

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2013...

N°

Thèse

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

FERMIER Brice
Né le 14 août 1983 à Montargis (45)

Présentée et soutenue publiquement le 18 octobre 2013

***Analyse comparative du métabolome de l'air exhalé de patients de réanimation,
intubés ventilés en état de choc et de patients programmés de bloc opératoire***

Président : Monsieur le Professeur Marc LAFFON

Membres : Monsieur le Professeur Jacques FUSCIARDI

Monsieur le Professeur Christian ANDRES

Madame le Docteur Martine FERRANDIERE

Madame le Docteur Hélène BLASCO

Remerciements

A Monsieur le Professeur Marc Laffon,
Vous me faites l'honneur de présider et de juger ce travail.
Merci pour votre aide précieuse à la construction et à la réalisation de ce travail.
Merci pour votre dynamisme et votre disponibilité tout au long de mon internat.
Merci pour toutes les connaissances que vous transmettez à vos internes.
Vous êtes un modèle d'investissement et de compétences.

A Monsieur le Professeur Jacques Fusciardi
Vous me faites l'honneur de juger ce travail.
Merci pour votre enseignement et votre soutien tout au long de mon internat.

A Monsieur le Professeur Christian Andres
Merci d'avoir accepté de juger ce travail.
Merci pour votre soutien et vos encouragements dans ce projet.
En espérant que notre collaboration pourra perdurer.

A Madame le Docteur Martine Ferrandière
Un énorme MERCI pour tout.
Tout d'abord merci pour la construction, la réalisation la finalisation de ce projet.
Merci pour ton aide constante, ta disponibilité, ton écoute, ta gentillesse.
Merci de transmettre ton savoir au quotidien, de faire partager tes immenses connaissances théoriques et ton sens pratique. Tu es un modèle pour de très nombreux internes qui ont travaillé sous ta responsabilité. J'espère continuer à travailler à tes côtés et que nos projets aboutiront.

A Madame le Docteur Hélène Blasco
Merci d'avoir accepté de juger ce travail.
Merci pour avoir cru en notre projet.
Merci pour ta disponibilité, et pour l'aide apportée à la réalisation de ce travail.

A Monsieur le Docteur Emmanuel Godat
MERCI pour l'initiation de ce projet.
Merci pour ton soutien constant, ta disponibilité, ton investissement.
Merci pour le partage de tes connaissances scientifiques.
Je suis admiratif de ta détermination pour changer de cursus, courage pour ton internat.

A l'équipe du département d'analyse chimique biologique et médicale 6^{ème} étage Bâtiment Vialle
Au Dr Emond merci pour votre participation a notre projet, et vos encouragements en fin de journée.
A Cinzia un grand merci pour ton travail et ta participation active à notre projet.
Merci pour ton accueil, ta gentillesse.
Merci pour ta disponibilité et pour ta patience pendant ses quelques (nombreuses) heures à travailler sur tes supers logiciels.
Merci aux thésardes du service.

A Jérôme Rollin merci pour ta disponibilité et pour le prêt de la boîte au -80°C .

A tous les médecins et à toutes les équipes soignantes que j'ai côtoyées pendant mon externat au CHU Mondor

Merci aux Dr Lagneau, Quenet et Rienzo de m'avoir transmis votre amour pour l'anesthésie réanimation.

Merci à Pierre (Aide soignant) en cardio 12^{ème} CHU Mondor pour m'avoir encadré pendant mon premier stage hospitalier.

A tous les médecins et à toutes les équipes soignantes que j'ai côtoyées pendant mon internat.

Aux Docteurs Delalande, Tao, Réa, M'Fam, Germain du CHR Orléans et merci aux équipes d'IADE et d'IBODE pour mon premier semestre.

Aux Dr Bodin, Lundi, Teutsch, Blanchard, Lahrimi, Cayrol, Hamm du CH Blois de m'avoir accueilli pendant mon internat et pendant des jours complémentaires, de m'avoir formé à l'ALR. Merci pour votre gentillesse. Merci également Aux IADE, IDE et IBODE.

Merci au Dr Chiron pour m'avoir permis de présenter au congrès de la SFAR.

A toutes les équipes du CHRU Tours.

Aux Professeurs Perrotin et Dequin, aux Docteurs Mercier, Legras, Masseret, Garot, Guillon, Jonas. Merci pour leur formation, pour leur rigueur.

Merci à toute l'équipe de la réanimation médicale pour leur gentillesse, leur compétence et désolé pour ses entrées nombreuses et nuits agitées passées avec vous.

Aux Dr Fabre, Leturgy, Dergham, Fakhreddine pour leur accueil en réa neurochir.

Aux Dr Legros, Fournier pour la transmission de leur connaissance.

A Madame le Dr Pujol pour ton dynamisme, ta pugnacité, ton écoute et ton côté « maman poule »

A toute l'équipe paramédicale du 8^{ème} étage Trousseau.

Aux équipes de bloc opératoires du CHU Bretonneau

A Monsieur le Dr Cordier

Merci à toi Michel pour encadrement et la confiance que tu as eu en moi. Tu es un exemple pour moi, j'ai beaucoup appris à tes côtés notamment ta maîtrise pour gérer le bloc, les équipes et ... (les 4 salles aussi).

Aux Dr Bensenouci, Jaber, MH Benardeau, Mangin, Libsig, Proust, Fournier pour la formation que vous dispensez.

Aux équipes de bloc opératoire de CHU Clocheville

Aux Dr Mille, Thévenin, Lesage, Martin pour m'avoir transmis vos connaissances

Aux Dr Crenn, Dubost et du Duchalais pour m'avoir appris l'installation et aussi pour le protocole « comme d'hab »

Au Dr Delplace pour ton enseignement et ma frayeur en Samu.

Au Dr Francis, notre collègue ivoirien, bravo pour ton courage.

Aux équipes paramédicales du CHU Trousseau : l'imagerie que l'on ennuie souvent, l'équipe IBODE de l'OTV, l'équipe de brancardiers.

Aux IADE IDE AS du Bloc 3^{ème} merci pour toutes ses heures de chirurgie, toutes ses blagues en SSPI.
A tous les élèves IADE maintenant diplômé (Julien, Dimitri, Karine ...)
Merci aux IADE de 12h pour ses longues nuits.

Aux Dr Anesthésiste de Trousseau, à tous merci mais vous êtes trop nombreux. Merci pour ces longues soirées de garde, pour vos conseils.

Merci Aux Dr Pallud, Couvret, Araci, Tricoche, Belze, Bault, Texier pour les 6 mois d'ortho-vasculaire
A monsieur le Dr Remérand pour votre enseignement.

A Monsieur le Dr Vesin

Merci a toi de transmettre tes connaissances toujours renouvelées et ta rigueur, merci de m'avoir permis d'effectuer mes prélèvements dans de bonnes conditions. J'espère que l'année qui vient nous permettra de travailler ensemble.

Aux Dr Marchand, Jeannon, Lathelize pour m'avoir permis de faire mes prélèvements.

A toute l'équipe de réanimation polyvalente du CH Blois, j'ai passé 6 mois très agréables à vos cotés malgré mes débuts Continuez, vous faites du super travail.

Merci aux Dr Jouet, Chekroun, Solo, Kauphy de m'avoir rapidement intégré.

Merci aux Dr Série, Chadda, Rouet, Hanna pour les connaissances que vous m'avez enseigné, pour votre expérience et pour toutes ses visites détendues.

Merci a toi Dr Marc Feller de m'avoir fait confiance, de m'avoir donné des responsabilités, bravo pour le travail que tu accomplis dans ton service, tu es quelqu'un de très bien.

A l'équipe de réanimation chirurgicale, merci de m'avoir supporté pendant deux semestres.

Merci pour votre travail au quotidien, souvent difficile.

Merci aussi pour ces après midi humides, colorées ou puants (marine en 1 et les mecs après david, bertrand ...).

Merci aux 2 secrétaires (Héloïse et Virginie) pour mes cassettes interminables et mes phrases incompréhensibles.

Merci aux Dr Barbaz, Bazin et Bénardeau, mes chefs préférés, toujours aussi compréhensibles, brillants, drôles ou pas toujours, dévoués, pointilleux (le codage !!!) et futur collègue surtout, j'ai hâte !!!

Merci au Dr ACTH pour ta spontanéité, tes connaissances, ta jovialité, je suis impatient de rejoindre l'équipe.

Merci au Dr FL, notre chef, merci pour l'ouverture de l'USCC et les premiers jours impossibles, merci pour ton humour et ton sens clinique. Merci de nous transmettre ton savoir faire, (mais SVP éteint ton téléphone).

Merci à toute l'équipe du Samu 37 pour ses sorties au fond du département et dans des endroits insolites. Merci au Dr Chiaroni pour sa présence et son oreille toujours attentive.

Merci à l'équipe des pièces détachées pour leur sympathie et pour leur accueil.

Merci à tous mes cointernes de promo HB, Joseph, benco, emma

Merci aux autres coniternes notamment juliette, micka, olivier, Alexandre, pascaline, béné pour mes absences répétés mes malades à technique ou à transporter et mes départs en plein après midi.

Merci à tous les autres internes/chef /IADE/IDE/kiné croisés dans les box ou dans les différents services Kevin, Clément, claire, Sophie M, Dr Mankikian, Dr Lagrenade, Dr Sunder, Dr Taillandier et LR titi.....

Merci spéciale a Nath pour être toujours présente, disponible et au petit soin pour notre matériel, sans toi ce projet serait encore dans les cartons.

Merci spéciale à Dodo, écoute attentive, toujours présente, qui règle tous nos petits problèmes, tu es le pilier du SAR 1.

Au revoir aux personnes proches qui nous ont quittés pendant ses années : Bertrand, pépé, mémé. Régis j'aurais aimé que tu sois présent aujourd'hui.

A mes parents

Merci pour l'éducation que j'ai reçu, pardon pour les moments difficiles que je vous ai fait subir (mauvais joueur, colérique). Merci pour les supers souvenirs familiaux qui sont toujours présents, merci pour votre disponibilité malgré la distance. Je vous aime. Merci pour tout.

A Serge et Isabelle

Merci pour votre soutien sans faille tout au long de ses 12 ans,
Merci pour les déménagements réguliers, les vacances partagés, les attentions répétés, votre présence constante. Merci de m'avoir intégré au sein de votre famille je vous serai éternellement reconnaissant.

Aux Dujardins

Merci d'avoir toujours été présent, disponible, attentif.
Merci de m'avoir choisi pour être parrain
Merci pour tous ses moments partagés en famille,
Les garçons, continuez de grandir et de rester sage, Mattis concentre toi.

