HAL
open science

L'approche métabolomique par RMN pour la recherche de biomarqueurs : une étude comparative in vitro du Liquide Céphalo-Rachidien et du sérum de patients atteints de Sclérose en Plaques

Olivier Varennes

To cite this version:

Olivier Varennes. L'approche métabolomique par RMN pour la recherche de biomarqueurs : une étude comparative in vitro du Liquide Céphalo-Rachidien et du sérum de patients atteints de Sclérose en Plaques. Sciences pharmaceutiques. Université de Picardie Jules Verne, 2015. Français. NNT : . tel-01159820

HAL Id: tel-01159820

https://theses.hal.science/tel-01159820v1

Submitted on 3 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE UFR DE PHARMACIE

THESE D'EXERCICE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 19 FEVRIER 2015

par **Olivier VARENNES**

L'approche métabolomique par RMN pour la recherche de biomarqueurs : une étude comparative *in vitro* du Liquide Céphalo-Rachidien et du sérum de patients atteints de Sclérose en Plaques

---

Président de Jury

Pr François MESNARD (PU)

Membres du jury

Pr Jean-Marc CONSTANS (PU-PH)

Dr Ophélie FLINIAUX (MCU)

Dr Aurélien MARY (AHU – PHARMACIEN)

Dr Roland MOLINIE (MCU)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Eric Gontier, Directeur de l'EA BioPI 3900, de m'avoir accueilli au sein de cette unité de recherche, ainsi que le Professeur François Mesnard, Directeur Adjoint de l'unité, de m'avoir ouvert les portes du laboratoire et offert l'opportunité de réaliser ces travaux de thèse d'exercice en pharmacie.

Je remercie chaleureusement le Professeur Jean-Marc Constans, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, pour son dévouement dans l'encadrement,sa passion dans ses recherches et dans son travail. Merci de m'avoir permis de porter un regard différent sur la pratique hospitalière et celle de la Recherche, d'avoir guidé mes réflexions et nourri ma curiosité.

Je remercie le Docteur Ophélie Fliniaux, Maître de Conférence, pour son accompagnement et son encadrement durant ce travail, ses précieux conseils, sa disponibilité et son soutien. Merci d'avoir su être à l'écoute et d'avoir pu aiguiller mon travail.

Je remercie les Docteurs Roland Molinié et Jean-Xavier Fontaine, Maîtres de Conférence, pour leur accompagnement régulier au laboratoire et les réponses qu'ils ont pu apporter à toutes les questions que j'ai pu leur poser. Merci d'avoir contribué à mon apprentissage pratique et technique.

Je remercie le Docteur Aurélien Mary d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier le Professeur Antoine Galmiche, Praticien Hospitalier, ainsi que Madame Chantal Laverdure, Technicienne au Centre de Biologie Humaine d'Amiens. Sans votre accueil et votre disponibilité, je n'aurais rien pu faire. Je souhaite remercier l'ensemble des étudiants de masters, doctorants, post-doctorants ou ATER du laboratoire BioPI, et parmi eux Hyacinthe, Romain, Benjamin, Fabien, Arash, Cédric et Anthony. Vous avez été d'excellents collègues, puissiez-vous aller loin dans vos recherches et vous accomplir.

Et enfin, je remercierai ma famille et mes amis, ceux qui m'ont soutenu durant ces travaux, qui m'ont attendu durant de longues soirées et de longs week-ends passés au laboratoire plutôt qu'à leurs côtés. Je m'en excuse publiquement.

« C'est par le travail que l'homme se transforme. »

Louis Aragon.

SOMMAIRE

Glossaire

Liste des figures

Liste des tableaux

I. Introduction **1**

I.1 La Sclérose en Plaques 4

I.1.a Différentes formes de SEP 6

I.1.b Initiation et diagnostic de la maladie 7

I.1.c Evolution de la maladie et prise en charge 10

I.2 La Résonance Magnétique Nucléaire 13

I.2.a Bases physiques 13

I.2.b Propriétés magnétiques de l'atome 13

i. Vecteur d'aimantation microscopique *13*

ii. Vecteur d'aimantation macroscopique *14*

I.2.c Noyaux atomiques et phénomène de résonance 15

I.2.d Le FID : signal de précession libre 16

I.2.e Les paramètres du spectre RMN : unités de mesure 17

i. Le déplacement chimique *18*

ii. La densité électronique *19*

II. Etat de l'art 20

II.1Naissance et progrès de la métabolomique 21

II.1.a Métabolomique etmétabonomique 21

II.1.b Les différentes techniques analytiques en métabolomique 22

II.2 Analyse métabolomique par RMN sur les biofluides 24

II.2.a Approche métabolomique ciblée et non ciblée 25

II.2.b Les échantillons explorés en métabolomique 26

II.3 Métabolomique et biomarqueurs 27

II.3.a La métabolomique et la sclérose en plaques 28

II.3.b La métabolomique dans d'autres pathologies 30

II.4 Intérêt du profilage du LCR et du sérum dans le recherche de

biomarqueurs de la SEP 31
II.5 Les séquences en RMN pour la métabolomique 31
i. Pour le LCR *32*
ii. Pour le sérum *32*

III. Matériels et méthodes 33
III.1 Design expérimental 34
III.2 Matériels et méthodes biologiques 35
III.2.a Les échantillons 35
III.2.b Protocoles de prélèvement des LCR et séra et conservation 36
III.2.c Protocoles de préparation des LCR et séra en vue de l'analyse par RMN 37
i. Protocole de préparation des LCR *37*
ii. Protocole de préparation sérum *38*
III.3 Analyse métabolomique en RMN 39
III.3.a L'acquisition 39
III.3.b Les paramètres d'acquisition en RMN qualitative 39
III.3.c Data préprocessing 42
III.3.d L'analyse des données spectrales 44
III.3.e L'identification des métabolites 44

IV. Résultats 46
IV.1 Optimisation du protocole de préparation du LCR pour analyse par RMN 47
IV.1.a Les conditions de préparation testées 47
IV.1.b Influence des différents paramètres et choix du protocole final 48
IV.2 L'identification du métabolome 50
IV.3 Etude comparative *in vitro* du LCR des patients SEP cliniquement définis et non-SEP par une approche métabolomique 52
IV.3 a Vérification des dossiers patients et validation du neurologue 52
IV.3 b Résultats statistiques sur LCR après amélioration de l'échantillonnage
IV.4 Etude comparative *in vitro* du sérum des patients cliniquement définis comme SEP par une approche métabolomique 54

V. Discussion **58**

V.1 L'inclusion des patients de l'étude 59

V.2 La normalisation des données 60

V.3 Les métabolites discriminants dans le LCR chez les patients SEP 61

V.4 Les métabolites biomarqueurs dans le sérum des patients SEP 61

V.4.a Isoleucine, valine, tyrosine, 2-hydroxybutyrate et rôle de la barrière hématoencéphalique 62

V.4.b Glucose et créatinine 62

VI. Conclusion et perspectives **64**

Bibliographie **66**

Annexes

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: DIAGRAMME DES URINES 2
FIGURE 2: L'APPROCHE METABOLOMIQUE ET LES NOUVELLES TECHNIQUES "OMICS" 3
FIGURE 3: PREVALENCE MONDIALE POUR 100 000 HABITANTS DE LA SCLEROSE EN PLAQUES 5
FIGURE 4: SCHEMA DE L'ORGANISATION DES NEURONES DANS LE SNC 6
FIGURE 5: UN MODELE D'IMMUNOPATHOGENESE DE LA SEP 8
FIGURE 6: ECHELLE EDSS POUR L'EVALUATION DU HANDICAP DE SCLEROSE EN PLAQUES 11
FIGURE 7: LE VECTEUR D'AIMANTATION DANS LE CAS D'UN PROTON. 14
FIGURE 8: ALIGNEMENT DES PROTONS DANS LE CHAMP B0. 14
FIGURE 9: ABSORPTION DE L'ENERGIE RADIO FREQUENCEE. 16
FIGURE 10: SEQUENCE DE BASE POUR LA SPECTROSCOPIE RMN. 17
FIGURE 11: LE SIGNAL RMN ET LA TRANSFORMEE DE FOURIER. 17
FIGURE 12: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PARAMETRES RMN. 18
FIGURE 13: REPRESENTATION DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES ET CORRESPONDANCE AVEC LA DENSITE ELECTRONIQUE. 19
FIGURE 14: NOMBRE D'ARTICLES RECENSES COMPRENANT LES DIFFERENTS TERMES « OMICS » 22
FIGURE 15: CLASSIFICATION GENERALE DE LA METABOLOMIQUE 26
FIGURE 16: LE WORKFLOW EN METABOLOMIQUE POUR LA COMPREHENSION DE MECANISMES BIOLOGIQUES ET A LA RECHERCHE DE BIOMARQUEURS. 28
FIGURE 17: DESIGN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE ET ANALYSE PAR UNE APPROCHE METABOLOMIQUE 34
FIGURE 18: PROTOCOLE DE PREPARATION DES LCR. 38
FIGURE 19: PROTOCOLE DE PREPARATION DES SERUMS. 38
FIGURE 20: SPECTRES RMN 1H DE SERUM. 43
FIGURE 21: EXEMPLE DE L'UTILISATION DE SPECTRES 1H NOESY 1D DE LCR SOUS AMIX 45
FIGURE 22: COMPARAISON DES CONDITIONS TESTEES POUR LA MISE AU POINT DU PROTOCOLE LCR. 49
FIGURE 23: SPECTRES RMN 1H DU SERUM ET DU LCR HUMAIN NON-MS. 51
FIGURE 24: RESULTATS SUR LCR PAR RMN 1H. 53
FIGURE 25: RESULTATS SUR SERUM PAR RMN 1H. 55
FIGURE 26: AGRANDISSEMENT DES ZONES CARACTERISTIQUES DES METABOLITES DISCRIMINANTS DU SERUM. 56

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: CRITERES DE MCDONALD REVISES 10
TABLEAU 2: COMPARAISON DES METHODES ANALYTIQUES EN METABOLOMIQUE. 23
TABLEAU 3: PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES GROUPES MS ET NON-MS 36
TABLEAU 4 : PREPARATION DES SOLUTIONS MERES NECESSAIRES AU TAMPON PHOSPHATE 37
TABLEAU 5 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES ET OBJECTIFS DES SEQUENCES RMN UTILISEES 40
TABLEAU 6 : PARAMETRES D'ACQUISITION DES SEQUENCES RMN UTILISEES POUR L'ANALYSE METABOLOMIQUE 41
TABLEAU 7 : LES CONDITIONS DE TESTS POUR L'OPTIMISATION DE L'ACQUISITION DES DONNEES LCR EN METABOLOMIQUE 47

GLOSSAIRE

^{1}H : Proton

^{13}C : Carbone 13

^{15}N : Azote 15

^{19}F : Fluor 19

^{31}P :Phosphore 31

ACP : Analyse en Composantes Principales

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CNIL : Commission Nationale Informatique et Liberté

CPMG :Séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill

COSY :*Correlation SpectroscopY*

CPP : Comité de Protection des Personnes

D_2O : Oxyde de deutérium ou eau deutérée

d et dd : Doublet et doublet de doublet

DSS : Acide 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonique

FID : *Free Induction Decay* ou signal de précession libre

HMDB :*Human MetabolomeDataBase*

HSQC :*Heteronuclear Single Quantum Correlation*

IEF : Isoélectrofocalisation des IgG

IgG : Immunoglobulines de type G

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire

ISO+ : Patients présentant un profil de bandes oligoclonales surnuméraires lors de l'isoélectrofocalisation des IgG.

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

MS : Patients atteints de sclérose en plaques

Non-MS : Patients non atteints de sclérose en plaques

NOESY :*Nuclear OverhauserSpectroscopY*

NORB :NévriteOptiqueRétro-Bulbaire

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

PCA : *Principal Component Analysis*

PLS : *Partial Least Squares regression*

Ppm : Partie par millions

RF : Radio-fréquence

RPM : Rotation par minute

Sd : Standard deviation

SEP : Sclérose En Plaques

SRM : Spectroscopie par Résonance Magnétique

t : Triplet

TMSP : Acide 3-(trimethylsilyl) 3,3,3,3-tetradeutero-propionique

PARTIE I

INTRODUCTION

L'observation des variations de composés dans les fluides biologiques afin de caractériser et d'identifier des pathologies n'est pas une nouveauté. Le concept existait déjà dès l'antiquité, et au moyen-âge avec l'utilisation d'un « diagramme des urines » qui liait la couleur, l'odeur et le goût des urines en fonction du changement de l'état de santé[1]. En pratique clinique courante, la mesure de paramètres physiologiques (la température d'un patient par exemple), biochimiques (une glycémie), ou moléculaires peuvent être des paramètres suivis pour définir un état physiologique ou pathologique. Aujourd'hui, l'utilisation de techniques plus modernes permettent l'analyse des échantillons biologiques, mais le principe fondamental reste le même : observer les variations de marqueurs biologiques, comme les métabolites associés à différentes conditions biologiques.

Figure 1: Diagramme des urines[1].
Cette roue qui liait l'odeur, la couleur, le goût des urines à un état pathologique, a été publiée en 1506 par Ulrich Pinder dans son livre « Epiphanie Medicorum ».

Rechercher des marqueurs biologiques d'un état (physiologique ou pathologique) qui permettraient un diagnostic précoce et donc une prise en charge plus rapide, une orientation pronostique, un suivi ou une indication thérapeutique, fait partie des enjeux modernes de la recherche en biologie et en médecine. Ces marqueurs biologiques peuvent être définis comme

des biomarqueurs, c'est-à-dire, comme une « caractéristique biologique mesurée de façon objective et évaluée comme un indicateur, soit de processus biologiques normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique »[2].Un biomarqueur efficace doit être sensible, prédictif, mesurable, d'accès facile et de coût faible[3].

Bien qu'actuellement de nombreuses techniques approuvées et validées en biochimie, en biologie moléculaire, grâce au génie enzymatique ou génétique par exemple, permettent d'obtenir un ensemble d'outils pour l'exploration des marqueurs biologiques, il existe de nouvelles techniques, en plus de ces moyens classiques d'accès aux biomarqueurs, comme celles des « OMICs » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique) qui ouvrent de nouvelles opportunités pour la recherche et la découverte de biomarqueurs. Leur finalité serait de révéler et caractériser des profils génétiques, protéiques, lipidomiques, métaboliques ou encore hormonaux unique d'un état pathologique.

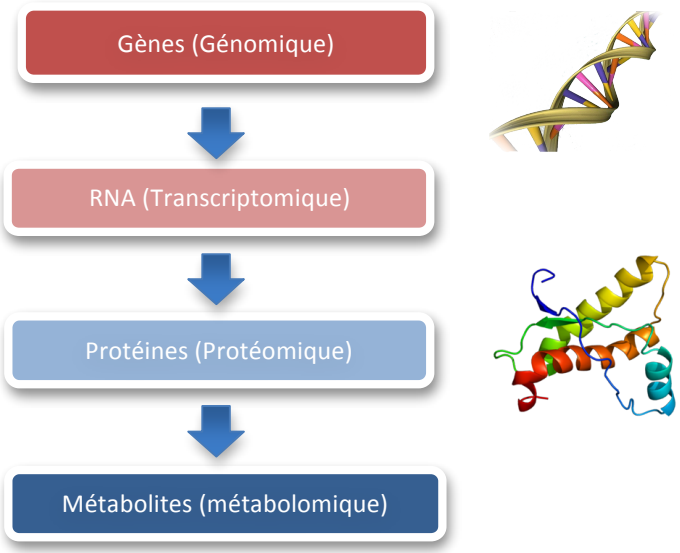


Figure 2: l'approche métabolomique et les nouvelles techniques "OMICs".

Dans la pratique médicale actuelle, il n'est pas rare de découvrir ou de détecter une pathologie de manière fortuite lors d'un examen clinique. La plupart des examens cliniques ou paracliniques ne sont prescrits et réalisés que lorsqu'on suspecte une pathologie chez un patient, ce qui signifie qu'ils sont efficaces pour détecter des pathologies installées, sans forcément avoir un rôle prédictif. On peut alors considérer deux façons d'aborder la recherche de biomarqueurs : d'une part ceux qui permettent de confirmer le diagnostic d'un état pathologique, d'autre part ceux qui ont un rôle prédictif. Cet aspect est primordial dans le cas des cancers par exemple, où la précocité de la détection est associée à l'augmentation des chances de rémission[4].

En ce qui concerne la sclérose en plaques, le diagnostic reste très délicat à poser, car le manque de tests diagnostiques plus sensibles et spécifiques pour dépister cette pathologie ou suivre son évolution reste un obstacle pour l'amélioration de la prise en charge précoce de la maladie. Les nouvelles technologies émergentes ces dernières années ont permis de développer des techniques qui permettent justement un diagnostic plus précis, un dépistage précoce ou le suivi de prise en charge thérapeutique.

C'est dans ce contexte que notre étude portera sur l'analyse métabolomique du LCR et du sérum de patients atteints de SEP. Nous avons fait le choix d'utiliser la Résonance Magnétique Nucléaire du Proton (RMN ^{1}H) comme outil d'exploration du métabolome*invitro*, cela nous permettant d'établir un profilage métabolomique précis des patients sains et des patients malades. L'utilisation de la RMN du Carbone (RMN ^{13}C) vient en complément afin d'obtenir une identification structurale des métabolites. Après analyse statistique (ACP ou PLS), les métabolites retrouvés comme discriminants les deux groupes de patients pourraient devenir de potentiels biomarqueurs de la SEP ou de son évolution, et pourraient permettre de mieux comprendre les processus physiopathologiques de la maladie.

I.1 La Sclérose en Plaques

La SEP est une maladie auto-immune et inflammatoire du système nerveux central, qui affecte les gaines de myéline et entraîne la démyélinisation des fibres nerveuses du cerveau, de la moelle épinière et du nerf optique. C'est une pathologie à prédominance féminine[5] (3 femmes pour 1 homme), qui survient plus fréquemment chez les jeunes adultes (vers 20 à 30

ans pour le premier épisode) et dans les pays de l'hémisphère nord.La race caucasienne est la plus touchée. La maladie est plus commune en Europe, en Amérique du Nord ou en Australie, alors qu'elle est rare dans les pays de l'hémisphère sud, en Afrique ou en Amérique du sud. L'Europe est une zone à prévalence haute de la maladie, avec près de la moitié des patients atteints[6] par rapport à l'ensemble des patients touchés dans le monde. On retrouve un gradient de répartition du nombre de personnes atteintes en Europe, avec une augmentation de la prévalence du sud vers le nord et de l'ouest vers l'est. Plus de 2,5 millions de personnes sont atteintes à travers le monde[7].

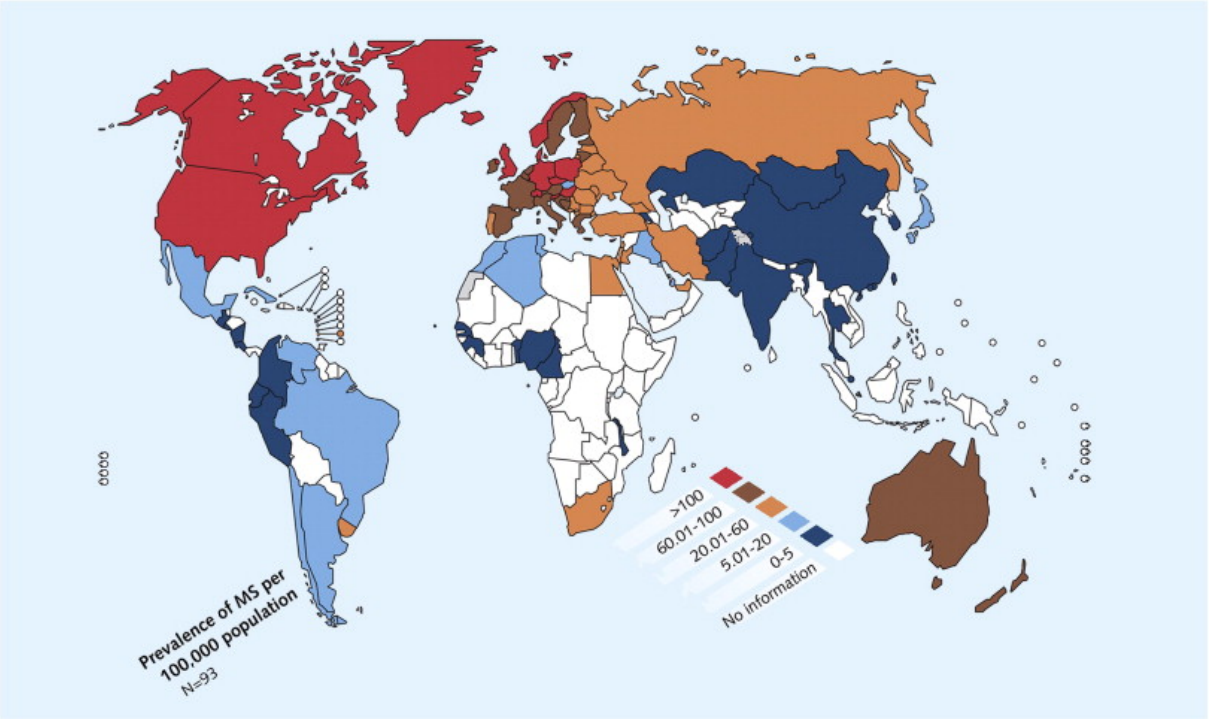


Figure 3: prévalence mondiale pour 100 000 habitants de la sclérose en plaques[8].
Le nombre de personnes atteint par la SEP est plus important dans l'hémisphère nord que dans l'hémisphère sud.

