire produits par les voies métabolique (Figure 1). Il s'agit donc d'une approche appropriée pour l'étude des maladies rénales, l'oncologie, les maladies cardiovasculaires et plus récemment, la transplantation d'organes. La métabolomique permet soit de suivre un profil de plusieurs métabolites ou d'identifier des biomarqueurs dont les concentrations varient en fonction de l'état pathophysiologique du patient ou d'un traitement.

Nous avons cherché à savoir si les approches de métabolomiques seraient applicables dans les laboratoires cliniques du système de santé du Québec. De plus, nous avons étudié la littérature pour identifier des biomarqueurs qui pourraient représenter des cibles de développement à court terme.

Considérations techniques

La métabolomique repose typiquement sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse qui sont deux méthodes qui permettent le dosage de plusieurs centaines de composés lors d'une seule expérience (Figure 2). Chaque méthode possède des avantages et des inconvénients (Tableau 1).

La spectrométrie de masse est la méthode la plus adaptée pour le milieu clinique de par la taille des appareils et des coûts associés. En métabolomique, les approches les plus courantes se basent sur le MS et le MS/MS couplé à des méthodes chromatographiques, principalement en phase gazeuse (GC) et liquide (LC) qui sont des appareils déjà couramment utilisés et disponibles dans les grands centres québécois.

La métabolomique est aussi une approche permettant de faire des analyses sur un nombre impressionnant de matrices différentes:

- Sang (sérum et plasma)
- Urine
- LCR
- Bile
- Salive
- Liquide de conservation d'organes
- Tissus (biopsie)
- Etc...

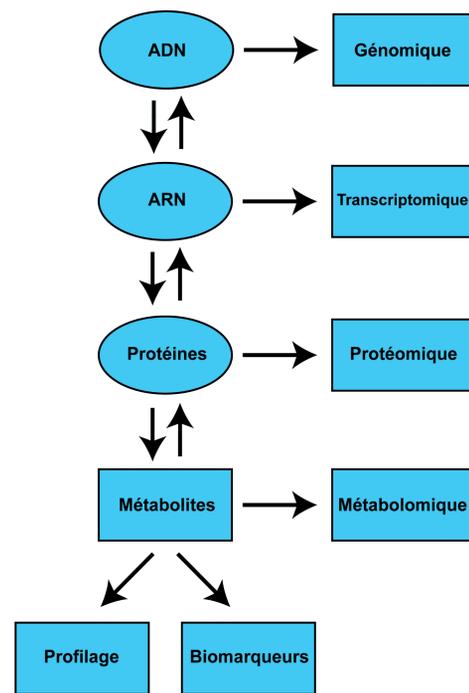


Figure 1. Approches « omics » et leur lien avec les processus cellulaires. Adapté de Goldsmith et al.

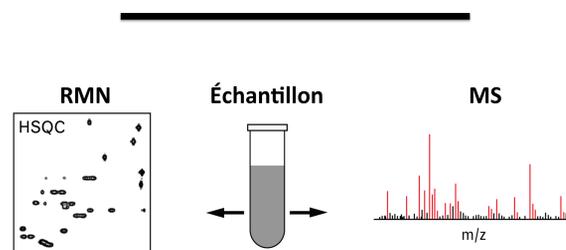


Figure 2. Applications de la spectrométrie de masse et de la RMN en métabolomique. Adapté de Bingol et al.

Tableau 1. Avantages et limitations des approches par RMN et MS en métabolomique. Adapté de Bonneau et al.

