

La métallomique ou la spéciation des éléments traces *in vivo*

Ryszard Lobinski

Résumé

Cet article présente un bref aperçu des avancées récentes dans la méthodologie analytique pour la détection, l'identification et la quantification des formes chimiques des métaux à l'état de traces en milieu biologique. Les derniers développements des interfaces entre les techniques séparatives utilisées en protéomique et métabolomique et la spectrométrie de masse à plasma (ICP-MS) font de celle-ci la technique pivot de la détection ultrasensible, spécifique et quantitative *in vivo* des biomolécules contenant dans leur structure un métal ou un métalloïde. L'utilité de ces avancées méthodologiques en biotechnologie environnementale (bioremédiation) et agroalimentaire (nutrition fortifiée) ainsi qu'en toxicologie environnementale et clinique est soulignée.

Mots-clés

Métaux, analyse de traces, spéciation, biomolécules, métallomique.

Abstract

Metallomics or *in vivo* speciation of trace elements

Recent advances in analytical approaches to the detection, identification and quantification of metal species in life sciences are discussed. New developments in interfaces between separation techniques used in proteomics and metabolomics and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) make the latter a linchpin analytical technique for the ultrasensitive, specific and quantitative detection of metal (or metalloid)-containing biomolecules. The potential of these developments for research on new environmental (bioremediation) and nutrition (fortified food) biotechnologies and in environmental and clinical toxicology is highlighted.

Keywords

Metals, trace analysis, speciation, biomolecules, metallomics.

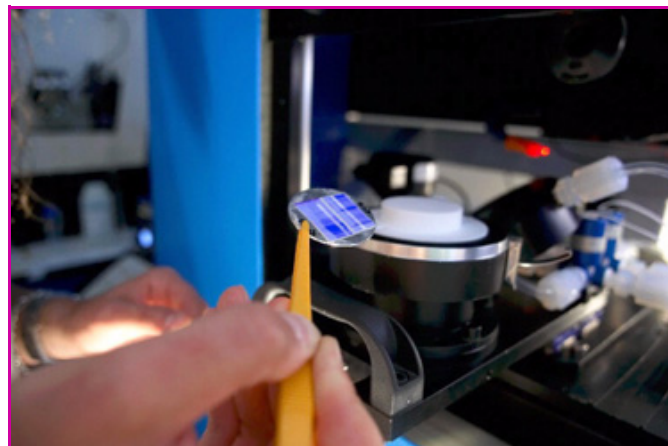
La chimie des ions métalliques a joué un rôle clé dans l'évolution biochimique [1]. Les éléments à l'état de traces dits essentiels (Fe, Cu, Co, Mo, Zn) ou bénéfiques (V, Cr, Ni, Se, B) sont utilisés par la nature pour remplir des fonctions spécifiques vitales, tandis que les éléments dit toxiques (Cd, Hg, Pb, Al, As) font l'objet d'une préoccupation constante et d'une attention particulière.

Les voies de sélection des éléments par une cellule à partir de l'environnement ont évolué pour donner lieu à une distribution élémentaire dans une cellule ou un tissu, appelé le métallome [1] ou l'ionome [2], par analogie à l'ensemble des protéines, le protéome. Des corrélations de plus en plus évidentes entre les métallomes et les génomes ont fait naître une discipline nouvelle : la métallomique [3-4], par analogie avec la protéomique et la génomique.

La connaissance de l'inventaire des éléments chimiques présents au sein d'un organisme vivant (plante, animal ou être humain), même déterminé très précisément, s'avère insuffisant pour la compréhension des mécanismes de biodisponibilité, d'assimilation, de toxicité et d'excrétion des éléments à l'état de traces. Le message clé pour la compréhension de la fonction spécifique d'un élément dans la nature est véhiculé par sa forme chimique : le degré d'oxydation, un environnement de coordination, une entité organométallique ou un complexe avec un bioligand. Ainsi sur le plan biologique, la toxicité éventuelle d'un élément ne peut être comprise que par la caractérisation des entités moléculaires impliquées dans le métabolisme biochimique qui interagissent avec cet élément. Les recherches visent les cibles protéiques des métaux (ex. protéines réceptrices, chélatantes, transporteurs) et l'étude des métalloprotéines

in vivo à des fins de rationalisation des processus cellulaires mis en jeu, de modélisation des scénarios d'exposition chronique ou d'intoxication aiguë, pour, à terme, élaborer des stratégies de prévention et de traitement [5-6].