La SEP, au niveau physiopathologique, touche la gaine de myéline, qui entoure les axones et participent à la transmission de l'influx nerveux. Elle est endommagée suite à une inflammation du système nerveux. Lorsque ce phénomène inflammatoire disparait, un processus de régénération de la gaine de myéline apparait (ou remyélinisation) mais lorsque l'inflammation se reproduit et devient chronique, un durcissement des tissus apparait, à type

de scléroses. La topographie des lésions particulière, en plaques, a donné le nom de « sclérose en plaques», attribué en 1868 par Charcot. L'origine de la maladie reste peu connue, et multifactorielle, mais il est fréquemment considéré que cette maladie auto-immune est médiée par les lymphocytes T. L'invasion des lymphocytes T CD4+ autoréactifs dans le SNC est une étape centrale dans le déclenchement de la maladie[9].

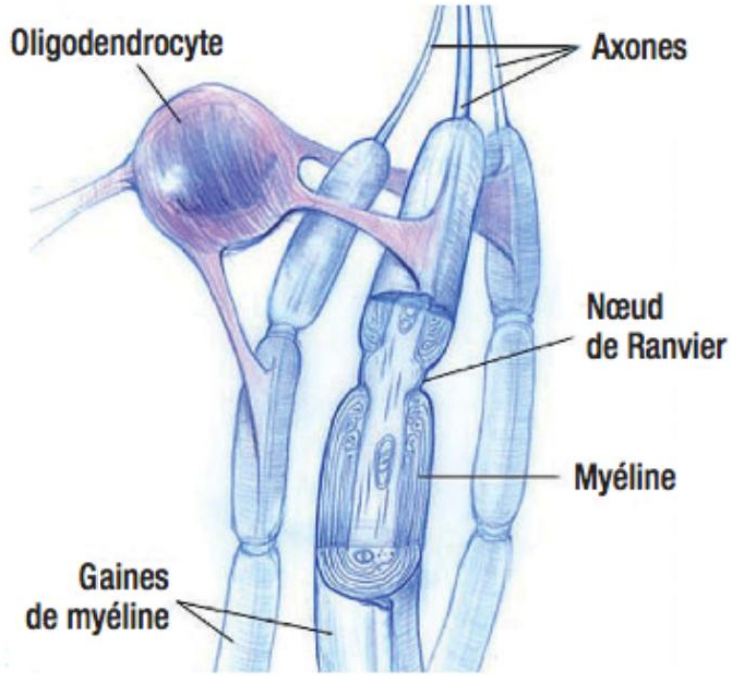


Figure 4: Schéma de l'organisation des neurones dans le SNC[10].
La Sclérose en plaques détruit myéline, oligodendrocytes et axones.

La SEP n'altère pas l'espérance de vie, mais elle entraîne un handicap progressif très invalidant pour le patient.

I.1.a Différentes formes de SEP

La SEP est une pathologie difficile à diagnostiquer et à qualifier. Chaque patient présente une forme de la maladie qui lui est propre, cependant, en fonction du type d'apparition de la maladie et de son évolution, on peut différencier 3 types de SEP:

- *SEP rémittente-récurrente (RR)*

La SEP rémittente-récurrente est la forme la plus répandue, avec près de 85% des formes débutantes. Il y a une alternance entre phases de poussées et phases de rémissions. La poussée est définie comme étant l'apparition de nouveaux symptômes ou l'aggravation d'anciens symptômes, pendant plus de 24h, et sans poussée fébrile. Leur fréquence est aléatoire, pouvant aller de plusieurs fois par an à une tous les 10 ans. En moyenne, un patient présente une poussée tous les 18 à 24 mois.

- *SEP secondairement progressive (SP)*

La SEP secondairement progressive caractérise les épisodes d'aggravation régulière irréversible. Les rémissions sont mineures, et il y a peu ou pas de rechutes. La maladie et le handicap progressent régulièrement.

50% des patients atteints par une forme débutante rémittente-récurrente se trouvent atteints par une forme secondairement progressive après 10 ans de maladie, et 95% d'entre eux en sont atteints après 25 ans.

- *SEP progressive d'emblée*

La SEP progressive d'emblée est beaucoup plus rare et touche 15% des patients. La progression de la maladie est continue, sans rémissions ni poussée. Cette forme affecte généralement les patients plus âgés, qui débutent une SEP après 40 ans.

I.1.b Initiation et diagnostic de la maladie

Les facteurs génétiques semblent être de première importance dans le déclenchement de la pathologie, en lien probable avec des facteurs environnementaux[11]. D'autres hypothèses suggèrent qu'il peut y avoir un lien entre le déclenchement de la maladie et la présence de certains agents infectieux, qui pourraient potentialiser le développement d'une réaction auto-immune dirigée contre le SNC.

Les lymphocytes T auto-réactifs de l'immunité (CD4+ et CD8+) ainsi qu'un antigène semblable à la myéline jouent un rôle important dans la maladie[12,13,14]. Les lymphocytes T activés migrent à travers la barrière hématoencéphalique, infiltrent le SNC, et initient la réponse inflammatoire passant par des cytokines et des macrophages dirigés contre les oligodendrocytes et les axones, ce qui conduit à la démyélinisation et au dommage axonal.

L'inflammation en cours est responsable des dommages axonaux secondaires (neurodégénérescence), ce processus étant responsable du handicap retrouvé dans les formes secondairement progressives.

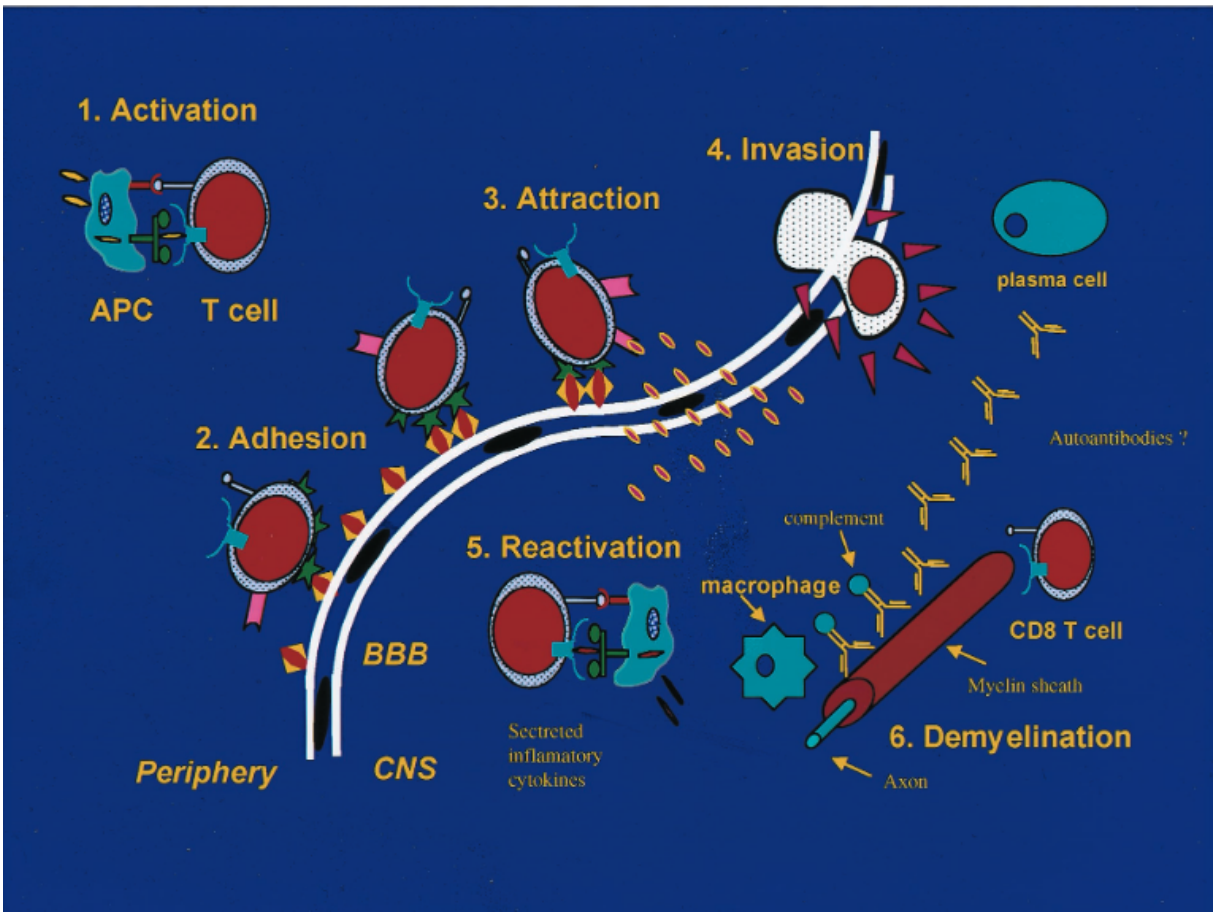


Figure 5: un modèle d'immunopathogénèse de la SEP[12].
Les cellules T autoréactives sont activées chez les patients SEP(1), à cause de facteurs génétiques ou environnementaux. Les molécules d'adhésion endothéliales comme ICAM-1 et VCAM-1 sont augmentées (2), ce qui facilite leur migration dans le SNC. Les chimiokines et l'élaboration de métalloprotéases peuvent augmenter la migration en dégradant les protéines extracellulaires de la matrice (4). Les cellules T autoréactives passent à travers la barrière hématoencéphalique (BHE). A l'intérieur du SNC, la réactivation des cellules T par des cellules présentatrices d'antigènes provoque la libération de médiateurs pro-inflammatoires et cytotoxiques. La gaine de myéline est alors attaquée (6) suivant différents mécanismes : attaque par les cytokines ; digestion des antigènes de surface de la myéline par les macrophages ; attaque médiée par le complément ; attaque directe par les lymphocytes T CD4+ et CD8+

Les cellules B jouent également un rôle important dans la pathogénèse de la SEP, à l'image de l'augmentation de la synthèse des immunoglobulines intrathécales chez les patients SEP. Cette augmentation est mise en évidence par la présence de bandes oligoclonales supplémentaires lors de l'isoélectrofocalisationdes protéines sur gel d'agarose[15].

Le diagnostic de SEP, très délicat à établir, est basé à l'heure actuelle sur un faisceau d'arguments cliniques et de symptômes évocateurs : un début entre 15 et 30 ans, l'alternance de poussées et de rémissions, une névrite optique rétrobulbaire (douleur unilatérale aigüe accentuée par les mouvements oculaires, le nerf optique est lésé au niveau rétrobulbaire[16]), une ophtalmoplégie internucléaire (mouvements oculaires horizontaux anormaux), le signe de Lhermitte (symptôme sensoriel à type de décharge électrique dans la moelle ou dans un membre lors d'une flexion de nuque[17]) ou le phénomène « Uhthoff » (une sensibilité exacerbée à la chaleur[18]). D'autres symptômes cliniques comme une fatigue constante, des troubles de la marche et de la coordination, une dépression, des troubles cognitifs ou intestinaux, vésicaux et sexuels[8] peuvent étayer le tableau clinique. Enfin, les résultats de l'observation des lésions à l'IRM et sur l'examen du liquide céphalo-rachidien permettent de caractériser les processus neuroinflammatoires. L'analyse du LCRpermet donc d'orienter le diagnostic mais également d'écarterdes diagnostics différentiels (lupus érythémateux, maladie de Gougerot-Sjögren…).

Ce sont les critères révisés de McDonald[19] qui permettent de confirmer le diagnostic de SEP. Un patient sera diagnostiqué comme atteint de la sclérose en plaques s'il présente un critère temporel (plus de deux poussées successives) et un critère spatial de dissémination des lésions à l'imagerie, ce qui peut prendre plusieurs mois. L'utilisation de l'IRM a un impact important dans le diagnostic plus précoce et précis de la maladie. En effet, l'IRM, sensible au contenu en eau du parenchyme, permet de mettre en évidence les lésions œdémateuses, démyélinisées ou gliotiques, sous la forme d'hypersignaux lors d'utilisation de séquences pondérées T2/FLAIR, par exemple. D'autres lésions, très démyélinisées ou très œdématiées, peuvent apparaître en hyposignal en séquence T1[20].

Présentation clinique	Données supplémentaires nécessaires au diagnostic
≥ 2 poussées ; ≥ 2 lésions cliniques	Aucune
≥ 2 poussées ; 1 lésion clinique	Dissémination spatiale démontrée par IRM ou 2 lésions IRM et LCR positif ou Attendre une nouvelle poussée dans un site différent
1 poussée ; ≥ 2 lésions cliniques	Dissémination temporelle démontrée par IRM ou Deuxième poussée
1 poussée ; 1 lésion clinique (forme mono symptomatique, syndrome clinique isolé)	Dissémination spatiale démontrée par IRM ou 2 lésions IRM et LCR positif et Dissémination temporelle démontrée par IRM ou Deuxième poussée
Progression insidieuse évocatrice de SEP	Progression clinique sur au moins 1 an deux des 3 items suivants : ≥ 9 lésions cérébrales T2 ou 4–8 lésions cérébrales et PEV anormaux ≥ 2 lésions médullaires focales LCR positif

MacDonald révisé, 2005.
LCR positif signifie la présence de bandes oligoclonales spécifiques du LCR ou augmentation de l'index IgG.

Critères IRM en faveur d'une SEP : dissémination spatiale
3 des 4 items suivants
Une lésion rehaussée par le gadolinium ou 9 lésions T2
Au moins une lésion sous-tentorielle
Au moins une lésion sous-corticale
Au moins 3 lésions périventriculaires
Critères IRM en faveur d'une SEP : dissémination temporelle
Détection d'une lésion rehaussée par le gadolinium au moins 3 mois après le début des symptômes (si elle ne correspond pas aux signes cliniques)
Détection d'une nouvelle lésion T2 si elle apparaît après une première IRM pratiquée au moins 30 jours après le début des symptômes cliniques

Tableau 1: Critères de McDonald révisés.
Tableau reprenant les critères de McDonald révisé pour le diagnostic de la SEP[21] (haut) ainsi que le tableau reprenant les critères IRM de dissémination spatiale et temporelle (bas).

I.1.c Evolution de la maladie et prise en charge

La progression du handicap moteur est une des difficultés principales du patient atteint de SEP. Cette progression est mesurée à l'aide d'une échelle internationale, EDSS[22] (ExpandedDisabilityStatusScale), qui évalue huit paramètres fonctionnels. L'échelle est cotée de 0 (pas de handicap) à 10 (décès). Elle évalue 4 paramètres dits « majeurs » : la fonction pyramidale, cérébelleuse (pour la coordination des mouvements), sensitive (pour le toucher et la douleur) et du tronc cérébral et 4 paramètres dits « mineurs » : le transit intestinal et la fonction urinaire, la fonction visuelle et la fonction cérébrale.

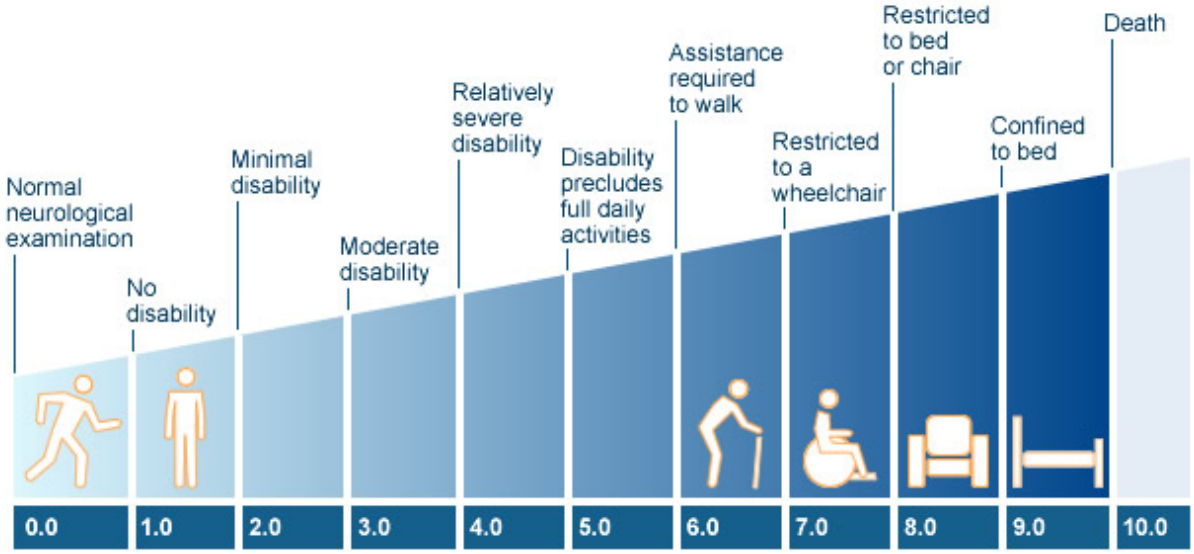


Figure 6: Echelle EDSS pour l'évaluation du handicap de sclérose en plaques.
L'échelle est chiffrée de 0 à 10. 0 pour un examen neurologique normal, jusqu'à 10 lors du décès du patient.

La prise en charge de la SEP est pluridisciplinaire, et associe le médecin mais également l'ensemble de l'équipe médicale et paramédicale (kinésithérapeute, psychologue, assistante sociale…). Les traitements médicamenteux usuels de la SEP associent classiquement des traitements des poussées et des traitements de fonds de la maladie, en plus de traitements symptomatiques en fonction de l'état du patient.

La prise en charge des poussées sévères ou prolongées se fait généralement par l'utilisation de corticoïdes, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoire et immunomodulatrice. La corticothérapie est souvent réalisée par voie IV, à l'hôpital. Le traitement n'a pas d'intérêt préventif et n'influence pas l'évolution de la maladie. En théorie, n'importe quel corticoïde peut être utilisé, mais en pratique, la méthylprednisolone (Solumédrol) administrée en IV à la dose de 0,5g à 1g/j pendant 3 à 5 jours est privilégiée.

Les traitements de fond font généralement appel aux immunosuppresseurs, comme les interférons bêta (bêta-1a avec Avonex® et Rebif® ou bêta-1b avec Bétaféron®). Ces glycoprotéinesaux propriétés immunomodulatrices sont indiquéeschez les patients présentant des SEP marquées par des poussées successives dans les 2 ou 3 années précédentes. Il est fréquent de voir des effets secondaires de ces interférons, notamment des réactions au site d'injection ou des syndromes pseudo-grippaux (prévenus pas la prise d'antalgique antipyrétique ou d'un AINS). La surveillance du traitement est étroite avec NFS, numération

plaquettaire, surveillance hépatique.L'acétate de glatiramère (Copaxone®) est un autre immunomodulateuravec une activité thérapeutique analogue aux interférons. Il permet de réduire les lésions inflammatoires visibles à l'IRM. Enfin, d'autres immunosuppresseurs sont utilisés dans la SEP, hors AMM, en cas de contre-indication ou d'inefficacité des premiers. Il s'agit du méthotrexate, de l'azathioprine, de la ciclosporine, du mycophénolate ou encore du cyclophosphamide.