	RMN	MS
Aspects expérimentaux		
Réglages pour biofluides	1D ¹ H and 1D ³¹ P 2D CPMG 2D HSQC 2D COSY 2D TOCSY	GC/LC/CE-MS ESI-Q-TOF ESI-Q-orbitrap MALDI-TOF
Réglages pour biopsie	HRMAS	MALDI-TOF
Réglages pour études in vivo	Possible avec MRS	Non
Détection moyenne de métabolites	< 200	500+
Équipement		
Coût de l'équipement	Très élevé	Modéré à élevé
Coût de maintenance	Élevé	Modéré
Analyses automatisées	Oui	Oui
Temps expérimental	5 minutes pour 1D Jusqu'à 60 minutes pour 2D	Jusqu'à 60 minutes si combiné à de la chromatographie
Avantages généraux		
	Non-destructible	Applications larges
	Intrinsèquement quantitatif	Très sensible (pg-ng)
	Préparation minimale	Haute résolution
	Robuste et reproductible	Détection élevée de métabolites
	Utilisable sur tout type de biofluide	Peut être couplé à des méthodes de séparation
Limitations générales		
	Résolution modérée à cause de la superposition de pics	Méthode destructive
	Faible sensibilité (µg)	Reproductibilité modérée pour les biofluides avec des sels
	Détection basse de métabolites	Biais de détection (mode positif ou négatif)
	Très dispendieux	

Tableau 2. Sommaire des métabolites identifiés par métabolomiques et associés à des complications de transplantation. Adapté de Bonneau et al.

Complication	Matrice	Métabolites
Rein		
Domage ischémique	Urine	TMAO, DMA, acétate, lactate, citrate
Domage ischémique	Plasma	TMAO, allantoiné, inosine, hypoxanthine, glucose, lactate, lipides, adénine, guanosine, urate, polyols, prostaglandines, kynurenine, citrulline
Domage ischémique	Tissu	ATP
Rejet	Urine	Kynurenine, phosphatidylcholines, proline, dérivés d'acides aminés
Rejet	Sérum	Acides aminés, carbohydrates, lipides, métabolites de la flore intestinale, métabolites cataboliques, kynurenine
Délai reprise de fonction	Urine	TMAO, créatine, créatinine, hippurate, mannitol, acétate
Délai reprise de fonction	PM	Glutathion, glucose, leucine, inosine, gluconate
Tox. immunosuppresseurs	Urine	Glucose, TMAO, citrate, lactate, 15-F _{2t} -isoprostane, hippurate, inositol, créatinine, succinate, α-ketoglutarate, créatine, TMA, taurine
Tox. immunosuppresseurs	Plasma	Créatinine, TMAO, glutathion
Tox. immunosuppresseurs	Sérum	Lipides, glucose, hypoxanthine, lactate, succinate, taurine
Foie		
Domage ischémique	Plasma	ADMA
Domage ischémique	Sérum	Acides gras, carbohydrates
Domage ischémique	Tissu	Urée, acides biliaires, acide homovanillique, méthionine, glutathion réduit, formate, orthophosphate, ADP, lactate, pyruvate, glycérol, fumarate, succinate
Domage ischémique	PM	Lactate, urée, acides biliaires
Rejet	Bile	Acide biliaire conjugué à la taurine
Délai reprise de fonction	Tissu	Acides biliaires, xanthine, acide urique, kynurenine, 3-nitrotyrosine, acide 4-hydroxy-3-méthoxymandélique
Coeur		
Rejet	Urine	Nitrate
Rejet	Plasma	Lipides, lipoprotéines, proline, glycine, sérine, phénylalanine, isocitrate
Rejet	Tissu	Phosphocréatine, ATP, N-acétylaspartate, myo-inositol, créatine
Poumon		
Domage ischémique	Tissu	Phénylalanine, tyrosine, acides gras
Domage ischémique	Liquide de préservation	Glutathion, uracil

Tableau 3. Utilité du dosage du TMAO pour le diagnostic et le suivi thérapeutique des patients avec atteintes rénales ou transplantation rénale. Adapté de Bonneau et al.