La détection et l'identification des formes chimiques des métaux sont avant tout un défi analytique [7]. Le rôle déterminant a été joué par des avancées dans des techniques de couplage qui combinent à la fois un haut pouvoir de séparation de la chromatographie ou de l'électrophorèse capillaire et une grande sensibilité et sélectivité de la spectrométrie de masse, atomique (ICP-MS) ou moléculaire (électrospray MS/MS) [8].



Analyse des métalloprotéines dans un gel par ablation laser/ICP-MS.
© CNRS Photothèque/CHEZIERE Alexis.

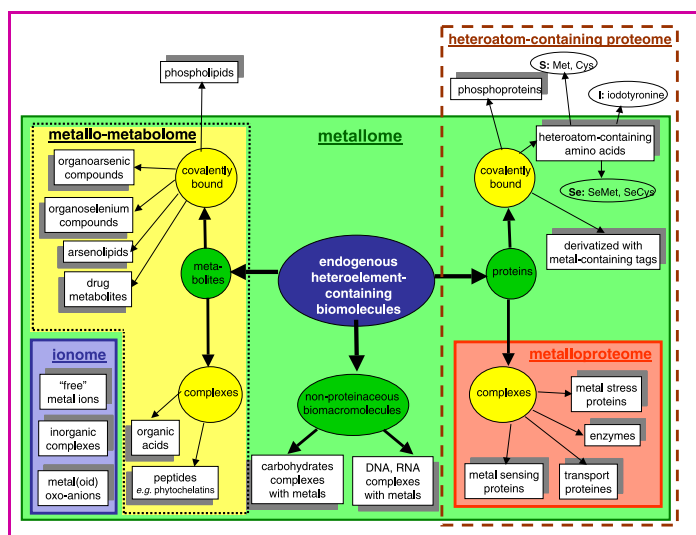


Figure 1 - Métallome et sous-métallomes : les formes chimiques des métaux en milieu biologique [8].

Le métallome : l'information recherchée

Les différentes catégories de biomolécules contenant dans leur structure un métal ou un métalloïde sont présentées dans la *figure 1* [8]. Elles vont de très petits métabolites vers des assemblées de metalloprotéines, et de composés thermodynamiquement très stables (où l'hétéroatome est incorporé par une liaison covalente) à des complexes de coordination labiles.

La détection, la recherche de l'identité et la détermination des quantités des metallobiomolécules nécessitent la considération de plusieurs questions. D'abord celle de la sensibilité adéquate de la détection. Les teneurs de la plupart des métaux essentiels dans des échantillons cliniques varient de 0,1 à 1 ng.g⁻¹. De plus, ces valeurs, qui représentent la somme de toutes les formes d'un élément, signifient que les composés individuels ont des concentrations encore plus basses. Lors de l'analyse d'un échantillon disponible en faible quantité (ex. tissu de biopsie, cellule individuelle, compartiments subcellulaires), la quantité de l'analyte à doser peut facilement descendre à des femtogrammes (10⁻¹⁵ g). La limite de détection de la technique analytique doit donc être encore plus basse, et ceci en présence d'une matrice biologique, par nature extrêmement complexe. Vu les problèmes connus de suppression d'ionisation électrospray ou MALDI (« matrix assisted laser desorption ionization »), la spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS) est souvent la seule technique capable de détecter le metallocomposé présent dans l'échantillon.

