

Année 2021/2022

N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Sophie CATANESE

Née le 17.06.1992 à Kaiserslautern, Allemagne (99)

**VALIDATION DE L'ANALYSE METABOLOMIQUE ET LIPIDOMIQUE SUR
LARMES HUMAINES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ULTRA-HAUTE
PERFORMANCE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN
TANDEM**

Présentée et soutenue publiquement le **17 juin 2022** devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Pierre-Jean PISELLA, Ophtalmologie, Faculté de Médecine – Tours

Membres du Jury :

Professeur Hélène BLASCO, Biochimie et biologie moléculaire, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Sophie ARSENE, Ophtalmologie, PH, CHU – Tours

Docteur Guillaume VANDERMEER, Ophtalmologie, PH, CHU – Tours

Directeur de thèse : Docteur Raoul Kanav KHANNA, Ophtalmologie, CCA – Tours

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| LISTE DES ENSEIGNANTS | 4 |
| REMERCIEMENTS | 8 |
| SERMENT D'HIPPOCRATE | 14 |
| RESUME | 15 |
| ABSTRACT | 16 |
| ABREVIATIONS | 17 |
| INTRODUCTION | 18 |
| MATERIELS ET METHODES | 20 |
| I. Origine des échantillons | 20 |
| II. Méthodes d'extraction des composés | 20 |
| III. Reproductibilité des techniques de prélèvement | 22 |
| IV. Optimisation du volume de larmes | 22 |
| V. Évaluation de la variabilité métabolomique inter-œil | 23 |
| VI. Analyses par spectrométrie de masse | 23 |
| VII. Traitement des données | 24 |
| VIII. Application des méthodes validées d'analyse du métabolome des larmes | 24 |
| IX. Analyses statistiques | 25 |
| RESULTATS | 26 |
| I. Une méthode de prélèvement rapide et sûre | 26 |
| II. Contenu métabolique et lipidique | 26 |
| III. Extraction des métabolites à partir des bandelettes de Schirmer | 26 |
| IV. Extraction des lipides | 26 |
| V. Meilleure reproductibilité avec les tubes microcapillaires en verre | 27 |
| VI. Excellente reproductibilité à partir d'un petit volume d'échantillon en métabolomique et lipidomique | 28 |
| VII. Comparabilité du profil métabolomique entre les deux yeux | 29 |
| VIII. Un métabolisme à part entière | 30 |
| IX. Absence d'effet âge sur le métabolome des larmes de sujets sains | 31 |
| DISCUSSION | 33 |
| I. Une couverture satisfaisante du métabo-lipidome lacrymal par UHPLC-MS/MS | 33 |
| II. Détermination du protocole d'extraction | 33 |
| III. Avantages et inconvénients des techniques de prélèvement | 33 |
| IV. Supériorité du tube microcapillaire en verre pour la métabolomique | 34 |

| | |
|---|----|
| V. Volume de larmes de 5 μL : un bon compromis pour les explorations métabolomiques et lipidomiques | 34 |
| VI. Possibilité de regrouper les larmes des deux yeux | 35 |
| VII. Voies du rétinol et du tréhalose dans les larmes | 35 |
| VIII. Tendance à la variabilité en fonction de l'âge | 36 |
| CONCLUSION | 37 |
| REFERENCES | 38 |
| MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE | 40 |

UNIVERSITE DE TOURS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr Henri MARRET

ASSESEURS

Pr Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*

Pr Mathias BUCHLER, *Relations internationales*

Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, *Moyens – relations avec l'Université*

Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*

Pr François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*

Pr Patrick VOURC'H, *Recherche*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Pr Emile ARON (†) – 1962-1966

Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962

Pr Georges DESBUQUOIS (†) – 1966-1972

Pr André GOUAZE (†) – 1972-1994

Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON

Pr Gilles BODY

Pr Jacques CHANDENIER

Pr Philippe COLOMBAT

Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL

Pr Pascal DUMONT

Pr Dominique GOGA

Pr Gérard LORETTE

Pr Dominique PERROTIN

Pr Roland QUENTIN

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – A. CHANTEPIE – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – P. COSNAY – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – O. HAILLOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – AM. LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | |
|---------------------------------------|---|
| ANDRES Christian..... | Biochimie et biologie moléculaire |
| ANGOULVANT Denis | Cardiologie |
| APETOH Lionel | Immunologie |
| AUPART Michel..... | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| BABUTY Dominique | Cardiologie |
| BAKHOS David | Oto-rhino-laryngologie |
| BALLON Nicolas | Psychiatrie ; addictologie |
| BARILLOT Isabelle | Cancérologie ; radiothérapie |
| BARON Christophe | Immunologie |
| BEJAN-ANGOULVANT Théodora | Pharmacologie clinique |
| BERHOUEZ Julien | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| BERNARD Anne | Cardiologie |
| BERNARD Louis | Maladies infectieuses et maladies tropicales |
| BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle | Biologie cellulaire |
| BLASCO Hélène..... | Biochimie et biologie moléculaire |
| BONNET-BRILHAULT Frédérique | Physiologie |
| BOURGUIGNON Thierry | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| BRILHAULT Jean..... | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| BRUNEREAU Laurent | Radiologie et imagerie médicale |
| BRUYERE Franck..... | Urologie |
| BUCHLER Matthias..... | Néphrologie |
| CALAIS Gilles..... | Cancérologie, radiothérapie |
| CAMUS Vincent..... | Psychiatrie d'adultes |
| CORCIA Philippe..... | Neurologie |
| COTTIER Jean-Philippe | Radiologie et imagerie médicale |
| DEQUIN Pierre-François..... | Thérapeutique |
| DESOUBEAUX Guillaume..... | Parasitologie et mycologie |
| DESTRIEUX Christophe | Anatomie |
| DIOT Patrice..... | Pneumologie |
| DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague | Anatomie & cytologie pathologiques |
| DUCLUZEAU Pierre-Henri..... | Endocrinologie, diabétologie, et nutrition |
| EL HAGE Wissam..... | Psychiatrie adultes |
| EHRMANN Stephan | Médecine intensive – réanimation |
| FAUCHIER Laurent | Cardiologie |
| FAVARD Luc..... | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| FOUGERE Bertrand | Gériatrie |
| FOUQUET Bernard..... | Médecine physique et de réadaptation |
| FRANCOIS Patrick..... | Neurochirurgie |
| FROMONT-HANKARD Gaëlle | Anatomie & cytologie pathologiques |
| GATAULT Philippe..... | Néphrologie |
| GAUDY-GRAFFIN Catherine..... | Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière |
| GOUPILLE Philippe | Rhumatologie |
| GRUEL Yves..... | Hématologie, transfusion |
| GUERIF Fabrice | Biologie et médecine du développement et de la reproduction |
| GUILLOIN Antoine..... | Médecine intensive – réanimation |
| GUYETANT Serge | Anatomie et cytologie pathologiques |
| GYAN Emmanuel..... | Hématologie, transfusion |
| HALIMI Jean-Michel..... | Thérapeutique |
| HANKARD Régis..... | Pédiatrie |
| HERAULT Olivier | Hématologie, transfusion |
| HERBRETEAU Denis | Radiologie et imagerie médicale |
| HOURIOUX Christophe..... | Biologie cellulaire |
| IVANES Fabrice | Physiologie |
| LABARTHE François | Pédiatrie |
| LAFFON Marc | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence |
| LARDY Hubert..... | Chirurgie infantile |
| LARIBI Saïd..... | Médecine d'urgence |
| LARTIGUE Marie-Frédérique | Bactériologie-virologie |
| LAURE Boris..... | Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie |
| LECOMTE Thierry..... | Gastroentérologie, hépatologie |
| LESCANNE Emmanuel..... | Oto-rhino-laryngologie |
| LINASSIER Claude | Cancérologie, radiothérapie |
| MACHET Laurent | Dermato-vénéréologie |
| MAILLOT François | Médecine interne |
| MARCHAND-ADAM Sylvain | Pneumologie |

| | |
|-------------------------------|--|
| MARRET Henri | Gynécologie-obstétrique |
| MARUANI Annabel | Dermatologie-vénérologie |
| MEREGHETTI Laurent..... | Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière |
| MITANCHEZ Delphine | Pédiatrie |
| MORINIERE Sylvain..... | Oto-rhino-laryngologie |
| MOUSSATA Driffa | Gastro-entérologie |
| MULLEMAN Denis..... | Rhumatologie |
| ODENT Thierry..... | Chirurgie infantile |
| OUAISSI Mehdi | Chirurgie digestive |
| OULDAMER Lobna..... | Gynécologie-obstétrique |
| PAINTAUD Gilles | Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique |
| PATAT Frédéric | Biophysique et médecine nucléaire |
| PERROTIN Franck | Gynécologie-obstétrique |
| PISELLA Pierre-Jean..... | Ophtalmologie |
| PLANTIER Laurent..... | Physiologie |
| REMERAND Francis | Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence |
| ROINGEARD Philippe..... | Biologie cellulaire |
| ROSSET Philippe..... | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| RUSCH Emmanuel..... | Epidémiologie, économie de la santé et prévention |
| SAINT-MARTIN Pauline..... | Médecine légale et droit de la santé |
| SALAME Ephrem..... | Chirurgie digestive |
| SAMIMI Mahtab | Dermatologie-vénérologie |
| SANTIAGO-RIBEIRO Maria | Biophysique et médecine nucléaire |
| THOMAS-CASTELNAU Pierre | Pédiatrie |
| TOUTAIN Annick..... | Génétique |
| VAILLANT Loïc..... | Dermato-vénérologie |
| VELUT Stéphane..... | Anatomie |
| VOURC'H Patrick..... | Biochimie et biologie moléculaire |
| WATIER Hervé | Immunologie |
| ZEMMOURA Ilyess | Neurochirurgie |

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DIBAO-DINA Clarisse
LEBEAU Jean-Pierre

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien Soins palliatifs || POTIER Alain | Médecine Générale |
| ROBERT Jean..... | Médecine Générale |

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine.....Anglais

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | |
|-----------------------------------|---|
| AUDEMARD-VERGER Alexandra | Médecine interne |
| BARBIER Louise..... | Chirurgie digestive |
| BINET Aurélien | Chirurgie infantile |
| BISSON Arnaud | Cardiologie (CHRO) |
| BRUNAUT Paul | Psychiatrie d'adultes, addictologie |
| CAILLE Agnès | Biostat., informatique médical et technologies de communication |
| CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo | Rhumatologie (au 01/10/2021) |
| CLEMENTY Nicolas | Cardiologie |
| DENIS Frédéric..... | Odontologie |
| DOMELIER Anne-Sophie | Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière |
| DUFOUR Diane | Biophysique et médecine nucléaire |
| ELKRIEF Laure..... | Hépatologie – gastroentérologie |
| FAVRAIS Géraldine | Pédiatrie |
| FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie..... | Anatomie et cytologie pathologiques |
| GOUILLEUX Valérie..... | Immunologie |
| GUILLOIN-GRAMMATICO Leslie..... | Epidémiologie, économie de la santé et prévention |

| | |
|--------------------------------------|--|
| HOARAU Cyrille | Immunologie |
| LE GUELLEC Chantal | Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique |
| LEFORT Bruno | Pédiatrie |
| LEGRAS Antoine..... | Chirurgie thoracique |
| LEMAIGNEN Adrien | Maladies infectieuses |
| MACHET Marie-Christine | Anatomie et cytologie pathologiques |
| MOREL Baptiste | Radiologie pédiatrique |
| PARE Arnaud..... | Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie |
| PIVER Éric..... | Biochimie et biologie moléculaire |
| REROLLE Camille..... | Médecine légale |
| ROUMY Jérôme | Biophysique et médecine nucléaire |
| SAUTENET Bénédicte | Thérapeutique |
| STANDLEY-MIQUELESTORENA Elodie | Anatomie et cytologie pathologiques |
| STEFIC Karl | Bactériologie |
| TERNANT David..... | Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique |
| VUILLAUME-WINTER Marie-Laure..... | Génétique |

