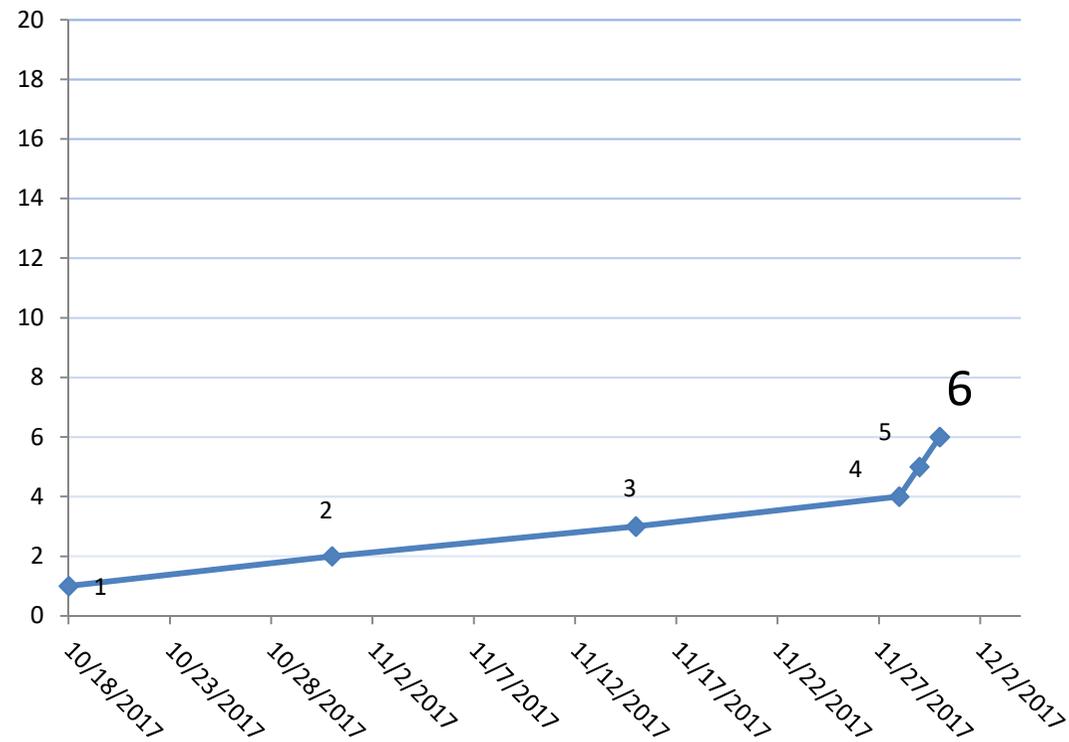


Quel choix d'étalons marqués aux isotopes stables pour
les acides aminés, acides organiques et acylcarnitines

Chris Ottolenghi, Christophe Merlette, Florence
Habarou, Clément Pontoizeau (Necker)



Nombre de laboratoires ayant répondu depuis la diffusion du questionnaire



COMMENT PROCEDER ?

METABOLOMIQUE CIBLEE EN URGENCE, KING'S COLLEGE

- Pas de dérivation ; précipitation méthanol (< 5 min)
- Colonne phase amphotère, élution isocratique, 15 min
- HPLC -QQQ haute sensibilité (API 6500 > API 5500, en cours : Shimadzu 8060, Xevo TQS)
- **N = 90 analytes en 1 run; rendu : 20 min**
 - acides aminés
 - acides organiques
 - acylcarnitines
 - marqueurs d'inflammation
- *N = 62 étalon internes marqués*

METABOLOMIQUE KING'S COLLEGE : EXTENSION

- Alloisoleucine et Isoleucine non séparées => LEU/ALA
ou :
 - **Mobilité ionique** (Selexion) (en cours)
 - **2-cétoisocaproïque, N-acétylleucine**
- Hors urgences : run supplémentaire 9 min sans acide formique pour acides organiques (**sensibilité +**)
- Conditions compatibles avec **peptidomique** en parallèle

DEUX QUESTIONS PRINCIPALES :

- *Design* ≥ 3 cocktails d'étalons marqués pour les acides aminés instables ou non-protéinogènes d'intérêt clinique
- *Design* ≥ 2 cocktails d'étalons marqués pour les acides organiques urinaire, et d'autres pour plasma/LCR ?