Le deuxième défi à relever est celui de la spécificité moléculaire. Les ligands, protéines ou métabolites complexant les métaux ont souvent des propriétés physico-chimiques très similaires. De plus, l'existence des isomères de position et des complexes de stœchiométries différentes avec le même ligand rendent souvent impossible la détection spécifique des metallobiomolécules individuelles. Le problème de la spécificité moléculaire peut être résolu par l'utilisation d'un spectromètre de masse moléculaire (électrospray ESI ou MALDI) qui, comme mentionné ci-dessus, manque souvent de sensibilité *in vivo*, ou bien

en précédant l'ICP-MS par une technique de séparation chromatographique ou électrophorétique.

Concernant l'identification, nous nous trouvons face à une recherche exploratoire, la plupart des formes chimiques des métaux restant encore inconnues, et donc les étalons indisponibles. La RMN, principale technique d'identification, n'étant pas suffisamment sensible, le recours à la spectrométrie de masse ESI ou MALDI devient obligatoire. Néanmoins, le succès ne peut être atteint qu'après l'isolement de la molécule d'intérêt par électrophorèse ou chromatographie multidimensionnelle sous suivi rigoureux de sa stabilité et du rendement en utilisant la détection par l'ICP-MS.

Et, « *last but not least* », il ne faut pas oublier que l'information sur la spéciation *in vivo* est actuellement obtenue pour des échantillons broyés. Dans ces conditions, des réactions d'un métal d'un compartiment cellulaire avec un ligand d'un autre compartiment peuvent donner lieu à la formation de nouveaux composés et provoquer une fausse interprétation des résultats observés par les techniques analytiques. D'où l'intérêt des méthodes directes, EXAFS (spectrométrie d'absorption des rayons X) ou microsonde ionique, permettant l'analyse *in situ* avec une haute résolution spatiale, souvent suffisante pour l'imagerie cellulaire [9].

L'ICP-MS et les limites de détection

Un saut quantitatif vers l'acquisition de l'information sur les formes chimiques *in vivo* n'est devenu possible que grâce à l'introduction de l'ionisation par un plasma à couplage inductif couplée à la spectrométrie de masse (ICP-MS). Dans cette technique, l'échantillon est introduit à très haute température (entre 6 000 et 10 000 °C) dans un plasma d'argon, où les composants chimiques de l'échantillon seront atomisés et ionisés. Les ions correspondant aux isotopes des éléments présents dans l'échantillon sont ensuite triés par un analyseur de masse pour produire un spectre de masse dans la gamme entre 5 (⁷Li, le plus léger) et 250 (²⁴²Pu, le plus lourd). Ce mécanisme d'ionisation très différent de celui de l'électrospray ou du MALDI, est caractérisé par :

- l'indépendance pratique de l'intensité du signal élémentaire de son environnement moléculaire et de la matrice, ce qui donne la possibilité de détecter et de quantifier le metallocomposé d'intérêt en milieu biologique complexe, et même sans que l'étalon soit disponible,
- de très basses limites de détection (dans des cas idéaux quelques attogrammes (10⁻¹⁸ g) d'élément),
- une spécificité isotopique et donc la possibilité d'utiliser la dilution isotopique pour la quantification.

La *figure 2* illustre cette haute sensibilité pour le dosage du plutonium dans l'urine (la courbe de calibration montrée a été obtenue dans la gamme 0,03-1 femtogramme !) [10] et pour le dosage du sélénium dans des cerveaux de mouches individuelles au niveau des picogrammes (10⁻¹² g). Le mode de détection (signaux transitoires) est directement applicable en chromatographie ou électrophorèse capillaire [11]. Ces très basses limites de détection du plutonium dans les fluides biologiques sont demandées par la médecine du travail dans le secteur nucléaire.