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

| | |
|-------------------------------|---|
| AGUILLON-HERNANDEZ Nadia..... | Neurosciences |
| NICOGLU Antonine | Philosophie – histoire des sciences et des techniques |
| PATIENT Romuald..... | Biologie cellulaire |
| RENOUX-JACQUET Cécile | Médecine Générale |

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

| | |
|-----------------------------|-------------------|
| BARBEAU Ludivine..... | Médecine Générale |
| ETTORI-AJASSE Isabelle..... | Médecine Générale |
| PAUTRAT Maxime | Médecine Générale |
| RUIZ Christophe..... | Médecine Générale |
| SAMKO Boris..... | Médecine Générale |

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRAE

| | |
|-------------------------------|--|
| BECKER Jérôme..... | Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253 |
| BOUAKAZ Ayache | Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253 |
| BRIARD Benoit..... | Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100 |
| CHALON Sylvie | Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253 |
| DE ROCQUIGNY Hugues | Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259 |
| ESCOFFRE Jean-Michel..... | Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253 |
| GILLOT Philippe..... | Chargé de Recherche Inrae – UMR Inrae 1282 |
| GOUILLEUX Fabrice | Directeur de Recherche CNRS – EA 7501 - ERL CNRS 7001 |
| GOMOT Marie..... | Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253 |
| HEUZE-VOURCH Nathalie..... | Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100 |
| KORKMAZ Brice..... | Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100 |
| LATINUS Marianne..... | Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253 |
| LAUMONNIER Frédéric | Chargé de Recherche Inserm - UMR Inserm 1253 |
| LE MERREUR Julie..... | Directrice de Recherche CNRS – UMR Inserm 1253 |
| MAMMANO Fabrizio..... | Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259 |
| MEUNIER Jean-Christophe | Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259 |
| PAGET Christophe | Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100 |
| RAOUL William | Chargé de Recherche Inserm – UMR CNRS 1069 |
| SI TAHAR Mustapha | Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100 |
| SUREAU Camille | Directrice de Recherche émérite CNRS – UMR Inserm 1259 |
| WARDAK Claire..... | Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253 |

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| DELORE Claire | Orthophoniste |
| GOUIN Jean-Marie..... | Praticien Hospitalier |

Pour l'Ecole d'Orthoptie

| | |
|------------------------|-------------|
| BOULNOIS Sandrine..... | Orthoptiste |
| SALAME Najwa..... | Orthoptiste |

Pour l'Ethique Médicale

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| BIRMELE Béatrice..... | Praticien Hospitalier |
|-----------------------|-----------------------|

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

RESUME

Objectif : L'objectif de cette étude était de standardiser les étapes préanalytiques et analytiques de l'analyse métabo-lipidomique des larmes humaines afin de faciliter son application dans les pathologies ophtalmologiques et systémiques.

Méthode : Nous avons évalué différentes méthodes pour chaque étape de l'analyse des larmes humaines, du prélèvement à l'acquisition du profil « omique », afin d'obtenir la plus large couverture possible avec les critères analytiques les plus robustes. Des comparaisons de la reproductibilité de l'analyse métabo-lipidomique par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem selon la latéralité oculaire, deux méthodes de prélèvement, trois volumes (2 μ L, 5 μ L, 10 μ L) et trois méthodes d'extraction en métabolomique et deux en lipidomique ont été réalisées. L'effet de l'âge sur le métabo-lipidome des larmes a aussi été étudié sur des sujets sains.

Résultat : L'extraction par méthanol/eau était supérieure aux autres méthodes en termes de coefficient de variation moyen et de nombre de métabolites ayant un coefficient de variation inférieur à 30% en métabolomique par bandelette de Schirmer tandis que l'extraction de type Folch était supérieure au méthyl tert-butyl éther en lipidomique quelle que soit la méthode de prélèvement. Sur ces mêmes critères, les tubes microcapillaires en verre donnaient une meilleure couverture du métabolome par rapport aux bandelettes de Schirmer, mais ces deux techniques étaient comparables en lipidomique. Le volume de 5 μ L permettait une couverture satisfaisante du métabo-lipidome. Aucune différence significative entre les deux yeux n'était retrouvée dans le métabo-lipidome de sujets sains. Tandis que la majorité des métabolites et lipides n'étaient pas influencés par l'âge, les voies de la phénylalanine-tyrosine-tryptophane, de la biosynthèse de l'amnioacyl ARN-t et du métabolisme alanine-aspartate-glutamate étaient les trois principales voies associées aux 15 métabolites les plus variables selon l'âge.

Conclusion : Ces résultats contribueront à améliorer les travaux en métabo-lipidomique dans les larmes humaines pour l'identification de nouveaux biomarqueurs. La standardisation des étapes pré-analytiques et analytiques est essentielle pour améliorer les comparaisons inter-études et augmenter les chances de transfert de résultats en recherche fondamentale vers la pratique clinique.

Mots clés : métabolomique ; lipidomique ; larmes ; UHPLC-MS/MS ; optimisation analytique

ABSTRACT

Purpose: To standardize preanalytical and analytical steps for metabo-lipidomics in human tears to facilitate application in ophthalmological and systemic diseases.

Methods: We assessed different methods for each step of the workflow, from sampling to omics profiles acquisition, to provide the largest metabolic coverage with the most robust analytical criteria in human tears. We compared reproducibility according to eye laterality, two sampling techniques, three volumes (2 μ L, 5 μ L, 10 μ L) and different extraction methods using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem high-resolution mass spectrometry for metabolomic and lipidomic application. The effect of age on the tear metabo-lipidome was also investigated in healthy subjects.

Results: The extraction method using methanol/water provided the best results for Schirmer strip metabolomics, while Folch extraction was superior for lipidomics, whatever the sampling method used. When comparing both sampling methods, microcapillary glass tube was superior to Schirmer strip for metabolomics but comparable for lipidomics. The 5 μ L volume provided a satisfying metabo-lipidomic coverage. There was no significant difference in tear metabo-lipidome between both eyes in healthy subjects. While most metabolites and lipids were not influenced by age, the phenylalanine-tyrosine-tryptophan pathway, aminoacyl t-RNA biosynthesis, and alanine-aspartate-glutamate metabolism were the 3 principal pathways associated with the 15 most variable metabolites according to age.

Conclusions: The current findings will contribute to improve metabolomics/lipidomic workflow in human tears for the identification of new biomarkers. Preanalytical and analytical standardization is mandatory in order to perform better between-study comparisons and increase the chances of transferring laboratory findings into clinical practice.

Keywords: Metabolomic; Lipidomic; Tears; UHPLC-MS/MS; Analytical optimization

ABREVIATIONS

ACN : acétonitrile

CV : coefficient de variation

ESI : ionisation positive par électrospray

HILIC : colonne de chromatographie liquide à interaction hydrophile

LC-MS/MS : chromatographie liquide, couplée à la spectrométrie de masse en tandem

MeOH : méthanol

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

MTBE : méthyl tert-butyl éther

PLS-DA : analyse discriminante des moindres carrés partiels

UHPLC-MS/MS : chromatographie liquide ultra-haute performance, couplée à la spectrométrie de masse en tandem

UPLC (ou HPLC) -MS : chromatographie liquide ultra (-haute) performance, couplée à la spectrométrie de masse

INTRODUCTION

Depuis plusieurs décennies, l'ambition de la médecine de précision a fait progresser les techniques de recherche de biomarqueurs, notamment par l'exploration non invasive de fluides biologiques utilisables en pratique clinique. Le choix d'un fluide biologique comme source de biomarqueurs dépend également de sa capacité à refléter les mécanismes physiopathologiques. Dans le domaine des pathologies ophtalmologiques et systémiques, l'utilisation du film lacrymal répond à divers critères pertinents pour identifier des biomarqueurs, tels que des méthodes de prélèvement non invasives, indolores et rapides. Cependant, bien que le film lacrymal soit un fluide biologique accessible, l'étude de sa composition complexe a été entravée par son faible volume disponible. Il est important de noter que la connaissance de la composition du film lacrymal s'est améliorée au cours des vingt dernières années grâce au développement de techniques performantes telles que celles "omiques" [1–3].

La métabolomique correspond à l'identification et la quantification dans un système biologique de petites molécules (< 1500 Da), constituant le « métabolome », tandis que la lipidomique implique l'identification et la quantification des lipides, constituant le « lipidome ». Ces deux domaines bénéficient de méthodes ciblées et non ciblées qui permettent l'analyse d'un grand nombre de molécules à l'aide d'outils à haut débit. Cette stratégie est particulièrement adaptée pour un petit volume d'échantillon, principale limite concernant les larmes humaines. L'approche métabo-lipidomique dans les larmes humaines représente une stratégie innovante pour l'identification de biomarqueurs pertinents, mais il subsiste un manque important de homogénéisation en ce qui concerne les procédures utilisées pour l'extraction et l'analyse des échantillons [4]. Afin de transférer les résultats expérimentaux vers une utilisation en clinique, l'obtention de résultats fiables et comparables entre les différentes équipes de recherche est indispensable. Une validation rigoureuse de la méthode, y compris des étapes pré-analytiques et analytiques est nécessaire avant d'envisager une application clinique éventuelle.

L'objectif de notre travail était de développer, valider et standardiser une procédure analytique en métabolomique et lipidomique dans des échantillons de larmes afin d'améliorer le processus de recherche de biomarqueurs dans les domaines des pathologies ophtalmologiques et systémiques. Dans ce contexte, nous avons utilisé la chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution en tandem (UHPLC-MS/MS) pour explorer les larmes basales humaines.

Dans un premier temps, nous avons évalué différentes techniques d'extraction et d'échantillonnage. Ensuite, la reproductibilité en fonction de différents volumes a été évaluée pour les applications en métabolomique et lipidomique. Nous avons également étudié la variabilité métabolomique inter-œil. Les métabolites détectés dans les larmes ont été comparés à ceux trouvés dans d'autres fluides corporels tels que le sang et la périlymphe afin d'identifier les voies métaboliques impliquées et spécifiques des larmes humaines. Enfin, la méthodologie développée et validée dans ce travail a été appliquée cliniquement à une cohorte de sujets sains de différents âges.

MATERIELS ET METHODES

I. Origine des échantillons

Les sujets ont été recrutés dans le service d'ophtalmologie du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours. Tous les participants ont fourni un consentement éclairé oral. Ce protocole a fait l'objet d'un accord du comité de protection des personnes (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT04953286). Cette étude a respecté les principes de la Déclaration d'Helsinki. Les critères de non-inclusion étaient les suivants : port de lentilles de contact dans les dernières 48 heures et toute instillation de collyre dans les dernières 24 heures. Tous les sujets inclus étaient âgés de 18 ans ou plus.