A ma sœur et mes neveux

Merci de ton soutien, merci de tous ses souvenirs en famille.
Continue de prendre soin des enfants tout va s'arranger.
Baptiste/Alan vous pourrez toujours compter sur moi.

Au reste de la famille : la matriarche mémé, tata Rolande, Phil et tous les cousins.

Merci a la famille Moreau : Mémère, Yves, Arlette, mamie, Sophie, Nico et tous les autres
Merci pour votre soutien.

A mon Émilie qui m'a supporté pendant tout ce temps,

Merci de m'avoir toujours soutenu, merci pour tout sans toi je n'aurai jamais réussi.

Merci d'avoir toujours été présente malgré mes sauts d'humeur, et mes absences répétées.

Tu m'as donné deux enfants magnifiques, je suis fier de ce que l'on a réussi à construire.

Mes 2 anges merci pour tous ses moments de bonheur au quotidien malgré ces nuits fractionnées.

Je vous aime.

RÉSUMÉ

Analyse comparative du métabolome de l'air exhalé de patients de réanimation, intubés ventilés en état de choc et de patients programmés de bloc opératoire

Problématique : L'état de choc et les dysfonctions d'organes qui lui sont associées sont une cause importante de morbidité et de mortalité en réanimation. De nombreux signaux moléculaires sont impliqués dans la pathogénèse de ces dysfonctions, notamment la dysfonction respiratoire. La prise en charge optimale de ces patients va nécessiter une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'infection et de l'inflammation. L'analyse métabolomique qui combine chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse est en plein essor. Elle permet d'appréhender l'ensemble des métabolites, qu'ils soient substrats, produits ou cofacteurs impliqués dans les réactions enzymatiques ou chimiques, et de définir un profil métabolomique spécifique d'une population. L'analyse métabolomique peut être ciblée sur la recherche d'un biomarqueur connu ou conduite de façon plus globale à la recherche de molécules d'intérêt différenciant deux populations.

Objectif : Le but de cette étude prospective était de démontrer une différence de profils métabolomiques entre des patients ventilés, programmés au bloc opératoire pour une chirurgie réglée et des patients de réanimation en état de choc avec dysfonction respiratoire.

Matériel et Méthode : Les condensats d'air exhalé sont recueillis puis analysés en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (mode d'ionisation positif et négatif). Nous avons utilisé une analyse multivariée en OPSL-DA et utilisé R^2 ($> 40\%$) pour expliquer la variance du modèle et Q^2 ($> 50\%$) pour la capacité prédictive du modèle.

Résultats : Nous avons inclus 26 patients, 12 patients en état de choc et 14 patients de bloc opératoire. Nous mettons en évidence une différence significative sur les analyses multivariées : en mode positif, $R^2 = 78\%$ et $Q^2 = 75\%$; pour le mode négatif, $R^2 = 72\%$ et $Q^2 = 50\%$. Ces analyses ont également permis de mettre en évidence des métabolites d'intérêt (VIP).

Conclusion : Le profil métabolomique des condensats d'air exhalé de patients sains ventilés au bloc opératoire pour une chirurgie programmée est différent de celui de patients de réanimation en choc avec une défaillance respiratoire. Cependant, la différence de profil métabolomique entre ces deux populations n'est pas surprenante. L'étape suivante est d'identifier les métabolites d'intérêt qui les différencient. Ces métabolites pourraient être des biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques. Grâce à son caractère non invasif, le recueil des condensats d'air exhalé peut être répété sans risque, de la phase aiguë à la résolution de l'agression pulmonaire. L'analyse métabolomique globale pourrait permettre une meilleure compréhension de la mécanistique de l'inflammation pulmonaire et permettre la mise en évidence de nouvelles voies métaboliques.

Metabolomics Applied to Exhaled Breath Condensate of Ventilated Patients: Comparison between an Operating Room Population and an Intensive Care Unit Population with Shock and Respiratory Failure.

Rationale: Shock and associated organ dysfunctions is a major cause of morbidity and mortality in intensive care. Many molecular signals involved in the pathogenesis of these dysfunctions, including the respiratory one. Optimal care of patients with respiratory associated failure and shock will require a better understanding of mechanisms underlying response to infection and inflammation. The application of metabolomic profiling on biofluid is an emerging approach that provides biochemical profiles of low-molecular-weight endogenous metabolites. The extreme sensitivity of this technique combining liquid chromatography and mass spectrometry allows analysis of new biofluids such as exhaled breath condensate (EBC). Metabolomic analysis can be conducted in a targeted way (search for metabolites already known as biomarkers) or global (search for Variable Importance Parameters that may offer a more relevant, amplified signature).

Objective: The aim of this prospective study was to demonstrate a difference in EBC metabolomic profile between ventilated shocked patients and healthy ventilated patients of operating room.

Methods: EBC were collected during mechanical ventilation and analyzed by UPLC coupled with a Q Exactive Mass Spectrometer using an electrospray ionization in both positive and negative modes. We performed multivariate data analysis (OPLS-DA) using R^2 (>40%) and Q^2 (>50%) values as representative of the model quality (model's variance and predictive ability respectively). **Results:** We included 26 ventilated patients, 12 patients in shock and 14 patients of the operating room. We found a significant difference in multivariate analyzes and a correct predictability of our models ($Q^2 = 75%$, $R^2 = 78%$ and $Q^2 = 50%$, $R^2 = 72%$ for positive and negative electrospray ionization respectively). These analyze also highlight distinct metabolites of interest between the 2 populations.

Conclusion: The metabolomic profiles of EBC collected from intubated healthy patients ventilated in the operating room or from shocked patients with a respiratory failure are different. However, a difference in metabolomics between healthy individuals and those with critical illness is not surprising. The next step is to identify metabolites of interest that discriminate the 2 populations; metabolites that could be diagnostic or prognostic biomarkers. Thanks to its non-invasive nature, EBC collection can be renewed from acute phase to resolution of the respiratory associated failure of shock. Global metabolomic analysis could provide a better understanding of the pathogenesis of pulmonary inflammation and pave the way for new ways of regulation.

Analyse comparative du métabolome de l'air exhalé de patients de réanimation, intubés ventilés en état de choc et de patients programmés de bloc opératoire.

Introduction

L'état de choc et la dysfonction d'organes associée est une cause majeure de mortalité et de morbidité en réanimation. De nombreux signaux moléculaires sont impliqués dans la pathogénèse de ces dysfonctions entraînant une altération profonde du métabolisme cellulaire. L'état initial est une activation immunologique excessive par les médiateurs et les cytokines pro-inflammatoires entraînant une dysrégulation systémique et des défaillances organiques multiples. Les atteintes rénales et respiratoires sont les plus fréquentes. Le mécanisme spécifique de ces atteintes n'est pas encore élucidé, bien que de nombreuses cytokines et antigènes solubles aient été mis en évidence dans les lavages broncho-alvéolaires. Toutefois, ces marqueurs biologiques isolés ne permettent pas d'évaluer l'ensemble de la réaction pulmonaire et, par là même, de comprendre le mécanisme de cette défaillance respiratoire. L'analyse métabolomique, décrite en 1998 ¹ et actuellement en plein essor, pourrait nous permettre d'appréhender l'ensemble de ces modifications.

Dernière-née des approches « omiques », c'est-à-dire génomique (étude de l'ensemble des gènes), transcriptomique (étude de l'ensemble des ARN messagers) et protéomique (étude de l'ensemble des protéines), l'analyse métabolomique évaluée par chromatographie et spectrométrie de masse le métabolome, c'est-à-dire le spectre de l'ensemble des métabolites contenus dans un fluide biologique : urine, plasma, liquide cérébro-spinal (LCS), lavage broncho-alvéolaire, broyat cellulaire ². Les métabolites sont des substrats, produits ou cofacteurs de réactions enzymatiques ou simplement chimiques, impliqués dans les processus métaboliques. Le terme métabolite inclut par conséquent toutes les molécules de faible masse moléculaire (< 1500 Dalton), telles que les acides organiques, les sucres, les acides gras, les métabolites conjugués, les acides aminés mais aussi certains peptides (glutathion), les vitamines, les stéroïdes, les xénobiotiques et d'autres molécules ³. Ainsi, l'analyse métabolomique permet de mesurer les modifications de l'ensemble des métabolites d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme, secondaires à une variation de l'état physiologique, quelle qu'en

soit la cause (Figure 1) ^{4 5}. Elle permet donc à la fois une analyse globale (métabolome), mais aussi ciblée sur un métabolite particulier.

Concernant la pathologie pulmonaire, l'analyse métabolomique a été l'objet de nombreuses publications pour le suivi des patients asthmatiques ⁶, atteints de BPCO ⁷, exposés à des substances toxiques ou environnementales ⁸, atteints de pathologie néoplasique ⁹, ou de patients de réanimation avec une atteinte pulmonaire. Mais ces analyses, réalisées sur des condensats d'air exhalé ou de liquide de lavage broncho-alvéolaire, ne s'intéressaient qu'à certains métabolites déjà référencés (interleukine, récepteur soluble de Trem1) ¹⁰. Il n'existe pas de donnée concernant le métabolome d'origine pulmonaire dans l'état de choc. Pourtant son analyse pourrait être informative. Il a été montré, par rapport à des sujets sains, des métabolomes différents chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (analyse du LCS) ¹¹, avec une atteinte coronarienne tri-tronculaire (analyse du plasma) ¹² et chez des enfants atteints d'autisme (analyse des urines) ¹³. Des métabolomes différents ont été mis en évidence chez des patients atteints de pneumopathie (analyse plasma) ¹⁴ ou avec un sepsis (analyse urine) ¹⁵ en fonction du pronostic et de la mortalité à J₉₀.

Nous avons émis l'hypothèse que l'analyse métabolomique globale et ciblée du condensat d'air exhalé, non invasif par rapport au lavage broncho-alvéolaire, pourrait nous permettre d'étudier le mécanisme de l'atteinte pulmonaire associée aux états de choc. Toutefois, la première étape est de mettre en évidence un métabolome différent du condensat entre des patients en état de choc et des sujets contrôles.

C'est pourquoi, l'objectif de notre étude prospective a été de comparer le métabolome du condensat d'air exhalé de patients intubés ventilés en état de choc à celui de patients bénéficiant d'une chirurgie programmée sous anesthésie générale.