Bien évidemment, la haute température du plasma fait disparaître l'information moléculaire. Celle-ci ne peut être retenue que par l'introduction des metallobiomolécules dans le plasma de manière à ce qu'elles soient séparées dans le

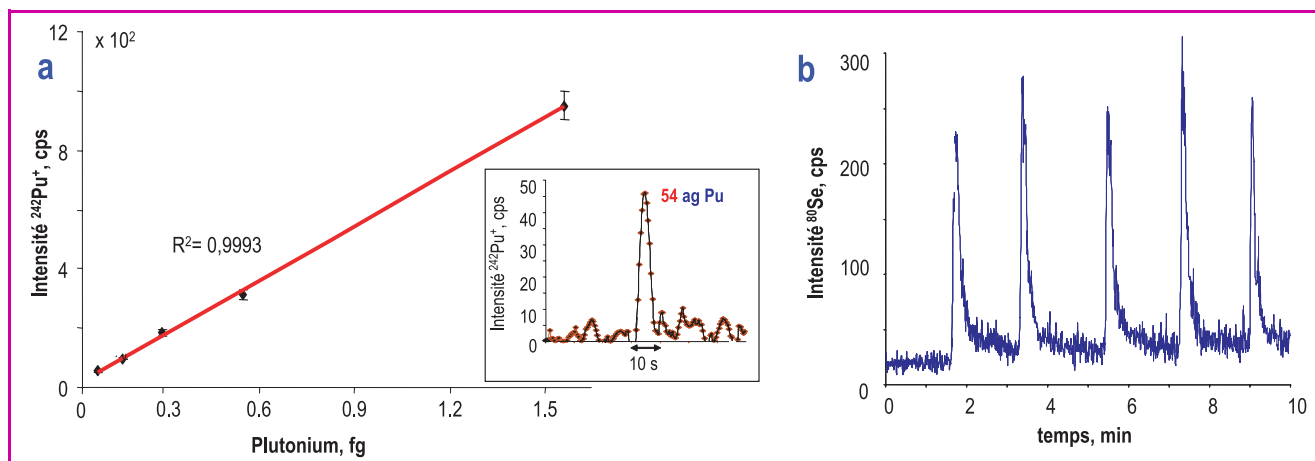


Figure 2 - Sensibilité de l'ICP-MS.

a) Courbe de calibration du ^{242}Pu . L'encadré présente un signal mesuré pour l'injection de 54 attogrammes de Pu [10] ; b) Analyse du sélénium dans le cerveau (digéré en 1 μL de $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$) d'une mouche. Les pics correspondent à 8 pg environ par cerveau [11].

temps (par chromatographie ou électrophorèse capillaire) ou dans l'espace (prélèvement d'échantillon des gels électrophorétiques par ablation laser). L'utilisation réussie de l'ICP-MS dans la métallomique est donc fortement dépendante de la conception et de la construction des interfaces adéquates entre la technique séparative et l'ICP-MS.

L'ICP-MS et la spécificité moléculaire : l'enjeu des interfaces

L'introduction d'un échantillon dans un plasma à couplage inductif s'effectue typiquement par la nébulisation d'une solution à $0,7\text{-}1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et la sélection de la fraction fine de l'aérosol (typiquement $< 5\%$) dans une chambre de nébulisation. Cette méthode est totalement inadéquate pour l'analyse de microéchantillons et des éluats des colonnes capillaires utilisées dans la protéomique et la métabolomique modernes. En effet, un volume mort significatif du système induit la dispersion et des pertes de l'analyte dans la chambre de nébulisation. D'où la nécessité de construire des micronébuliseurs qui fonctionneraient dans la gamme de débits inférieurs à $1\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Ils doivent se passer de la chambre de nébulisation pour éliminer des pertes et minimiser la dispersion de l'analyte, et donc diminuer les limites de détection. L'avantage de ce type d'interfaces est de pouvoir réaliser la détection en parallèle par l'ESI-MS, et donc une corrélation des données ou bien un constat d'une ionisation électrospray insatisfaisante de la biomolécule d'intérêt, pourtant bien visible dans le chromatogramme avec détection par l'ICP-MS.

La figure 3 montre un micronébuliseur à consommation totale fonctionnant dans la gamme de débits de $100\text{-}200\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ récemment développé pour le couplage nanoHPLC/ICP-MS [12] et le principe de l'approche parallèle ESI-MS et ICP-MS dans la détection des biomolécules possédant un hétéroatome dans leur structure [13].