Des échantillons de larmes basales ont été prélevés à l'aide de tubes microcapillaires en verre (Drummond®, USA) chez des sujets sains volontaires. Selon notre objectif, environ 2 à 5 µL de larme par œil était collectés sans anesthésie ni autres collyres préalablement instillés. Il était demandé aux sujets de lever les yeux et de maintenir un clignement régulier. Après avoir tiré la paupière inférieure vers le bas, le tube capillaire d'une contenance de 10 µL était placé délicatement dans le fornix conjonctival inférieur jusqu'à ce qu'un niveau suffisant de liquide soit visible dans le tube. Les échantillons de larmes étaient conservés dans des tubes Eppendorf de 0,5 ml à -80°C immédiatement après le prélèvement et jusqu'à l'analyse. Une centrifugation douce à 5 000 - 7 000 tours par minute pendant 30 secondes était appliquée avant l'analyse.

L'évaluation de la méthode d'extraction, des techniques de prélèvement et de la reproductibilité en fonction des différents volumes a été réalisé sur des larmes humaines mélangées issues de 3 donneurs anonymes d'origine commerciale provenant de MyBiosource® (San Diego, Californie, États-Unis) sous la référence MBS170230.

Tous les échantillons étaient conservés à -80°C jusqu'à leur analyse.

II. Méthodes d'extraction des composés

Extraction des métabolites

Dans le cas de larmes prélevées par tube microcapillaire en verre, le volume de larmes (2 µL, 5 µL ou 10 µL) était directement mélangé dans de l'acétonitrile (ACN) pour obtenir un

volume total de 100 μL , puis l'ensemble était homogénéisé par vortex. Cette technique est basée sur une étude précédente de notre équipe et est la plus appropriée pour la séparation des métabolites sur colonne C18 et colonne de chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) avant analyse par spectrométrie de masse (données non présentées ici) [5].

Trois méthodes d'extraction des métabolites ont été testées sur des bandelettes de Schirmer. Le premier centimètre de chaque bandelette était coupé en languettes de 2 à 3 mm et placé dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Les instruments utilisés pour les manipuler étaient lavés au méthanol (MeOH) entre chaque bandelette. Ces languettes étaient ensuite mélangées avec 400 μL soit de méthanol/eau (1:1, v/v), soit de méthanol pur, soit d'ACN avant d'être vortexés (3 échantillons pour chaque solvant d'extraction).

Le mélange obtenu à partir de tubes microcapillaires en verre ou de bandelettes de Schirmer était ensuite agité pendant 30 minutes à 4°C par agitation planaire et centrifugé à 4 000 g à 4°C pendant 10 minutes. Enfin, 90 μL de surnageant étaient placés dans un flacon compatible avec le chromatographe.

Extraction des lipides

Deux méthodes d'extraction des lipides ont été testées : méthyl tert-butyl éther (MTBE) et la technique de Folch, à partir d'échantillons de 5 μL prélevés par tubes microcapillaires en verre et par bandelettes de Schirmer (5 échantillons chaque solvant d'extraction).

L'extraction au MTBE consistait à ajouter 200 μL d'eau Milli-Q® et 400 μL de MTBE à 5 μL de larmes ou à une bandelette de Schirmer préparée comme précédemment décrit. Le mélange était vortexé pendant 1 minute, agité pendant 30 minutes à 4°C par agitation planaire, et centrifugé à 4 600 g, à 4°C, pendant 10 minutes. Trois cents microlitres de la phase supérieure étaient récupérés et transférés dans des tubes en verre pour une évaporation du solvant dans un système de concentration SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) à température ambiante. Le résidu était ensuite reconstitué avec 100 μL d'un mélange 6:3:1, v/v/v, d'ACN/isopropanol/eau suivi d'une centrifugation (15 000 g, 10 min, 4°C) avant l'analyse par spectrométrie de masse.

La méthode d'extraction de Folch consistait à ajouter 450 μL de chloroforme/MeOH (1:2, v/v) à 5 μL de larmes ou à une bandelette de Schirmer préparée comme précédemment décrit. Le mélange était soigneusement vortexé pendant 1 minute, agité pendant 30 minutes à

4°C par agitation planaire. Ensuite, 250 µL d'eau Milli-Q® et 150 µL de chloroforme étaient ajoutés, puis le mélange vortexé pendant 1 minute et centrifugé à 4 600 g, à 4°C, pendant 10 minutes. Deux cents microlitres de la phase inférieure, sous le disque protéique, correspondant à la fraction non polaire, étaient récupérés et transférés dans des tubes en verre pour évaporation du solvant dans un système de concentration SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) à température ambiante. Le résidu était ensuite reconstitué avec 100 µL d'un mélange 6:3:1, v/v/v, de ACN/isopropanol/eau, suivi d'une centrifugation (15 000 g, 10 min, 4°C) avant l'analyse par spectrométrie de masse.

III. Reproductibilité des techniques de prélèvement

Deux techniques de prélèvement de larmes ont été comparées : les tubes microcapillaires en verre et les bandelettes de Schirmer. Ces deux techniques sont utilisées en pratique courante. L'utilisation de ces méthodes à partir de larmes humaines commerciales a été simulé afin d'étudier leur reproductibilité.

Dans le cas des bandelettes de Schirmer, 5 µL de larmes commerciales étaient déposées sur l'extrémité d'une bande maintenue verticalement pendant 5 minutes pour simuler le temps de migration sur un prélèvement humain.

La reproductibilité du métabolome extrait par ACN pour les tubes microcapillaires en verre (larmes humaines commerciales directement introduites dans le tube) et par méthanol/eau (1:1, v/v) pour les bandelettes de Schirmer a été évaluée (10 échantillons pour chaque méthode de prélèvement). Pour l'exploration du lipidome, l'extraction de Folch était utilisée pour les tubes microcapillaires en verre et les bandelettes de Schirmer (10 échantillons pour chaque méthode de prélèvement).

IV. Optimisation du volume de larmes

Trois volumes ont été comparés en analyse métabolomique et lipidomique : 2 µL, 5 µL et 10 µL. Afin de limiter la variabilité associée à la multiplication des étapes analytiques, seuls les tubes microcapillaires en verre ont été utilisés pour cette expérience. Dix échantillons de chaque volume étaient extraits par ACN pour la métabolomique et par extraction de Folch pour la lipidomique, comme décrit ci-dessus.

V. Évaluation de la variabilité métabolomique inter-œil

Les métabolomes des deux yeux de 9 patients ont été comparés. Les échantillons ont été collectés par tubes microcapillaires en verre. Un volume de 5 μ L était analysé par UHPLC-MS/MS après extraction par ACN.

VI. Analyses par spectrométrie de masse

Application métabolomique

Cinq microlitres de préparation étaient injectés dans un système UHPLC Ultimate WPS-3000 (Dionex, Allemagne) couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Allemagne) et fonctionnant en mode d'ionisation positive par électrospray (ESI+). La chromatographie liquide était réalisée à l'aide d'une colonne HILIC Phenomenex Kinetex (150 mm x 2,10 mm, 100 Å). Le gradient était maintenu à un débit de 0,3 mL/min. Le gradient à plusieurs étapes était programmé comme suit : 0-1,5 min, 95 % B ; 1,5-8 min, 95-82 % B ; 8-15 min, 82-75 % B ; 15-15,5 min, 75-25 % B ; 15,5-16 min, 25-3 % B ; 16-22 min, 3-95 % B.

Après ce premier cycle avec une colonne HILIC, le volume restant était évaporé par un système de concentration SpeedVac à 40°C et remis en suspension dans 100 μ L de méthanol/eau (1:9, v/v). Dix microlitres de ce mélange étaient ensuite analysés sur le même spectromètre de masse et exploités en modes d'ionisation positive et négative par électrospray (ESI+ et ESI-) en utilisant une colonne UHPLC C18 pour la chromatographie comme décrit précédemment [6].

Application lipidomique

L'analyse UHPLC-MS/MS a été réalisée sur un système UHPLC Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA), couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) fonctionnant en mode d'ionisation positive par électrospray (ESI+). La chromatographie a été réalisée avec une colonne UHPLC C18 (Kinetex, Phenomenex, Torrance, CA). La méthodologie détaillée est décrite dans une publication précédente [7].

Pour toutes les analyses « omiques », des échantillons de contrôle qualité ont été préparés à partir d'un mélange de volumes égaux de tous les échantillons extraits provenant du même protocole d'extraction.

VII. Traitement des données

Une analyse ciblée basée sur une bibliothèque de composés standards (*Mass Spectroscopy Metabolite Library (MSML®) of standards*, IROA Technologies™) a été appliquée. Les lipides ont été identifiés et ajoutés à la base de données avec le logiciel Simlipid® sur la base de la fragmentation ms/ms. Pour identifier les métabolites, les critères suivants ont été utilisés : le temps de rétention du métabolite détecté devait se situer à ± 20 s de la référence standard et sa masse moléculaire mesurée dans une plage de 10 ppm autour de la masse moléculaire connue du composé de référence. Deuxièmement, une correspondance visuelle correcte entre les rapports isotopiques du métabolite et de la référence standard devait être présente. Pour traiter les données brutes afin d'aligner et d'encadrer les pics, le logiciel HRMS-XCMS implanté dans la plateforme Galaxy a été utilisé (<https://workflow4metabolomics.org>). Les pics ont été normalisés sur la surface totale. Les coefficients de variation (CV), représentant la variabilité des surfaces des pics normalisés, exprimés en pourcentage, ont été calculés pour les contrôles qualité. Les métabolites ont été exclus si le CV des contrôles qualité était supérieur à 30 %, seuil communément admis comme satisfaisant. Les redondances entre les 3 modalités (C18 mode +, C18 mode -, HILIC) étaient éliminées selon le temps de rétention qui devait être supérieur à 57 secondes en C18 et 90 secondes en HILIC. Si le temps de rétention était correct dans plus d'une modalité, ou inférieur à ces seuils dans toutes les modalités, celui dont le CV était le plus faible était conservé.

VIII. Application des méthodes validées d'analyse du métabolome des larmes

Métabolome des larmes comparé aux autres fluides

Nous avons décrit les métabolites et leurs voies biochimiques associées, analysés par notre méthode validée et les avons comparés à ceux obtenus à partir du sang et de la périlymphe.

Métabolome en fonction de l'âge

Vingt-sept patients ont été inclus et séparés en 3 groupes en fonction de leur âge pour évaluer la relation entre le métabolome des larmes et l'âge. Les sujets du groupe A étaient âgés d'environ 20 ans, d'environ 30 ans dans le groupe B et de plus de 40 ans dans le groupe C. Tous les sujets avaient moins de 50 ans pour limiter les biais de confusion potentiels en lien avec des pathologies ophtalmologiques ou systémiques. Les échantillons ont été collectés par des tubes microcapillaires en verre et analysés par la méthode validée.

IX. Analyses statistiques

Nous avons déterminé les meilleures méthodes d'extraction, de prélèvement et le meilleur volume à partir des critères suivants : nombre de composés détectés, coefficient de variation de l'aire du pic, nombre de composés avec un coefficient de variation inférieur à 30 % et biais moyen entre les aires des pics normalisées dans une condition par rapport à une condition de référence.