D'autres traitements par voie injectable, soit réservés à l'usage hospitalier ou encore en cours de développement existent, comme les anticorps monoclonaux (natalizumab,alemtuzumab, daclizumab, rituximab), les immunosuppresseurs (mitoxantrone), ou encore les traitements agissant sur la composante inflammatoire (fingolimod, tériflunomide, laquinimod, diméthylfumarate). Enfin, il existe des traitements par voie orale qui pourraient permettre d'augmenter l'observance grâce à leur facilité d'administration : fingolimod, laquinimod, cladribine (Tréosulfan®) ou encore tériflunomide (métabolite actif du léflunomideArava®).

Un ensemble de traitements symptomatiques peut être proposé au patient en fonction de ses atteintes, en luttant notamment contre :

- La spasticité : baclofène(Liorésal®), dantrolène (Dantrium®), et encore des injections de toxine botulique,
- Les troubles urinaires : oxybutinine (Ditropan®) et toltérodine (Detrusitol®),
- La constipation,
- Les troubles sexuels : sildénafil (Viagra®), tadalafil(Cialis®), vardénafil (Levitra®)
- La douleur et les douleurs neurogènes :utilisation des antiépileptiques comme la carbamazépine ou le valproate de sodium, ou bien encore avec la gabapentine,
- La fatigue : et notamment l'effet chape de plomb de la maladie, qui est traité par amantadine (Mantadix®), hors AMM.

Après avoir abordé les principaux éléments permettant la compréhension de la physiopathologie, du diagnostic et de la prise en charge de la sclérose en plaques, intéressons-nous aux bases physiques de la RMN, qui constitue l'outil d'exploration du LCR et du sérum utilisé dans cette étude. La compréhension des éléments physiques de résonance magnétique, mais également de lecture du spectre sont indispensables afin d'interpréter les résultats d'une étude métabolomique.

I.2 La Résonance Magnétique Nucléaire

I.2.a Bases physiques

La RMN repose sur un principe fondamental de magnétisme nucléaire : les noyaux des atomes sont constitués de protons et de neutrons qui se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par leur spin (grandeur quantique). Afin d'être observables en RMN, ces noyaux doivent avoir un spin non nul, c'est-à-dire que leur nombre de nucléons (nombre de masse A) et leur nombre de protons (nombre Z) ne doivent pas être pairs.Bien que de nombreux noyaux peuvent être observés en RMN commele ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F et ^{31}P, l'intérêt se porte généralement sur les noyaux ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P seulement, du fait de leurs propriétés atomiques (spin non nul et abondance naturelle). Ces noyaux peuvent subir des transitions énergétiques lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique statique (B0) et lorsqu'on leur applique des pulses radio-fréquencés[23] ayant une énergie précise et égale à leur fréquence de précession (ou fréquence angulaire $\omega 0$ définie par l'équation de Larmor[24]).Leur état d'équilibre est alors perturbé et les noyaux sont déplacés dans un état d'excitation en absorbant l'énergie provenant du champ RF. C'est ce phénomène que l'on appelle résonance. Le signal est observé lorsque les noyaux retournent à leur état d'équilibre en induisant le FID ou signal de précession libre. Ce sont ces données qui, après avoir subies une transformée de Fourier, donnent le spectre RMN.

I.2.b Propriétés magnétiques de l'atome

Comme nous l'avons vu précédemment, la RMN repose sur le principe de magnétisme nucléaire, les noyaux se comportant comme des micro-aimants caractérisés par leur spin. Deux notions sont fondamentales à la compréhension du mécanisme de résonance magnétique : le vecteur d'aimantation microscopique et le vecteur d'aimantation macroscopique.

i. Vecteur d'aimantation microscopique

Le proton, qui possède une charge positive, et qui est animé d'un mouvement de rotation, va entraîner l'apparition d'un champ magnétique, appelé moment magnétique. Ce moment magnétique est aligné sur l'axe de rotation et est représenté par un *vecteurd'aimantation* μ. Le

noyau hydrogène, formé d'un seul proton, possède un moment magnétique élevé, qui donne lieu à un important phénomène de résonance.

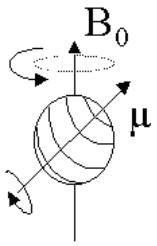


Figure 7: Le vecteur d'aimantation dans le cas d'un proton.

ii. Vecteur d'aimantation macroscopique

Dans le cas où l'échantillon n'est soumis à aucun champ magnétique extérieur, les vecteurs d'aimantation des protons de l'échantillon sont orientés de façon aléatoire, et la résultante de tous ces vecteurs d'aimantation est nulle. Il n'y a pas de *vecteur d'aimantation macroscopique.*

Si on vient appliquer un champ magnétique extérieur B0 à ces protons, il y a une réorganisation des vecteurs d'aimantation, avec un peu plus de protons parallèles qu'antiparallèles, ce qui va créer un *vecteurd'aimantationmacroscopique*, à l'origine du signal RMN.

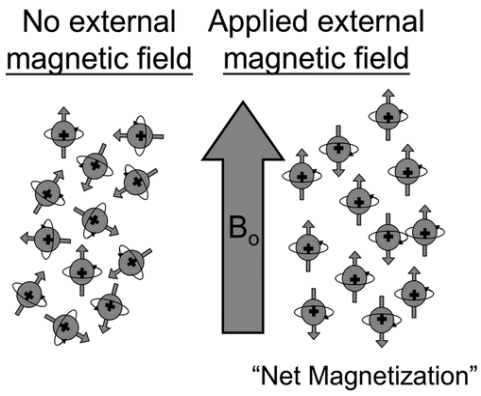


Figure 8: Alignement des protons dans le champ B0.
A gauche, il n'y a pas de champ magnétique externe. A droite, l'application du champ B0 provoque une réorganisation parallèle et antiparallèle des protons.

On dit que les protons précessent autour de B0, avec une fréquence angulaire ω0 définie par l'équation de Larmor : $\omega 0 = \gamma.B0$[24],γ étant le rapport gyromagnétique de l'espèce nucléaire considérée.

I.2.c Noyaux atomiques et phénomène de résonance

Les noyaux atomiques étudiés en RMN sont ceux possédant un moment magnétiquenon nul[24](^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F et ^{31}P, qui subissent des transitions énergétiques lorsqu'on applique un pulse de radio-fréquence). Tout comme lors des expériences RMN, la Spectroscopie par Résonance Magnétique *in vivo* (SRM) s'intéresse plus particulièrement aux noyaux^{1}H,^{13}C et ^{31}P en pratique clinique.

Le principe même de la RMN consiste à étudier les modifications d'aimantation des noyaux lorsque 2 champs magnétiques sont appliqués :

- *Un champ magnétique statique* (B0)
- *Un champ magnétique tournant ou onde radiofréquence* (RF), de direction perpendiculaire à B0.

Comme nous venons de la voir, lorsqu'on applique le champ magnétique B0 puissant, les noyaux peuvent prendre deux orientations différentes : soit ils s'alignent dans la même direction que le champ B0 (*position parallèle*) et possèdent alors une énergie plus basse, soit ils s'alignent dans la direction contraire (*position anti-parallèle*).

Les spins précessent dans deux directions opposées, et sont dans un état d'équilibre. Pour observer un signal RMN, il faut perturber l'état d'équilibre en soumettant les spins à un *champ magnétique tournant ou Radiofréquence (RF),* dont la fréquence doit être égale à la fréquence de Larmor ω0 spécifique des protons dans le champ magnétique donné. Cette impulsion RF est transmise pendant une courte période : c'est ce qu'on appelle le *pulse RF.* Les protons sont alors déplacés dans un état d'excitation en absorbant l'énergie provenant du champ RF. Ce phénomène est appelé *résonance.*

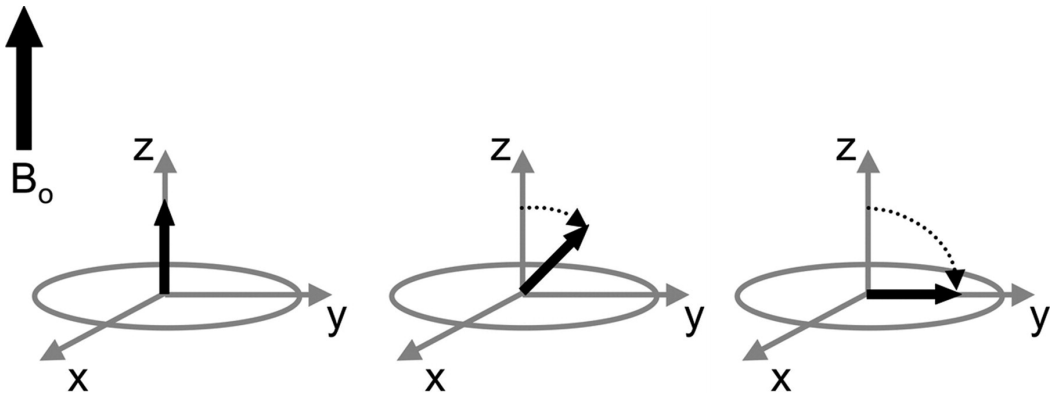


Figure 9: Absorption de l'énergie Radio Fréquencée.
A gauche, avant l'impulsion RF, la petite flèche noire représente l'aimantation microscopique, parallèle au champ B0. Au centre et à droite, le pulse RF produit à la fréquence de Larmor provoque un déplacement de l'axe de rotation du proton de z vers y[24].

Après excitation, il y a retour à l'état d'équilibre et apparition de phénomènes inverses que l'on appelle relaxation T1 et T2. Le temps T1 est appelé « temps de relaxation spin-réseau », il est de l'ordre de la seconde et représente le temps nécessaire pour que 63% des spins retournent à leur état fondamental. Le temps T2 est appelé « temps de relaxation spin-spin ». Ces temps de relaxation sont responsables, par exemple, des contrastes en Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire et permettent donc d'observer les images.

I.2.d Le FID : signal de précession libre

A l'arrêt de l'excitation RF, les spins retournent à leur état d'équilibre, et restituent l'énergie acquise sous la forme d'un signal décroissant avec le temps et de fréquence spécifique : c'est le FID (Free Induction Decay).Cette énergie est captée par une bobine réceptrice, de direction perpendiculaire au champ B0, et placée dans le plan transverse, qui permet de mesurer la variation d'aimantation décrite précédemment. Cette variation est à l'origine d'un courant électrique : c'est le signal RMN.

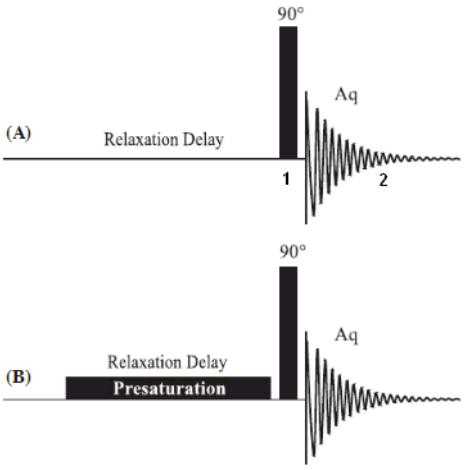


Figure 10: Séquence de base pour la spectroscopie RMN.
(A) Après une impulsion RF, de durée 1, le signal est détecté pendant la durée 2. (B) représente la séquence permettant une présaturation de l'eau.

Le signal RMN enregistré est complexe et contient plusieurs fréquences. Afin de séparer ces fréquences et de déterminer leurs intensités respectives pour obtenir un spectre, on applique une transformation de Fourier.

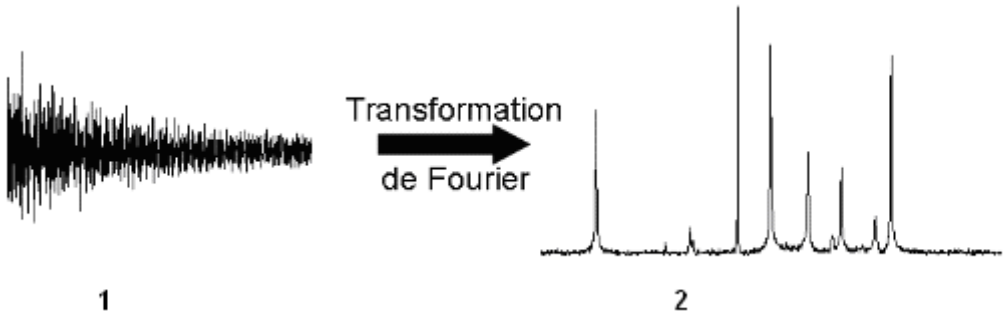


Figure 11: le signal RMN et la transformée de Fourier.
Le signal RMN détecté (1) et le spectre obtenu après transformation de Fourier (2).

I.2.e Les paramètres du spectre RMN : unités de mesure

Certains paramètres sont importants pour la lecture et l'identification d'un spectre RMN. Ils varient en fonction de l'environnement chimique du proton et apporte des informations sur la structure du métabolite. Parmi ces paramètres, les plus importants restent le déplacement chimique δ exprimé en ppm, la constante de couplage J en Hz, la multiplicité et l'intensité du

signal en unités relatives. Il est important de noter que les expériences doivent être réalisées dans les mêmes conditions physico-chimiques de température et de pH. En effet, les paramètres précédents sont soumis aux variations de ces conditions physico-chimiques. L'idéal étant de se placer dans les mêmes valeurs que les bases de données existantes afin de faciliter l'interprétation des spectres.

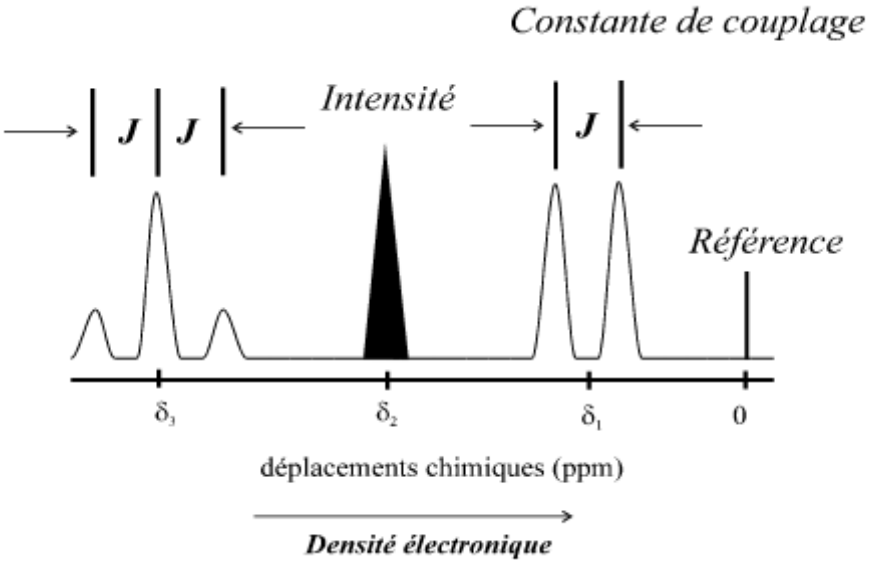


Figure 12: Représentation schématique des paramètres RMN.

i. Le déplacement chimique

Cette valeur δ définit la position du signal suivant l'axe des fréquences du spectre. Il est calculé à partir d'une valeur de référence. Nous utilisons le TMSP comme référence, et la valeur δ est calculée avec la formule :

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6$$

Les fréquences ν et $\nu_{réf}$ sont de l'ordre du MHz, et sont donc très grandes, c'est la raison pour laquelle δ est exprimé en ppm.

ii. La densité électronique

Cette densité électronique est responsable du blindage ou déblindage des atomes qu'on analyse en RMN. En effet, l'atome se trouve dans un environnement qui peut-être électro-attracteur ou répulseur. Des atomes voisins électroattracteurs vont induire un déblindage électronique, alors que des atomes électrorépulseurs auront tendance à augmenter la densité électronique autour du noyau. Ce phénomène impacte directement la mesure, puisque plus un électron sera « déblindé », plus la radiofréquence nécessaire à provoquer sa magnétisation transversale sera élevée. Cela laisse donc apparaître 2 zones sur le spectre RMN : une zone de hauts champs magnétiques et une de bas champs. L'ensemble de ces zones est caractéristique des noyaux et de leur substitution. C'est ce qui permet de déterminer la structure d'une molécule par l'outil RMN.

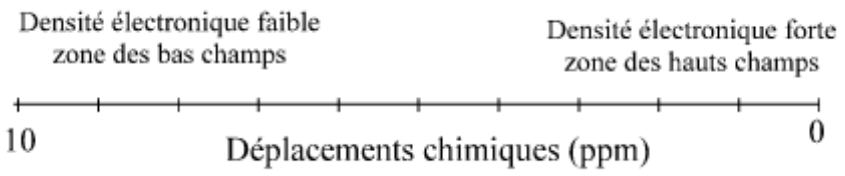


Figure 13: Représentation des déplacements chimiques et correspondance avec la densité électronique.

Après avoir abordé quelques notions fondamentales de Résonance Magnétique Nucléaire, nous permettant notamment de comprendre le fonctionnement de la RMN et la lecture d'un spectre, la partie II de ce travail s'intéressera à dresser un état de l'art de la métabolomique et de son utilisation comme méthode de découverte des biomarqueurs.

PARTIE II

ETAT DE L’ART

II.1 Naissance et progrès de la métabolomique

II.1.a Métabolomique et métabonomique

Les termes « Métabolomique »[25] et « métabonomique » sont apparus à la fin des années 1990, début des années 2000, et désignent l'étude du métabolome. Le but de la métabonomique est la mesure de la réponse métabolique dynamique globale des systèmes vivants aux différents stimuli ou manipulation génétique. En pratique, il n'y pas de différence entre la métabonomique et métabolomique, mais le terme métabonomique reste plus utilisé dans le cadre de recherches en santé afin de décrire l'empreinte ou « fingerprinting » d'un changement biomédical observé suite à une pathologie, des médicaments ou des toxines[26]. Ces études apportent des informations capitales grâce aux mesures et aux modélisations mathématiques des variations des produits du métabolisme retrouvés par exemple dans les fluides biologiques et dans les tissus. Elles permettent ainsi d'observer les effets des aliments, médicaments ou des pathologies sur l'organisme. C'est une approche en pleine expansion dans le domaine biomédical, des études toxicologiques ou du métabolisme[27].
Une des définitions proposées pour la métabolomique peut-être la suivante : « C'est une étude quantitative des métabolites dans un système biologique, et des changements dans les concentrations ou les flux de ces métabolites en rapport avec des perturbations génétiques ou environnementales»[28]. C'est une discipline qui étudie les métabolites, qu'ils soient endogènes ou exogènes[29], produits finaux ou intermédiaires du métabolisme[30]. Ces métabolites, molécules de moins de 1500 daltons[31], sont retrouvés dans les cellules, les organes ou l'organisme entier et sont le reflet des facteurs génétiques et environnementaux qui agissent sur un individu et signent son phénotype. Ils sont une opportunité afin de rechercher des biomarqueurs spécifiques dans les pathologies neurologiques par exemple[32].

La métabolomique est un champ de recherche qui se développe beaucoup ces dernières années, avec plus de 1420 articles relatifs à cette science et publiés en 2011[33].