Le couplage de l'électrophorèse capillaire avec l'ICP-MS, possible grâce au développement d'une interface dédiée [14], a permis par exemple l'analyse d'un mélange d'isoformes et des complexes mixtes de méthionine en utilisant seulement 20 nL de solution (figure 4). Le dosage simultané du métal et du soufre, souvent présent dans des protéines sous forme de cystéine ou méthionine, permet la

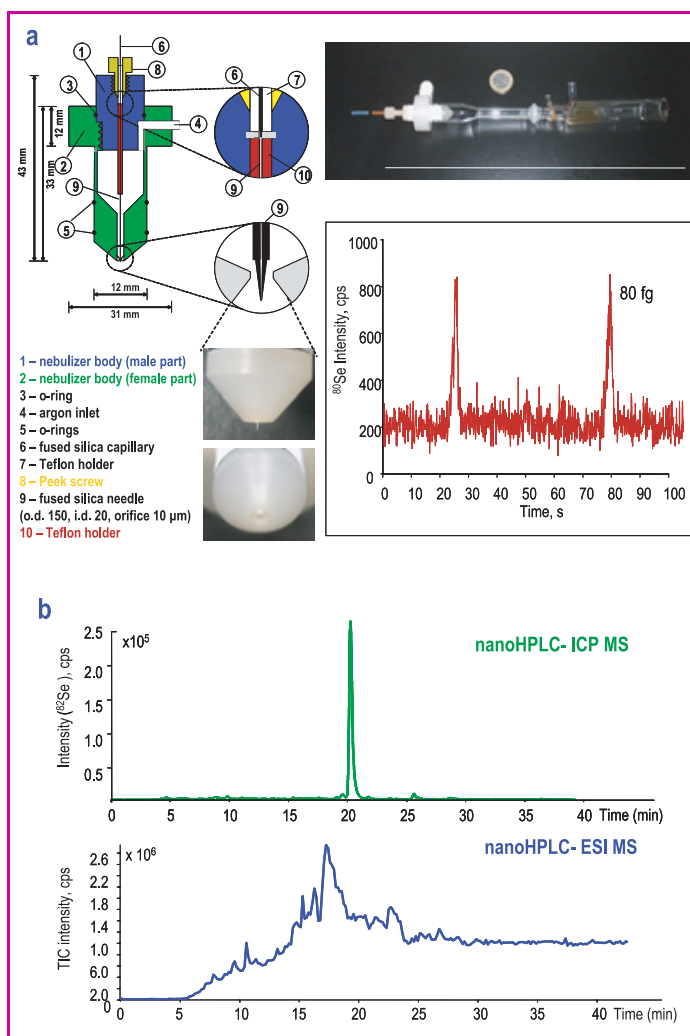


Figure 3 - a) Micronébuliseur à consommation totale développé pour le couplage nanoHPLC/ICP-MS. Le graphe en dessous de la photo présente deux injections successives de 80 fg de sélénométhionine [12] ; b) Concept de la détection parallèle par ICP-MS et ESI MS/MS en métallomique.

L'ICP-MS permet de détecter les métallocomposés présents (malgré une coélution des interférents) et de les quantifier. Elle montre ainsi les temps de rétention auxquels l'information moléculaire doit être recherchée dans le spectre par l'ESI-MS/MS. L'absence d'un signal ESI-MS témoigne de l'ionisation trop faible de l'analyte (intrinsèque ou à cause de la coélution d'autres composés).