Les effets de la latéralité et de l'âge ont été analysés à l'aide d'une analyse univariée par Wilcoxon, d'une analyse multivariée non supervisée sous forme d'analyse en composantes principales (ACP) et d'une analyse supervisée PLS-DA (analyse discriminante des moindres carrés partiels) via Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) pour mettre en évidence les clusters d'échantillons et les métabolites discriminants. Des diagrammes de Venn ont été réalisés à partir du site <http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html> pour identifier les similitudes et les différences de profils en fonction des différentes conditions testées [8]. Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) a également été utilisé pour l'analyse d'enrichissement des voies métaboliques, à partir de la base de données KEEG. La comparaison des voies métaboliques identifiées entre les larmes, le sang et la périlymphe a également été réalisée à l'aide d'un diagramme de Venn.

RESULTATS

I. Une méthode de prélèvement rapide et sûre

Pour l'ensemble du développement de la méthode, 9 sujets ont été inclus pour la comparaison des deux yeux et 27 sujets pour la comparaison de la composition lacrymale en fonction de l'âge. Suite au prélèvement de larmes, aucun des sujets n'a signalé de douleur oculaire. Une légère sensation de picotement pouvait être ressentie. Aucune complication n'a été signalée. La technique de prélèvement était rapide et simple à réaliser.

II. Contenu métabolique et lipidique

Quarante-neuf métabolites ont été identifiés avec la colonne C18 ESI-, 61 métabolites avec la colonne C18 ESI+, et 86 métabolites avec la colonne HILIC ESI+. Au total, 155 métabolites ont été identifiés après exclusion des redondances moléculaires, dont 137 (88,3 %) avaient un CV inférieur à 30 %.

En analyse lipidomique, 67 lipides ont été détectés dans tous les échantillons, dont 57 avaient un coefficient de variation inférieur à 30 %.

III. Extraction des métabolites à partir des bandelettes de Schirmer

En utilisant le méthanol/eau, le CV moyen était de 19,4 %, ce qui était inférieur à celui du méthanol pur (25,8 %) et de l'ACN (40,0 %). En outre, 131 métabolites sur 152 (86,1 %) avaient un CV inférieur à 30 % avec le méthanol/eau (1:1, v/v), contre 109 sur 155 (70,3 %) avec le méthanol pur et 82 sur 143 (57,3 %) avec l'ACN. Le méthanol/eau (1:1, v/v) semble donc être le meilleur solvant d'extraction avec les bandelettes de Schirmer.

IV. Extraction des lipides

L'extraction par Folch permettait une meilleure couverture du lipidome. En effet, 54 et 59 lipides avaient un CV inférieur à 30% respectivement avec les tubes microcapillaires en verre et les bandelettes de Schirmer, contre 48 et 36 lipides avec l'extraction par MTBE. De plus, le CV moyen calculé sur l'ensemble des lipides détectés était inférieur par Folch (28,0 % avec les tubes microcapillaires en verre et 24,8 % avec les bandelettes de Schirmer) par rapport au MTBE (29,8 % avec les tubes microcapillaires en verre et 43,7 % avec les bandelettes de

Schirmer) (**Tableau supplémentaire 1**). Par conséquent, la technique de Folch a été choisie pour les analyses ultérieures.

V. Meilleure reproductibilité avec les tubes microcapillaires en verre

Application métabolomique

Seuls 58 des 131 métabolites détectés (44,2 %) avaient un CV inférieur à 30 % avec les bandelettes de Schirmer, contre 113 sur 154 (73,3 %) avec les tubes microcapillaires en verre. Le CV moyen était inférieur au seuil de 30 % avec les tubes microcapillaires en verre (28,6 %), contre 68,0 % avec les bandelettes de Schirmer (**Tableau 1**). Par ailleurs, sur les 135 métabolites dont le CV était inférieur à 30 %, 36 étaient détectés par les deux techniques de prélèvement (**Figure supplémentaire 1**). Seuls 9 des 35 métabolites détectés avec les deux techniques avaient un biais moyen inférieur à 20 % (référence : tubes microcapillaire en verre). La bandelette de Schirmer est donc apparue moins satisfaisante que le prélèvement par tube microcapillaire en verre.

Tableau 1. Résultats de l'analyse métabolomique selon la technique de prélèvement : tubes microcapillaire en verre ou bandelette de Schirmer (CV en %).

| | Tubes microcapillaire en verre | Bandelettes de Schirmer |
|--|---------------------------------------|--------------------------------|
| Nombre total de métabolites détectés | 154 | 131 |
| CV moyen | 28,6 | 68,0 |
| Nombre de métabolites ayant un CV < 30% | 113 | 58 |
| CV moyen des métabolites ayant un CV < 30% | 15,3 | 18,7 |
| Nombre de métabolites ayant un CV < 30% et un biais moyen < 20%, parmi les métabolites en commun (référence : tube microcapillaire en verre) | - | 9/35 |

Application lipidomique

Les CV moyen était inférieur à 20% avec un nombre similaire de lipides ayant un CV inférieur à 30% pour les deux méthodes de prélèvement (**Tableau 2**). Parmi les 58 lipides ayant un CV inférieur à 30 %, 54 étaient détectés avec les deux méthodes de prélèvement (**Figure supplémentaire 2**). Trente-neuf lipides sur les 54 détectés par les deux méthodes et ayant un CV inférieur à 30 % avaient un biais moyen inférieur à 20 % (référence : tubes microcapillaires en verre) (tableau 2).

Tableau 2. Résultats de l'analyse lipidomique selon la technique de prélèvement : tubes microcapillaires en verre ou bandelette de Schirmer (CV en %).

| | Tubes microcapillaire en verre | Bandelettes de Schirmer |
|--|---------------------------------------|--------------------------------|
| Nombre total de lipides détectés | 67 | 67 |
| CV moyen | 19,2 | 18,4 |
| Nombre de lipides ayant un CV < 30% | 55 | 57 |
| CV moyen des lipides ayant un CV < 30% | 12,6 | 12,4 |
| Nombre de lipides ayant un CV < 30% et un biais moyen < 20%, parmi les lipides en commun (référence : tube microcapillaire en verre) | - | 39/54 |

VI. Excellente reproductibilité à partir d'un petit volume d'échantillon en métabolomique et lipidomique

Application métabolomique

Contrairement au volume de 2 μL , le CV moyen calculé sur la totalité des métabolites détectés était inférieur à 30% pour les volumes de 5 μL et 10 μL . Le volume de larmes de 10 μL donnait de meilleurs résultats en termes de couverture du métabolome (137 métabolites avec un CV inférieur à 30% (CV moyen de 11,1%)). Les résultats obtenus avec les deux autres volumes d'échantillons étaient également satisfaisants : 113 métabolites avec 5 μL (CV moyen 15,3%) et 89 avec 2 μL (CV moyen 14,7%) (**Tableau 3**). Nous avons remarqué que 81 métabolites sur 143 ayant un CV inférieur à 30 % étaient détectés dans les trois volumes (**Figure supplémentaire 3**). Avec une couverture métabolique et une reproductibilité satisfaisantes, nous avons opté pour le volume d'échantillon le plus faible : 5 μL .

Tableau 3. Résultats de l'analyse métabolomique selon les 3 volumes testés : 10 μL , 5 μL et 2 μL .

| | 10μL | 5μL | 2μL |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Nombre total de métabolites détectés | 155 | 153 | 154 |
| CV moyen | 17,7 | 26,8 | 37,0 |
| Nombre de métabolites ayant un CV < 30% | 137 | 113 | 89 |
| CV moyen des métabolites ayant un CV < 30% | 11,1 | 15,3 | 14,7 |
| Nombre de métabolites ayant un CV < 30% et un biais moyen < 20%, parmi les métabolites en commun (référence : 10 μL) | - | 58/110 | 28/84 |

Application lipidomique

Le CV moyen, calculé à partir de tous les lipides détectés, était inférieur à 30 % pour les trois volumes. Le meilleur coefficient de variation parmi les lipides avec un CV < 30% a été

obtenu avec 10 μL de larmes, mais plus de lipides avec un CV < 30% ont été détectés avec 5 μL (55 lipides, par rapport à 52 avec 10 μL , et 49 avec 2 μL) (Tableau 4). Sur les 58 lipides avec un CV < 30 %, 43 ont été détectés dans les trois volumes (**Figure supplémentaire 4**). Quarante des 48 (83,3 %) lipides détectés dans 5 μL et 10 μL avaient un CV inférieur à 30 % et un biais moyen inférieur à 20 % (référence 10 μL) (**Tableau 4**).

Tableau 4. Résultats de l'analyse lipidomique selon les 3 volumes testés : 10 μL , 5 μL et 2 μL .

| | 10μL | 5μL | 2μL |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Nombre total de lipides détectés | 67 | 67 | 67 |
| CV moyen | 22,6 | 19,2 | 22,3 |
| Nombre de lipides ayant un CV < 30% | 52 | 55 | 49 |
| CV moyen des lipides ayant un CV < 30% | 10,4 | 12,6 | 12,2 |
| Nombre de lipides ayant un CV < 30% et un biais moyen < 20%, parmi les lipides en commun (référence : 10 μL) | - | 40/48 | 26/44 |

VII. Comparabilité du profil métabolomique entre les deux yeux

Cinquante et un métabolites étaient retrouvés dans 18 échantillons, issus des yeux droits et gauches de 9 sujets. Le CV du contrôle qualité était inférieur à 30 % pour 49 métabolites. Aucune différence n'a été trouvée entre les deux yeux dans l'analyse en composantes principales avec 49,2 % de la variance expliquée par le modèle (PC 1 = 31,0 % ; PC 2 = 18,2 %) (**Figure 1**). De même, aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux yeux pour chaque métabolite après une analyse univariée appariée (données non présentées).