& Acylcarnitines : les kits existants sont-ils ok ?

Deux critères : prioriser les combinaisons en allant du plus important à prix raisonnable au moins important et/ou très coûteux

ACIDES AMINES :

- ne s'applique pas à la méthode de dérivation **Abi Sciex Atraq (Lille)**
 - POINT DE DEPART: 17 étalons d'acides aminés protéinogènes (Cambridge Isotopes Lab)
Ou bien 13 dans le kit MassChrom DPN (Chromsystems) + autre cocktail de 4 ?
- + cocktail d'étalons d'acides aminés protéinogènes instables (GLN, ASN, TRP)

Les 3 autres acides aminés protéinogènes (labiles)		Concentration finale μM	YOUR ADVICE / ALTERNATIVE PROPOSAL
Asparagine/ASN	Asparagine $^{13}\text{C}_4$	50	$^{13}\text{C}_4\text{D}_3\text{-}^{15}\text{N}_2$ / $^{15}\text{N}_2$
Glutamine/GLN	Glutamine 2,3,3,4,4-D5	50	$^{13}\text{C}_5\text{D}_5\text{-}^{15}\text{N}_2$ / D5
Tryptophane/TRP	Tryptophane Indole-D5	50	$^{13}\text{C}_{11}\text{-}^{15}\text{N}_2$ /D5

+ « cocktail 1 » : étalons d'acides aminés non-protéinogènes essentiels en IEM hors coûteux

+ « cocktail 2 » : étalons d'acides aminés non-protéinogènes moins importants ou coûteux

Cocktail « 1 »

Cocktail d'étalons internes marqués pour d'autres acides aminés essentiels dans les IEMs		Concentration finale μM	YOUR ADVICE / ALTERNATIVE PROPOSAL
Citrulline/CIT	Citrulline 5-13C5,5,4,4-D4	25 / 20	Oui / (C13)
Ornithine/ORN	Ornithine13C5	50 / 100	D6 / D6
Taurine /TAU	Taurine D4	25 / 100	13C2-15N / D4
Δ -aminolevulinic/DALA	Δ -aminolevulinic 13C5	25	
Sulfocysteine/S-Cys	S-sulfo-DL-Cysteine (2,3,3-D3)	25	oui
Pipecolic/PIP	Pipecolic D9	25 / 100	13C6-15N / D9
Allo-isoleucine/AILE	Alloisoleucine D10	25 / 100	oui / oui (***)
Homocitrulline/HCI	Homocitrulline 2H4	25	oui
Homocystine/HCY	Homocystine 3,3,3',4,4,4'-D8	25 / 50	Oui / oui
α -aminobutyrate			?
GABA			13C4

(***) : D10 = temps de rétention très anticipé / naturel

Cocktail « 2 »

Cocktail d'étalons internes marqués pour d'autres acides aminés essentiels dans les IEMs		Concentration finale μM	YOUR ADVICE / ALTERNATIVE PROPOSAL
Argininosuccinic	Argininosuccinic 13C615N4		
α -aminoadipic acid	α -aminoadipic acid D3	25	
Sarcosine/SAR	Sarcosine 13C3		
β -alanine/BALA	BETA-ALANINE (1,2-13C2, 99%; 15N, 98%)		
Cystathionine	DL-CYSTATHIONINE (3,3,4,4-D4, 98%)		
Phosphoethanolamine	? *		
Formiminoglutamic	? *		
β -aspartyl glucosamine	? *		
Glycylproline/GLY-PRO	? *		

ACIDES ORGANIQUES URINAIRES :

DILEMME : étalons internes marqués à utiliser

- 1) Systématiquement pour toutes les CAOs ?
- 2) En deuxième intention et/ou à la demande ?