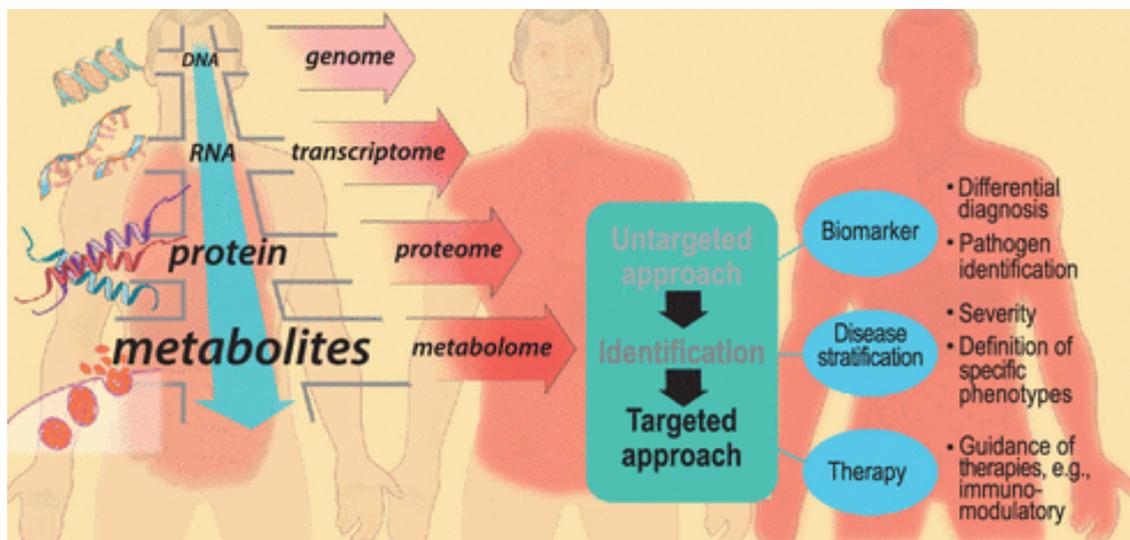


Figure 1 : représentation des différents processus entre ADN et métabolite, exploration ciblée ou globale et objectif de l'analyse des métabolites.

Matériel et Méthodes

Patients

Après information des patients ou de leur personne de confiance, 26 patients majeurs (dont 7 femmes non enceintes), non sous protection et ne recevant pas de gaz halogéné, ont été inclus. Ils étaient répartis en 2 groupes : 14 patients dans le groupe bloc (Grp b) et 12 dans le groupe réanimation (Grp r).

Les patients du Grp b bénéficiaient d'une chirurgie programmée sous anesthésie générale intraveineuse continue (propofol, rémifentanil) et d'une ventilation en oxygène-air. Le monitoring peropératoire était conforme aux bonnes pratiques pour le type de chirurgie et adapté aux antécédents du patient. En cas de pathologie pulmonaire préopératoire décompensée et d'hémodynamique instable peropératoire (nécessité d'amine pressive IV à la seringue électrique), les patients n'étaient pas inclus. Le condensat d'air exhalé était collecté dans l'heure suivant l'intubation, avant le début de la chirurgie.

Les patients du Grp r étaient hospitalisés en réanimation pour un état de choc. Ils bénéficiaient tous d'une sédation intraveineuse continue (midazolam, sufentanil) et d'une ventilation en oxygène-air. Le monitoring en réanimation était conforme aux bonnes pratiques et adapté à la pathologie du patient et à ses dysfonctions d'organes. En cas de syndrome de détresse respiratoire aiguë avec une pression artérielle en oxygène / fraction inspirée en oxygène (PaFi) < 100, le patient n'était pas inclus.

Dans les deux groupes, l'air et l'oxygène étaient délivrés sans polluant externe grâce au système des fluides hospitaliers ; les tuyaux du respirateur et la sonde d'intubation étaient identiques. Par ailleurs, les prélèvements de condensat étaient effectués dans la matinée pour éliminer un éventuel impact du rythme nyctéméral.

Condensat d'air exhalé

Le condensat d'air exhalé était recueilli grâce à un condensateur Ecoscreen™ (Viasys HealthCare, Hoechberg, Germany). Il est composé à 99,9 % de vapeur d'eau et contient des gouttelettes du liquide de revêtement épithélial, aérosolisé par la turbulence de l'air dans l'arbre bronchique lors de l'inspiration et de l'expiration^{13,14}. La condensation du flux d'air expiratoire s'effectue à -20°C dans un système de manchon réfrigéré avec valve à double voie anti-retour permettant le recueil du condensat dans une cupule en polypropylène préalablement stérilisée (Viasys Healthcare, Hoechberg, Germany) (Figures 2 et 2bis).

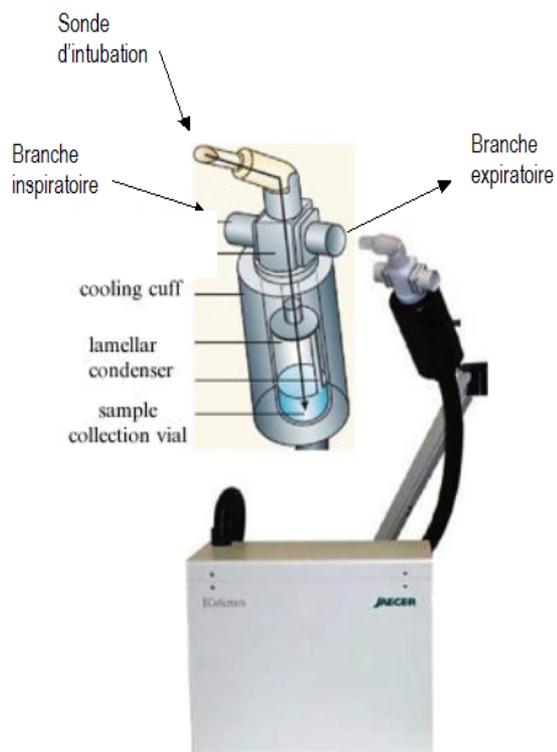


Figure 2 : Condensateur.



Figure 2 bis : Cupule de recueil du condensat.

Le condensateur était positionné sur les branches inspiratoire et expiratoire du circuit du respirateur ; le filtre antibactérien était placé à la fin de la branche expiratoire. Le manchon était connecté directement à la sonde d'intubation après clampage de celle-ci, afin d'éviter le dé-recrutement alvéolaire. Ce branchement permettait de recueillir l'aérosolisation pulmonaire (la vapeur d'eau des voies aériennes) directement, sans contamination oropharyngée. La durée de recueil était de 20 minutes, permettant de récupérer 3 ml de condensat répartis en 3 aliquots de 1 ml dans des Eppendorfs de 1,5 ml en polypropylène. A l'issue du recueil, le condensateur était retiré du circuit de ventilation sans dé-recrutement alvéolaire. Tout au long du recueil, la sécurité des patients était préservée par les précautions décrites en annexe 1.

Les trois aliquots étaient stockés dans un congélateur à -80°C . Pour l'analyse métabolomique, les condensats étaient transportés au laboratoire dans un conteneur isotherme rempli de carboglace. Ce mode de conservation assurait la stabilité des échantillons (études de stabilité extraites de données sur le stockage du LCS) ¹⁵.

Analyse métabolomique

L'analyse métabolomique des condensats était réalisée par chromatographie liquide UHPLC Ultimate 3000™ (Dionex Corporation, Sunnyvale, Californie, USA) couplée à la spectrométrie de masse par un spectromètre Orbitrap Q Exactive™ (ThermoFischer Scientific, San Jose, Californie, USA). Un mélange d'étalons internes a été ajouté à raison de 5 μL pour 195 μL d'échantillon biologique pour permettre un contrôle de stabilité de l'analyse. Pour la chromatographie liquide, l'analyse des échantillons a été encadrée par l'injection de 2 pools identiques pour permettre d'éliminer une modification d'ionisation. Le temps d'acquisition en mode positif était choisi à 20,5 min et à 10,3 min en mode négatif (annexe 3) avec un gradient comprenant une phase A aqueuse contenant 0,1 % d'acide formique et une phase B organique contenant de l'acétonitrile et 0,1 % d'acide formique (gradients représentés en annexe 2). Le débit d'ionisation était maintenu à 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ et le volume injecté était de 20 μL .

Les données obtenues par LC-MS étaient analysées par le logiciel SIEVE 2.0® (ThermoFischer Scientific, San Jose, Californie, USA) qui permettait d'effectuer un alignement chromatographique, d'extraire une liste d'ions selon le rapport de leur masse sur leur charge (m/z), le temps de rétention et l'intensité des ions. SIEVE 2.0® (ThermoFischer Scientific, San Jose, Californie, USA) réalise une matrice Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) complexe. Après une analyse manuelle permettant d'éliminer les signaux parasites correspondants aux bruits de fond, les données étaient analysées par le logiciel Xcalibur® (ThermoFischer Scientific, San Jose, Californie, USA). Ce logiciel permettait de vérifier que les pics correspondaient à des ions.

Données

Outre les données issues de l'analyse métabolomique, pour chaque patient, il était colligé les données suivantes : âge, sexe, motif d'hospitalisation, antécédents, traitements reçus sur les 24 dernières heures, délai depuis l'intubation. Les paramètres ventilatoires (VT, PEEP, FiO₂, pression de plateau), la température œsophagienne du patient et de la pièce étaient notés.

Analyse Statistique

Données patients

Les résultats sont exprimés en médiane [extrêmes]. Pour les comparaisons, un test de Mann et Whitney a été réalisé. Un $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

Données de l'analyse métabolomique

L'ensemble des données a été soumis à des analyses statistiques multivariées grâce aux logiciels SIMCA® (*Soft Independent Modelling by Class Analogy*) (Umetrics, Umea, Suède). L'analyse comportait

deux temps. Un premier temps descriptif, appelé analyse en composante principale (ACP), permet de décrire les données et de visualiser leur répartition spontanée selon les individus. Il ne nécessite pas d'information « a priori » sur la nature des échantillons. Le second consistait en une analyse explicative multivariée appelée OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis*). Un modèle de régression permet de séparer les individus inter- et intra-groupes, et de détecter les métabolites discriminants en fonction de leur puissance. Appelés VIP (*Variable Importance Parameters*), ces métabolites sont définis par leur rapport m/z.

La puissance de nos modèles était confirmée par des tests statistiques multivariés R² (coefficient de détermination) et Q² (paramètre de prédiction). Nous considérons le modèle robuste avec R² > 50 % et Q² > 40 %.¹¹.