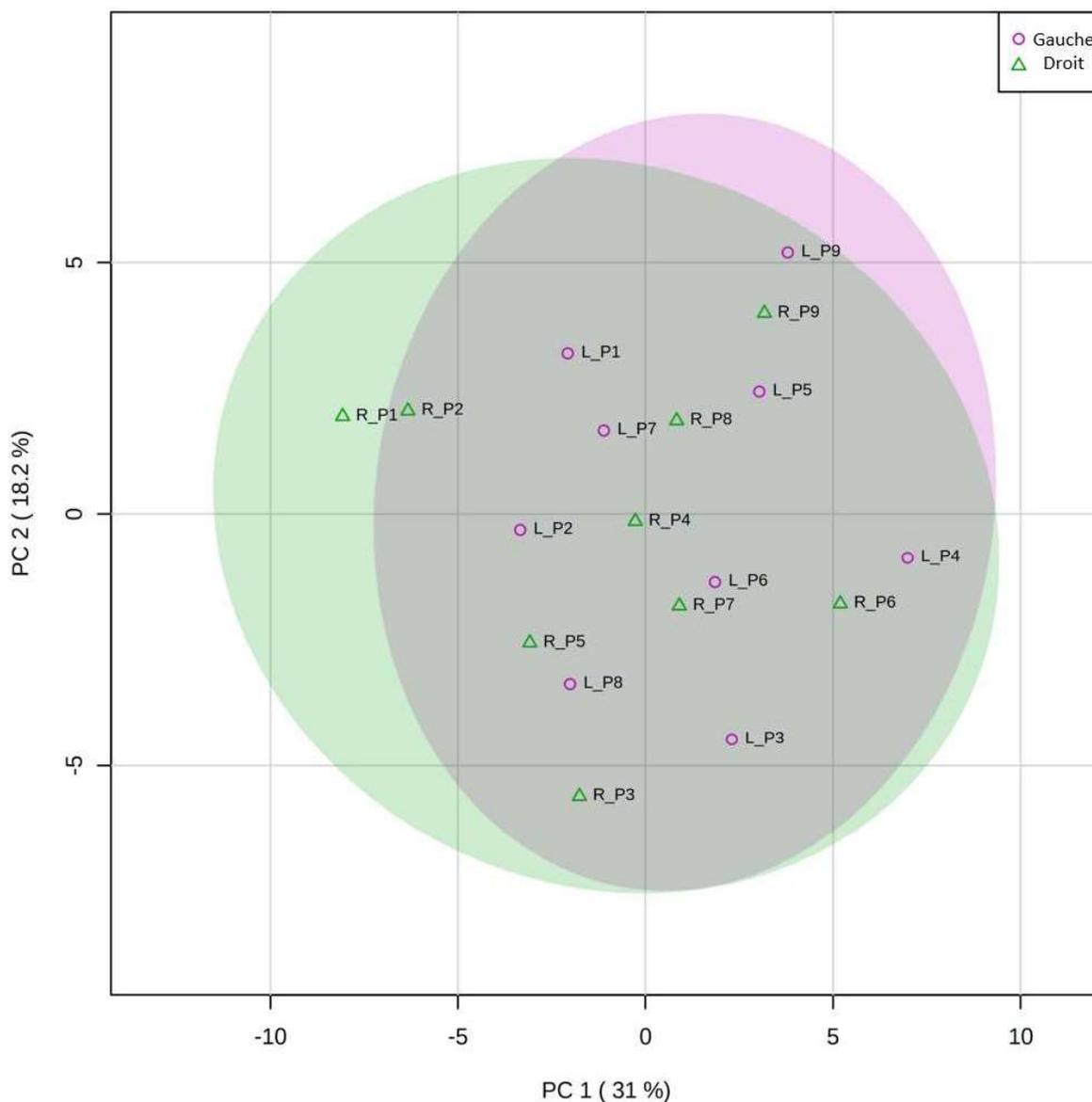


Figure 1. Carte factorielle représentant la composition métabolomique de l'œil droit (R ; triangles) par rapport à l'œil gauche (L ; ronds) de neuf sujets sains en analyse en composantes principales.

VIII. Un métabolisme à part entière

Les métabolites retrouvés dans les larmes ont été comparés à ceux détectés dans le sang et la périlymphe par la même technique. Quarante-deux métabolites étaient retrouvés en commun dans ces trois fluides biologiques. Vingt-neuf étaient spécifiques à la périlymphe, 28 aux larmes et 57 au sang (**Figure supplémentaire 5**). Une analyse d'enrichissement a été effectuée sur la base des 28 métabolites spécifiques aux larmes. Les voies les plus représentées

impliquaient le métabolisme du rétinol, du galactose, la dégradation du tréhalose et la bêta-oxydation des acides gras à très longue chaîne (**Figure 2**).

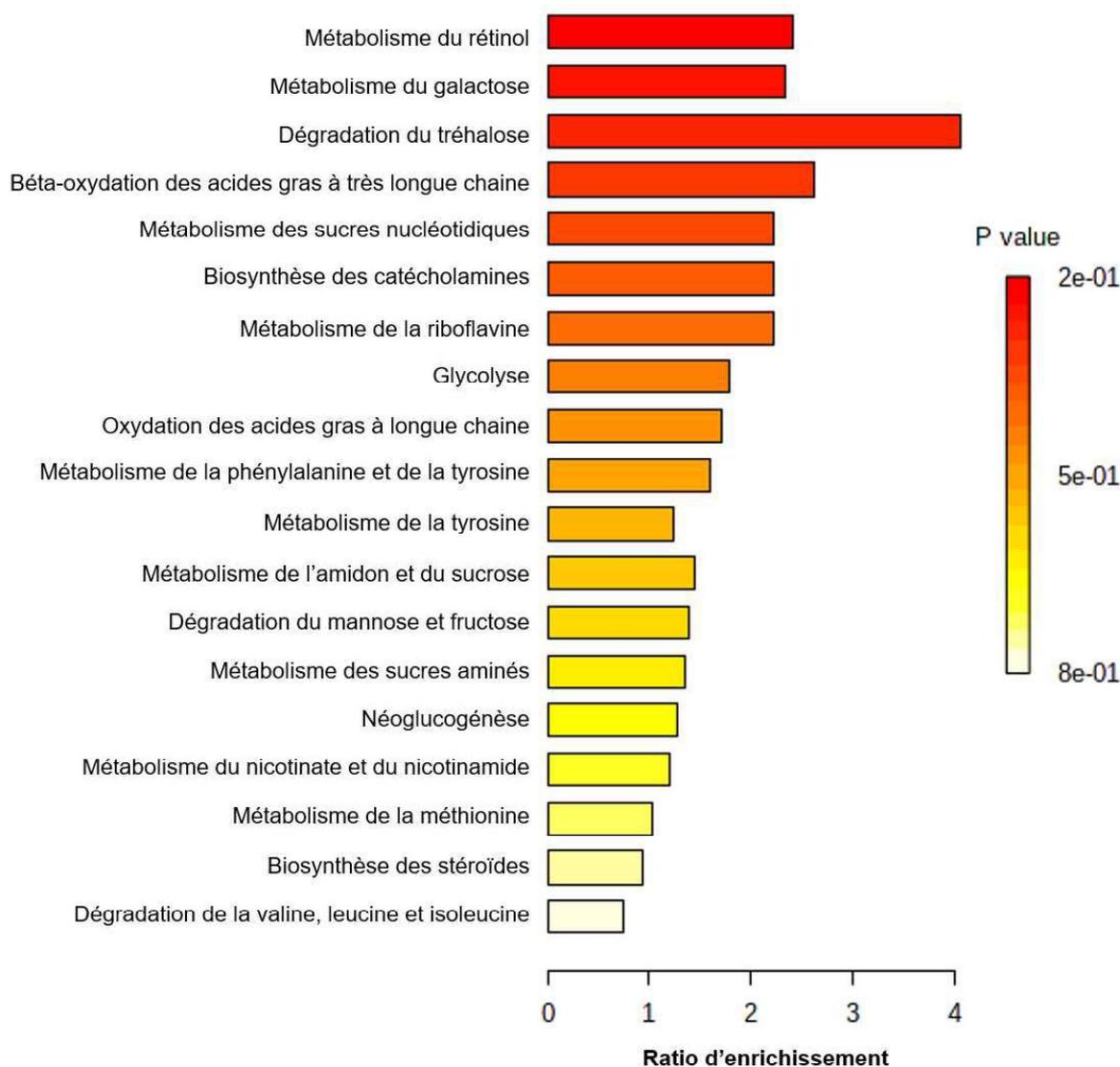


Figure 2. Résultats de l'analyse d'enrichissement basée sur les métabolites spécifiquement présents dans les larmes.

IX. Absence d'effet âge sur le métabolome des larmes de sujets sains

Trois groupes de 9 sujets sains ont été étudiés. Le groupe A comprenait des sujets âgés de 18 à 23 ans (âge médian 21 ans), le groupe B des sujets âgés de 28 à 32 ans (âge médian 31 ans) et le groupe C des sujets de 40 à 47 ans (âge médian 43 ans). Au total, 131 métabolites étaient détectés. Bien que non significative, une tendance à la variation de la composition métabolomique des larmes avec l'âge était remarquée dans l'analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA) (**Figure 3**). Les voies de la phénylalanine-tyrosine-tryptophane, de la

biosynthèse de l'aminocyl t-RNA et du métabolisme de l'alanine-aspartate-glutamate étaient les 3 voies principales associées aux 15 métabolites les plus variables en fonction de l'âge (Figures supplémentaires 6 et 7).

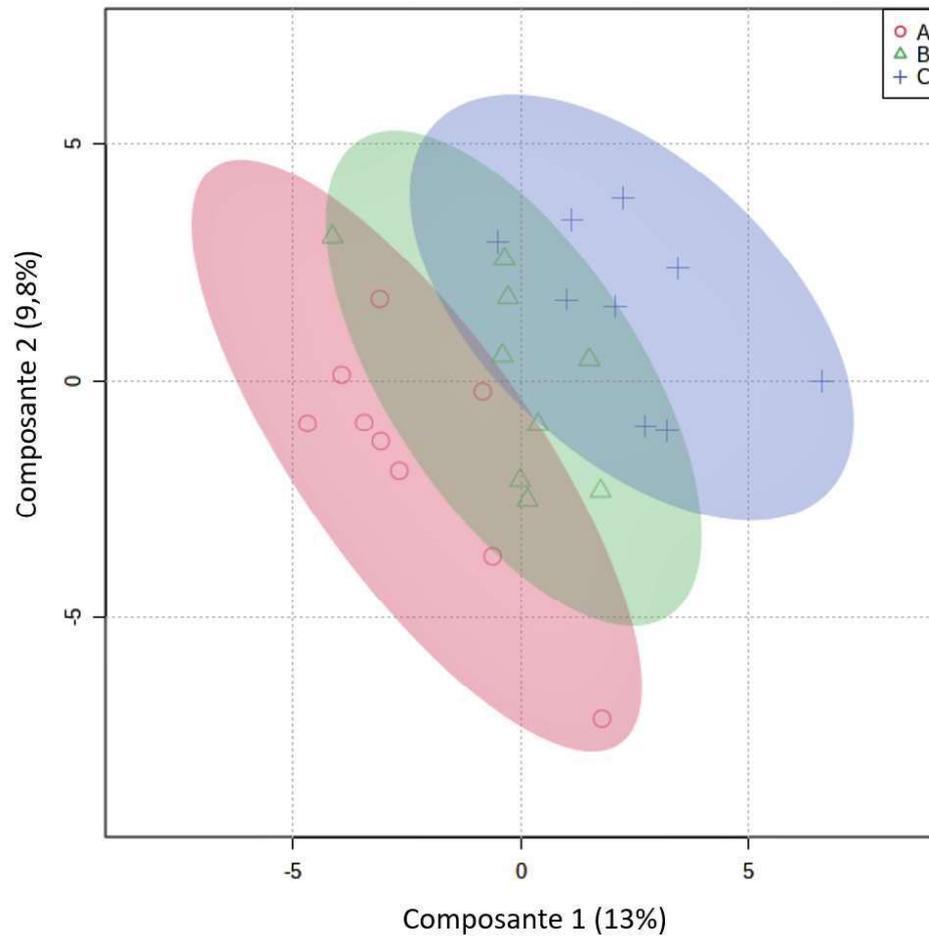


Figure 3. Carte factorielle représentant la comparaison de la composition métabolomique des larmes de 9 sujets ayant un âge moyen de 21 ans (groupe A ; cercles), 9 sujets d'âge moyen de 30 ans (groupe B ; triangles) et 9 sujets d'âge moyen de 43 ans (groupe C ; croix) en analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA).