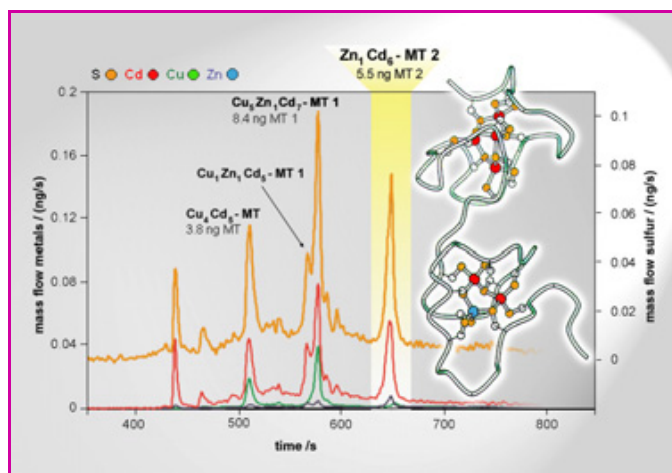


Figure 4 - Détermination de la stoechiométrie des complexes métal/métallothionéine par le couplage de l'électrophorèse capillaire et l'ICP-MS [15].

détermination de la stoechiométrie métal/protéine en ligne [15]. La caractérisation des complexes métal/métallothionéine est essentielle à la compréhension des mécanismes d'homéostasie et de détoxification des métaux lourds.

Une approche totalement différente a été développée pour permettre la détection spécifique des métallos ou des sélénoprotéines dans des gels 1D et 2D utilisés en analyse protéomique. Le gel est balayé par un faisceau laser et la matière ablatée est introduite en temps réel dans le plasma inductif. Un développement récent concerne l'utilisation d'un laser à haute cadence du tir (laser femtoseconde) associé à un scanner, ce qui permet d'augmenter la quantité de matière ablatée et d'améliorer la sensibilité d'un ordre de grandeur par rapport à l'utilisation d'un laser classique (nanoseconde). La figure 5 montre un exemple de la détection des isotopes du cuivre et du zinc dans la superoxyde dismutase (focalisation isoélectrique, laser nanoseconde [9]) et des protéines sélénées (laser femtoseconde [16]). La possibilité de détection des métallos et des sélénoprotéines *in vivo* amène une contribution nouvelle à l'élucidation des mécanismes d'essentialité et de toxicité des éléments à l'état de traces.

La spéciation *in vivo* et les préoccupations de la société

Bien que complexes en apparence, les techniques de couplage rentrent progressivement dans la routine analytique et permettent d'obtenir de l'information *in vivo* sur les formes chimiques des métaux en milieux biologiques. Leur maturité croissante commence à permettre des études interdisciplinaires dans différents domaines, tels que la toxicologie environnementale, bio- et plus particulièrement phytoremédiation, production des aliments fortifiés, ou pharmacologie et toxicologie clinique, résumées dans un article de synthèse récent [17].

La compréhension des modes d'action des toxiques (métaux lourds et éléments radioactifs) sur le vivant à différentes échelles (cellules, organes et tissus, organismes entiers) est l'un des objectifs de la toxicologie nucléaire. Les mécanismes d'accumulation des toxiques dans des compartiments cellulaires ou tissulaires et leurs conséquences ne peuvent être appréhendés que par l'information sur les formes chimiques. Il en va de même pour les voies d'entrée