Résultats

Patients et prélèvements

Les principales caractéristiques des vingt-six patients inclus, 12 dans le Grp r et 14 dans le Grp b sont résumés tableau 1. Les motifs d'hospitalisation étaient, en réanimation : 9 chocs septiques (7 secondaires à des péritonites et 2 à des pneumopathies), 1 choc anaphylactique, 1 choc hémorragique et 1 choc cardiogénique ; au bloc opératoire : 7 actes chirurgicaux sur l'artère fémorale (endartériectomie ou pontage), 6 interventions sur l'aorte et 1 phlébectomie. Ainsi, du fait de la pathologie, du type de chirurgie et des antécédents, les traitements reçus par les patients étaient différents en intra- et inter-groupe.

Pendant tous les prélèvements, nous n'avons noté aucune complication liée à la procédure de collection des condensats (cf. annexe 1). La technique de recueil a été jugée simple, reproductible et efficace, ne conduisant à aucune exclusion. Le volume de condensats d'air exhalé récolté en 20 min variait de 2 à 3 ml.

Analyse métabolomique

Les données de la LC/MS, après vérification de la stabilité des étalons internes, ont été analysées par le logiciel SIEVE 2.0® (ThermoFischer Scientific, San Jose, Californie, USA). Ce logiciel a permis d'identifier 10.972 pics chromatographiques pour le mode positif et 1.468 pics chromatographiques pour le mode négatif exprimés en ligne Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Après analyse manuelle des chromatogrammes, 1.762 ions en mode positif et 545 ions en mode négatif étaient retenus. Après traitement de ces derniers par le logiciel XCalibur® (ThermoFischer Scientific, San Jose, Californie, USA) et la recherche de l'enrichissement isotopique des ions, le nombre d'ions retenus était de 1.345 en mode positif et de 460 en mode négatif.

L'analyse multivariée OPLS-DA, effectuée par le logiciel SIMCA® (Thermofischer Scientific, San Jose, Californie, USA) sur la totalité des 1.345 ions retenus en mode positif, permettait d'obtenir une différenciation des 2 groupes. La robustesse de ce modèle de représentation des données est validée par la bonne valeur de R2 ($R^2 = 0,70$) indiquant que 70 % de la variance des données est expliquée par ce modèle ; $Q^2 = 0,42$ représente la capacité prédictive du modèle. La répartition des Grp b et r est illustrée par la Figure 3. Le groupe p (Grp p) correspondait aux patients groupés en pools pour l'analyse. Le regroupement en pool permettait de confirmer la fiabilité de l'analyse. Après élimination des pools et des ions avec faible variation et ayant un faible pouvoir de discrimination entre les groupes, 29 ions présentant un coefficient de variation > 1 , appelés VIP (*Variable Importance in Projection*), ont été retenus et sont représentés Figure 4. La robustesse de ce modèle de représentation des données est validée par la bonne valeur de R2 ($R^2 = 0,78$) indiquant que 78 % de la variance des données est expliquée par ce modèle ; $Q^2 = 0,75$ représente la capacité prédictive du modèle.

L'analyse multivariée OPLS-DA sur la totalité des 640 ions retenus en mode négatif permettait d'obtenir une différenciation des 2 groupes. La robustesse de ce modèle de représentation des données est validée par la bonne valeur de R2 ($R^2 = 0,72$) indiquant que 72 % de la variance des données est expliquée par ce modèle ; $Q^2 = 0,50$ représente la capacité prédictive du modèle. La répartition des groupes b et r est illustrée par la Figure 5. Après élimination des pools et des ions avec faible variation et ayant un pouvoir faible de discrimination entre les groupes, 60 ions présentant un coefficient de variation > 1 , appelés VIP (*Variable Importance in Projection*), ont été retenus et sont représentés Figure 6. La robustesse de ce modèle de représentation des données est validée par la bonne valeur de R2 ($R^2 = 0,61$) indiquant que 61 % de la variance des données est expliquée par ce modèle ; $Q^2 = 0,45$ représente la capacité prédictive du modèle.

Que ce soit en mode positif ou négatif, 3 patients (GJ, FL, DS) se situent en dehors de leur groupe. L'analyse du dossier clinique ne retrouve pas de caractéristique particulière pour les patients FL et DS ; pour le patient GJ, une maladie inflammatoire (sclérodermie) avec poussée datant de moins de 10 jours par rapport à l'inclusion est retrouvée.

Tableau 1 : Caractéristiques des patients. La donnée PaFi n'est pas documentée pour les patients du groupe bloc car ils ne bénéficiaient pas d'une gazométrie artérielle peropératoire.

	Groupe bloc (Grp b)		Groupe réa (Grp r)		p
	(n = 14)		(n = 12)		
Femme	1		6		
Homme	13		6		
Âge (années)	62	[49-83]	71	[53-89]	0,22
Paramètres respiratoires					
PEEP (cmH ₂ O)	5	[0-8]	5,5	[5-8]	0,018
Volume (L/min)	6,1	[4,0-7,6]	9,15	[6,9-11,6]	0,000914
FiO ₂ (%)	60	[50-60]	50	[33-80]	0,04
PaFi (mmHg)	-		232	[126-415]	-
Durée de ventilation (h)	0,75	[0,3-2,0]	20	[12-384]	0,00001
Pression de plateau (cmH ₂ O)	16,5	[14-20]	18	[16-28]	0,105
Température (°c)					
Patient	36	[35,7-36,6]	37,9	[36,3-39,9]	0,00003
Pièce	20	[20]	25	[24-26]	0,00012

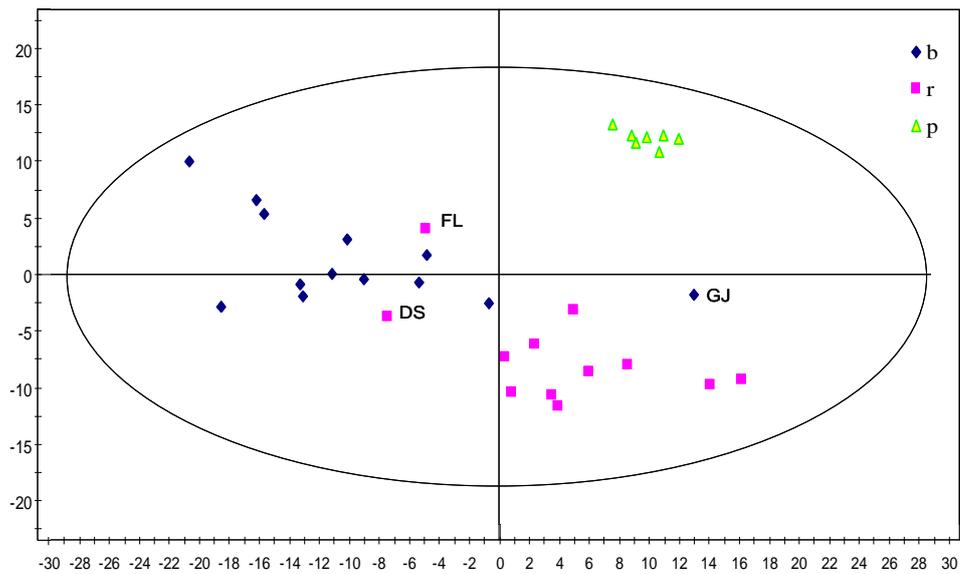


Figure 3 : Carte des similarités (« *Score Plot* ») après une analyse discriminante par OPLS-DA (losange bleu = Grp b ; carré rose = Grp r ; triangle vert = pools)

Un symbole correspond à un patient. Les 3 patients identifiés par leurs initiales sont des patients sortant de leur groupe.

Il n'y a pas d'unité sur les axes ; c'est un cercle entourant 95 % des projections des données.

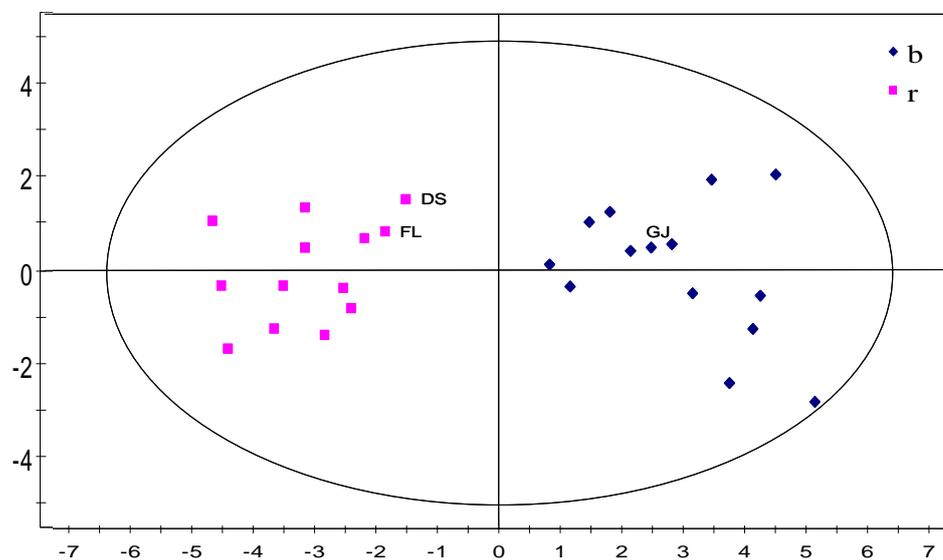


Figure 4 : Carte des similarités (« *Score Plot* ») après une analyse discriminante par OPLS-DA (losange bleu = Grp b ; carré rose = Grp r)

Un symbole correspond à un patient. Les 3 patients identifiés par leurs initiales sont des patients sortant de leur groupe.

Il n'y a pas d'unité sur les axes ; c'est un cercle entourant 95 % des projections des données.