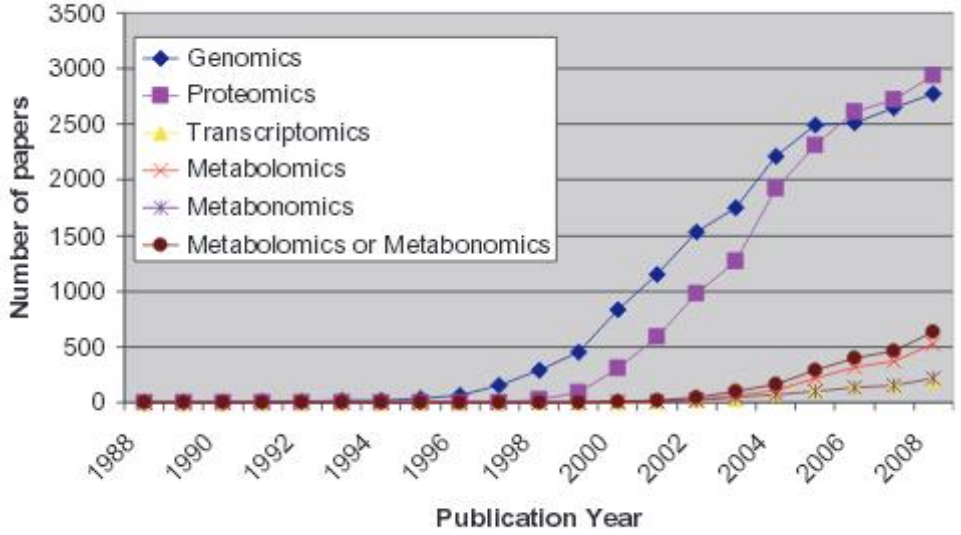


Figure 14: nombre d'articles recensés comprenant les différents termes « OMICs », ISI Web of Science (Thomson Scientific) [33]**.**
Le nombre d'articles scientifiques traitant de la métabolomique a considérablement augmenté ces quinze dernières années.

II.1.b Les différentes techniques analytiques en métabolomique

L'étude du métabolome peut s'appréhender de différentes façons en fonction du but recherché :

- Par profilage métabolique qui consiste à cibler des métabolites présentant le même type de structure chimique
- Par analyse complet du métabolome d'une cellule, d'un biofluide, ou d'un tissu sans restriction à un groupe de molécules
- Par empreinte métabolique ou « fingerprinting » qui permet de comparer 2 profils métaboliques différents en fonction de conditions particulières, et qui visent à chercher les métabolites discriminants afin de trouver les voies métaboliques perturbées.

La métabolomique s'appuie sur de nombreuses techniquesanalytiques comme la spectroscopie de masse (MS) ou la RMN, mais également sur la chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide haute performance (CLHP) ou encore la chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS)[1].Toutes ces techniques analytiques sont complémentaires et présentent chacune des avantages ou des

inconvénients. Spectroscopie de masse et RMN restent les deux techniques de choix lorsqu'il s'agit d'identifier et quantifier les métabolites.

En spectroscopie de masse, de nombreuses méthodes d'introduction des échantillons existent (comme l'injection directe, la GC ou la LC), ainsi que de multiples méthodes d'ionisation (électrospray, impact électronique ou MALDI). Les diverses méthodes de détection (Temps de vol ou TOF, FT-ICR) permettent quant à elles d'obtenir des informations structurelles différentes.

La RMN présente de nombreux avantages dans le cadre de l'analyse du métabolomecar l'acquisition nécessite peu ou pas de préparation de l'échantillon, son coût est modéré, la technique est non biaisée, rapide, robuste et reproductible, quantitative et non-sélective[34] (tableau 2). De plus, les analytes ne sont pas détruits, ce qui permet des études métabolomiques dans les tissus intacts comme les échantillons de biopsies[1].Par exemple, la RMN haute-résolution est une méthode qualitative et quantitative et non-destructrice. C'est une méthode analytique robuste, avec une très bonne reproductibilité et répétabilité[35].

Dans le champ de la métabolomique, la RMN et la spectroscopie de masse sont des techniques qui sont utilisées à part égale dans les études, en fonction de leur particularité propre.

	HPLC	GC-MS	LC-MS	MS	RMN
Préparation de l'échantillon	++	-	-	+	+++
Reproductibilité	-	+	-	+	+++
Quantification absolue	-	-	-	-	+++
Quantification relative	+	++	+	++	+++
Identification	+	++	++	++	++
Sensibilité	+	++	++	+++	-

Tableau 2: Comparaison des méthodes analytiques en métabolomique.
– représente les inconvénients et + les avantages[36].

Dans un fluide biologique, tel le LCR ou le sérum, tous les protons ou les atomes de carbone contenus dans chacune des molécules de l'échantillon donneront un signal RMN. Afin d'être observables et détectables sur un spectre, il faut que les métabolites soient en concentration suffisante,mais il faut également que les séquences d'acquisition RMN choisies(NOESY 1D, CPMG, Jresolve, HSQCet COSY) soient cohérentes avec l'objectif de notre démarche : identification de métabolites ou obtention de données spectrales semi-quantitatives. En effet, la métabolomique permet également d'avoir une approche semi-quantitative[37]du métabolite identifié. L'intensité du signal observé sur les spectres en RMN est proportionnelle à la quantité de noyaux présents dans l'échantillon. En se servant d'un étalon interne, on peut ainsi déterminer la quantité relative du métabolite. On peut utiliser à ce titre du TMSP ou du DSS comme référence interne[5]. Nous avons fait le choix d'utiliser du TMSP pour sa bonne solubilité dans l'eau, la possibilité de calibrer le spectre à 0 ppm et parce que les bases de données du laboratoire sont calibrées avec cet étalon.

II.2 Analyse métabolomique par RMN sur les biofluides

Vers la fin des années 1960, le développement de la transformée de Fourier et l'utilisation de la spectroscopie RMN ainsi que la mise en œuvre d'aimants supraconducteurs ont permis de développer l'application de la métabolomique pour le profilage des biofluides. La première application réelle de l'analyse RMN sur des biofluides date de 1984, avec les travaux de Nicholson et collaborateurs qui ont mis en évidence les corps cétoniques chez des sujets diabétiques sur des échantillons de plasma, sang et urine[38]. Plus tard, dans les années 1990, d'autres améliorations techniques sur la spectroscopie RMN, comme l'utilisation des hauts champs magnétiques ou bien des sondes cryogéniques, ont permis d'améliorer nettement la sensibilité des spectres, qui restait jusqu'alors un facteur limitant à l'utilisation de la RMN. Les ratios signal sur bruit ont été nettement affinés, ce qui permet une détection plus précise. Aujourd'hui, avec l'ensemble de ces améliorations, les limites de détection des appareils de spectroscopie RMN peuvent atteindre l'ordre du micromolaire.

L'utilisation de la métabolomique pour la découverte de nouveaux biomarqueurs ou de facteurs de risque associés à une pathologie est assez ancienne. Il existe de très nombreuses études basées sur l'analyse de biofluides chez l'animal ou directement chez l'homme, dont le but principal est la découverte de biomarqueurs, par exemple pour les pathologies du SNC[39,40]. Les produits observables lors des études métabolomiques sont le reflet de

l'interaction entre gène, protéine, et l'environnement cellulaire,et c'est la raison pour laquelle de très nombreusesautres maladies, non limitées aux pathologies du SNC, ont été explorées par métabolomique RMN (la myopathie de Duchenne[41], le cancer ou la schizophrénie par exemple)

Un avantage important de la métabolomique réside dans le fait que des études translationnelles peuvent être menées, dans la mesure où un certain nombre de métabolites ne sont pas dépendants d'espèces. Ainsi, des biomarqueurs présents chez des animaux en phase pré-clinique, pourront être suivis durant une phase clinique chez l'homme, pour une potentielle application clinique de routine.

II.2.a Approche métabolomique ciblée et non ciblée[42]

Les analyses métabolomiques peuvent s'appréhender de deux manières différentes : l'approche ciblée et l'approche non ciblée.
L'analyse ciblée permet de se focaliser sur un groupe spécifique de métabolites, quantifiés et identifiés précisément. Ce type d'approche permet d'évaluer le comportement d'un sous-groupe particulier de métabolites dans des conditions particulières. Cette approche nécessite généralement un haut niveau de purification de l'échantillon, et une extraction sélective des métabolites. Les métabolites observés sont connus et identifiés, mais ce type d'analyse présente l'inconvénient de n'être que partielle par rapport à l'ensemble des métabolites potentiellement observable.
L'analyse non ciblée quant à elle, permet d'observer la totalité des métabolites d'un échantillon, afin d'établir une « empreinte », ou « fingerprint » sans forcément identifier ou quantifier un métabolite spécifique ou des métabolites discriminants.

Les analyses métabolomiques peuvent également être classées en analyse discriminatoire, d'information et/ou prédictive (figure 15).
Les analyses discriminantes ont pour but de trouver des différences discriminantes entre deux ou plusieurs échantillons, en fonction de leurs caractéristiques métabolomiques. Ces analyses utilisent généralement des modèles statistiques multivariés (analyses multivariées de données), notamment grâce à l'utilisation des ACP (Analyses par Composantes Principales) ou PLS (méthodes des moindres carrés). C'est l'approche que nous avons utilisée dans notre étude, idéale afin de rechercher des biomarqueurs.

L'analyse métabolomique informative a pour but d'identifier et de quantifier le métabolome soit par une approche ciblée ou non ciblée, mais dont le but est d'obtenir des informations intrinsèques quant à la composition de l'échantillon. C'est l'approche qui est utiliséepour la constitutiondes bases de données internationales comme HMDB (*The HumanMetabolome Database*[31]) de Wishart et collaborateurs.

Enfin, la métabolomique peut être prédictive. Dans ce cas, des modèles statistiques basés sur le profil métabolomique sont créés afin de prédire une variable qu'il est difficile de quantifier autrement[43].

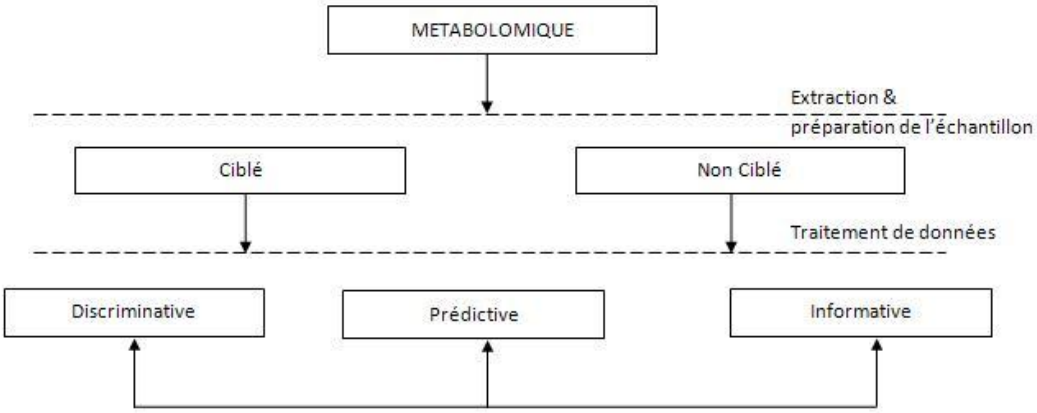


Figure 15: Classification générale de la métabolomique[42]

II.2.b Les échantillons explorés en métabolomique

La recherche des biomarqueurs peut s'effectuer notamment dans deux types d'échantillons : d'une part les biofluides, et d'autre part les tissus.

Les biofluides les plus utilisés pour les études métabolomiques restent l'urine, le plasma ou le sérum et le LCR. Ils contiennent entre des centaines et des milliers de métabolites potentiels, et hormis le LCR, sont tous faciles à obtenir. Le LCR permet d'obtenir des informations intéressantes quant aux métabolites pouvant avoir un lien avec les maladies neurologiques, ce qui fait de lui un matériel précieux pour ce type d'études[44]. Il faut cependant préciser que les conditions de recueil des échantillons biologiques doivent être strictes car elles peuvent influencer le métabolome, ce qui reste une limite lors de la réalisation de la ponction lombaire pour le prélèvement du LCR.

Le sérum, grâce à sa facilité d'accès, et par le fait qu'il contient de nombreuses molécules provenant de différentes voies métaboliques, est l'un des biofluides les plus utilisés pour la détection précoce de pathologies[45]. Il peut-être obtenu en larges quantités et la répétition de l'échantillonnage est aisée. Les profils métaboliques du sérum peuvent devenir des indicateurs importants des états physiologique ou pathologique et peuvent aider à comprendre les mécanismes pathologiques, d'apparition ou de progression des maladies[46].Les analyses métabolomiques qui utilisent la spectroscopie RMN du ^{1}H ou la spectroscopie de masse, réalisées sur des biofluides comme l'urine, le sang ou le LCR, permettent d'identifier des signatures de métabolites précises qui peuvent être utiles comme biomarqueurs de pathologies[47].

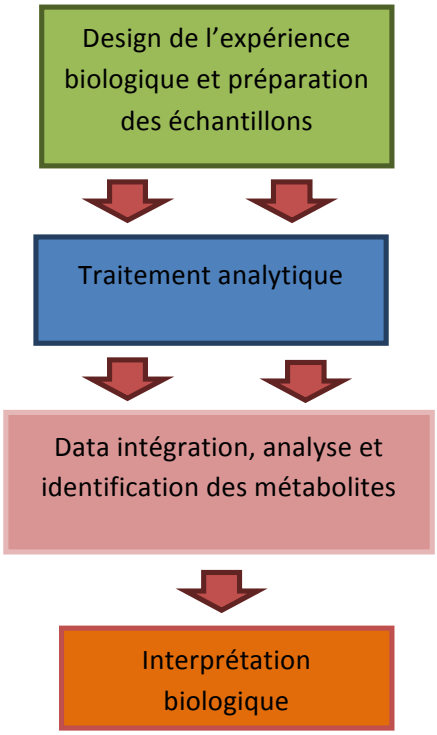
Du coté des tissus, on retrouve des études concernant la métabolomique dans les pathologies neurologiques liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer mais également dans la SLA ou Parkinson. La neurométabolomique permet d'améliorer les connaissances des fonctions physiologiques et pathologiques sur les cellules neuronales[48]. Enfin, d'autres étudesmétabolomiques ont été menées sur les hépatites et notamment les hépatocytes. La recherche de biomarqueurs pour ces pathologies est devenue un enjeu crucial dans le diagnostic et la détection précoce de ces maladies[49].

II.3 Métabolomique et biomarqueurs

Comme nous l'avons vu, la métabolomique est un puissant outil pour découvrir de nouveaux biomarqueurs ou de nouvelles signatures métaboliques afin d'individualiser une pathologie précise.Ceci est possible d'une part grâce au développement des plateformes d'analyse et d'autres part grâce aux innovations techniques qui permettent de réaliser un nombre d'expérimentations plus important et qui donnent accès à plus de métabolites, ce qui concoure à renforcer le potentiel diagnostic et l'exploration des systèmes biologiques[50]. Plus particulièrement en ce qui concerne les pathologies neurologiques, où les contraintes d'accès *in vivo* aux tissus du système nerveux central sont importantes.

De plus, tout cela est devenu possible grâce à l'utilisation de l'analyse de données multivariéesen métabolomique. Ces analyses statistiques permettent d'identifier les différences du métabolome perturbé ou non perturbé, chez des volontaires sains ou des

patients atteints de pathologies, ce qui conduit à la compréhension des mécanismes des pathologies sous-jacentes[51] et la discrimination des biomarqueurs.



A. Design de l'expérience
B. Collecte des échantillons
C. Préparation des échantillons
D. Data acquisition
E. Data pré-processing
F. Analyse des données
G. Intégration avec des métadonnées
H. Identification des métabolites
I. Classification des métabolites
J. Comment les changements métaboliques sont liés aux mécanismes biologiques ?
K. Biomarqueurs ?

Figure 16: le workflow en métabolomique pour la compréhension de mécanismes biologiques et à la recherche de biomarqueurs.

II.3.a La métabolomique et la sclérose en plaques

De nombreuses revues existent à propos de l'utilisation de la métabolomique dans les pathologies neurologiques[40,52]et plus particulièrement dans la sclérose en plaques. Certaines étudesont été réalisées *in vitro* en utilisant la spectroscopie RMN ^{1}H sur le LCR, qui représente un fluide d'intérêt dans les maladies neurodégénératives, grâce à sa proximité avec le parenchyme et ses échanges avec la circulation systémique par le biais des plexus choroïdes.L'étude de Nicoli et collaborateurs en 1996, montre une augmentation du lactate et du fructose, une diminution de la créatinine et la présence d'autres métabolites inconnus chez les patients atteints de SEP[53]. Une autre étude de Lutz et collaborateurs en 2007, s'est intéressée à rechercher les effets caractéristiques des plaques inflammatoires de patients

atteints de sclérose en plaques sur le métabolome du LCR. Ils ont été particulièrement attentifs au recrutement des patients, afin d'avoir une cohorte cliniquement homogène (patients avec un syndrome cliniquement isolé). Leur étude a été menée par RMN du proton. Leurs résultats montrent une augmentation du BHIB (béta-hydroxyisobutyrate) chez les patients SEP avec plaque inflammatoire active, contrairement à ceux sans plaque active. Récemment, une étude[54] de Dickens et collaborateurs en 2014, à chercher à mettre en évidence des biomarqueurs permettant de discriminer des patients atteints de SEP rémittente-récurrente (RR) de patients atteints de SEP secondairement progressive (SP). Ils ont utilisé la RMN du proton sur des sérums de patients RR, de patients SP et de patients avec d'autres maladies neurodégénératives comme contrôle. Ils ont pu mettre en évidence un biomarqueur de type II afin de discriminer les deux groupes (un biomarqueur de type II est un marqueur biologique considéré comme critère de substitution : une modification de ce biomarqueur est associé à un bénéfice clinique ou à un risque). Une étude[55] récente de Reinke et collaborateurs en 2014, réalisée sur des LCR de patients SEP par RMN du proton grâce à un spectromètre à haute définition de 800 MHz a permis de détecter 15 métabolites et des niveaux élevés de choline, myo-inositol et thréonate chez les patients SEP, alors que les niveaux de 3-hydroxybutyrate, citrate, phénylalanine, 2-hydroxyisovalérate et mannose avaient diminué. Selon cette équipe, ces différences du métabolomeproviendraient d'altérations des voies énergétiques et du métabolisme des phospholipides.L'étude a été réalisée sur 15 patients SEP et 17 patients non-SEP.

Du côté de l'expérimentation animale, une étude de Noga et collaborateurs en 2012, avec un modèle animal de sclérose en plaques (rats EAE) a montré des changements importants du profil métabolomique du LCR à deux moments différents de la maladie : au début, et au pic de la maladie[56]. Le groupe a réalisé une approche par métabolomique ciblé par LC-MS et GC-MS et a montré qu'au début de la pathologie, le métabolomese caractérisait par une diminution de l'arginine, de l'alanine et des acides aminés branchés par rapport au contrôle, alors que durant le pic de la maladie, une augmentation dans les concentrations de nombreux métabolites comme la glutamine, l'O-phosphoéthanolamine, les acides aminés branchés et la putrescine a été révélée. Une autre étude menée par Mangalam et collaborateurs en 2013, sur un modèle animal de sclérose en plaques rémittente-récurrente (rats RR-EAE), a cherché à observer les métabolites du plasma à la phase chronique de la maladie, par une approche métabolomique non ciblée, en utilisant la chromatographie liquide et gaz couplées à la spectroscopie de masse (LC-MS et GC-MS). Ils ont pu identifier 282 métabolites, et ils ont

observé des changements sur 44 d'entre eux (32 étant augmentés et 12 diminués), parmi lesquels ils ont pu mettre en évidence des lipides, des acides aminés, des nucléotides, et recouper avec plusieurs voies biochimiques altérées.

II.3.b La métabolomique dans d'autres pathologies

De nombreuses autres revues existent en ce qui concerne l'utilisation potentielle de la métabolomique dans différentes pathologies comme le diabète[57,58],les maladies cardiovasculaires[59,60,61], ou encore les cancers[62,63,64]

Dans le cas des maladies auto-immunes, l'outil métabolomique peut permettre de donner des informations sur les processus impliqués, ainsi que l'évolution ou la sévérité de la maladie. L'étude menée par Lauridsen et collaborateurs en 2010 sur des sérums de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde[65], a permis d'identifier le cholestérol, le lactate, les glycoprotéines acétylées et les lipides comme étant des métabolites impliqués dans des formes plus sévères de la maladie, par rapport à des patients contrôles. Les sérums ont été analysés par spectroscopie RMN du ^{1}H. A ce titre, les profils de patients avec une maladie active et ceux présentant une rémission étaient différents. De plus, après 31 jours de traitement des deux groupes, les profils métabolomiques n'étaient plus différents. Une seconde étude[66] de Madsen et collaborateurs en 2011, dont le but était de vérifier la faisabilité du diagnostic précoce de la Polyarthrite Rhumatoïde en mesurant des biomarqueurs particuliers, grâce à une plateforme de GC-MS et de LC-MS a permis de montrer que la PR pouvait être diagnostiquée avec une sensibilité de 93% et une spécificité de 70%, en utilisant un profil de 52 métabolites. De plus, les patients présentant une PR ou une arthrite psoriasique pouvaient être discriminés avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 94%. L'acide glycérique, le D-ribofuranose et l'hypoxanthine sont augmentés chez les patients présentant une arthrite psoriasique, alors que l'histidine, l'acide thréonique, la méthionine, le cholestérol, l'asparagine et la thréonine sont diminués par rapport aux contrôles sains. Enfin, une étude[67] menée sur la maladie cœliaque par Bertini et collaborateurs en 2009, en RMN du proton sur des échantillons d'urine et de sérum, a permis de montrer que certains acides aminés, lipides, pyruvate et choline du sérum des patients malades étaient diminués, alors que les niveaux de glucose, d'acide 3-hydroxybutrique étaient plus élevés. D'autres métabolites discriminants ont été rapportés dans les urines.