A Necker :

Quantification relative automatique systématique (ciblée) :

- 63 métabolites vérifiés manuellement (72 pics)
- dont 34 en commun avec deux autres labos
(13-14 quantifiés systématiquement, 20-21 selon chromatogramme)
- + 12 non vérifiés manuellement (total = 75)

ACIDES ORGANIQUES URINAIRES

COCKTAIL #1_étalons internes marqués aux isotopes stables "critiques" (kit n°1 à proposer)

Labeled internal standard	Qty/Tube (nmol) for urinary organic acid determination	YOUR ADVICE / ALTERNATIVE PROPOSAL
2-Ketoisocaproic 13C6	10	oui / ok
3OH Isovaleric, methyl 13C3	10	/ ok
Adipic 13C6	15	oui / ok
Fumaric 13C4	5	oui / ok ou D2
Glutaric Acid D4	10	oui / ok
Hexanoyl Glycine 13C2; 15N	5	oui / ok
Malic 13C4	20	/ ok
Methylcitric D3	10	/ ok
Methylmalonic 13C4	25	oui / D3 (Sigma)
Malonic 13C3	25	/ ok
Thymine 13C5,15N2	10	/ ok
N-AcétylAspartate D3	25	oui / ok
N-(3-Methyl-1-oxo-2-butenyl)glycine-13C2,15N	10	/ ok
4,6-Dioxoheptanoic Acid-13C7	20	/ ok
3-OH-glutaric D5	to be tested	oui / ok

COCKTAIL #2_étalons internes marqués aux isotopes stables "moins critiques" (kit n°2 à proposer)

Labeled internal standard	Qty/Tube (nmol) for urinary organic acid determination	YOUR ADVICE / ALTERNATIVE PROPOSAL
3-Methylglutaconic 13C2, 3-methyl13C	10	/ ok
6-OH-Hexanoic D10	10	/ ok
Isovaleryl-N-Glycine 13C2; 15N	7.5	Oui / ok
Succinic 13C4	20	Oui / ok ou D4
2-OH-Glutaric D3	25	Oui / ok
2-OH-Isovaleric 13C5	test under way	/ ok
Propionylglycine 13C2; 15N	test under way	/ ok
URACIL 13C4 15N2	to be tested	/ ok
OROTIC U-13C5 ou (2-13C;1,3-15N2)	to be tested	Oui / ok 1,3-15N2
...		

Acylcarnitines plasma (& urine)
Acylcarnitines buvard

KIT NSK-B (Cambridge Isotope Labs)		
Labeled Standard	Acronym	nmol/mL
2H9-Carnitine (free carnitine, CN)	C0-D9	152
2H3-Acetylcarnitine	C2-D3	38
2H3-Propionylcarnitine	C3-D3	7.6
2H3-Butyrylcarnitine	C4-D3	7.6
2H9-Isovalerylcarnitine	C5-D9	7.6
2H3-Octanoylcarnitine	C8-D3	7.6
2H9-Myristoylcarnitine	C14-D9	7.6
2H3-Palmitoylcarnitine	C16-D3	15.2

KIT NSK-B-G1 (Cambridge Isotope Labs)		
Labeled Standard	Acronym	nmol/mL
2H3-Glutarylcarnitine	C5DC-D3	15.2
2H3-Hydroxyisovalerylcarnitine	C5OH-D3	7.6
2H9-Dodecanoylcarnitine	C12-D9	7.6
2H3-Octadecanoylcarnitine	C18-D3	15.2
2H3-Hydroxypalmitoylcarnitine	C16OH-D3	15.2

Kit MassChrom pour le
dépistage néonatal
(Chromsystems)

Mix EI AA+AO +Succinylacétone
Labeled Standard
C0-D9
C2-D3
C3-D3
C4-D3
C5-D9
C5DC-D6
C6-D3
C8-D3
C10-D3
C12-D3
C14-D3
C16-D3
C18-D3

CONCLUSIONS :

- 1) Attention aux marquages M+1 ou M+2 !!
- 2) Consensus / cocktails ?
- 3) Comment placer ce consensus en rapport aux approches métabolomiques imminentes ?