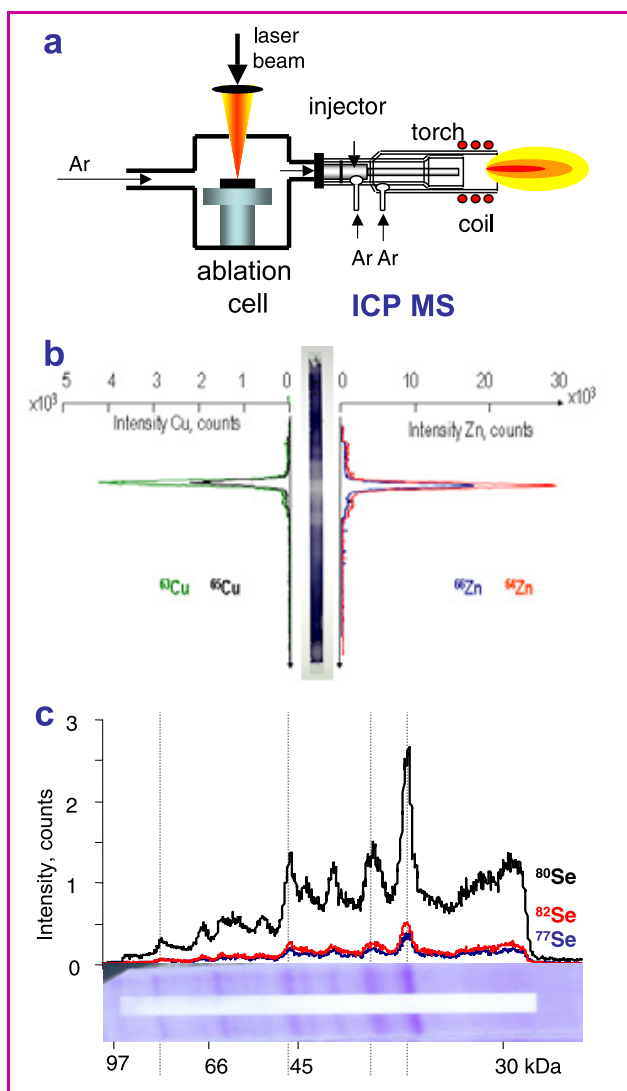


Figure 5 - Détection des métallos composés dans des gels 1D par l'ablation laser/ICP-MS.

a) Schéma de principe de la technique ; b) Détection du complexe de superoxyde dismutase avec le cuivre et le zinc séparée par la focalisation isoélectrique (IEF) (ablation laser nanoseconde) [9] ; c) Détection des protéines sélénées (séparées par 1D SDS) dans *E. coli* cultivé en milieu riche en sélénium (ablation laser femtoseconde). Les pics correspondent à quelques picogrammes du métal prélevé du gel [16].



Couplage de HPLC capillaire avec l'ICP-MS.

des toxiques métalliques dans le vivant (par exemple : le transfert du sol vers les plantes ou le transfert par voie alimentaire chez l'Homme).

L'utilisation des bioorganismes pour décontaminer ou dépolluer l'environnement (bioremédiation) ainsi que la production de nourriture fortifiée sont considérées comme faisant partie des dix biotechnologies clés pouvant améliorer l'état de santé dans les pays en voie de développement [18]. Ces deux applications nécessitent des mécanismes impliqués dans l'acquisition et l'homéostasie des minéraux. Ceci implique la compréhension des réseaux de gènes qui contrôlent la répartition des métaux, ainsi que la connaissance des formes chimiques de ceux-ci.

Enfin, les médicaments contenant un composé de métal comme principe actif sont de plus en plus utilisés en thérapie (par exemple, le cis-platine en chimiothérapie). Le suivi de la spéciation du composé administré est indispensable pour comprendre le métabolisme du médicament et ses interactions avec les cibles.

Conclusion

L'acquisition de l'information sur la distribution des métaux et de leurs formes chimiques à l'échelle des cellules, des tissus ou des organismes entiers (métallomique) devient l'un des objectifs phares des disciplines scientifiques très variées telles que toxicologie environnementale, bioremédiation, nutrition des plantes et biotechnologie alimentaire, pharmacologie et chimie clinique. Les avancées récentes dans la conception et la construction des interfaces entre des techniques séparatives à la spectrométrie de masse à couplage inductif (ICP-MS) permettent le développement de méthodes analytiques de plus en plus performantes (sensibles et spécifiques) pour la spéciation *in vivo*. Des études interdisciplinaires basées sur ces méthodes sont en train de se mettre en place.