II.4 Intérêt du profilage du LCR et du sérum dans la recherche de biomarqueurs de la SEP

Comme nous venons de la décrire, de nombreuses études ont cherché à identifier un profil métabolomique spécifique de la SEP en utilisant l'approche métabolomique sur le liquide céphalo-rachidien, mais rares sont celles qui ont utilisé l'approche métabolomique combinée sur du LCR et du sérum. A ce titre, le LCR représente un biofluide d'intérêt dans l'exploration de la SEP. C'est un fluide d'aspect « eau de roche », qui entoure le cerveau et la moelle épinière afin de les protéger des dommages mécaniques ou immunologiques. Il se compose principalement d'eau (99%), de protéines, de nutriments ou d'électrolytes nécessaires au métabolisme ou issus de dégradation. Il est produit à un rythme de 500 ml par jour et est renouvelé environ 4 fois dans une journée[68]. Il est directement en contact avec le système nerveux central, et sa composition biochimique est le résultat des atteintes physiopathologiques des maladies neurologiques. Cependant, le LCR reste un biofluide difficile d'accès. La ponction lombaire est un acte invasif, qui peut être douloureux et entraîner des complications. En revanche, la prise de sang est beaucoup moins dangereuse et douloureuse, et le sérum reste un fluide très intéressant, car de nombreuses lésions affectant la barrière hémato-encéphalique sont observées durant la SEP. Ainsi, on peut imaginer que les changements métaboliques affectant le LCR peuvent avoir diverses répercussions au niveau du sérum.

Comme nous l'avons vu, unbiomarqueurest un indicateur d'apparition ou de progression d'une pathologie,qui permet de distinguer un état normal d'un état pathologique. Et à ce titre, le profilage métabolique du LCR et du sérum peut révéler tout son intérêt pour déterminer de manière précoce un dysfonctionnement lié à la SEP, avant même que les premiers symptômes puissent être perçus, ce qui reste toute la difficulté decette maladie.

II.5 Les séquences en RMN pour la métabolomique

Des séquences d'acquisition particulières, appelées séquences d'impulsion, permettent d'obtenir des données spectrales intéressantes pour l'analyse métabolomique et la recherche de métabolites discriminants pour l'étude comparative (NOESY 1D pour le LCR, CPMG pour

le sérum), mais aussi pour l'identification du métabolome lorsque les seules données une dimension ne suffisent pas (Jresolve, HSQC ou COSY).

i. Pour le LCR

LA NOESY 1D est une technique permettant l'acquisition d'un spectre une dimension, qui représente le déplacement chimique du ^{1}H. Elle est rapide, quantitative et permet d'avoir une idée de l'environnement chimique des protons, et des couplages avec leurs voisins. En revanche, dans le cas où beaucoup de molécules possèdent des protons avec des déplacements chimiques proches, on aura un phénomène de superposition qui rendra l'interprétation du spectre difficile, et il faudra utiliser une autre technique en 2 dimensions. La J-res par exemple est une technique bidimensionelle qui permet d'observer le déplacement chimique du proton ^{1}H et les constantes de couplage (J).La COSY est une autre techniquebidimensionelle qui permet l'acquisition de spectreshomonucléaire^{1}H-^{1}H. Enfin, l'HSQC est une technique qui permet l'acquisition de spectres en 2D fréquentielle. Elle permet d'obtenir les corrélations entre les protons et carbones, et les empreintes spécifiques des métabolites recherchés.

ii. Pour le sérum

La CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) utilisée pour les séra est une séquence T2-filter qui permet une diminution de l'influence des molécules de haut poids moléculaire sur le spectre (comme les protéines sériques ou l'albumine) qui peuvent masquer de nombreux métabolites. Ce protocole a été optimisé au cours d'un travail précédent de master réalisé par Antoine Lion[69] au laboratoire en 2010.

Après avoir dressé un état de l'art de la métabolomique et l'intérêt de cette dernière pour la détermination de biomarqueurs, les parties III (matériels et méthodes), IV (résultats) et V (discussion) de ce travail concernent le cœur de l'étude comparative que nous avons menée sur le liquide céphalo-rachidien et le sérum chez des patients atteints de sclérose en plaques par l'approche métabolomique en RMN du proton.

PARTIE III

MATERIELS ET METHODES

III.1 Design expérimental

L'étude s'est déroulée en 3 étapes :

- Constitution des pools d'échantillons
- Analyse des échantillons par RMN ^{1}H et ^{13}C : acquisition des données et identification du métabolome
- Analyse statistique, modélisation multivariée et exploitation des résultats.

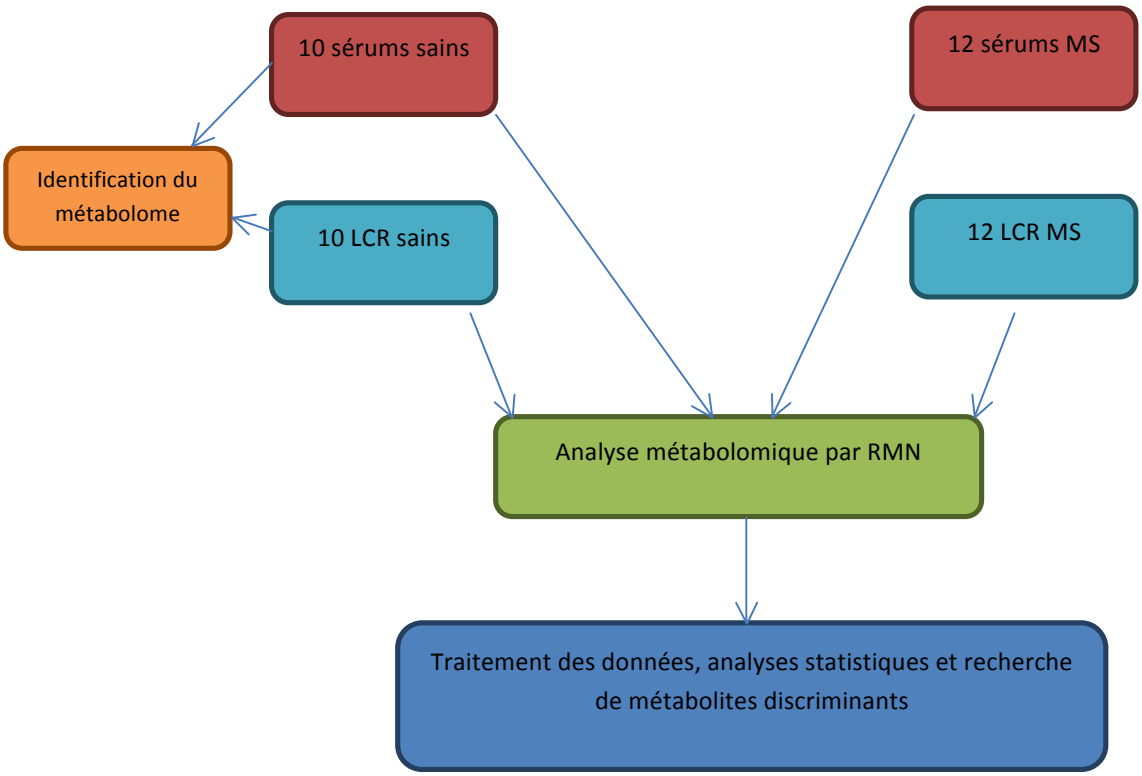


Figure 17: design expérimental de l'étude et analyse par une approche métabolomique.

III.2 Matériels et méthodes biologiques

III.2.a Les échantillons

Les échantillons de LCR et séra recueillis proviennent de fonds de tubes utilisés par le service de biochimie du Centre de Biologie Humaine du CHU d'Amiens. Ilsont permis de constituer 2 groupes : un groupe « MS » qui contient les patients atteints de SEP et un groupe « Non-MS » qui constitue notre groupe référence.
Une recherche sur les antécédents cliniques des patients a été effectuée et résumée dans le tableau de l'annexe 1.

Dans un premier temps, le critère biochimique d'isoélectrofocalisation des IgG du LCR a été retenu afin de discriminer le groupe MS du groupe non-MS. Cette technique permet de mettre en évidence la forte réaction immunitaire locale se manifestant par une synthèse intrathécaled'IgG par des clones lymphoplasmocytaires. Elle est révélée par la présence de bandes oligoclonalesd'IgG observées seulement dans le LCR et absentes du sérum[70]. Au-delà de 5 bandes apparaissant à l'isoélectrofocalisation des IgG, un diagnostic de maladie inflammatoire du système nerveux peut-être posé. Il vient étioler le faisceau d'arguments en faveur d'une SEP. On a également utilisé le critère du rapport de Delpech afin d'affiner l'inclusion dans le groupe MS. Les biochimistes du CHU d'Amiens considèrent que ce rapport se trouve dans une norme comprise entre 0.20 et 0.70. Les autres échantillons (0 bande d'IgG, et rapport de Delpech compris entre 0.20 et 0.70) ont permis de constituer le groupe référence. Ce sont des patients n'ayant pas de SEP définie sur les critères biochimiques.

Dans un deuxième temps, l'inclusion dans les différents groupes a été affinée. Pour le groupe MS, seuls les patients ayant une SEP cliniquement définie après validation du neurologue ont été retenus, et ceux ne présentant pas de SEP cliniquement définie, et dans la mesure du possible pas d'autre pathologie inflammatoire ont été inclus dans le groupe non-MS (tableau 3).

	Non-MS	MS
Nombre de patients	10	12
Femmes : hommes (n)	8:2	11 :1
Age moyen (années)	48.27 +/- 19.96	33.92 +/- 12.63
Pathologies	paralysie du VI gauche	SEP cliniquement définie (7)
	Troubles sensitifs	SEP forme primaire progressive
	encéphalite	Forte suspicion de SEP (4)
	polyneuropathie	
	myélite	
	diplopie	
	NORB Etiologie inconnue ou autres (3)	

Tableau 3: principales caractéristiques des groupes MS et non-MS.

Notre étude a été réalisée en accord avec un protocole de recherche non interventionnelle déposé auprès du comité de protection des personnes (CPP) d'Amiens. Une information auprès de la CNIL a été déposée.

III.2.b Protocoles de prélèvement des LCR et séra et conservation des échantillons

Le prélèvement du LCR s'effectue par ponction lombaire, par un clinicien, selon le protocole standard du CHU d'Amiens et dans des conditions strictes d'asepsie.Elle se fait au niveau du cul-de-sac dural. Le LCR est recueilli dans plusieurs tubes stériles, destinés aux examens biochimique, cytologique et bactériologique.

Le prélèvement de sérum s'effectue dans les conditions de la centrale de prélèvement du CHU d'Amiens. Il est fait sur une veine du bras à l'aide d'une aiguille papillon, garrot défait. Le sérum est récolté dans des tubes secs. Le prélèvement est fait à température ambiante.

Les échantillons de LCR et de séra sont conservés à -80°C au laboratoire BIOPI à la faculté de pharmacie d'Amiens avant le protocole de préparation en vue de l'analyse RMN. La

température de stockage à -80°C assure l'intégrité de la composition métabolique de l'échantillon. Il a été démontré qu'un stockage à -20°C pourrait entrainer un certain nombre de processus chimiques qui peuvent influencer la concentration en métabolites[71]. Avant leur préparation en vue de l'analyse RMN, les échantillons stockés à -80°Csont décongelés à température ambiante, durant environ 1 heure.

III.2.c Protocoles de préparation des LCR et séra en vue de l'analyse par RMN

i. Protocole de préparation des LCR

Un échantillon de 400 microlitres de LCR est dilué dans 200 microlitres de solution tampon phosphate. L'utilisation du tampon phosphate s'avère être la méthode la plus efficace qui a fait l'objet d'une optimisation (voir partie IV.1). La solution de tampon phosphate est concentrée à 0,2 mmol/l, et préparée selon le protocole décrit plus loin. Son pH est de 7,4.
On prépare une solution mère de Na_2HPO_4 à 1 mol/l et une solution mère de NaH_2PO_4 à 1 mol/l (tableau 4).

solution mère Na_2HPO_4 (1 mol/l)		solution mère de NaH_2PO_4 (1 mol/l)	
Na2HPO4	0,7098 g	NaH2PO4	0,999 g
D2O	5 ml	D2O	5 ml
M(Na2HPO4), xH20	119,98 g/mol	M(NaH2PO4), yH20	141,95 g/mol

Tableau 4 : préparation des solutions mères nécessaires au tampon phosphate.

On mélange ensuite 1,15 ml de la solution mère de Na_2HPO_4 à 1 mol/L avec 0,85 ml de la solution mère de NaH_2PO_4 à 1 mol/l dans une fiole jaugée de 10 ml. On ajoute 1,72 mg de TMSP (concentration de 0.172 mg/ml de TMSP), en tant qu'étalon interne.On ajoute également 6 mg de NaN3 (sodium azide), qui permet d'éviter la prolifération bactérienne. On complète la fiole jusqu'à 10 mL avec du D_2O.Nous utilisons des tubes 5mm 509-UP (NorellInc, Landisville, USA) pour l'analyse RMN de nos échantillons de LCR.

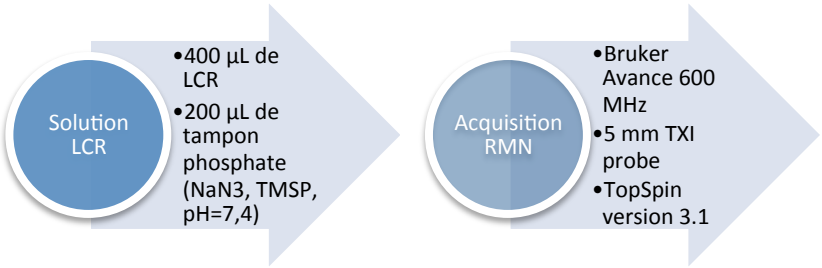


Figure 18: protocole de préparation des LCR.

ii. Protocole de préparation sérum

Un aliquot de sérum de 200 microlitres est décongelé à température ambiante. Il est dilué dans 300 microlitres de D_2O. L'homogénéisation se fait par 3 minutes de vortex puis 5 minutes de centrifugation à 24000 RPM. Le pH est ajusté entre 6,95 et 7,05, grâce à une solution de DCl, à 0,7N ou de NaOD à 0,1N[69]. Les tubes utilisés pour l'analyse RMN sont des tubes RMN CORTECNEC, disposant d'un système de capillaire pour l'étalon. Le capillaire contient une référence interne, qui est composée d'une solution de TMSP concentrée à 0,25mg/ml dans du D_2O. Le capillaire permet d'isoler le TMSP de notre solution de sérum, ce qui permet de s'affranchir des interférences dues aux protéines du sang, et notamment l'albumine[72].

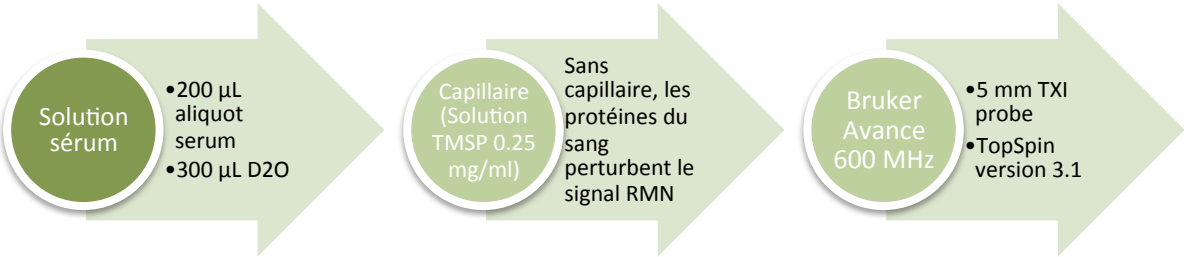


Figure 19: protocole de préparation des sérums.

III.3 Analyse métabolomique en RMN

III.3.a L'acquisition

Les spectres sont obtenus après acquisition sur un spectromètre RMN Bruker 600 MHz AVANCE III (système magnétique 14.09T), équipé d'une sonde TXI 5 mm z-gradient. Les spectres ^{1}H en une dimension pour le LCR ont été acquis en utilisant une séquence spin-écho avec suppression du pic de l'eau (présaturation sur l'eau). Le pic de l'eau présente un problème en RMN, puisqu'il masque les pics adjacents du fait de la résonance des protons (aux environs de 4,8 ppm sur le spectre). Le LCR contient majoritairement de l'eau et afin d'obtenir des résultats exploitables sur nos spectres, il est nécessaire de réaliser une présaturation correcte sur l'eau. Le logiciel TopSpin (Bruker) est utilisé pendant l'acquisition. Les shim sont réalisés par une procédure automatisée Topshim 1D.

III.3.b Les paramètres d'acquisition en RMN

La RMN liquide est une technique analytique permettant de déterminer les structures de molécules chimiques, en adoptant une approche qualitative et semi-quantitative[73]. L'approche qualitative, permettant de déterminer la composition chimique d'un échantillon biologique, est basée sur les relations existantes entre les différents noyaux d'une molécule, soumis à des champs magnétiques spécifiques. Un spectre RMN obtenu dans ces conditions particulières permet d'identifier et de caractériser précisément les composants chimiques d'un échantillon. L'approche semi-quantitative est également nécessaire pour l'analyse métabolomique.

Afin d'obtenir des spectres intéressants pour ces deux approches, il existe plusieurs séquences d'acquisition spécifiques (tableau 5). Ces différentes séquences d'impulsion permettent d'obtenir des spectres en une ou deux dimensions (spectre ^{1}H ou spectre couplé ^{1}H-^{13}C par exemple), qu'on appelle spectres homonucléaires ou hétéronucléaires. Les méthodes d'acquisition que nous utiliserons pour notre étude métabolomique RMN et leurs objectifs sont présentées en tableau 5, et leurs paramètres spécifiques sont en tableau 6.

Biofluide	Nom de la séquence	Dimension	Objectifs
SERUM	CPMG [74]	1 dimension ^{1}H	Semi-quantitatif/Identification
LCR	NOESY 1D [75]	1 dimension ^{1}H	Semi-quantitatif/Identification
LCR/SERUM	Jresolve ou JRES	2 dimensions ^{1}H-^{1}H	Identification
LCR/SERUM	HSQC	2 dimensions ^{1}H-^{13}C	Identification
LCR/SERUM	COSY [76,77]	2 dimensions ^{1}H-^{1}H	Identification

Tableau 5 : principales caractéristiques et objectifs des séquences RMN utilisées.