DISCUSSION

I. Une couverture satisfaisante du métabo-lipidome lacrymal par UHPLC-MS/MS

En utilisant l'UHPLC-MS/MS, jusqu'à 155 métabolites et 67 lipides ont été identifiés dans un seul échantillon de larmes basales humaines. Une revue de la littérature récente a révélé que l'UHPLC-MS/MS est la procédure la plus couramment utilisée pour l'analyse des larmes humaines, devant d'autres comme l'UPLC (ou HPLC)-MS, la LC-MS/MS, la MS/MS, la spectrométrie de masse par infusion directe et la résonance magnétique nucléaire ^1H [4]. Nous confirmons ici l'intérêt d'une telle technique qui est maintenant systématiquement disponible dans les laboratoires hospitaliers.

II. Détermination du protocole d'extraction

Supériorité de l'extraction méthanol/eau pour la bandelette de Schirmer en métabolomique

De multiples techniques d'extraction sont disponibles pour la métabo-lipidomique. Cette étape pré-analytique est essentielle pour isoler les métabolites ou les lipides, pour exclure les contaminants et ainsi, pour diminuer l'effet de matrice. Pour la métabolomique, nous avons observé que le méthanol/eau (1:1, v/v) était le meilleur solvant d'extraction comparé à l'ACN et au méthanol pur sur bandelettes de Schirmer.

Supériorité de l'extraction de Folch pour la lipidomique

Pour la lipidomique, la technique de Folch, qui repose sur l'utilisation d'une solution biphasique de chloroforme, de méthanol et d'eau, s'est avérée plus satisfaisante que le MTBE, tant pour les bandelettes de Schirmer que pour les tubes microcapillaires en verre [9]. Les techniques d'extraction étant différentes pour les métabolites et les lipides, le design de l'étude doit être anticipé pour prévoir la meilleure utilisation du volume limité de larmes.

III. Avantages et inconvénients des techniques de prélèvement

La bandelette de Schirmer et le tube microcapillaire représentent les deux principales méthodes de prélèvement pour les larmes humaines. Toutes deux se sont avérées être des techniques fiables, douces et non invasives [10]. Butovich *et al.* considèrent la bandelette de

Schirmer comme l'approche la plus adaptée pour prélever des larmes en minimisant le risque de blessure oculaire et en raison de son utilisation dans la pratique clinique courante [11]. Cependant, selon notre expérience, le tube microcapillaire en verre est également une méthode sûre et facile pour le prélèvement de larmes. Aucune douleur oculaire ni complication cornéenne ou conjonctivale n'a été signalée dans notre étude. Il est à noter que le prélèvement de larmes a été effectué par deux ophtalmologistes formés à la chirurgie oculaire et que, par conséquent, nous ne pouvons pas extrapoler la sécurité de la technique du tube microcapillaire à d'autres opérateurs non-ophtalmologistes. Par ailleurs, la quantification directe du volume lacrymal n'est pas possible avec la bandelette de Schirmer par rapport au tube microcapillaire en verre à moins de l'estimer indirectement en le calculant avec le poids (Schirmer imbibé moins Schirmer sec) et la densité des larmes. En évitant le contact direct avec la surface oculaire, les risques de contamination par les composants cellulaires et le larmolement réflexe sont réduits. La présence de larmes réflexes dans les échantillons basaux doit être évitée car leurs compositions est connue pour être significativement différente [12].

IV. Supériorité du tube microcapillaire en verre pour la métabolomique

La variabilité était plus importante en métabolomique et la détection de métabolites ayant un CV inférieur à 30% moindre avec les bandelettes de Schirmer. Aucune différence significative n'a été constatée en lipidomique entre les bandelettes de Schirmer et les tubes microcapillaires en verre, comme décrit précédemment par Butovich *et al.* [11]. Par conséquent, les deux techniques de prélèvement sont comparables pour la lipidomique des larmes, mais nous recommandons le tube microcapillaire en verre comme premier choix pour la métabolomique.

V. Volume de larmes de 5 μ L : un bon compromis pour les explorations métabolomiques et lipidomiques

Lors du prélèvement de larmes, le volume est un facteur important à prendre en compte, surtout lorsqu'une approche multimodale, utilisant différentes analyses, doit être réalisée afin d'augmenter la probabilité de trouver des biomarqueurs pertinents. L'un des défis actuels lors de la manipulation de volumes aussi faibles est d'utiliser le volume optimal pour une analyse donnée afin de préserver le reste de l'échantillon pour d'autres méthodes. A notre connaissance, il s'agit de la première étude comparant la reproductibilité en fonction du volume de larmes humaines. S'il est difficile d'obtenir 10 μ L de larmes basales en un seul échantillon, il est plus facile d'obtenir 5 μ L, surtout si les larmes deux yeux sont regroupées. En effet, selon la *Tear*

Film & Ocular Surface Society, le volume de larmes par œil est de $8 \pm 3 \mu\text{L}$ [13]. Un volume de $5 \mu\text{L}$ permet une couverture satisfaisante de la composition métabolique et lipidique, avec peu ou pas de perte d'information par rapport à $10 \mu\text{L}$. Deux microlitres peuvent être un volume acceptable si d'autres analyses sont nécessaires sur le même échantillon, mais il est à noter que la couverture métabo-lipidique sera réduite.

VI. Possibilité de regrouper les larmes des deux yeux

L'augmentation du volume des larmes basales au-delà de $5 \mu\text{L}$ est possible dans la pratique clinique grâce à deux méthodes : le prélèvement de larmes répété dans le temps et le regroupement des échantillons des deux yeux. Le prélèvement répété est rendu possible par un renouvellement rapide des larmes. En considérant un débit estimé à $16\%/min$ par la *Tear Film & Ocular Surface Society*, 5 microlitres supplémentaires peuvent être prélevés en 4 minutes [13]. Par ailleurs, la mise en commun des larmes n'est possible que si la composition inter-œil est comparable. Dans l'étude actuelle, il n'y avait pas de différence significative entre la composition métabolique de l'œil droit et de l'œil gauche après prélèvement par tube microcapillaire en verre. Cette constatation est concordante avec la publication de Dammeier *et al.* qui ne rapporte aucune différence significative pour le métabolome entre les yeux avec la bandelette de Schirmer [2]. La comparabilité du métabolome inter-œil reste à être démontrée en cas de pathologies, en particulier asymétriques, puisque nos résultats portent sur des larmes basales de sujets sains.

VII. Voies du rétinol et du tréhalose dans les larmes

En comparant le métabolome des larmes avec celui du sang et de la périlymphe, certains métabolites sont spécifiquement détectés dans les larmes humaines. Une analyse d'enrichissement a permis d'identifier les voies auxquelles les métabolites étaient liés. Le métabolisme du rétinol était l'une des voies les plus représentées, ce qui est cohérent avec les connaissances sur son rôle essentiel dans la lubrification de la surface oculaire et la physiopathologie de l'œil sec. La détection par chromatographie liquide à haute performance dans les larmes humaines de rétinol, une forme de vitamine A, est rapportée depuis les années 1980 [14,15]. Bien que des éléments du métabolisme du rétinol puissent être trouvés, le rétinol lui-même n'est pas facilement détectable dans les larmes. En effet, alors que dans notre étude le rétinoate, une autre forme de vitamine A, était retrouvé dans le sang et les larmes, le rétinol n'était détectable que dans le sang. Khaksari *et al.* ont rapporté des résultats similaires et ont suggéré comme éléments d'explication les faibles concentrations ou les interférences

d'ionisation de la spectrométrie de masse en mode ESI [16]. En effet, l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) semble être une meilleure méthode d'ionisation pour des molécules telles que les vitamines liposolubles qui, par leur faible polarité, sont plus difficiles à ioniser, et donc à détecter par ESI.

La dégradation du tréhalose ressortait également ici comme un voie très représentée dans les larmes. Bien qu'il ne soit pas synthétisé par les cellules humaines, il est présent dans les plantes ou les levures et peut donc se retrouver en petite quantité dans l'alimentation. Son métabolisme lors d'un apport exogène, en collyre par exemple, est connu pour protéger les cellules de la surface oculaire du stress oxydatif, de la déshydratation et de l'inflammation associés à l'œil sec [17]. Devant son poids dans cette analyse d'enrichissement, il faut se questionner sur l'utilisation par les sujets étudiés de collyre à base tréhalose qui auraient pu passer inaperçue et biaiser sa représentativité dans le métabolome.

VIII. Tendances à la variabilité en fonction de l'âge

L'étude du métabolome des larmes selon notre technique d'analyse des larmes ainsi développée n'a retrouvé aucune différence significative entre 3 groupes d'âge médian de 21, 31 et 43 ans. Cependant, il existait une tendance à la variabilité en fonction de l'âge pour certains métabolites. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si cette tendance est toujours présente chez les sujets plus âgés. Les voies de la phénylalanine-tyrosine-tryptophane, de la biosynthèse de l'aminocyl t-RNA et du métabolisme de l'alanine-aspartate-glutamate, étant les plus variables, doivent être particulièrement prises en compte lors de la comparaison de patients d'âges différents.

CONCLUSION

Les étapes pré-analytiques et analytiques de la métabo-lipidomique dans les larmes humaines nécessitent d'être standardisées car il s'agit d'un domaine en pleine expansion dans la stratégie de recherche de biomarqueurs dans les maladies ophtalmologiques et systémiques. Les résultats actuels apportent des solutions pour améliorer la reproductibilité, permettre des comparaisons entre les études et faciliter le transfert de résultats fondamentaux vers la pratique clinique.

REFERENCES

- [1] Chen L, Zhou L, Chan ECY, Neo J, Beuerman RW. Characterization of The Human Tear Metabolome by LC–MS/MS. *J Proteome Res* 2011;10:4876–82. <https://doi.org/10.1021/pr2004874>.
- [2] Dammeier S, Martus P, Klose F, Seid M, Bosch D, D’Alvise J, et al. Combined Targeted Analysis of Metabolites and Proteins in Tear Fluid With Regard to Clinical Applications. *Trans Vis Sci Tech* 2018;7:22. <https://doi.org/10.1167/tvst.7.6.22>.
- [3] Lam SM, Tong L, Duan X, Petznick A, Wenk MR, Shui G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *Journal of Lipid Research* 2014;55:289–98. <https://doi.org/10.1194/jlr.M044826>.
- [4] Khanna RK, Catanese S, Emond P, Corcia P, Blasco H, Pisella P-J. Metabolomics and lipidomics approaches in human tears: A systematic review. *Survey of Ophthalmology* 2022:S003962572200008X. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2022.01.010>.
- [5] Diémé B, Lefèvre A, Nadal-Desbarats L, Galineau L, Madji Hounoum B, Montigny F, et al. Workflow methodology for rat brain metabolome exploration using NMR, LC–MS and GC–MS analytical platforms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017;142:270–8. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.068>.
- [6] Blasco H, Bessy C, Plantier L, Lefevre A, Piver E, Bernard L, et al. The specific metabolome profiling of patients infected by SARS-COV-2 supports the key role of tryptophan-nicotinamide pathway and cytosine metabolism. *Sci Rep* 2020;10:16824. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73966-5>.
- [7] Beauclercq S, Nadal-Desbarats L, Germain K, Praud C, Emond P, Bihan-Duval EL, et al. Does lipidomic serum analysis support the assessment of digestive efficiency in chickens? *Poultry Science* 2019;98:1425–31. <https://doi.org/10.3382/ps/pey483>.
- [8] Bardou P, Mariette J, Escudié F, Djemiel C, Klopp C. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 2014;15:293. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>.
- [9] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry* 1957;226:497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
- [10] Posa A, Bräuer L, Schicht M, Garreis F, Beileke S, Paulsen F. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 2013;195:137–42. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2012.10.001>.