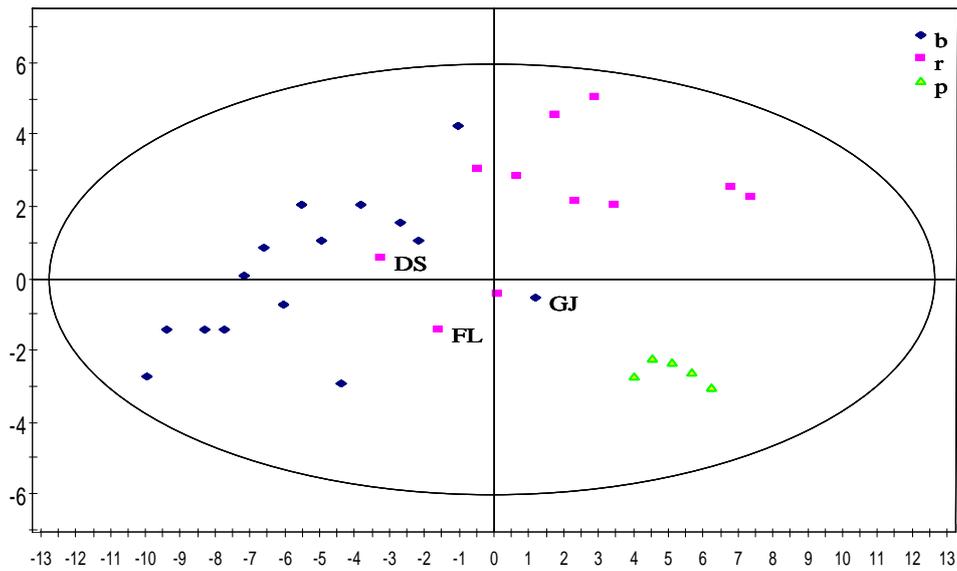


Figure 5 : Carte des similarités (« *Score Plot* ») après une analyse discriminante par OPLS-DA (losange bleu = Grp b ; carré rose = Grp r ; triangle vert = pools)

Un symbole correspond à un patient. Les 3 patients identifiés par leurs initiales sont des patients sortant de leur groupe.

Il n'y a pas d'unité sur les axes ; c'est un cercle entourant 95 % des projections des données.

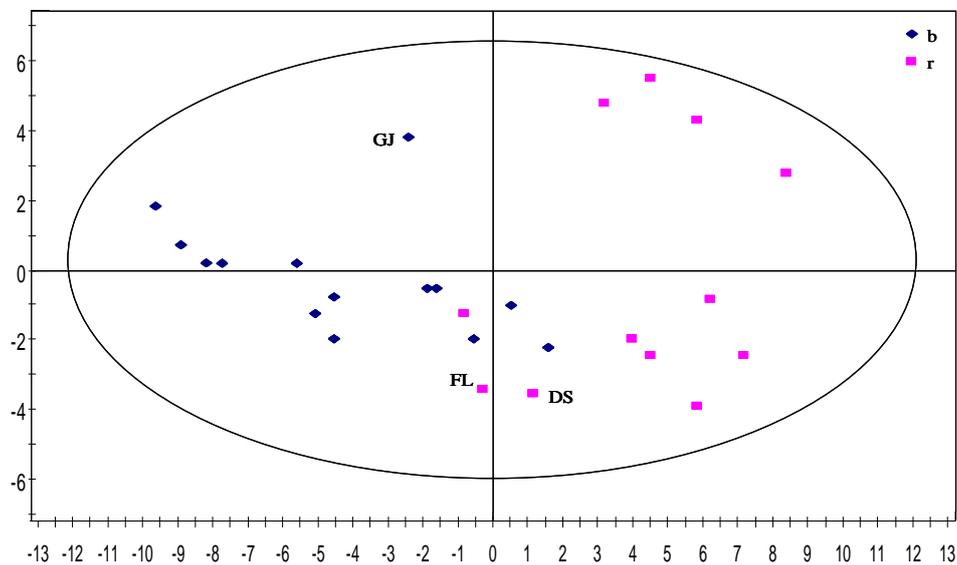


Figure 6 : Carte des similarités (« *Score Plot* ») après une analyse discriminante par OPLS-DA (losange bleu = Grp b ; carré rose = Grp r)

Un symbole correspond à un patient. Les 3 patients identifiés par leurs initiales sont des patients sortant de leur groupe.

Il n'y a pas d'unité sur les axes ; c'est un cercle entourant 95 % des projections des données.

Discussion

Notre travail est, à notre connaissance, la première étude de métabolomique globale sur les condensats d'air exhalé, comparant des patients intubés ventilés de bloc opératoire aux patients de réanimation en état de choc. Elle confirme que le recueil de condensats d'air exhalé de patients ventilés est applicable facilement au sein d'un service de réanimation. Elle met en évidence un métabolome différent des condensats entre les 2 groupes. Par ailleurs, ces métabolites d'intérêt, différents entre les 2 groupes, suggèrent que cette méthode pourrait aider à la compréhension des mécanismes de l'agression pulmonaire du patient de réanimation.

Pour l'analyse métabolomique du système pulmonaire, nous avons utilisé le recueil du condensat d'air exhalé. Il est composé à 99,9 % de vapeur d'eau contenant des gouttelettes du liquide de revêtement épithélial des voies aériennes avec les composés hydrosolubles ¹⁷. L'aérosolisation du liquide qui revêt les voies aériennes (*airway lining fluid*) se fait par la turbulence de l'air dans l'arbre bronchique lors de l'inspiration et de l'expiration ¹⁶. La recherche en pneumologie a beaucoup utilisée cette technique chez le patient en ventilation spontanée ^{6,7,8,9}. Sa réalisation chez le patient intubé permet d'éviter la contamination par la sphère oro-pharyngée et ainsi d'augmenter sa pertinence. L'utilisation de fluides médicaux normalisés et d'un matériel identique chez tous les patients (sonde d'intubation, circuit du respirateur), comme cela a été le cas dans notre étude, permet encore de diminuer la variabilité interindividuelle. Ces deux précautions permettent d'augmenter la probabilité que les métabolites d'intérêt mis en évidence ne soient pas secondaires à la seule différence des matériaux.

L'analyse métabolomique du lavage broncho-alvéolaire n'a pas été choisie, comme cela a déjà été rapporté ¹⁷ : cette méthode est plus invasive, parfois difficile chez le patient instable, peut modifier le comportement de la barrière alvéolo-capillaire et, par là même, les résultats de l'analyse. Le recueil de

condensat est non invasif : il peut donc être répété pour permettre un suivi du système pulmonaire et être interprété sans réserve.

L'analyse métabolomique des condensats requiert une grande rigueur durant toutes les étapes du processus. La sensibilité importante de la technique et la complexité de l'analyse peut biaiser les résultats. Des recommandations concernant le recueil (asepsie, standardisation des cupules), le stockage (- 70°) et l'analyse des condensats d'air exhalé ont été éditées par *The American Thoracic Society (ATS)* et de l'*European Respiratory Society (ERS)* en 2005 ¹⁷. Notre méthode standardisée, qui n'impliquait que deux expérimentateurs, était conforme à ces recommandations.

L'empreinte métabolomique des condensats chez les patients de bloc ou de réanimation était différente. De nombreuses différences opposent ces groupes (durée de ventilation, motif d'hospitalisation et traitements reçus). Le choix d'une approche métabolomique globale imposait la comparaison de groupes les plus semblables possibles. Ainsi, nos 2 groupes sont identiques sur toute la partie technique liée à la ventilation. Ils diffèrent par les traitements reçus dans les 24 heures précédant l'inclusion et dont on pourra tracer l'empreinte métabolomique. Ils diffèrent enfin par la défaillance hémodynamique et ventilatoire qui n'existe que dans le groupe réanimation. Notre hypothèse est que, une fois isolé ce qui dépend des traitements reçus, les métabolites d'intérêt retrouvés ne seront liés qu'à la pathologie respiratoire et hémodynamique. L'absence d'étude similaire rend difficile une discussion plus précise de ces résultats. Cependant, l'analyse métabolomique globale a déjà été réalisée pour la séparation de deux populations ne différant que par l'existence ou non d'une pathologie. En effet, une analyse métabolomique globale sur le LCS, de patient atteint ou non de SLA, a permis d'isoler les deux populations. L'analyse excluait 60 % et 80 % des chromatogrammes et obtenait des représentations OPLS-DA avec des seuils de $R^2 = 0,60$ et $Q^2 = 0,39$ ¹¹. Une analyse globale sur le plasma a permis

également de séparer une population avec atteinte coronarienne tri-tronculaire de celle à coronaire saine avec des scores de sensibilité et spécificité de 90 %¹².

Ces premiers résultats chez les patients de réanimation ouvrent de vastes champs d'investigations, d'autant que le métabolome des patients de chaque groupe semble similaire, hormis pour 3 patients. Les caractéristiques cliniques du patient GJ de bloc opératoire pourraient expliquer que son empreinte métabolomique soit proche des malades du groupe réanimation. Sa sclérodermie avec une poussée récente se rapproche peut-être des états inflammatoires des patients de réanimation. Pour les deux autres patients, nous n'avons pas d'explication. Un effectif plus important permettrait peut-être de proposer des variables explicatives.

Quatre-vingt-neuf métabolites d'intérêts ont été mis en évidence. Pour une complète validation de ces métabolites VIP présents dans chaque groupe, il faut identifier leur formule chimique afin de savoir si le métabolite VIP est le témoin d'une voie métabolique (physiologique ou non) ou le produit de dégradation d'un des médicaments administrés. Cette identification permettrait de connaître le retentissement de l'état de choc au niveau de la membrane alvéolo-capillaire.

Nous avons noté plusieurs limites à notre étude. Certes, nous avons mis en évidence une différence des métabolomes entre les deux groupes avec un faible effectif de patients mais la grande sensibilité de l'analyse métabolomique, le risque de biais à chaque étape de la technique et du traitement des données nécessitent un nombre plus important de patients par groupe. Si le traitement des données est effectué avec des logiciels de traitement adaptés, la sélection manuelle des chromatogrammes pour l'élimination du bruit de fond peut être imparfaite et modifier les résultats du métabolome ou des métabolites d'intérêts. Dans notre étude, la réduction des données par ce traitement manuel était de 65 à 85 %, comparable aux autres études de métabolomique globale ¹¹. Par ailleurs, les analyses multivariées en OPLS-DA sont également variables en fonction de la significativité des métabolites

sélectionnés. Dans notre étude, les seuils de significativité R2 et Q2 supérieurs respectivement à 50 et 40 % témoignent d'une puissance correcte pour des données biologiques.

En conclusion, notre étude montre que l'empreinte métabolique de condensats d'air exhalé chez des patients intubés de réanimation en état de choc est différente de l'empreinte métabolomique de patients sous anesthésie générale de bloc opératoire. L'étape suivante est d'identifier les métabolites d'intérêt qui différencient ces deux populations. Ces métabolites pourraient être des biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques. Grâce à son caractère non invasif, le recueil des condensats d'air exhalé peut être répété sans risque, de la phase aiguë à la résolution de l'agression pulmonaire. Nos résultats doivent toutefois être confirmés par un collectif de patients plus important. Ainsi, l'analyse métabolomique globale pourrait permettre une meilleure compréhension de la mécanistique de l'inflammation pulmonaire et permettre la mise en évidence de nouvelles voies métaboliques.