Séquences	Paramètres d'acquisition		
CPMGt2filter (Bruker)			
	Angle de basculement	90°	
	Nombre de points (TD)	128K	
	Largeur spectrale	8417 Hz	
	Nombre de scans (NS)	128	
	Fenêtre spectrale (SW)	14 ppm	
	Délai de relaxation (D1)	7 s	
NEOSY 1D avec présaturation de l'eau (Bruker NOESY 1D du 06/11/09)			
	Angle de basculement	90°	
	Nombre de points (TD)	128K	
	Nombre de scans (NS)	128	
	Fenêtre spectrale (SW)	14 ppm	
	Temps d'acquisition (AQ)	7.8 s	
	Délai de relaxation (D1)	7 s	
	Gain du récepteur (RG)	128	
	Centre de fenêtre (OSP)	4.708 ppm	
J-resolved 1H (Brukerjresesgpmodifiée du 04/09/02)		**F1**	**F2**
	Angle de basculement	90°	
	Nombre de points (TD)	64K	
	Nombre de scans (NS)	8	
	Fenêtre spectrale (SW)	0.13 ppm	14 ppm
	Temps d'acquisition (AQ)	0.8 s	3.89 s
	Gain du récepteur (RG)	203	
COSY 1H (Brukercosygpprqf du 9/04/04)		**F1**	**F2**
	Angle de basculement	90°	
	Nombre de points (TD)	512	4K
	Nombre de scans (NS)	8	
	Fenêtre spectrale (SW)	14 ppm	
	Temps d'acquisition (AQ)	0.03 s	0.24 s
	Délai de relaxation (D1)	1.5 s	
	Gain du récepteur (RG)	203	
	Centre de fenêtre (OSP)	4.709 ppm	
HSQC 1H-13C (Bruker hsqcetgpprsisp2.2 du 07/04/04)		**F1**	**F2**
	Angle de basculement	90°	
	Nombre de points (TD)	256	2048
	Nombre de scans (NS)	128	
	Fenêtre spectrale (SW)	200 ppm	14 ppm
	Temps d'acquisition (AQ)	3.89 s	
	Délai de relaxation (D1)	0.061 s	
	Gain du récepteur (RG)	2050	
	Centre de fenêtre (OSP)	4.709 ppm	

Tableau 6 : paramètres d'acquisition des séquences RMN utilisées pour l'analyse métabolomique.

III.3.c Data préprocessing

C'est une étape intermédiaire entre l'acquisition spectrale et l'analyse des données. L'étape de préprocessing permet de transformer les données afin de les rendre comparables et d'améliorer l'analyse statistique[78,79,80].Les étapes de préprocessing incluent la correction de la ligne de base ((a) figure 20), l'alignement, le binning et la normalisation si nécessaire.

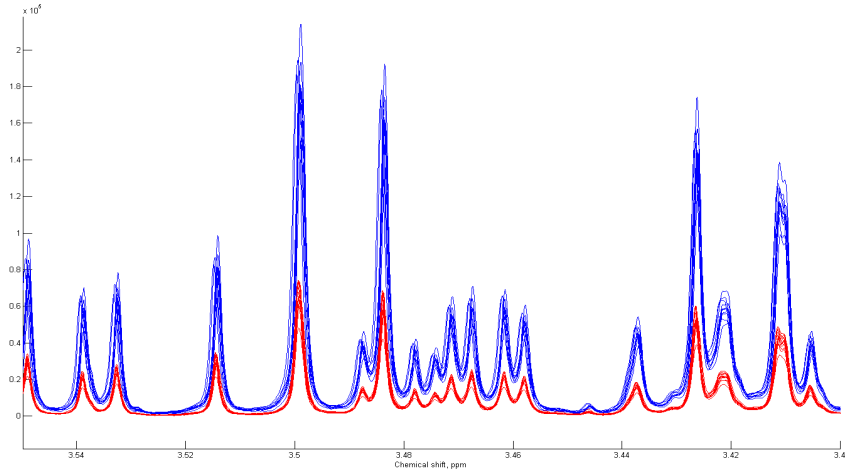
Les spectres sont phasés manuellement, la ligne de base est corrigée, et le TMSP est utilisé comme référence (0.0 ppm)[6]. Les zones en dehors de 0 et 10 ppm sont supprimées car elles ne contiennent aucun métabolite d'intérêt. La zone de présaturation de l'eau entre 4.7 et 5.0 ppm est supprimée afin de ne pas perturber l'analyse statistique.

Un alignement automatique des spectres est réalisé par IntervalCorrelatedShifting (icoshift v1.2 sous le logiciel MATLAB, (b) figure 20)[81]. Cet alignement est indispensable car les variations observées entre chaque spectre peuvent influencer l'analyse statistique[82].

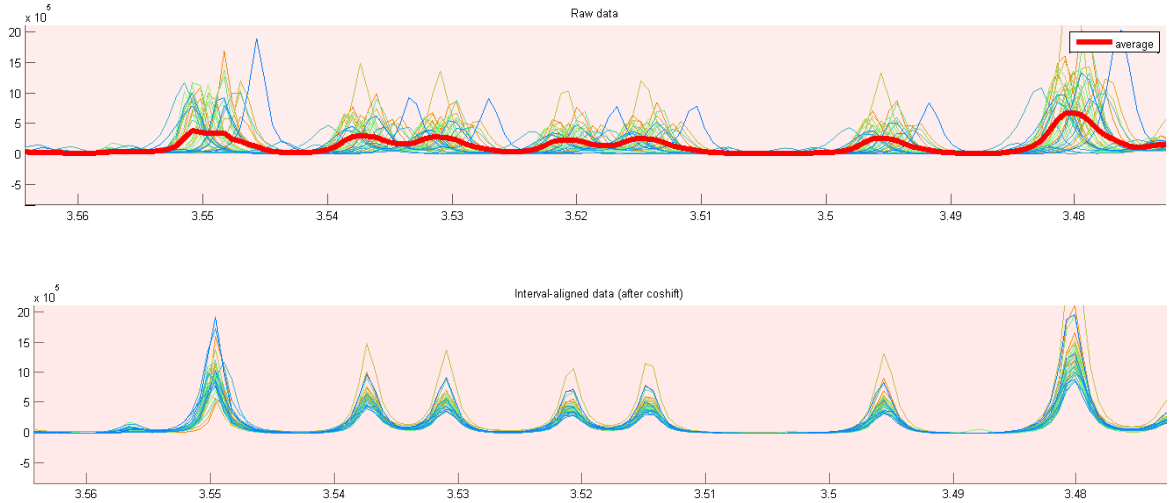
Afin de faciliter les analyses statistiques multivariées, les spectres sont buckettés entre 0 et 10 ppm ((c) figure 20). Cette étape de binning/bucketting permet de réduire la matrice de données en divisant le spectre en différents segments. Chaque segment du spectre est ensuite intégré afin de calculer une aire sous la courbe utilisée pour l'étape d'analyse statistique. Plusieurs méthodes sont proposées, la plus répandue étant un découpage du spectre équidistant (par exemple tous les 0.04 ppm)[83]. Cependant, ces méthodes présentent l'inconvénient de découper les pics de manière brute, ce qui peut engendrer de mauvais résultats lors de l'analyse statistique. Nous avons donc utilisé une méthode de Dynamic Adaptative Binning (DAB) qui permet de s'affranchir de ce problème (figure 20 (c)).

Enfin, un ajustement sur l'aire du TMSP est effectué sur nos données spectrales. Cet ajustement permet de corriger les variations des shimsou fluctuations instrumentales de la machine durant l'acquisition des spectres et rend les données comparables entre elles.

a)



b)



c)

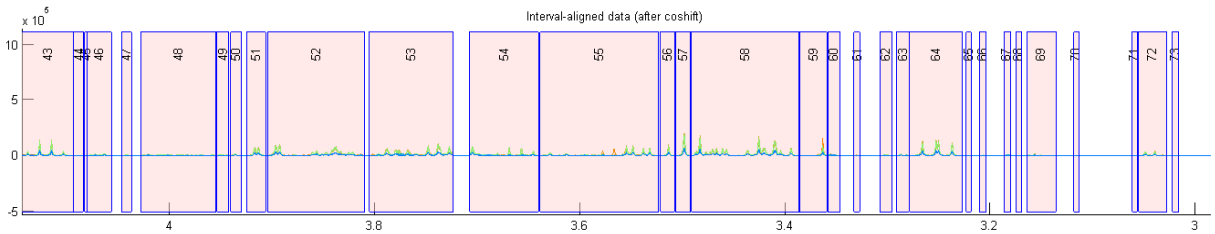


Figure 20: spectres RMN 1H de sérum.
(a) Influence de la correction de la ligne de base (spectre bleu : avant correction ;spectre rouge : après correction).
(b) Influence de l'alignement. (haut : avant l'étape d'alignement des spectres par l'utilisation d'icoshift v1.2 sous MATLAB ; bas : le réalignement final permet d'avoir des spectres comparables entre eux).
(c) Le binning ou découpage automatique des spectres avant l'étape d'intégration permet de définir les zones précises à intégrer avant l'analyse statistique.

III.3.d L'analyse des données spectrales

Les spectres sont analysés avec les logiciels AMIX-VIEWER 3.9.11 et TopSpin3.0. (Bruker). Ils sont exportés en matrices de données comportant *m* lignes (échantillons) et *n* colonnes (intégrales des bins). Cette matrice de données est utilisée afin de réaliser une modélisation statistique par ACP (analyse en composantes principales) ou PLS grâce au logiciel Simca P+v.12.0.1 (Umetrics). L'analyse par ACP est l'analyse statistique multivariée la plus utilisée en métabolomique[84]. Un test statistique de Wilcoxon a été réalisé avec le logiciel MATLAB.

III.3.e L'identification des métabolites

Une étape importante du travail consiste en l'identification et la caractérisation des métabolites. Cette étape préalable est nécessaire, puisque les métabolites identifiés sont susceptibles d'apparaître comme discriminants lors de notre analyse statistique. Il est donc primordial d'identifier le maximum de métabolites avec certitude dans nos échantillons de LCR et de séra.

La caractérisation des métabolites a été réalisée sur des individus identifiés « non-MS ». Pour procéder à l'identification, nous avons utiliséla base de données SBASE (AMIX), le logiciel TopSpin 3.0(spectres (a) et (b) de la figure 21), les bases de données du laboratoire, les bases de données internationales parmi lesquellesHMDB disponible en ligne (www.hmdb.ca)[31]ou la littérature. HMDB présente l'avantage de répertorier des métabolites dans le LCR et dans les séra humains. L'identification a nécessité un balayage manuel des spectres, avec une comparaison des empreintes protons ou carbone des métabolites de référenceaux tables de shifts.

Nous avons utilisé l'ensemble des spectres en NOESY 1D, en CPMG, ou en 2 dimensions lorsque les résonances en 1 dimension ne permettaient pas d'identifier les métabolites avec précision (zone d'overlaps, zones de densité trop importante). Un exemple des corrélations protons-protons ou protons-carbone sur 2 dimensions est présenté sur le spectre (c) de la figure 21. Les résultats de l'identification du métabolome des LCR et séra ont été reportés en annexe (tableaux des annexes 2 et 3) et à la figure 23. Enfin, des fiches synthétiques reprenant une partie du travail d'identification se trouvent en annexe.

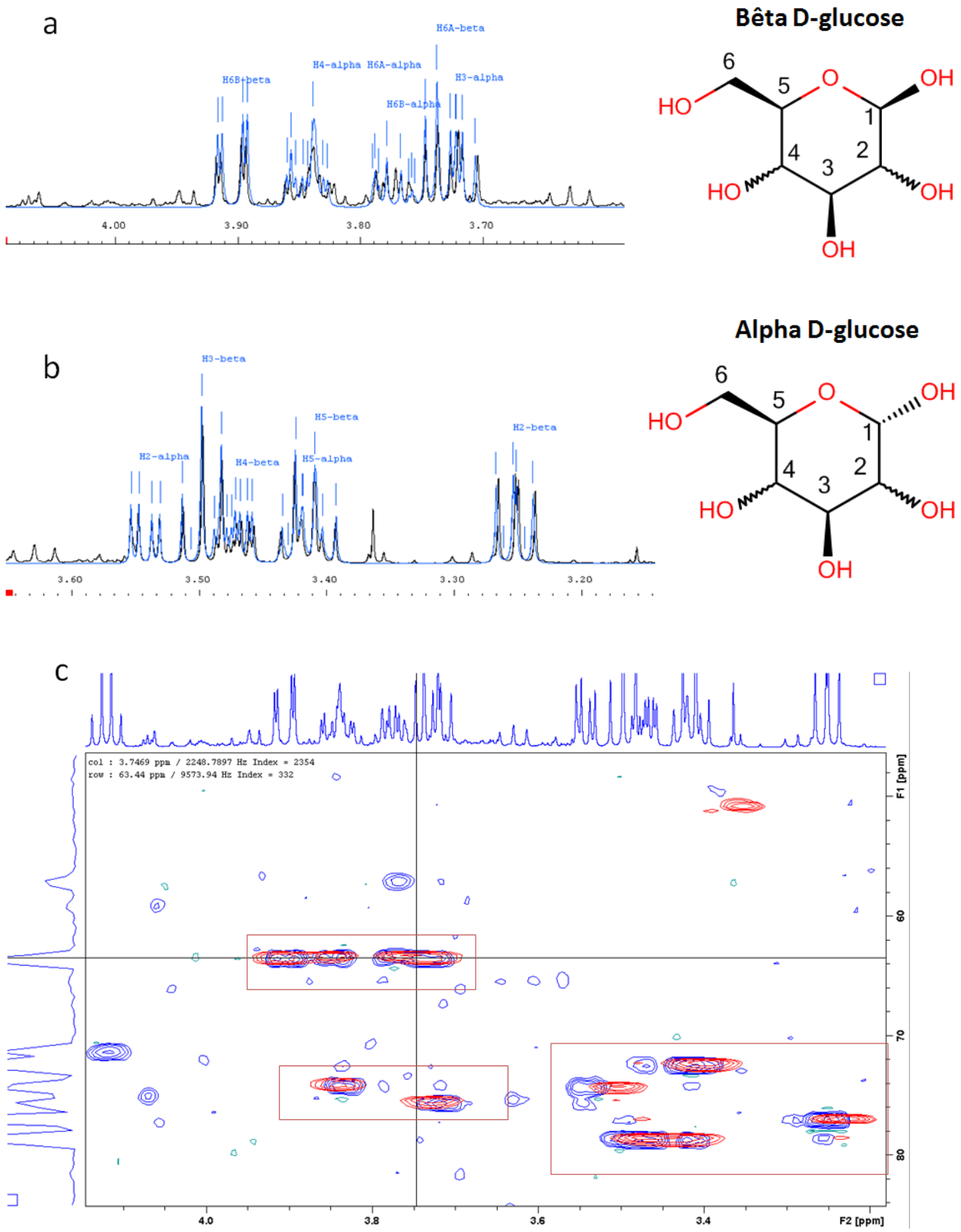


Figure 21: exemple de l'utilisation de spectres 1H NOESY 1D de LCR sous AMIX.
Identification du glucose (forme alpha et bêta D) grâce aux standards ((a) et (b), spectre bleu). Le spectre HSQC en 2D du LCR (c) est utilisé pour les identifications plus délicates. En rouge apparait l'empreinte ^{13}C du glucose standard. Le spectre est présenté entre 3 et 4,5 ppm, zone de résonance des sucres.

PARTIE IV

RESULTATS

IV.1 Optimisation du protocole de préparationdu LCR pour l'analyse par RMN

Avant de lancer les analyses de nos échantillons, nous avons effectué une étaped'optimisation du protocole de préparation des échantillons LCR. Nous avons suivi un protocole de la littérature[85], que nous avons adapté à nos échantillons. Avant de choisir le protocole le plus efficace, 7 conditions de préparation ont été testées.

L'échantillon de LCR utilisé a été récupéré auprès d'un patient atteint d'hydrocéphalie après ponction lombaire thérapeutique.

IV.1.a Les conditions de préparation testées

Les paramètres testés sont les suivants :

- TMSP dans l'échantillon ou isolé dans un capillaire
- Tampon phosphate ou solvant D_2O et ajustement manuel du pH
- Volume de LCR (200 µl, 300 µl ou 400 µl)
- Concentrations de TMSP (1 mg/l ou 0.172 mg/l)

Toutes ces conditions de préparation sont présentées dans le tableau 7.

Tube	Paramètre testé	Volume LCR (µl)	Volume D20 (µl)	Ajustement pH avec DCl (µl)	Volume étalon ou tampon (µl)	Concentration TMSP(mg/ml)	pH final
1	capillaire	400	100	Non	100 (capillaire)	1	8.12
2	capillaire	400	98	2	100 (capillaire)	1	7.38
3	pH	400	100	Non	100	1	8.37
4	solvant D2O	400	97	3	100	1	7.51
5	tampon	400	0	Non	200 (tampon)	0.172	7.41
6	volume LCR	200	299	1	100	1	7.5
7	volume LCR	300	198	2	100	1	7.3

Tableau 7 : les conditions de tests pour l'optimisation de l'acquisition des données LCR en métabolomique.

La fenêtre de détection du spectromètre RMN nécessite un volume d'échantillon final équivalent à 600 µl. Cependant, ne connaissant pas encore les volumes de LCR dont nous pourrions disposer, nous avons testé la viabilité de l'acquisition avec des volumes plus faibles (200 et 300 µl) dans les conditions 6 et 7 du tableau 7. L'ajustement final des volumes a été fait avec un solvant deutéré.

Le LCR contient des protéines, qui peuvent interagir avec le TMSP et perturber l'analyse RMN. C'est la raison pour laquelle nous avons testé d'isoler le TMSP dans un capillaire, à l'extérieur de notre échantillon et sans contact avec les protéines (conditions 1 et 2 du tableau 7).

Durant l'analyse RMN, un changement de pH induit un changement de force ionique, qui peut perturber les résultats (shifts). D'après la littérature, le pH doit être ajusté entre 7,3 et 7,7[85]. Sans ajustement, le LCR est basique, avec un pH autour de 8,3. Dans les conditions 2, 4, 6 et 7 du tableau (a), nous avons testé l'ajustement manuel du pH grâce à une solution de DCl à 0,7N ou NaOD à 0,1N.

IV.1.b Influence des différents paramètres et choix du protocole final

L'utilisation du capillaire a induit une mauvaise présaturation sur l'eau (pic à 4.8 ppm) (spectres (a) de la figure 22). Ceci engendre des résultats peu exploitables. De plus, l'utilisation du capillaire alourdit la préparation et n'améliore pas les résultats.

La correction et l'ajustement du pH sont nécessaires pour obtenir des spectres sans shift (spectre (b) de la figure 22). Le tampon phosphate permet d'avoir un milieu au pH fixé sans devoir réaliser un ajustement manuel.

Les faibles volumes d'échantillon n'offrent pas une bonne sensibilité d'acquisition (spectre (c) de la figure 22). Nous devons disposer d'au moins 400 µl par échantillon.La quantité d'eau présente dans le LCR (99%) induit une faible sensibilité lors de l'acquisition et nécessite une bonne pré-saturation sur l'eau que nous avons réussi à obtenir avec notre optimisation.

Enfin, la concentration de TMSP à 1 mg/ml est trop importante par rapport aux autres métabolites du spectre, ce qui induit un pic trop intense en 0 ppm. La concentration de 0,172 mg/ml est plus adaptée.