- [11] Butovich IA. On the Lipid Composition of Human Meibum and Tears: Comparative Analysis of Nonpolar Lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3779. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1889>.
- [12] Rohit A, Stapleton F, Brown SHJ, Mitchell TW, Willcox MDP. Comparison of Tear Lipid Profile among Basal, Reflex, and Flush Tear Samples. *Optometry and Vision Science* 2014;91:1391–5. <https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000000411>.
- [13] Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *The Ocular Surface* 2017;15:366–403. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.03.006>.
- [14] Speek AJ, van Agtmaal EJ, Saowakontha S, Schreurs WHP, van Haeringen NJ. Fluorometric determination of retinol in human tear fluid using high-performance liquid chromatography. *Current Eye Research* 1986;5:841–5. <https://doi.org/10.3109/02713688609029235>.
- [15] Ubels JL, Macrae SM. Vitamin A is present as retinol in the tears of humans and rabbits. *Current Eye Research* 1984;3:815–22. <https://doi.org/10.3109/02713688409000793>.
- [16] Khaksari M, Mazzoleni LR, Ruan C, Kennedy RT, Minerick AR. Data representing two separate LC-MS methods for detection and quantification of water-soluble and fat-soluble vitamins in tears and blood serum. *Data in Brief* 2017;11:316–30. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.02.033>.
- [17] Panigrahi T, Shivakumar S, Shetty R, D'souza S, Nelson EJR, Sethu S, et al. Trehalose augments autophagy to mitigate stress induced inflammation in human corneal cells. *The Ocular Surface* 2019;17:699–713. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2019.08.004>.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

Tableau supplémentaire 1. Résultats de l'analyse lipidomique selon la technique d'extraction : Folch ou MTBE (CV en %).

| | Folch | | MTBE | |
|--|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| | Tubes microcapillaire en verre | Bandelettes de Schirmer | Tubes microcapillaire en verre | Bandelettes de Schirmer |
| Nombre total de lipides détectés | 76 | 77 | 70 | 76 |
| CV moyen | 28,0 | 24,8 | 29,8 | 43,7 |
| Nombre de lipides ayant un CV < 30% | 54 | 59 | 48 | 36 |
| CV moyen des lipides ayant un CV < 30% | 21,1 | 19,0 | 17,2 | 16,1 |

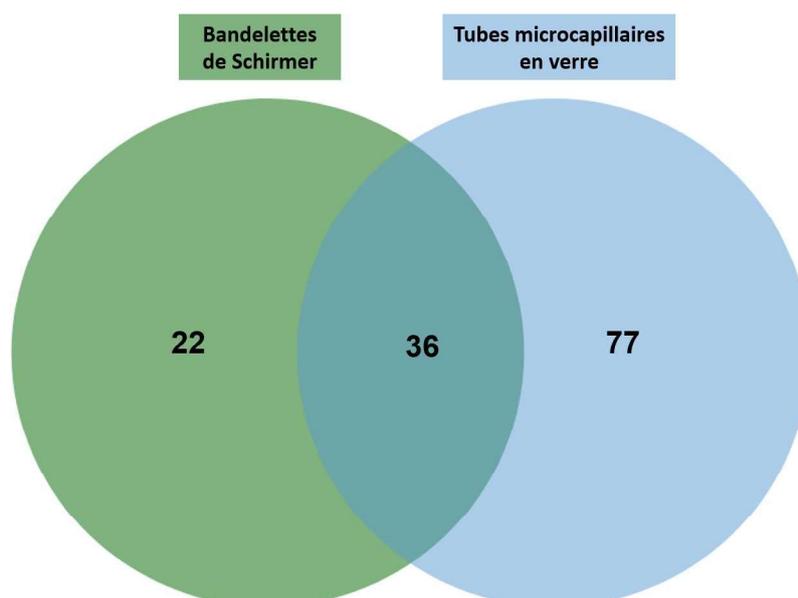


Figure supplémentaire 1. Diagramme de Venn montrant la distribution des métabolites ayant un coefficient de variation < 30% selon la technique de prélèvement (bandelette de Schirmer ou tube microcapillaire en verre).

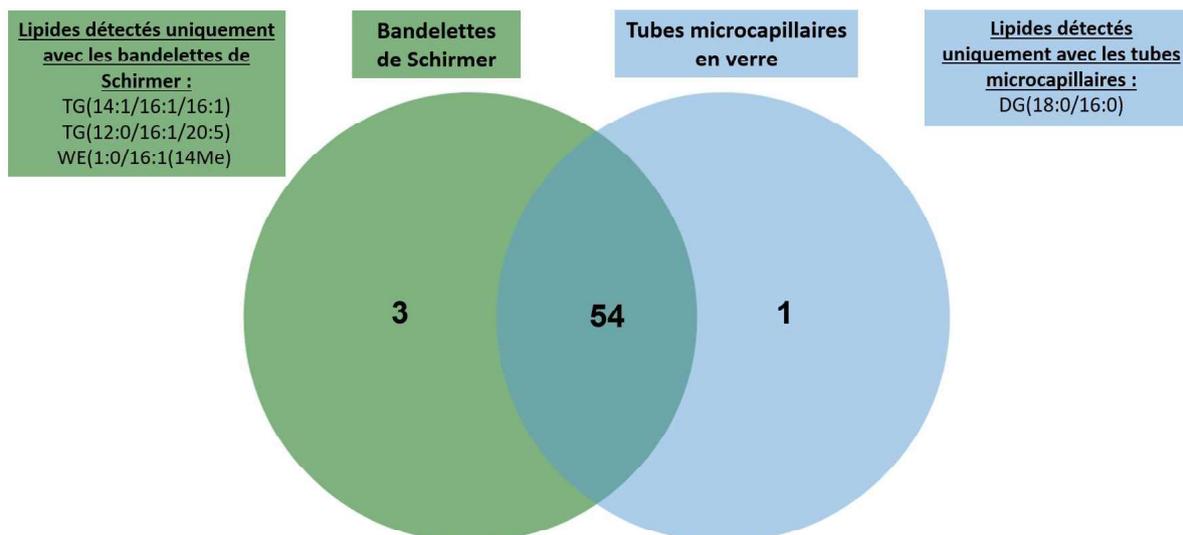


Figure supplémentaire 2. Diagramme de Venn montrant la distribution des lipides avec un coefficient de variation < 30% selon la technique de prélèvement (bandelette de Schirmer ou tube microcapillaire en verre) et listes des lipides détectés uniquement avec une technique (DG : diacylglycérol ; TG : triacylglycérol ; WE : wax ester).

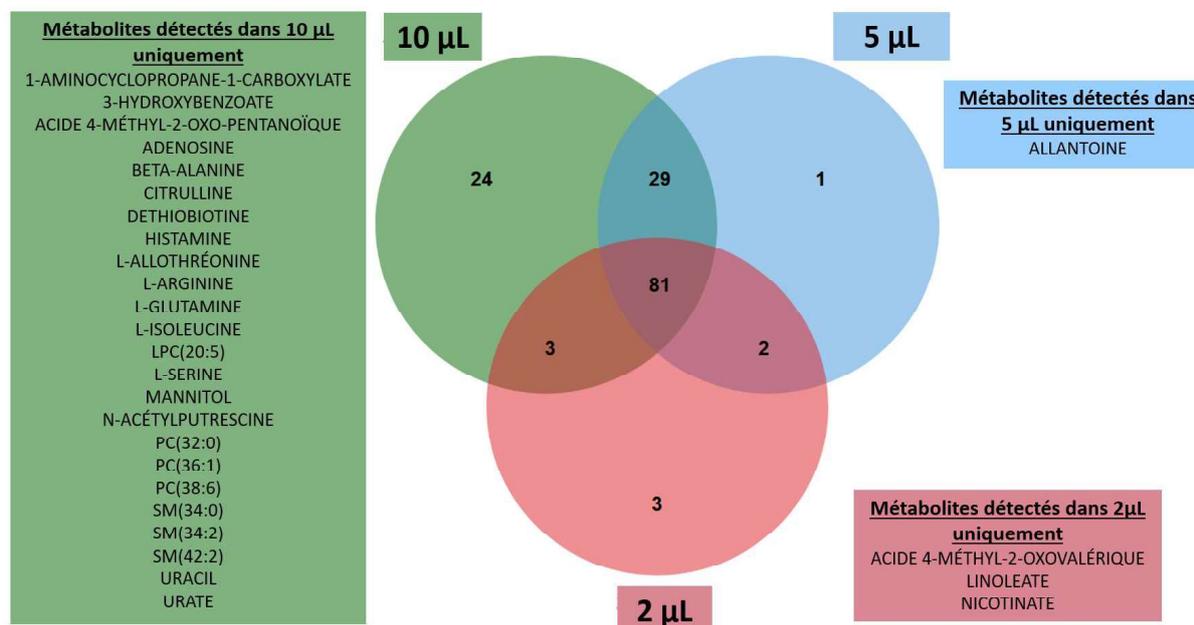


Figure supplémentaire 3. Diagramme de Venn montrant la distribution des métabolites avec un coefficient de variation < 30% selon le volume de larmes et liste des métabolites détectés uniquement dans un volume.

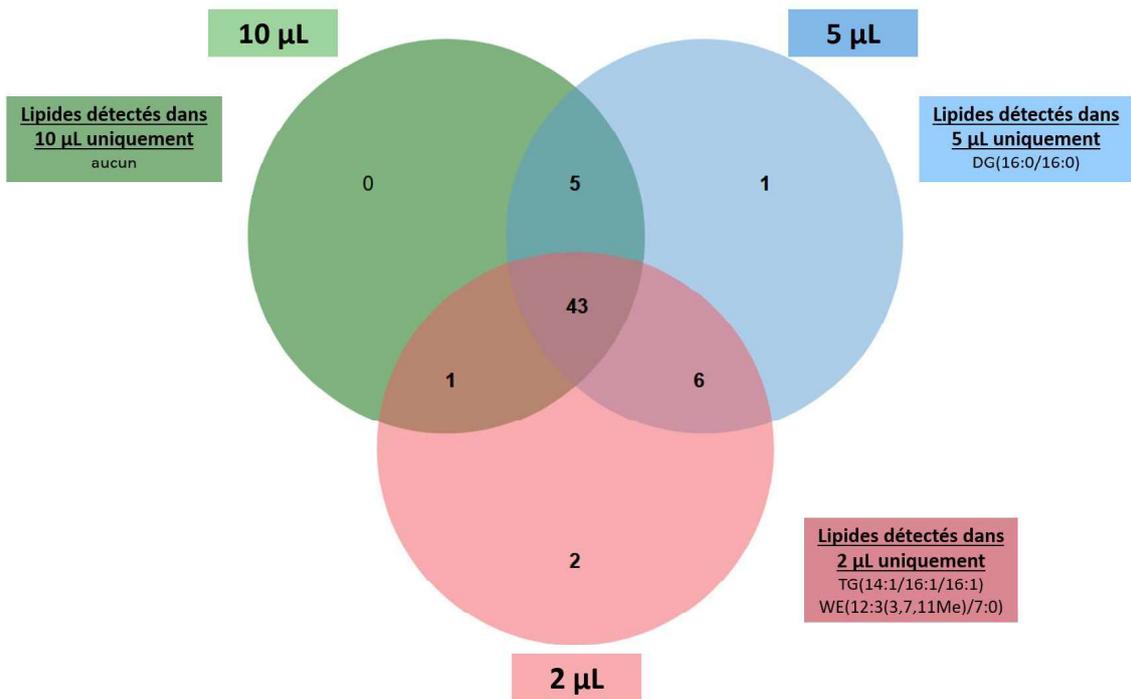


Figure supplémentaire 4. Diagramme de Venn montrant la distribution des lipides avec un coefficient de variation < 30 % en fonction du volume de l'échantillon et liste des lipides détectés uniquement dans un volume. DG : diacylglycérol ; TG : triacylglycérol ; WE : wax ester.