Condition	Signification	Niveau de TMAO
Normal	Protection des protéines et des acides nucléiques contre les altérations structurales causées par l'acide urique	Normal
Transplantation rénale	Marqueur de dommage médullaire rénal Marqueur d'intensification du stress oxydatif Associé à au dommage ischémique rénal Associé à la toxicité des immunosuppresseurs Associé à un délai de reprise de fonction	Augmenté
Maladies rénales chroniques	Corrélation inverse entre la concentration de TMAO et le DFG Risque de complications cardiaques	Augmenté

Tableau 4. Constitution de la banque d'échantillons de liquide de conservation de transplantation rénale à l'HMR

Information sur la banque d'échantillons	
Nombre d'échantillons (N)	169
Genre	
Homme	108
Femme	61
Temps d'ischémie moyen	
	11 heures et 3 minutes
Type de donneur	
Décès cardiocirculatoire	51
Décès neurologique	85
Donneur volontaire vivant	16
Inconnu	17
Reprise de fonction	
Immédiat	100
Lent	24
Inconnue	17
Nécrose	
Nécrose tubulaire aigue	28
Inconnu	17

Métabolomique en transplantation

Une multitude de métabolites ont été identifiés dans des études de métabolomiques effectuées lors de transplantation rénale, cardiaque, hépatique et pulmonaire, permettant de définir plusieurs complications post-greffe (Tableau 2):

- Dommages ischémiques
- Rejet du greffon
- Délai de reprise de fonction
- Toxicité des immunosuppresseurs

En transplantation rénale, le biomarqueur le plus commun correspond au triméthylamine-N-oxyde (TMAO). Le TMAO est un marqueur de dommages médullaire rénal et de stress oxydatif intensif. Des niveaux augmentés de TMAO dans l'urine et le plasma de patients greffés est associé à du dommage ischémique, de la toxicité aux immunosuppresseurs et au délai de reprise de fonction.

La kynurenine et le glutathion ont été identifiés dans les études de transplantation rénal, hépatique et pulmonaire. La kynurenine aurait un rôle immunomodulateur et serait diminué dans les cas de rejet rénal aigu. Le glutathion représente quant à lui la capacité de l'organe à se défendre contre les espèces oxygénées réactives. Le glutathion peut être utilisé comme un biomarqueur dont la concentration diminue en cas de dommage ischémique de l'organe.

Dosage du TMAO dans le liquide de conservation rénal

La présence de TMAO est associé à plusieurs conditions physiologiques et pathophysiologiques (Tableau 3). Le département de néphrologie de l'HMR possède une banque d'échantillon de liquide de conservation de reins (Tableau 4). Le dosage du TMAO dans ces échantillons pourrait permettre d'évaluer le dommage ischémique de l'organe avant transplantation et d'assurer au patient un suivi plus étroit ou encore un traitement au N-acétylcystéine.

Ainsi, nous avons initié à l'HMR le développement d'une approche de dosage du TMAO par LC-MS/MS. Le TMAO sera dosé suite à une séparation sur une colonne HILIC, ionisé par ESI et détecté en mode positif sans besoin d'extraction au préalable. La phase mobile est constituée eau/acide formique 0.1% (phase A) et d'acétonitrile (phase B).

Conclusion

La métabolomique représente une approche prometteuse pour l'identification de nouveaux biomarqueurs dans le contexte de la transplantation. La métabolomique peut être utilisée dans les milieux cliniques au Québec, ne requérant que des appareils de spectrométrie de masse et pourrait permettre d'identifier un grand nombre de nouveaux biomarqueurs. Il s'agit d'une approche parfaite pour les maladies complexes et multifactorielles comme la transplantation mais aussi les maladies cardiovasculaires et l'oncologie.

Référence

- Goldsmith et al. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. J Surg Res, 160(1): 122-132, 2010.
- Bingol et al. Two elephants in the room: new hybrid nuclear magnetic resonance and mass spectrometry approaches for metabolomics. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 18(5): 471-477, 2015.
- Bonneau et al. Metabonomics: Perspectives on potential biomarkers in organ transplantation and immunosuppressant toxicity. Clin Biochem, 49(4-5): 377-384, 2016