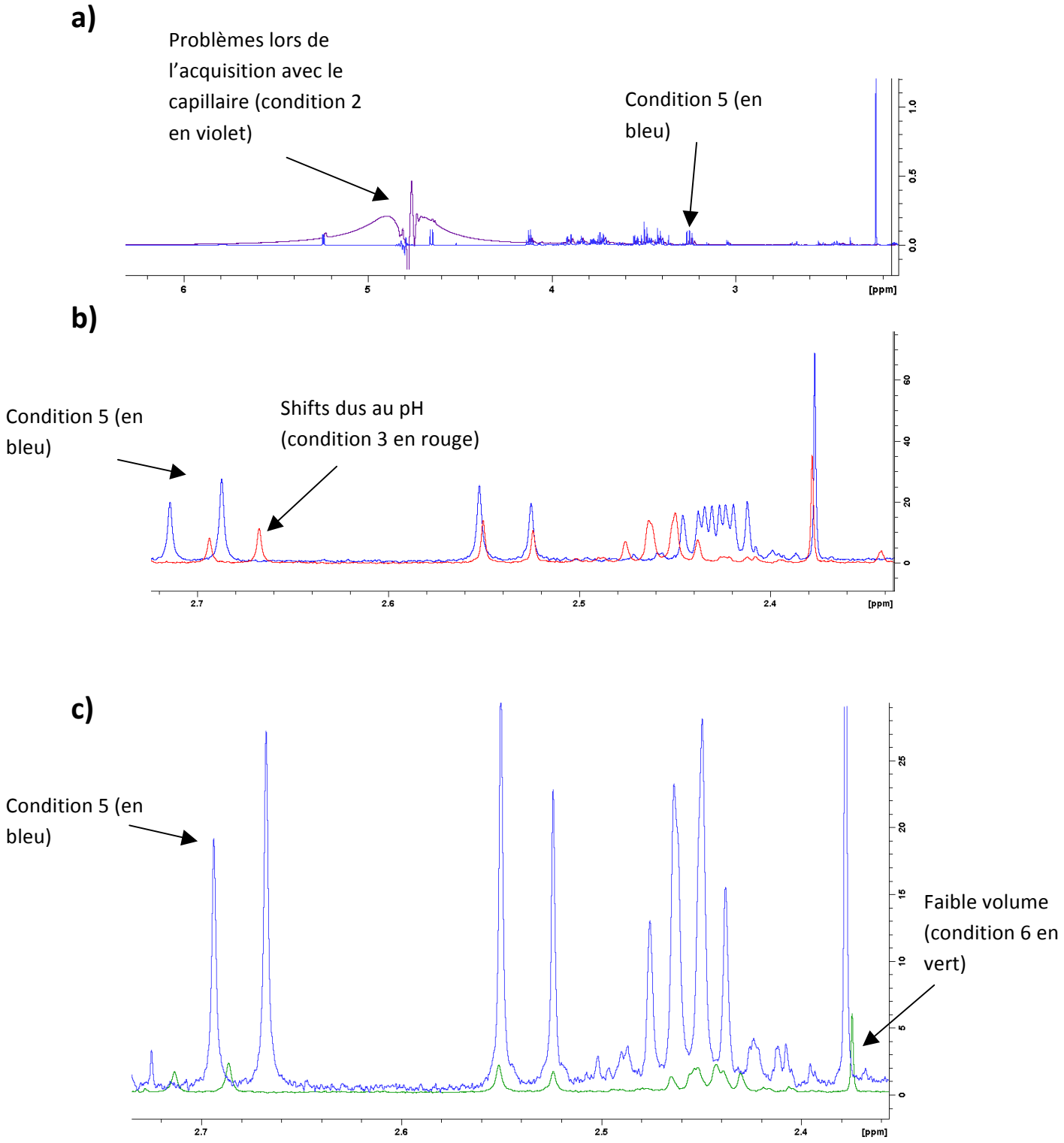


Figure 22: Comparaison des conditions testées pour la mise au point du protocole LCR.
Après comparaison des spectres en condition 2 (violet), condition 3 (rouge), condition 5 (bleue) et condition 6 (verte), on note que la condition 5 utilisant le tampon phosphate offre de meilleurs résultats.

La condition 5 utilisant le tampon phosphate est celle présentant le meilleur rapport interprétation et facilité de préparation. Elle offre un résultat qualitatif intéressant, avec des spectres plus précis, despics assez distincts, une bonne présaturation sur l'eau et un retour correct à la ligne de base.

IV.2 L'identification du métabolome

Une partie importante du travail consiste en l'identification du métabolome sur les sérums et LCR non-MS. Notre identification a permis de caractériser 23 métabolites en quantité suffisante dans le LCR[86] et 22 métabolites dans le sérum. Les métabolites identifiés dans ces deux fluides biologiques sont représentés dans les tableaux 2 et 3 en annexe. Un profil spectral métabolomique du LCR humain et un profil du sérum humain obtenu par RMN ^{1}H chez un individu « Non-MS » sont représentés en figure 23. Les données obtenues après identification sont cohérentes avec celles déjà réalisées dans la littérature[85].

On peut découper les spectres RMN en plusieurs zones. On observe le TMSP à 0 ppm, puis une zone dans laquelle on observe les résonances des acides gras et CH2 ou CH3 entre 0.5 et 1.5 ppm.Entre 0.7 ppm et 3.5 ppm, on retrouve la zone des acides aminés/acides organiques et la zone de résonance des sucres entre 3 et 4.5 ppm (figure 23). On peut apercevoir les fonctions alcènes pour des déplacements supérieurs à 5-6 ppm.Cette zone n'apparait pas sur les spectres de nos figures car elle ne contient que très peu de métabolites d'intérêt dans les deux biofluides.

Certains prélèvements de LCR ont laissé apparaitre un métabolite inconnu qui n'a pas été identifié et qui apparaissait sous forme d'un singulet à 3.7 ppm associé à un carbone à 73.43 ppm, certainement dû à une contamination exogène par produits anesthésiques/antiseptiques au moment de la ponction lombaire (13 échantillons sur 23). D'autres métabolites exogènes comme de l'isopropanol ont pu être identifiés dans certains échantillons, associés une fois de plus à une provenance extérieure.

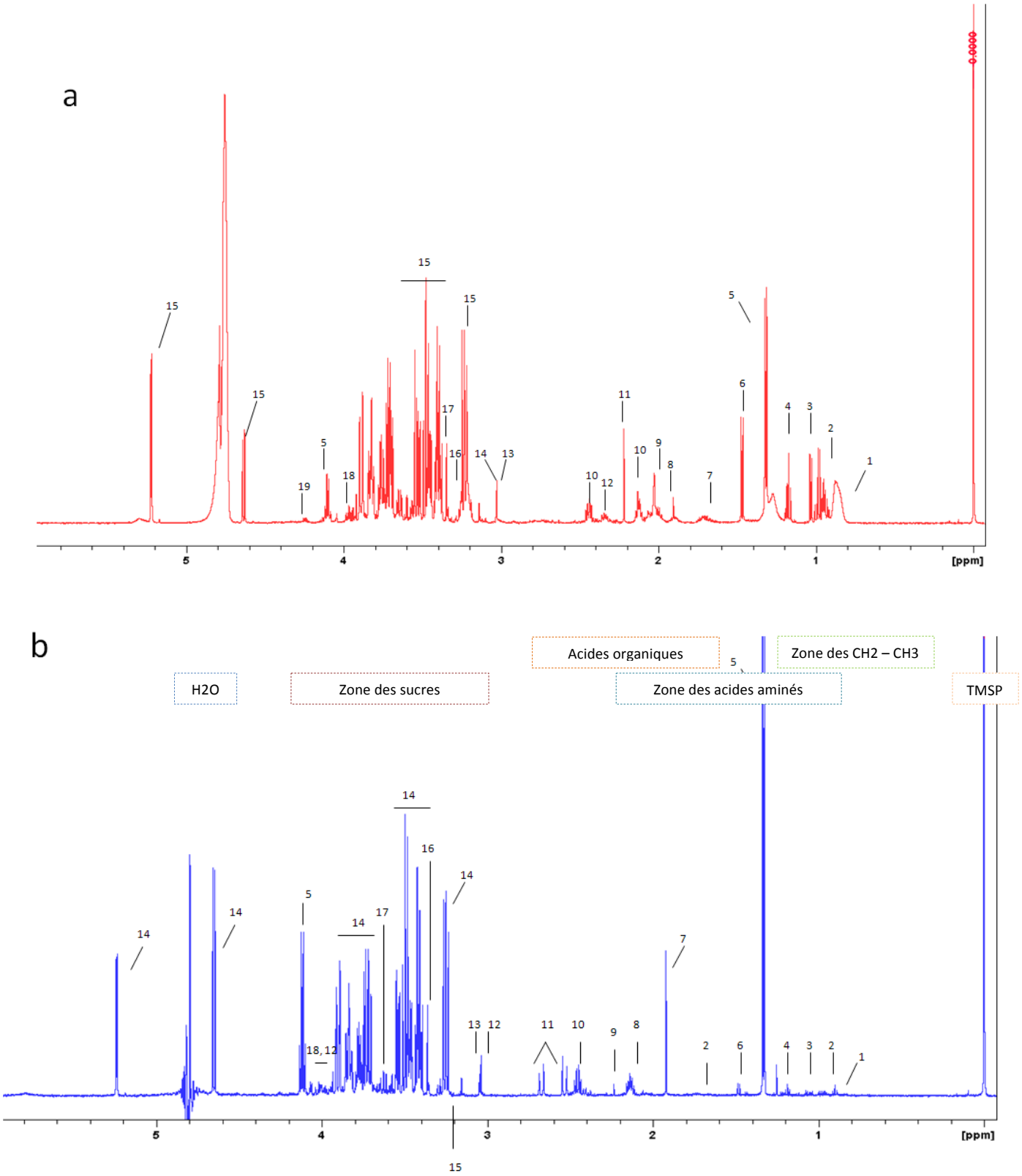


Figure 23: spectres RMN 1H du sérum et du LCR humain non-MS.
(a) spectre représentatif d'une acquisition 1H RMN sur sérum humain non-MS. 1: HDL; 2: leucine; 3: valine; 4: éthanol; 5: lactate; 6: alanine; 7: 2-hydroxybutyrate; 8: acétate; 9: glycérol; 10: glutamine; 11: acétone; 12:glutamate; 13: créatine; 14: créatinine; 15: glucose; 16:bétaine; 17: scyllo-inositol; 18: histidine; 19 : thréonine.
(b) Spectre représentatif d'une acquisition 1H RMN sur LCR humain non-MS. 1: 2-hydroxyisovalérate; 2: 2-hydroxybutyrate; 3: valine; 4: éthanol; 5: lactate; 6: alanine; 7: acétate; 8: glutamine; 9: acétone; 10: glutamate; 11: citrate; 12: créatine; 13: créatinine; 14: glucose; 15: choline; 16: méthanol; 17: myo-inositol; 18: threonate.

IV.3 Etude comparative *in vitro* du LCR des patients SEP cliniquement définie et non-SEP par une approche métabolomique

IV.3.a Vérification des dossiers patients et validation du neurologue

L'échantillonnage des patients est indispensable pour la réalisation des études métabolomiques, et le critère de bandes oligoclonales surnuméraires à l'isoélectrofocalisation des IgG seul ne peut être suffisant pour constituer l'inclusion dans le groupe MS. En effet, certaines scléroses en plaques sont cliniquement définies sans pour autant présenter un profil de bandes oligoclonales supplémentaires à l'isoélectrofocalisation, et *a contrario* certains profils positifs à l'isoélectrofocalisation peuvent refléter des pathologies inflammatoires périphériques qui ne sont pas diagnostiquées comme SEP.

Les dossiers cliniques des patients ont été étudiés afin de préparer les 2 groupes, en éliminant dans la mesure du possible les pathologies neurologiques inflammatoires, qui peuvent présenter des profils métabolomiques similaires aux SEP. La sclérose en plaques doit être cliniquement définie, c'est-à-dire que les patients doivent répondre aux critères de Mc Donald révisés pour être diagnostiqués comme atteints de SEP[87].La validation du diagnostic de Sclérose en Plaques estdemandée à un neurologue du CHU d'Amiens et est retenue pour l'inclusion.

IV.3.b Résultats statistiques sur LCR après amélioration de l'échantillonnage

Après cette confirmation, les échantillons se composent d'un groupe de patients « non-MS » et d'un groupe de patients « MS » cliniquement définis (tableau de l'annexe 1).

L'ACP (score-plot (a) de la figure 24) ne permet pas de discriminer des groupes significativement différents en fonction des conditions pathologiques. Cependant, la composante principale R2X(1) permet d'expliquer 60,18% de la variance des données. Les composantes principales représentent la distribution de la variance maximum dans le modèle multivarié. Malgré cette répartition des échantillons dans le modèle de l'ACP, une tendance générale peut se dégagerexpliquant le comportement de 50% des échantillons MS (5 sur 10) contre 56% des échantillons non-MS (5 sur 9).

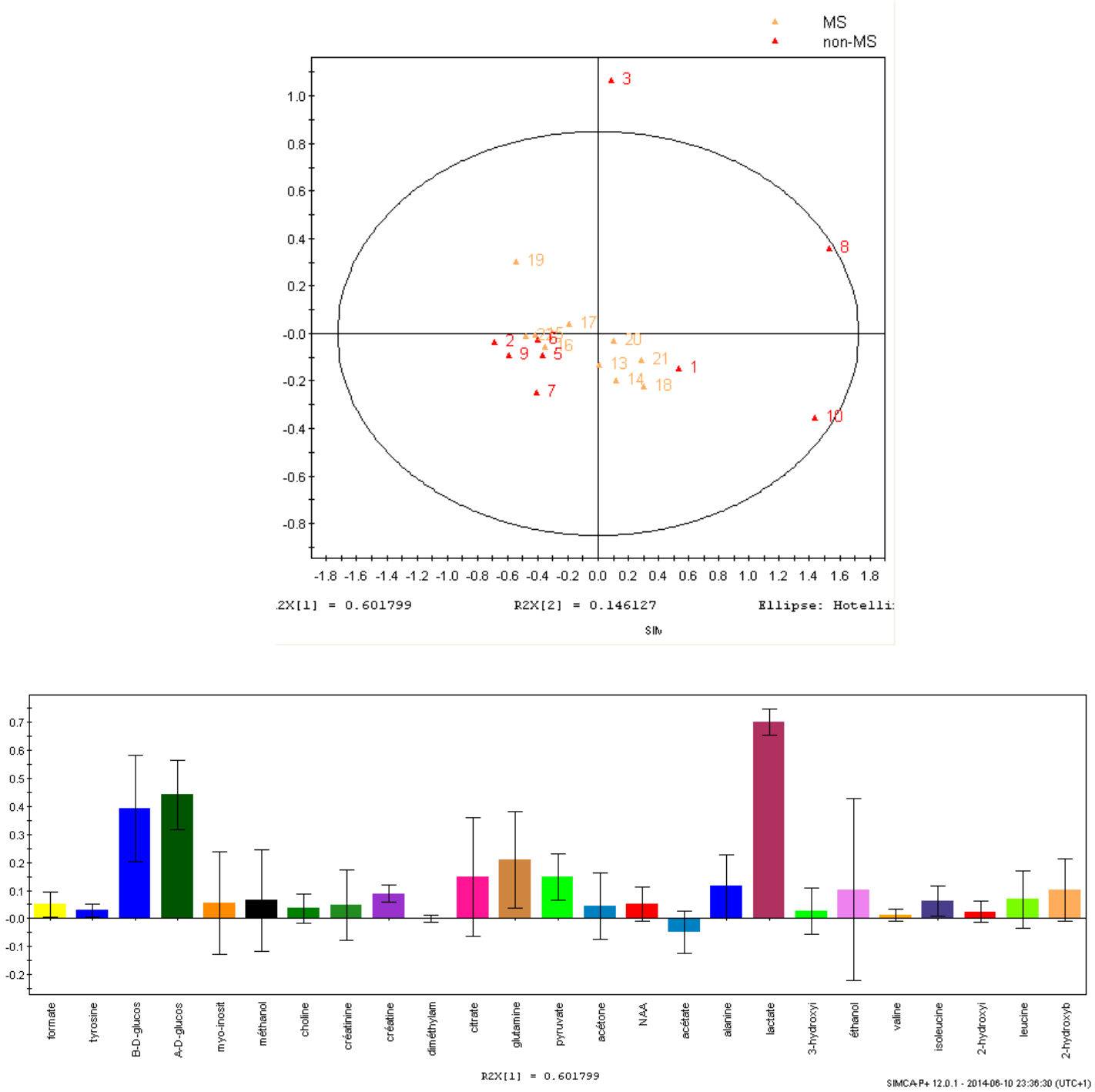


Figure 24: Résultats sur LCR par RMN 1H.
(a) Score-plot de l'analyse par ACP des données spectrales du LCR par RMN ^{1}H dans le groupe non-MS et le groupe MS. Echelle pareto, R2X(1)=0.601799 et R2X(2)=0.146127. (b) Le loading-column plot permet de visualiser les métabolites les plus significatifs lors de l'analyse par ACP (NAA = N-acétylaspartate ; 3-hydroxyi = 3-hydroxyisovalérate ; 2-hydroxyi = 2-hydroxyisovalérate ; 2-hydroxbb = 2-hydroxybutyrate).

Le loading-column plot (figure 24 (b)) permet d'observer quels métabolites apportent le plus leur contribution dans ce modèle, suivant la composante R2X(1).Lorsque l'intervalle de confiance à 95% croise l'axe des abscisses, le métabolite n'a pas un poids discriminant dans le modèle.

Le lactate, la glutamine, le pyruvate, la créatine et le glucose (forme alpha et bêta D) sont ceux dont la variance est significativement différente entre les groupes MS et non-MS. Tous ces métabolites ont une tendance à être augmentés dans le groupe MS.

IV.4 Etude comparative *in vitro* du sérum des patients cliniquement définis comme SEP par une approche métabolomique

L'étude comparative du métabolome des séra a été réalisée sur 8 échantillons de patients non-MS et 12 échantillons MS à cause de mauvais profils spectraux retrouvés sur certains échantillons, dus principalement à des problèmes durant l'acquisition. Seuls les patients cliniquement définis comme MS, validés par le neurologue et avec de bons profils spectraux RMN ont été inclus.

La classification hiérarchique ascendante (CAH) permet de classer les patients en fonction du degré de similarité de l'ensemble des variables dans des groupes (figure 25 (a)). La carte construite laisse apparaître 5 faux-négatifs parmi tous les individus. La sensibilité calculée est de 58% pour une spécificité de 100% (Vrais positifs = 7, Faux-positifs = 0, faux-négatifs = 5, vrais négatifs = 8).
Afin de déterminer si il existe une différence entre les groupes MS et non-MS, une analyse multivariée par ACP a été réalisée (figure 25 (b)). Elle permet de discriminer deux groupes de patients avec seulement deux individus MS dans le mauvais groupe (individus 14 et 21). La composante R2X(1) explique 29,79% de la variance totale. La composante R2X(2) permet d'expliquer 16,11% de la variance additionnelle dans la totalité des données.