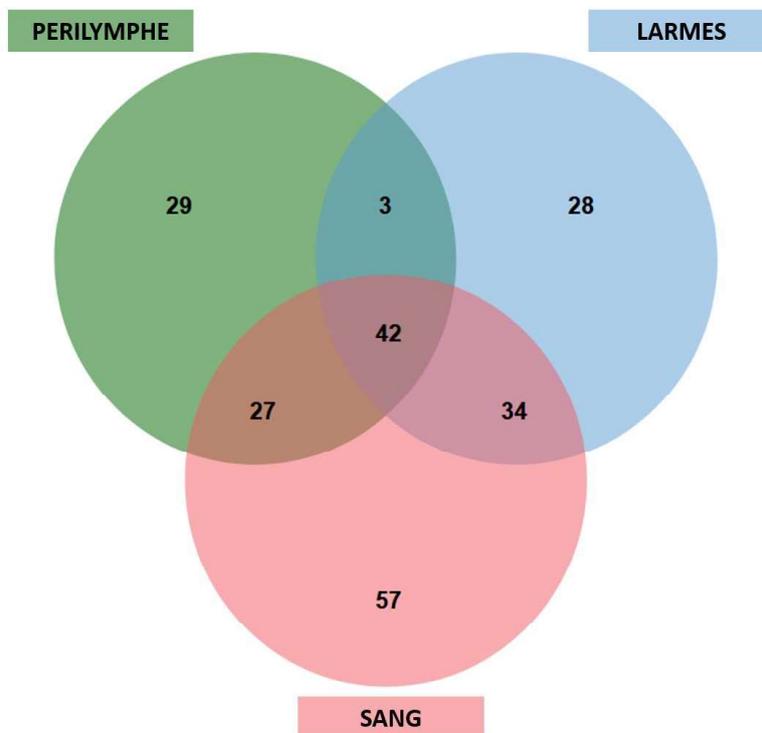


Figure supplémentaire 5. Diagramme de Venn montrant la distribution des métabolites avec un coefficient de variation < 30 % selon l'origine de l'échantillon : périlymphe, larmes ou sang.

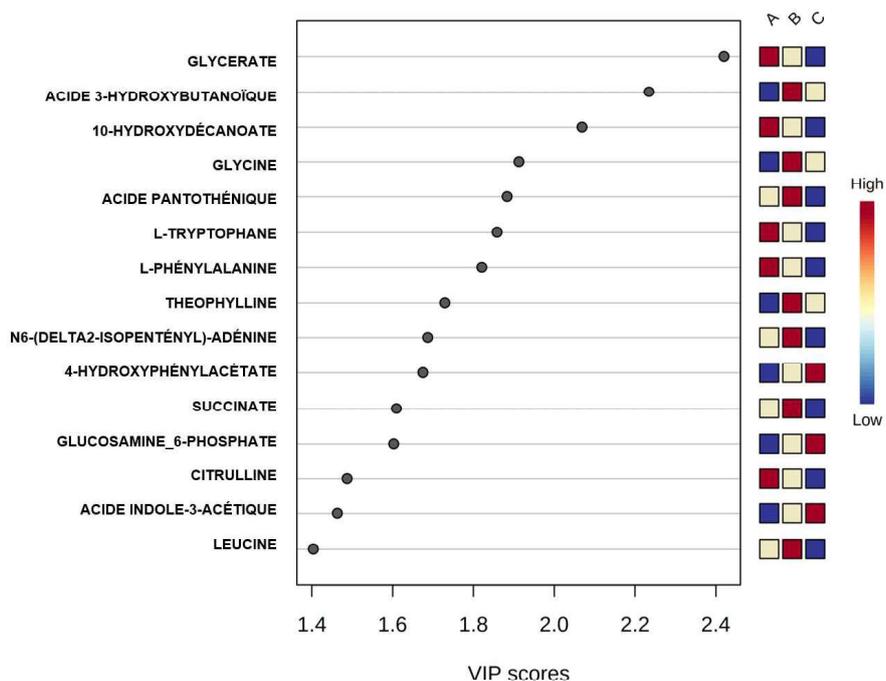


Figure supplémentaire 6. Présentation des quinze métabolites les plus variables selon l'âge dans les larmes et leur score d'importance des variables dans la projection (VIP scores).

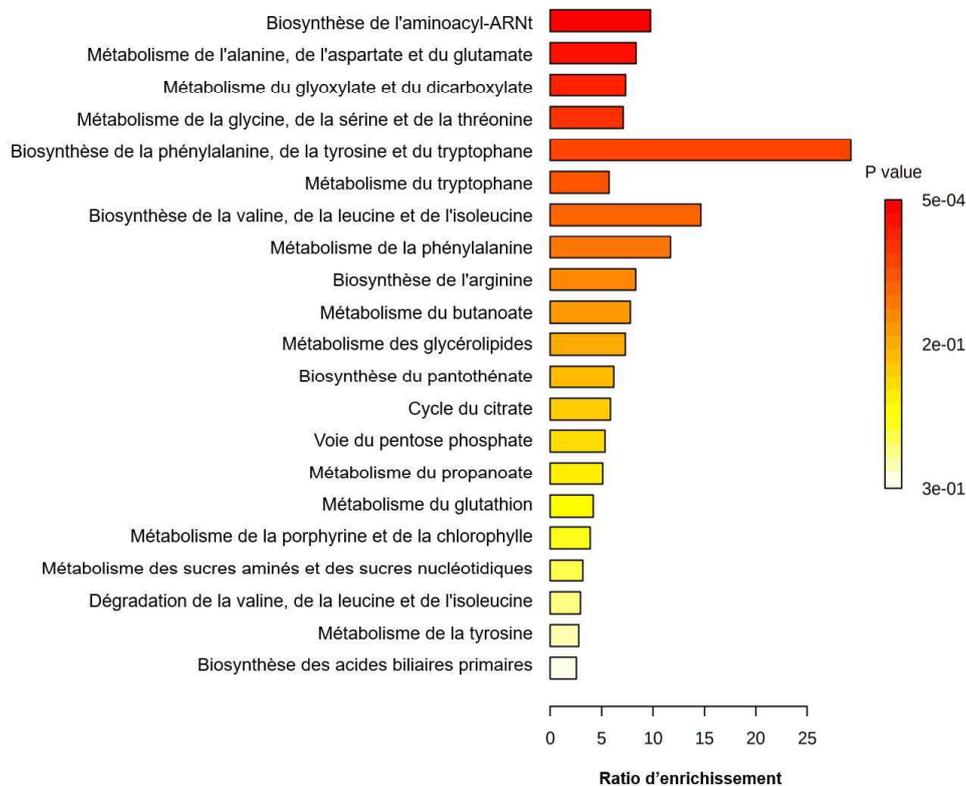


Figure supplémentaire 7. Aperçu de l'analyse d'enrichissement basée sur les 15 métabolites les plus variables en fonction de l'âge dans les larmes.

Vu, le Directeur de Thèse

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes.

Le 18/05/2022

**Vu, le Doyen
De la Faculté de Médecine de Tours
Tours, le**

CATANESE Sophie

46 pages – 4 tableaux – 3 figures – 6 matériels supplémentaires

RESUME :

OBJECTIF : L'objectif de cette étude était de standardiser les étapes préanalytiques et analytiques de l'analyse métabo-lipidomique des larmes humaines afin de faciliter son application dans les pathologies ophtalmologiques et systémiques.

METHODE : Nous avons évalué différentes méthodes pour chaque étape de l'analyse des larmes humaines, du prélèvement à l'acquisition du profil « omique », afin d'obtenir la plus large couverture possible avec les critères analytiques les plus robustes. Des comparaisons de la reproductibilité de l'analyse métabo-lipidomique par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem selon la latéralité oculaire, deux méthodes de prélèvement, trois volumes (2 μ L, 5 μ L, 10 μ L) et trois méthodes d'extraction en métabolomique et deux en lipidomique ont été réalisées. L'effet de l'âge sur le métabo-lipidome des larmes a aussi été étudié sur des sujets sains.

RESULTAT : L'extraction par méthanol/eau était supérieure aux autres méthodes en termes de coefficient de variation moyen et de nombre de métabolites ayant un coefficient de variation inférieur à 30% en métabolomique par bandelette de Schirmer tandis que l'extraction de type Folch était supérieure au méthyl tert-butyl éther en lipidomique quelle que soit la méthode de prélèvement. Sur ces mêmes critères, les tubes microcapillaires en verre donnaient une meilleure couverture du métabolome par rapport aux bandelettes de Schirmer, mais ces deux techniques étaient comparables en lipidomique. Le volume de 5 μ L permettait une couverture satisfaisante du métabo-lipidome. Aucune différence significative entre les deux yeux n'était retrouvée dans le métabo-lipidome de sujets sains. Tandis que la majorité des métabolites et lipides n'étaient pas influencés par l'âge, les voies de la phénylalanine-tyrosine-tryptophane, de la biosynthèse de l'arnioacyl ARN-t et du métabolisme alanine-aspartate-glutamate étaient les trois principales voies associées aux 15 métabolites les plus variables selon l'âge.

CONCLUSION : Ces résultats contribueront à améliorer les travaux en métabo-lipidomique dans les larmes humaines pour l'identification de nouveaux biomarqueurs. La standardisation des étapes pré-analytiques et analytiques est essentielle pour améliorer les comparaisons inter-études et augmenter les chances de transfert de résultats en recherche fondamentale vers la pratique clinique.

MOTS CLES : métabolomique ; lipidomique ; larmes ; UHPLC-MS/MS ; optimisation analytique

JURY :

Président du Jury : Professeur Pierre-Jean PISELLA
Directeur de thèse : Docteur Raoul Kanav KHANNA
Membres du Jury : Professeur Hélène BLASCO
Docteur Sophie ARSENE
Docteur Guillaume VANDERMEER

Date de soutenance : 17.06.2022