Bibliographie

- 1 Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B. and Baganz, R. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 16: 373–8.
- 2 Tweeddale, H, L Notley-McRobb, and T Ferenci. “Effect of Slow Growth on Metabolism of *Escherichia Coli*, as Revealed by Global Metabolite Pool (‘metabolome’) Analysis.” *Journal of Bacteriology* 180, no. 19 (October 1998): 5109–16.
- 3 Forster, J. « Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network ». *Genome Research* 13, n° 2 (1 février 2003): 244-53. doi:10.1101/gr.234503.
- 4 Keun, Hector C, Timothy M D Ebbels, Mary E Bollard, Olaf Beckonert, Henrik Antti, Elaine Holmes, John C Lindon, et Jeremy K Nicholson. « Geometric Trajectory Analysis of Metabolic Responses to Toxicity Can Define Treatment Specific Profiles ». *Chemical Research in Toxicology* 17, n° 5 (mai 2004): 579-87. doi:10.1021/tx034212w.
5. Raamsdonk, L M, B Teusink, D Broadhurst, N Zhang, A Hayes, M C Walsh, J A Berden, et al. « A Functional Genomics Strategy That Uses Metabolome Data to Reveal the Phenotype of Silent Mutations ». *Nature Biotechnology* 19, n° 1 (janvier 2001): 45-50. doi:10.1038/83496.
6. Carraro, Silvia, Serge Rezzi, Fabiano Reniero, Károly Héberger, Giuseppe Giordano, Stefania Zanconato, Claude Guillou, et Eugenio Baraldi. « Metabolomics Applied to Exhaled Breath Condensate in Childhood Asthma ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175, n° 10 (15 mai 2007): 986-90. doi:10.1164/rccm.200606-769OC.
7. Borrill, Z. L., K. Roy, et D. Singh. « Exhaled breath condensate biomarkers in COPD ». *European Respiratory Journal* 32, n° 2 (19 mars 2008): 472-86. doi:10.1183/09031936.00116107.

8. Syslová, K, P Kačer, M Kuzma, A Pankráčová, Z Fenclová, š Vlčková, J Lebedová, et D Pelclová. « LC-ESI-MS/MS method for oxidative stress multimarker screening in the exhaled breath condensate of asbestosis/silicosis patients ». *Journal of Breath Research* 4, n° 1 (1 mars 2010): 017104. doi:10.1088/1752-7155/4/1/017104.
9. Horvath, I., Z. Lazar, N. Gyulai, M. Kollai, et G. Losonczy. « Exhaled biomarkers in lung cancer ». *European Respiratory Journal* 34, n° 1 (30 juin 2009): 261-75. doi:10.1183/09031936.00142508.
10. Carter, Stewart R., Christopher S. Davis, et Elizabeth J. Kovacs. « Exhaled breath condensate collection in the mechanically ventilated patient ». *Respiratory Medicine* 106, n° 5 (mai 2012): 601-13. doi:10.1016/j.rmed.2012.02.003.
11. Blasco, Hélène, Philippe Corcia, Pierre-François Pradat, Cinzia Bocca, Paul H. Gordon, Charlotte Veyrat-Durebex, Sylvie Mavel, et al. "Metabolomics in Cerebrospinal Fluid of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Untargeted Approach via High-Resolution Mass Spectrometry." *Journal of Proteome Research* 12, no. 8 (August 2, 2013): 3746–54. doi:10.1021/pr400376e.
12. Brindle, Joanne T., Henrik Antti, Elaine Holmes, George Tranter, Jeremy K. Nicholson, Hugh W.L. Bethell, Sarah Clarke, et al. « Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabolomics ». *Nature Medicine* 8, n° 12 (25 novembre 2002): 1439-45. doi:10.1038/nm802.
13. Emond, Patrick, Sylvie Mavel, Nacima Aïdoud, Lydie Nadal-Desbarats, Frédéric Montigny, Frédérique Bonnet-Brilhault, Catherine Barthélémy, et al. "GC-MS-based Urine Metabolic Profiling of Autism Spectrum Disorders." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, no. 15 (June 2013): 5291–300. doi:10.1007/s00216-013-6934-x.

14. Seymour, Christopher W., Sachin Yende, Melanie J. Scott, John Pribis, Robert P. Mohnney, Lauren N. Bell, Yi-Fan Chen, et al. « Metabolomics in pneumonia and sepsis: an analysis of the GenIMS cohort study ». *Intensive Care Medicine* (15 mai 2013). doi:10.1007/s00134-013-2935.
15. Su, Longxiang, Lichao Cao, Ruo Zhou, Zhaoxu Jiang, Kun Xiao, Weijing Kong, Huijuan Wang, et al. « Identification of Novel Biomarkers for Sepsis Prognosis via Urinary Proteomic Analysis Using iTRAQ Labeling and 2D-LC-MS/MS ». Édité par John Matthew Koomen. *PLoS ONE* 8, n° 1 (23 janvier 2013): e54237. doi:10.1371/journal.pone.0054237.
16. Janicka, Monika, Agata Kot-Wasik, Jacek Kot, et Jacek Namieśnik. « Isoprostanes-Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Analysis ». *International Journal of Molecular Sciences* 11, n° 11 (17 novembre 2010): 4631-59. doi:10.3390/ijms11114631.
17. Horvath, I. « Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions ». *European Respiratory Journal* 26, n° 3 (1 septembre 2005): 523-48. doi:10.1183/09031936.05.00029705.
18. Wuolikainen, Anna, Mattias Hedenström, Thomas Moritz, Stefan L. Marklund, Henrik Antti, et Peter M. Andersen. « Optimization of procedures for collecting and storing of CSF for studying the metabolome in ALS ». *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10, n° 4 (janvier 2009): 229-36. doi:10.1080/17482960902871009.
19. Roux A, Lison D, Junot C, Heilier JF. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry* 2011;44: 119-35.

Annexe 1.

Sécurité

L'innocuité du système a été rapportée dans la revue de Stewart en 2011 qui n'identifie aucun incident sur les 10.000 prélèvements recensés ¹⁰, les risques possibles sont :

- l'extubation du fait du manque de souplesse du bras ;
- les problèmes de ventilation, de fuite du système ou de difficultés expiratoires liés à la valve à double courant ;
- les infections par la manipulation de la sonde.

Les deux premiers sont prévenus par la présence constante auprès du patient d'un membre de l'équipe soignante. Aucune extubation et aucun problème ventilatoire n'est à déclarer (fuites système < 50 ml).

Le troisième est limité par :

- le respect des conditions d'hygiène et du protocole de service lors des soins des patients ;
- l'utilisation de matériel à usage unique (tuyau et filtre) ;
- la désinfection rigoureuse du matériel ;
- la désinfection du dispositif et des cupules après chaque utilisation.

Cette stérilisation se fait en trois étapes selon un processus validé par le CLIN du CHU de Tours pour le bio-nettoyage des dispositifs médicaux invasifs non usage unique (cf. Figure 7).

MATÉRIEL SOUILLÉ

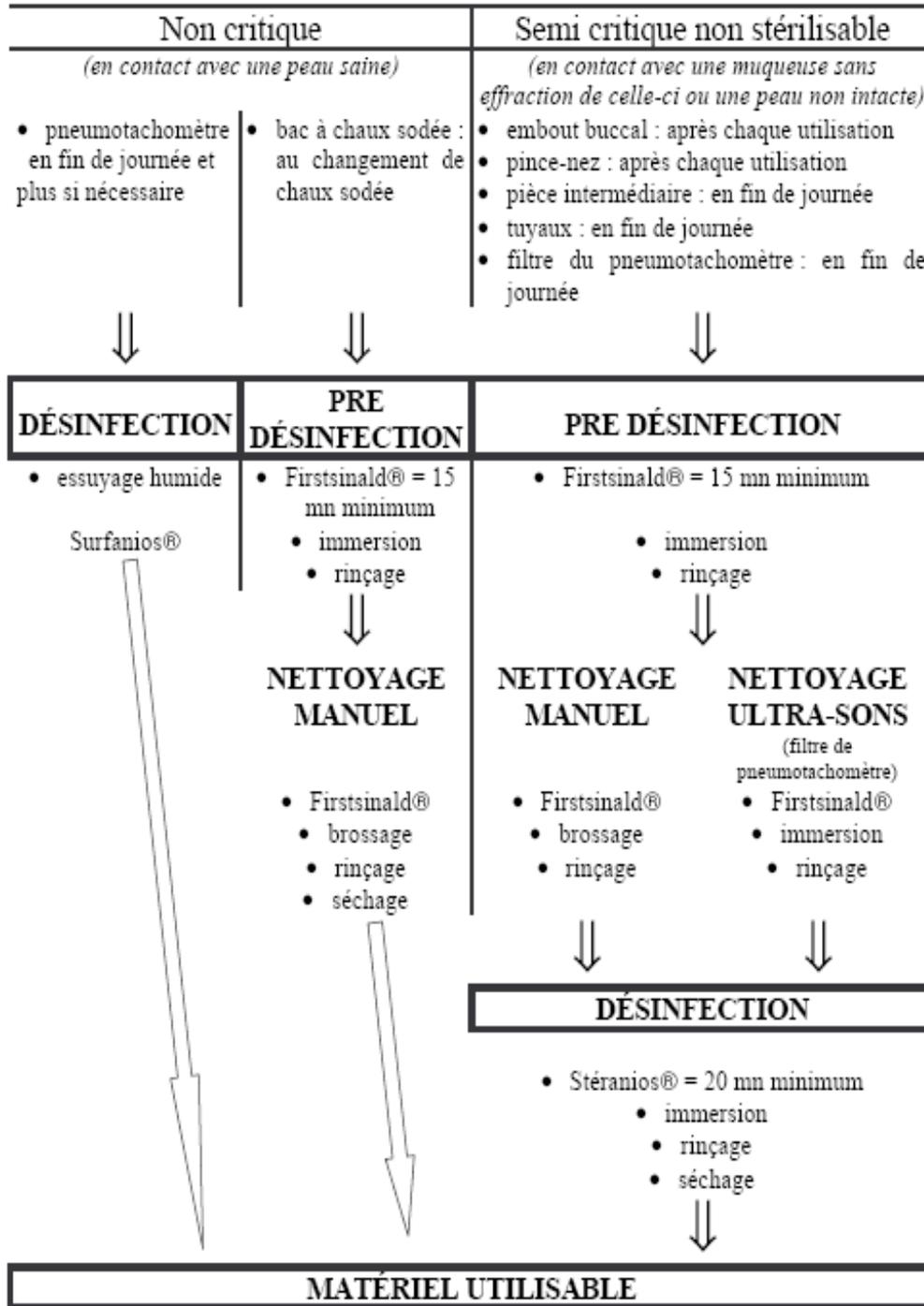
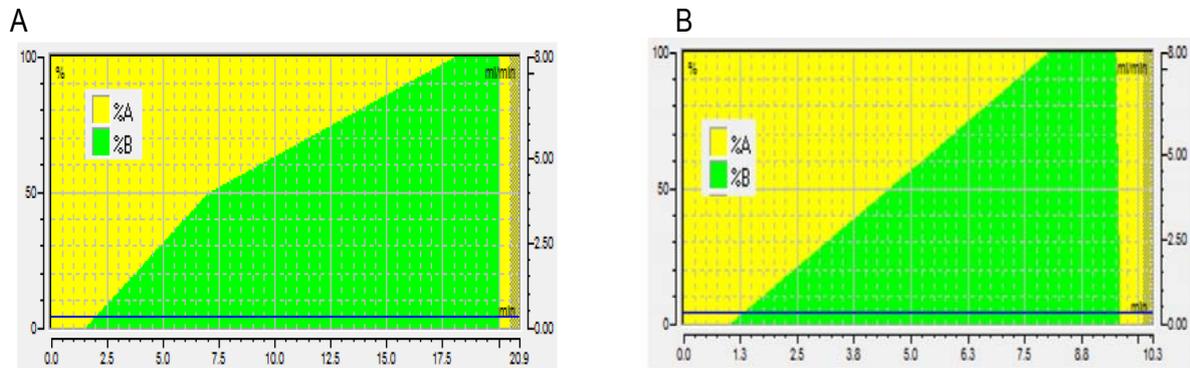