Références

- [1] Williams R.J.P., *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 216-217, p. 583.
- [2] Lahner B. et al., *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, p. 1215.
- [3] Haraguchi H., *J. Anal. At. Spectrom.*, **2004**, 19, p. 5.
- [4] Szpunar J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 378, p. 54.
- [5] O'Halloran T.V., Culotta V.C., *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, p. 25057.
- [6] Finney L.A., O'Halloran T.V., *Science*, **2003**, 300, p. 931.
- [7] Lobinski R., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 369, p. 113.
- [8] Lobinski R., Schaumlöffel D., Szpunar J., *Mass Spectrom. Rev.*, **2006**, 25, p. 255.
- [9] Lobinski R., Moulin C., Ortega R., *Biochimie*, **2006**, 88, p. 1591.
- [10] Schaumlöffel D., Giusti P., Zoriy M., Pickhardt C., Szpunar J., Lobinski R., Becker J.S., *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, p. 17.
- [11] Mounicou S., Schaumlöffel D., Lobinski R., **2006**, non publié.
- [12] Giusti P., Lobinski R., Szpunar J., Schaumlöffel D., *Anal. Chem.*, **2006**, 78, p. 965.
- [13] Giusti P., Schaumlöffel D., Preud'homme H., Szpunar J., Lobinski R., *J. Anal. At. Spectrom.*, **2005**, 21, p. 26.
- [14] Schaumlöffel D., Prange A., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1999**, 364, p. 452.
- [15] Szpunar J., Lobinski R., Prange A., *Appl. Spectrosc.*, **2003**, 57, p. 102A.
- [16] Ballihaut C., Pécheyran C., Mounicou S., Preud'homme H., Grimaud R., Lobinski R., *Trends Anal. Chem.*, **2007**, sous presse.
- [17] Szpunar J., *Analyst*, **2005**, 130, p. 442.
- [18] Daar A.S., Thorsteinsdottir H., Martin D.K., Smith A.C., Nast S., Singer P.A., *Nat. Genet.*, **2002**, 32, p. 229.

L'équipe de recherche

Les travaux de l'Équipe de Chimie analytique bio-inorganique⁽¹⁾ (au sein de l'URA 348 à l'Université Bordeaux 1 et ensuite à l'EP 132 et à l'UMR 5034 à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour) portent sur le développement des outils analytiques innovants pour l'identification et la quantification spécifique des formes chimiques des métaux et des métalloïdes en milieu biologique (spéciation, métalloprotéomique et métallomique). Ces approches sont basées sur les techniques de couplage qui combinent à la fois l'efficacité de séparation de la chromatographie ou de l'électrophorèse et la grande sensibilité, sélectivité de détection et précision de quantification (*via* la dilution isotopique) de la spectrométrie de masse, atomique (ICP MS) ou moléculaire (électrospray MS/MS).

Les méthodes développées sont ensuite adaptées à des études du métabolisme et de la biodisponibilité des éléments dans le cadre de problématiques interdisciplinaires, par exemple dans le cadre du programme InterOrganismes Toxicologie Nucléaire⁽²⁾. Un volet important est la valorisation des travaux *via* la cellule de valorisation Ultratrace Analyses Aquitaine (UT2A⁽³⁾), notamment dans les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique.

(1) www.web.univ-pau.fr/GCABI

(2) www.toxmuc-e.org

(3) www.univ-pau.fr/ut2a



L'équipe photographiée lors du 3^e colloque franco-espagnol à Oviedo (2004).

De gauche à droite : J. Ruiz Encinar, R. Ruzik, K. Polec-Pawlak, G. Ballihaut, B. Bouyssiere, F. Pannier, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, P. Giusti, Y. Ogra, R. Lobinski, L. Ouerdane, A. Polatajko, H. Preud'homme, O. Palacios, L. Tastet, M. Asztemborska, K. Krupczynska.



Ryszard Lobinski

est directeur de recherche au CNRS, au Laboratoire de chimie analytique bio-inorganique et de l'environnement à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour*. Il a reçu pour ses travaux la **Médaille d'argent du CNRS** en 2006 et le prix de la division Chimie analytique de la SFC en 1996. Il est également co-directeur de l'UT2A et président de la Division de chimie analytique de l'IUPAC.

* Laboratoire de chimie analytique bio-inorganique et environnementale, CNRS UMR 5254, Hélioparc, 2 avenue du Président Pierre Angot, Hélioparc, 64053 Pau.
Courriel : ryszard.lobinski@univ-pau.fr