Figure 7 : Protocole CLIN pour la décontamination du matériel souillé non a usage unique.

Annexe 2.

Sur les Figures 8, sont exposés le choix du gradient et l'élution de la phase mobile en mode positif et négatif. Le gradient est choisi pour une élution correcte tout en gardant un temps d'acquisition acceptable.



Figures 8 :

A : Gradient choisi en mode positif ; dans cet exemple, le temps d'acquisition choisi était de 20,5 min.

B : Gradient choisi en mode négatif ; dans cet exemple, le temps d'acquisition choisi était de 10,3 min.

Annexe 3. Analyse métabolique

L'analyse du métabolome est une approche multidisciplinaire mettant en jeu la chimie analytique, le traitement du signal et l'analyse statistique.

L'analyse se déroule selon les étapes décrites sur les Figures 9 et 10 :

- le recueil ;
- le traitement pré-analytique ;
- l'analyse des échantillons ;
- le traitement des données ;
- l'analyse statistique.

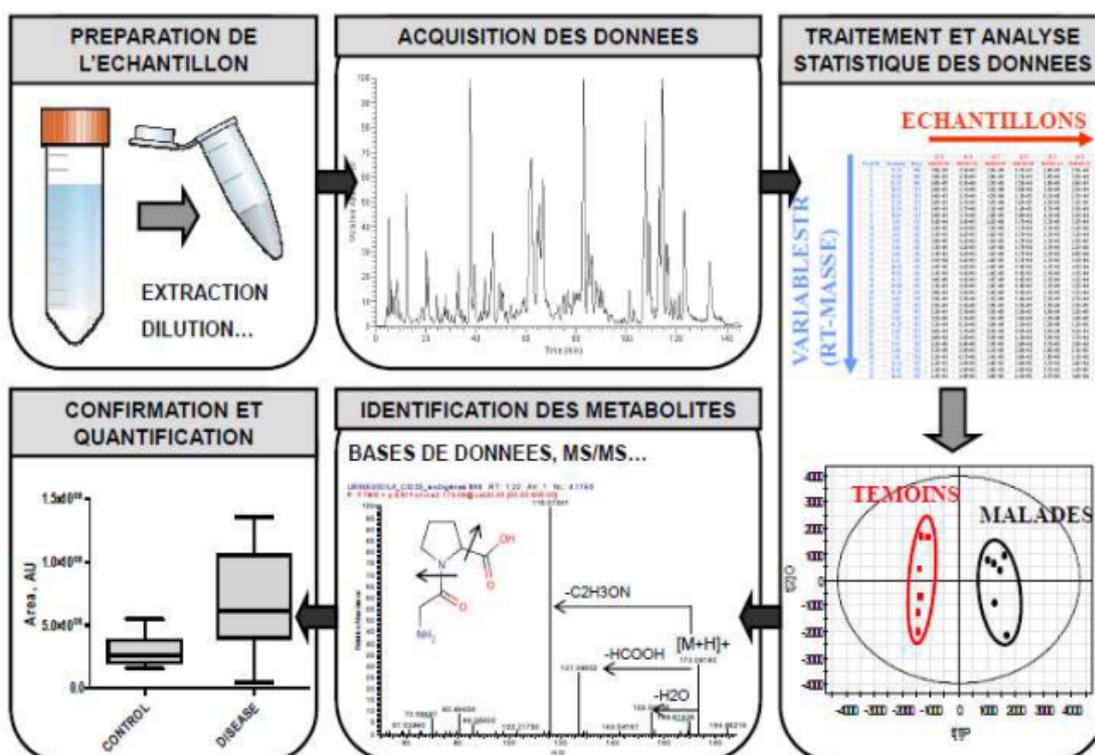


Figure 9 : Représentation des différentes étapes de l'analyse métabolique.

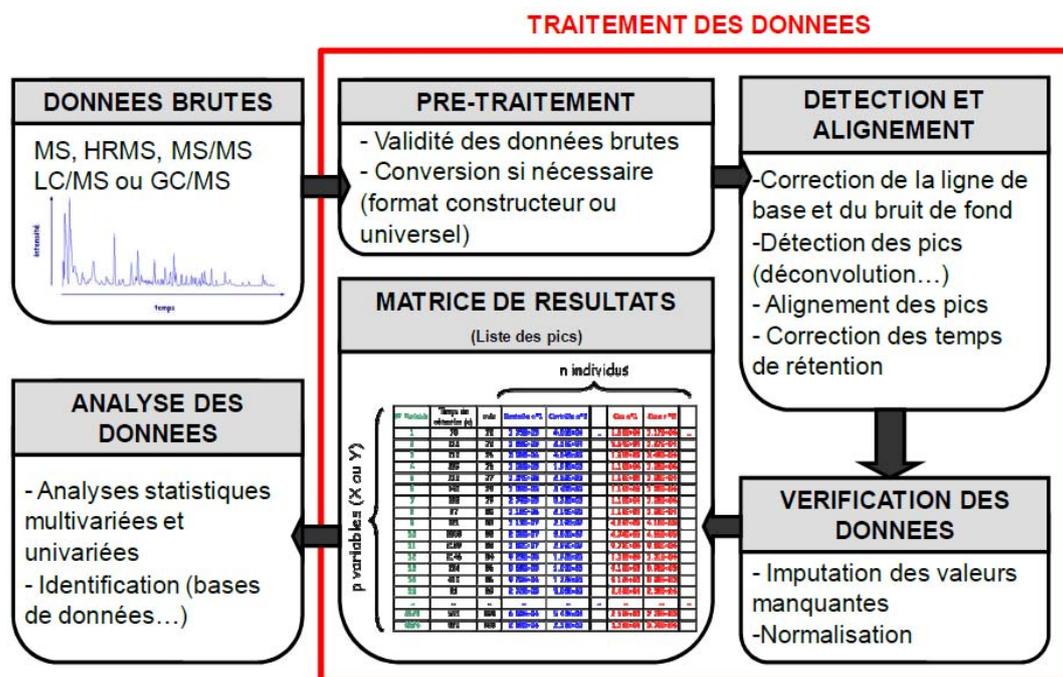


Figure 10 : Schématisation du traitement des données pour l'analyse métabolomique ¹⁹.

- MS = spectrométrie de masse
- HRMS = spectrométrie moléculaire haute résolution
- MS/MS = spectrométrie de masse en tandem
- LC/MS = chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
- GC/MS = chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Le traitement pré-analytique

Le condensat, de par sa nature et sa composition, est une matrice biologique qui ne nécessite aucune préparation chimique, contrairement à d'autres substrats (urines) qui doivent bénéficier de déprotéinisation et/ou de dérivations. Ces échantillons peuvent donc être injectés de façon directe dans l'analyseur. Les conditions de conservation des condensats destinés à être analysés en métabolomique (stockage dans des tubes en polypropylène, conservation à < - 70 °c) et l'absence d'intervention sur les échantillons permet une détection optimale des métabolites et une comparabilité.

Un mélange d'étalons internes ajouté à raison de 5 µL pour 195 µL d'échantillon biologique permet un contrôle de stabilité de l'analyse.

L'analyse des échantillons

Les techniques analytiques utilisées pour la métabolomique sont des techniques de pointe, à haut débit et riches de leur complémentarité. Les plus couramment utilisées sont la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). La RMN est peu sensible, mais présente l'avantage majeur d'être une technique non destructive, spécifique et permettant d'accéder relativement aisément à l'identification des métabolites. La GC/MS est une technique nécessitant une étape plus longue de préparation de l'échantillon mais est très spécifique et

dispose de banques de données informatives pour l'identification des métabolites. Enfin la LC/MS est la plus sensible et résolutive de toutes, mais souffre d'un manque d'outils fiables pour l'identification des composés d'intérêts et reste très coûteuse.

Spectrométrie

La chromatographie liquide est une méthode de séparation des constituants d'un mélange qui emploie un solvant comme phase mobile et un solide comme phase stationnaire (Figure 11). Les composants sont séparés sur une colonne après avoir subi une ionisation par la source d'électrospray. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif par génération d'ions positifs, soit en mode négatif en formant des ions négatifs. La spectrométrie est une technique analytique qui consiste à mesurer le rapport masse sur charge (m/z). Elle est sensible et permet la détection d'espèces à des concentrations de l'ordre du femtogramme (fg).

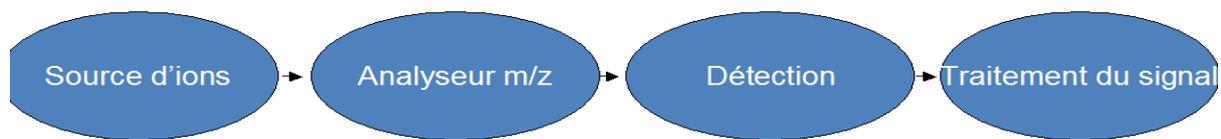


Figure 11 : Représentation schématique des étapes de la spectrométrie.

Réglage du spectromètre - Ionisation

Des essais préliminaires sont habituellement effectués sur un mélange de tous les échantillons (pool) pour permettre une optimisation de l'ionisation. L'analyse des échantillons encadrée par l'injection de 2 pools identiques permet d'éliminer une modification d'ionisation.

Source et Gradient

Le temps d'analyse peut être optimisé en choisissant l'intensité du signal, en prenant en compte l'ionisation des étalons internes, l'élution des signaux du chromatogramme et en choisissant un gradient adapté à l'échantillon.

Traitement des données

L'analyse par LC/MS conduit à l'obtention de chromatogrammes présentant des pics correspondant aux différents composés présents dans le milieu biologique. Ces données sont analysées par le logiciel SIEVE 2.0® (ThermoFischer Scientific, San Jose, Californie, USA) qui permet d'effectuer un alignement chromatographique, d'extraire les spectres selon leur rapport m/z , le temps de rétention et l'intensité des ions. Le but est d'effectuer des études statistiques et d'obtenir ainsi une matrice Excel complexe avec de très nombreux signaux. Le chromatogramme représente l'intensité du courant ionique total en fonction du temps de rétention ; il existe une troisième dimension qui correspond à la résolution en m/z des métabolites détectés pour chaque spectre (un exemple de chromatogramme est illustré par la Figure 12).

La sensibilité de la technique impose une analyse manuelle des chromatogrammes en fonction de la qualité du signal (intensité du pic, largeur du chromatogramme). Cette étape permet d'éliminer les signaux correspondants aux bruits de fond. Le logiciel Xcalibur® (ThermoFischer Scientific, San Jose,

Californie, USA) permet d'analyser ces chromatogrammes et de vérifier que les pics correspondent à des ions. Cette vérification manuelle s'effectue en recherchant l'enrichissement isotopique des ions. La difficulté de l'analyse est donc de gérer et de comparer ces empreintes qui contiennent de nombreux signaux correspondant à plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de métabolites. En pratique, il est difficile de comparer visuellement l'ensemble de ces données.

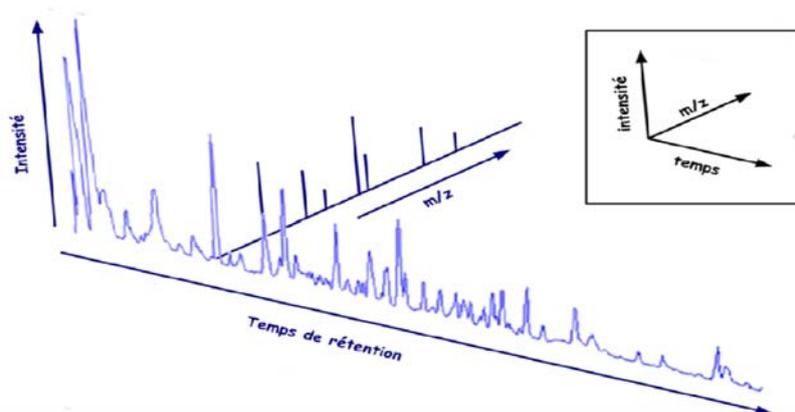


Figure 12 : Représentation schématique d'un chromatogramme obtenu par LC/MS.

L'analyse statistique

L'ensemble des données est soumis à des analyses statistiques multivariées grâce aux logiciels SIMCA® (*Soft Independent Modelling by Class Analogy*) (Umetrics, Umea, Suède). Ces analyses permettent de synthétiser rapidement une grande quantité d'informations, ceci en projetant les données initiales dans un espace de dimensions réduites qui permet une visualisation plus aisée. Pour cela, un changement de coordonnées est effectué afin de définir de nouveaux axes, appelés composantes principales, qui concentreront la plus grande partie de la variabilité des échantillons. La première composante extrait la plus grande source de variance, la seconde composante, orthogonale à la première, extrait la plus grande source de variance de ce qui reste à expliquer. Les données sont présentées sous forme de cartes factorielles des individus ou « *score plots* », c'est-à-dire les coordonnées des échantillons dans le nouveau repère. Les individus appartenant à un même groupe sont proches les uns des autres. Le « *score plot* » est représenté par un cercle entourant 95 % des projections des données.

Cette analyse statistique descriptive multivariée, appelée analyse en composante principale (ACP), ne nécessite pas d'information « *a priori* » sur la nature des échantillons. Elle permet de décrire des données et de visualiser la répartition spontanée des individus (Figure 13).

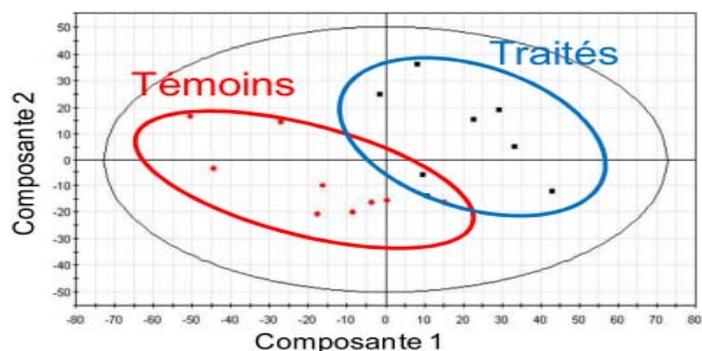


Figure 13 : Exemple de présentation des données lors d'une analyse multivariée en composante principale.

Une deuxième analyse statistique explicative multivariée appelée OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis*) permet de construire un modèle qui maximise la séparation entre les individus. Ce modèle mathématique de régression permet la séparation inter- et intra-groupe des individus (Figure 14).

Au final, cette analyse multivariée permet de détecter les métabolites discriminants en fonction de leur puissance ; ils sont appelés VIP (*Variable importance parameters*) et sont définis par leur rapport m/z permettant, dans un second temps, une identification de la masse et une identification précise du métabolite.

La puissance de ces modèles est confirmée par des tests statistiques multivariés R² (coefficient de détermination) et Q² (paramètre de prédiction). Le modèle est considéré comme robuste lorsque R² > 50 % et Q² > 40 %.¹¹

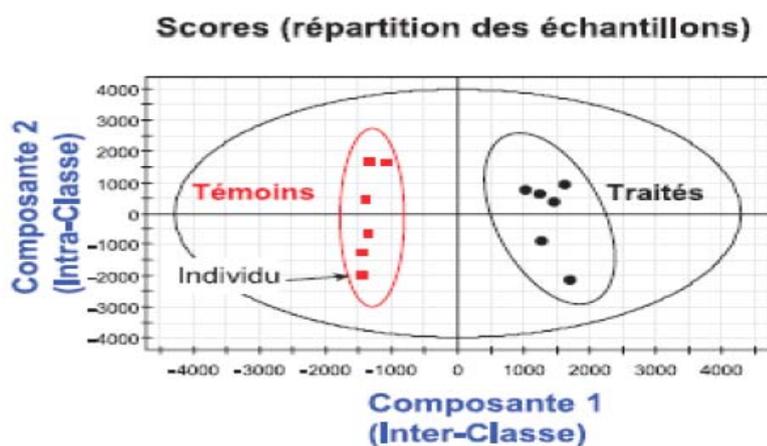


Figure 14 : Exemple de présentation des données en analyse OPLS-DA.

Académie d'Orléans – Tours

Université François-Rabelais

Faculté de Médecine de TOURS

FERMIER Brice

Thèse n°

30 pages – 1 tableau – 12 figures – 3 annexes

Résumé :

Problématique : L'état de choc et les dysfonctions d'organe qui lui sont associés sont une cause importante de morbidité et de mortalité en réanimation. De nombreux signaux moléculaires sont impliqués dans la pathogénèse de ces dysfonctions, notamment la dysfonction respiratoire. La prise en charge optimale de ces patients va nécessiter une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'infection et de l'inflammation. L'analyse métabolomique qui combine chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse est en plein essor. Elle permet d'appréhender l'ensemble des métabolites qu'il soit substrats, produits ou cofacteurs impliqués dans les réactions enzymatiques ou chimiques et de définir un profil métabolomique spécifique d'une population.

L'analyse métabolomique peut être ciblée sur la recherche d'un biomarqueur connu ou conduite de façon plus globale à la recherche de molécules d'intérêt différenciant deux populations.

Objectif : Le but de cette étude prospective était de démontrer une différence de profils métabolomique entre des patients ventilés, programmés au bloc opératoire pour une chirurgie réglée et des patients de réanimation en choc avec dysfonction respiratoire.

Matériel et Méthode : Les condensats d'air exhalé sont recueillis puis analysés en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (mode d'ionisation positif et négatif). Nous avons utilisé une analyse multivariée en OPSL-DA et utilisé R² (> 40%) pour expliquer la variance du modèle et Q² (>50%) pour la capacité prédictive du modèle.

Résultats : Nous avons inclus 26 patients, 12 patients en état de choc et 14 patients de bloc opératoire. Nous mettons en évidence une différence significative sur les analyses multivariées. En mode positif R² = 78 % et Q²= 75%, pour le mode négatif R²=72% et Q²=50%. Ces analyses ont également permis de mettre en évidence des métabolites d'intérêt (VIP).

Conclusion : Le profil métabolomique des condensats d'air exhalé de patients sains ventilés au bloc opératoire pour une chirurgie programmée est différent de celui de patients de réanimation en choc avec une défaillance respiratoire. Cependant la différence de profil métabolomique entre ces deux populations n'est pas surprenante. L'étape suivante est d'identifier les métabolites d'intérêt qui les différencient. Ces métabolites pourraient être des biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques. Grâce à son caractère non invasif, le recueil des condensats d'air exhalé peut être répété sans risque de la phase aigüe à la résolution de l'agression pulmonaire. L'analyse métabolomique globale pourrait permettre une meilleure compréhension de la mécanistique de l'inflammation pulmonaire et permettre la mise en évidence de nouvelles voies métaboliques.

Mots clés :

- état de choc
- analyse métabolomique globale
- condensat d'air exhalé

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Marc Laffon

Membres : Monsieur le Professeur Jacques Fusciardi

Monsieur le Professeur Christian Andres

Madame le Docteur Martine Ferrandière

Madame le Docteur Hélène Blasco

Date de la soutenance : 18 octobre 2013