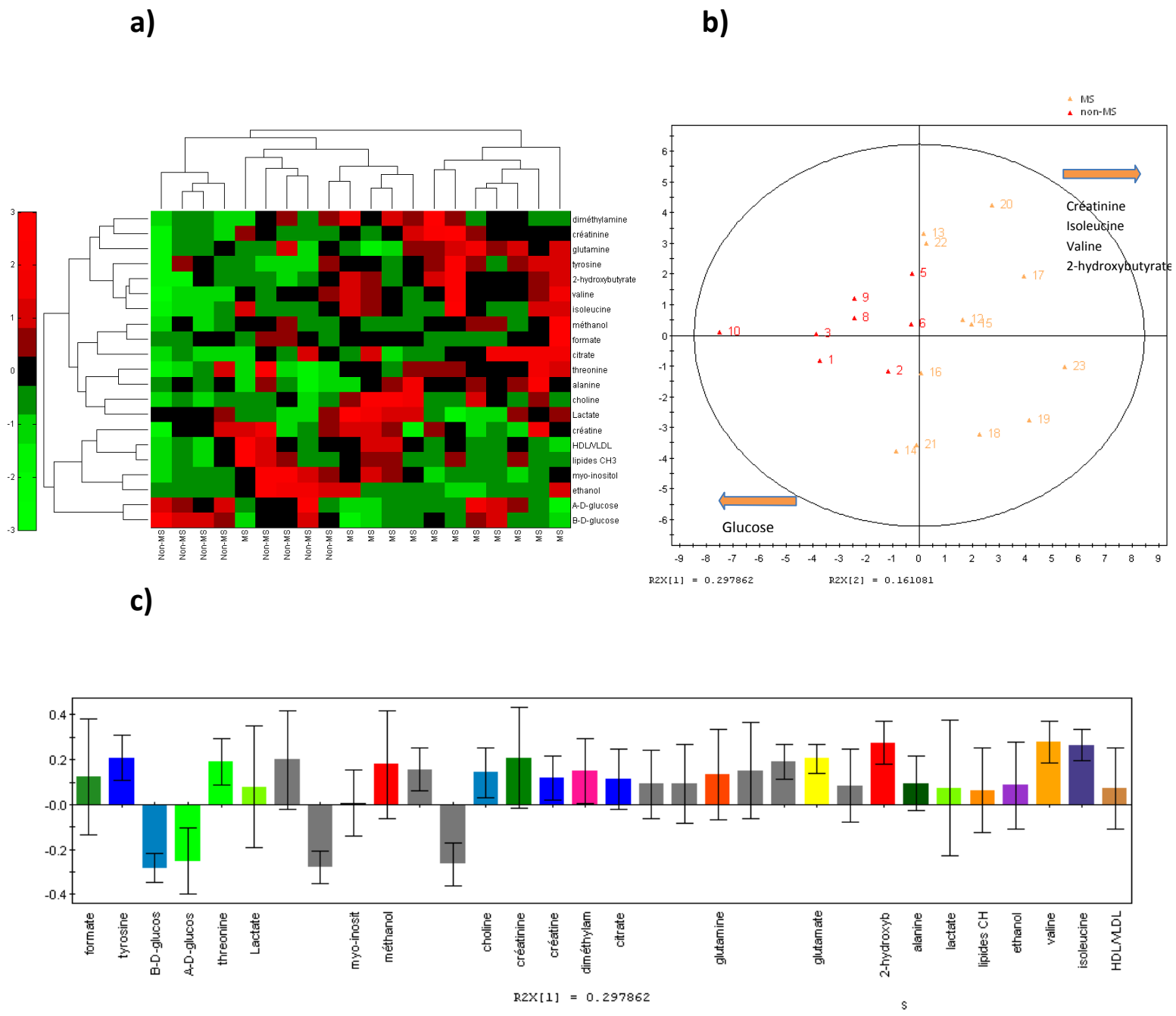
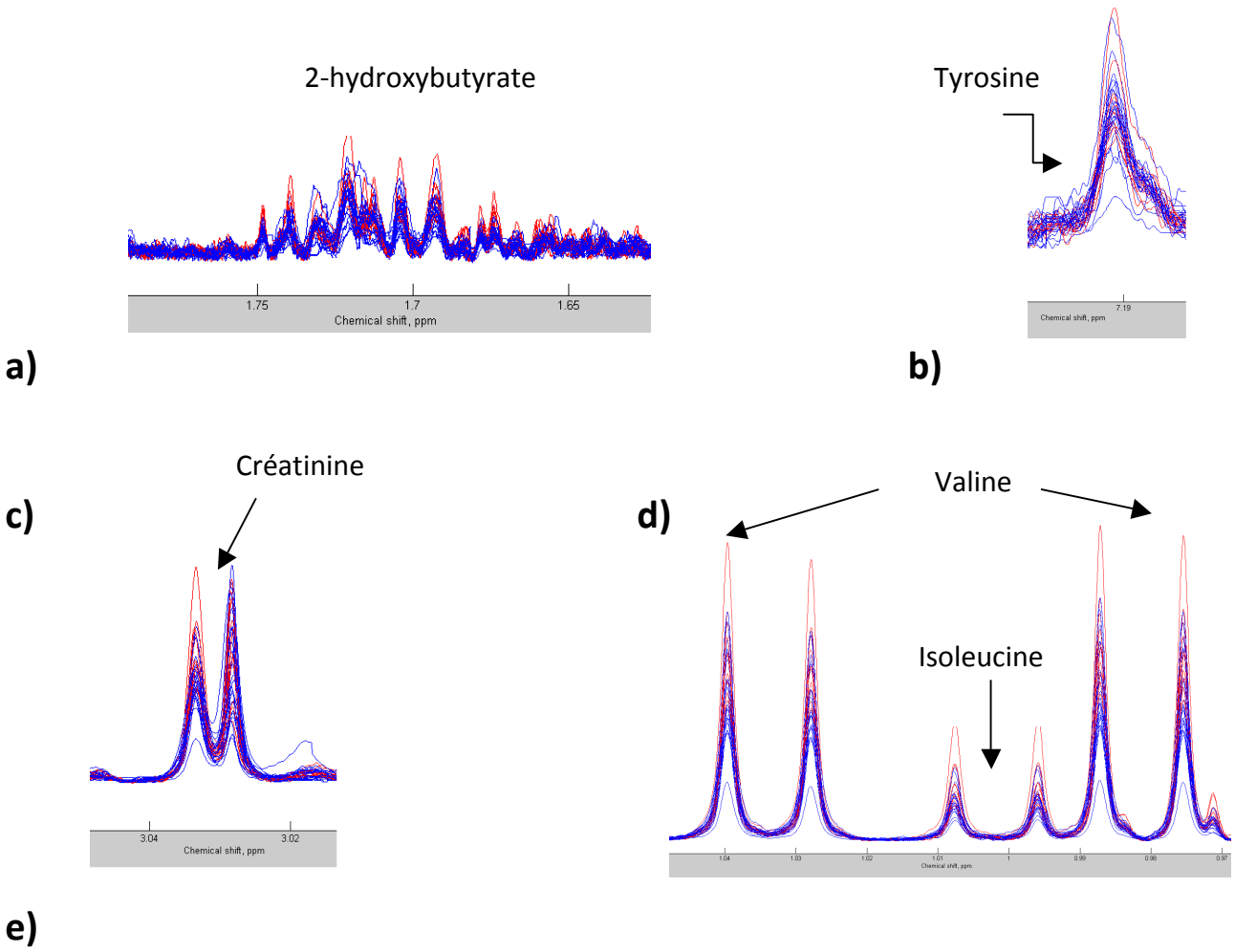


Figure 25: Résultats sur sérum par RMN 1H.
(a) Classification hiérarchique ascendante ou CHA. (b) Score-plot de l'analyse par ACP des données spectrales du sérum par RMN 1H. Echelle pareto. Deux groupes apparaissent distincts séparant les patients MS des patients non-MS. Le loadingcolumn plot (c) permet d'observer les métabolites qui influencent le plus le modèle. Les barres en gris représentent des métabolites non identifiés (HDL = High DensityLipoprotein et VLDL = VeryLowDensityLipoprotein).



Métabolites	p value	MS vs non-MS	Wilcoxon test	moyenne relative non-MS	moyenne relative MS	sd non-MS	sdms	Ratio
Isoleucine	**	↗	0.0014	0.0102	0.0162	0.001766	0.00198	1.59
Valine	**	↗	0.0011	0.0088	0.0122	0.001967	0.002123	1.39
2-hydroxybutyrate	**	↗	0.0024	0.0035	0.005	0.000859	0.00097	1.43
Créatinine	*	↗	0.0151	0.0024	0.0031	0.000444	0.000658	1.29
non identifié	*	↗	0.0334	0.0015	0.0018	0.000264	0.000365	1.2
Tyrosine	*	↗	0.0227	0.0008	0.0009	0.000126	0.000132	1.125
non identifié	**	↘	0.0078	0.0478	0.0406	0.00588	0.004152	0.85
non identifié	*	↘	0.0185	0.0644	0.0557	0.00875	0.005813	0.86
Glucose	*	↘	0.0122	0.0354	0.0297	0.004704	0.003276	0.84

Figure 26: Agrandissement des zones caractéristiques des métabolites discriminants du sérum.
*La figure représente l'agrandissement sur la zone caractéristique du (a) 2-hydroxybutyrate, (b) de la tyrosine, (c) de la créatinine et (d) de la valine et isoleucine. En rouge, on observe les spectres MS et en bleu les non-MS. (e) Tableau résumant les variations majeures des métabolites dans le modèle par ACP. Un test de Wilcoxon a été réalisé sur chacun de ces métabolites. *p<0,05, **p<0,01.*

La figure 26 représente la visualisation des spectres RMN des groupes MS et non-MS. On observe la confirmation des résultats de l'ACP pour le 2-hydroxybutyrate (a), la tyrosine (b), la créatinine (c), la valine et isoleucine (d). Les spectres rouges MS sont plus intenses que les spectres bleus non-MS. Du fait de la complexité des spectres au niveau de la zone des sucres, les résultats du glucose n'ont pas été montrés. Les résultats sur les métabolites inconnus n'ont pas été montrés.

L'analyse univariée (test de Wilcoxon non-paramétrique) a été réalisée sur l'ensemble des données (annexe 4). La créatinine, l'isoleucine, la valine, le 2-hydroxybutyrate, la tyrosine et le glucose (forme alpha et bêta-D) sont discriminants dans le modèle. 3 métabolites non identifiés sont également significativement différents entre les deux groupes. Les résultats non-paramétriques sont cohérents avec ceux de la figure 25(c) qui permet de montrer la contribution de chaque métabolite dans la discrimination du groupe MS et du groupe non-MS selon la composante R2X(1) du modèle multivarié par ACP.Isoleucine, valine, 2-hydroxybutyrate, tyrosine et un métabolite inconnu sont augmentés dans le groupe MS. Le glucose et 2 métabolites inconnus sont diminués.
D'autres métabolites ont un poids dans l'ACP et sont augmentés chez les MS comme le glutamate, la choline, la thréonine. Ils n'apparaissent pas discriminants dans l'analyse univariée.

PARTIE V

DISCUSSION

V.1 L'inclusion des patients de l'étude

La SEP est une pathologie auto-immune et évolutive du SNC, associée à une neuroinflammation chronique, et dont le diagnostic reste délicat à poser, en reposant principalement sur la clinique. Le LCR, en contact étroit avec le SNC, est utilisé pour révéler ces profils particuliers neuroinflammatoires afin de chercher des marqueurs spécifiques de la maladie. La première étape délicate de l'étude était d'inclure des patients atteints de SEP versus des patients « non-MS ». Le critère d'isoélectrofocalisation des IgG, qui signe la présence d'une synthèse intrathécale de protéines, n'est pas assez spécifique de la SEP. Il traduit la neuroinflammation, qu'elle soit centrale ou périphérique. Après vérification des dossiers et discussion avec le neurologue, il s'avère que ce critère ne permet pas d'être assez sélectif de notre pool de patients, qui présentent des profils cliniques différents, comme des pathologies inflammatoires diverses pouvant entraîner la présence de bandes oligoclonales supplémentaires à l'IEF sans être une SEP vraie. L'inclusion a été faite à partir des patients SEP définis par le neurologue et les autres échantillons de LCR et de sérum des patients présentant des situations cliniques ambigües comme les pathologies inflammatoires diverses n'ont pas été inclus. Cependant, il faut noter que la sclérose en plaques peut se présenter sous des formes cliniques différentes, comme une forme rémittente-récurrente (la plus fréquente), mais elle peut être également primaire progressive ou secondairement progressive. Nos moyens d'étude ne permettent pas de différencier ces formes dans notre groupe de patients, d'autant que ces critères sont souvent confirmés dans le temps, et donc ne nécessitent plus la pratique d'une ponction lombaire du LCR, plutôt réalisée en début de diagnostic, et en phase précoce. Ceci représente une limite importante à notre inclusion.

Une des solutions pour s'affranchir de ces problèmes d'inclusion aurait été de constituer un pool de patients « référence » non pas avec des échantillons destinés à l'isoélectrofocalisation des IgG (souvent demandée suite à un problème neurologique ou suspicion de maladie inflammatoire), mais plutôt avec des fonds de tubes de patients ayant subi une ponction lombaire pour une recherche bactériologique ou virologique qui s'avère négative.

V.2 La normalisation des données

La dernière étape de préprocessing qui consiste en la normalisation des données est classique en métabolomique par RMN. Elle permet de tenir compte de la fluctuation inter-individuelle des concentrations de métabolites dans les fluides biologiques due aux effets de dilution. Plusieurs études, notamment en lien avec les urines, montrent l'importance d'une telle normalisation[88]. Il existe de nombreuses méthodes de normalisation, comme l'utilisation du pic de la créatinine comme référence (pour les études sur l'urine). Nous avons normalisé les données du LCR avec une correction sur l'aire du TMSP, mais également en utilisant les ratios sur le pic de la créatinine. Malgré ces méthodes de normalisation, un effet de dilution interindividuel peut encore subsister, et il serait intéressant de tester des méthodes plus complexes de normalisation comme un *Probablistic Quotient Normalization*(PQN) pour le LCR[89] et de rechercher si le modèle mathématique est plus robuste

V.3 Les métabolites discriminants dans le LCR chez les patients SEP

Le modèle par ACP n'offre par une discrimination idéale des patients MS et non-MS, mais permet de dégager certaines tendances. L'observation des métabolites qui fluctuent entre les deux groupes laissent apparaître que le lactate, le pyruvate, la glutamine, la créatine et le glucose semblent avoir le plus de poids dans le modèle.

Le lactate est un métabolite résultant du métabolisme énergétique, et sa production dépend largement de la glycolyse. L'augmentation du pic du lactate est très souvent observée lorsque les cellules sont en hypoxie à cause des processus inflammatoires tissulaires ou d'une réduction du flux sanguin due aux oedèmes cérébraux par exemple. Ces résultats sont cohérents puisque la SEP entraîne un processus neuroinflammatoire majeur. De nombreuses études ont déjà rapporté le fait que le lactate était un métabolite d'intérêt en tant que marqueur de la SEP dans le LCR[90,91]. Une étude précédente utilisant la GC-MS (Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse) a montré l'augmentation du lactate chez les patients MS, à cause d'une augmentation de la glycolyse par dérèglement des processus énergétiques en lien avec un dysfonctionnement mitochondrial[92]. Ceci pourrait également appuyer les

résultats sur la tendance à la variation du glucose. Une autre étude *in vitro*de Nicoli et collaborateurs en 1996, a également démontré l'augmentation significative du pic du lactate chez les patients MS[53] et la Spectroscopie par Résonance magnétique *in vivo* utilise ce pic du lactate comme marqueur des processus inflammatoires des tissus.

La glutamine est un acide aminé qui joue un rôle majeur dans le métabolisme du cerveau. Elle est impliquée dans les processus énergétiques, dans la prolifération cellulaire, et peut-être consommée dans les états neuroinflammatoire par les cellules. Il résulterait une modification de sa concentration chez les patients MS par rapport aux patients non-MS. C'est ce que rapporte notamment l'étude de Smolinskaet collaborateurs en 2011, qui a travaillé sur des modèles animaux de la maladie[93].De plus, la glutamine est formée à partir du glutamate, lui-même issudu catabolisme des acides aminés. Les travaux de Frohmanet collaborateurs en 2006ont rapporté que les acides aminés et particulièrement la leucine pouvaient avoir un rôle dans la SEP en tant que régulateurs négatifs de la myélinisation des oligodendrocytes[94]. Il est possible que le métabolisme des acides aminés soit alors perturbé chez les patients atteints de SEP, et pourrait induire l'augmentation de glutamine observée chez nos patients MS.

La créatine est considérée comme un des principaux métabolites cérébraux. La variation de sa concentration semble être un marqueur de pathologies neurodégénératives[95], d'altérations gliales ou de démyélinisation. Des niveaux élevés de créatine ont déjà été rapportés dans des études précédentes[96, 97] chez des patients SEP, ce qui semble cohérents avec nos résultats.

Le glucose est un métabolite majeur qui entre dans les processus énergétiques. Cependant, il est sujet à une importante variabilité inter-individuelle dans sa concentration, ce qui induit un biais sur l'interprétation de la validité biologique du résultat.

V.4 Les métabolites biomarqueurs dans le sérum des patients SEP

L'analyse par ACP montre l'augmentation significative de 6 métabolites dans le groupe MS parmi lesquels la créatinine, l'isoleucine, la valine, le 2-hydroxybutyrate, la tyrosine et un métabolite inconnu, et la diminution du glucose et de deux métabolites inconnus chez les patients MS.

V.4.a Isoleucine, valine, tyrosine et 2-hydroxybutyrate et rôle de la barrière hématoencéphalique

L'isoleucine et la valine sont deux acides aminés branchés et le 2-hydroxybutyrate est un acide organique produit par le catabolisme des acides aminés (thréonine et méthionine). Les premiers résultats sur le LCR ont montré une tendance à la variation de la glutamine, impliquée dans le catabolisme des acides aminés. En situation physiologique normale, la barrière hémato-encéphalique forme une interface hémato-méningée qui empêche tout échange entre le sang et le liquide céphalo-rachidien par diffusion simple. Certains articles rapportent une altération de la barrière hématoencéphalique (BHE) chez les patients SEP[98], ce qui pourrait engendrer un passage de métabolites du LCR au sang. La rupture de la BHE se produit lors d'une poussée avec démyélinisation active. Glutamine, glutamate, isoleucine, valine et tyrosine sont des acides aminés appartenant à des voies communes. De plus, le pyruvate se trouve au carrefour de plusieurs voies métaboliques et, grâce à des transaminases,permet la synthèse d'acides aminés comme la valine et l'isoleucine.La variation de la concentration de la glutamine et du pyruvate dans le LCR peut expliquer l'augmentation de la concentration des petits acides aminés branchés retrouvée dans le sérum des patients MS, et pourrait traduire une phase de poussée de la SEP.

Le cluster (figure 25 (a)) montre que les individus d'un même groupe (MS ou non-MS) présentent des similitudes dans leur profil métabolomique, et des différences entre les deux groupes. L'isoleucine, la valine, la tyrosine,le 2-hydroxybutyrate et la glutamine sont des métabolites qui apparaissent comme liés, étant très proches sur la classification hiérarchique, ce qui semble cohérent avec nos résultats et leur implication dans des voies métaboliques communes. L'ensemble de ces résultats tend à souligner le potentiel de l'utilisation de la métabolomique dans la recherche de profils spectraux discriminants de la SEP, et dans la recherche de biomarqueurs d'intérêts.

V.4.b Glucose et créatinine

La glycémie est très variable d'un individu à l'autre, tout comme l'état de la fonction rénale. L'apparition de la créatinine et du glucose comme métabolite discriminant est alors à modérer. Nous n'avons pas d'information sur l'heure de prélèvement des échantillons de séra

des patients, ni même sur l'état de leur fonction rénale, ce qui peut induire d'importants biais quant à ces résultats.

Enfin, il serait intéressant d'approfondir l'identification structurale des 3 métabolites inconnus afin d'avoir encore plus d'informations sur des potentiels biomarqueurs de la SEP.

PARTIE VI

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude montre l'intérêt de l'utilisation de la métabolomique par RMN du proton comme possible voie vers la découverte de biomarqueurs de pathologies. La variation de certains métabolites caractéristiques d'états physiopathologiques est telle que, sous condition d'un échantillonnage suffisant, il est possible de trouver des profils spectraux spécifiques. Cependant, afin d'améliorer le modèle, il est indispensable d'affiner dès le départ l'inclusion des patients. La SEP étant une maladie très difficile à appréhender cliniquement (nombreux diagnostics différentiels et difficulté du diagnostic positif), les lésions physiopathologiques peuvent induire de grosses variations de métabolites, même lorsque les signes cliniques sont très proches. Le manque d'homogénéité du groupe témoin a sans doute été la raison principale pour laquelle l'investigation sur le LCR n'a pas donné de résultats significatifs.

Bien que notre étude n'ait pas permis de discriminer avec certitude des métabolites dans le LCR des patients SEP, elle a tout de même permis de mettre en évidence l'importance des petits acides aminés branchés (BCAA) dans le sérum comme possible reflet de l'effet de la démyélinisation et de l'altération de la barrière hématoencéphalique dans la SEP. De plus, l'utilisation des données couplées sur LCR et sérum reste une approche innovante et peu décrite dans la littérature pour la SEP.

Aujourd'hui, l'exploration *in vivo*grâce à la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire peut ouvrir la voie à des investigations encore plus poussées. Cette technique, qui se démocratise grâce à l'implantation quasi-systématique de séquences spécifiques d'acquisition sur les imageurs IRM, est non-invasive et apporte des informations complémentaires de l'imagerie, lors du diagnostic ou du suivi des SEP. La comparaison des deux techniques *in vivo* et *in vitro* pourrait apporter de nouvelles perspectives de suivi des traitements et pathologies des patients, voire même devenir une alternative à la ponction lombaire, nécessaire à l'analyse biochimique du LCR.

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

[1]Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature*. 2008;455(7216):1054-1056.

[2]Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers?.*Current opinion in HIV and AIDS*. 2010; 5(6): 463-66.

[3] Van Gool AJ, Henry B, Sprengers ED. From biomarker strategies to biomarker activities and back. *Drug DiscoveryToday*.2010; 15(3-4):121-6.

[4]Van der Vaart M, Pretorius PJ. Is the Role of Circulating DNA as a Biomarker of Cancer Being Prematurely Overrated?*Clinical Biochemistry*. 2010; 43(1-2): 26-36.

[5]Bove R,Chitnis T. Sexual Disparities in the Incidence and Course of MS. *Clinical Immunology*. 2013; 149(2): 201-10.

[6]Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD. Incidence and Prevalence of Multiple Sclerosis in Europe: A Systematic Review. *BMC Neurology*. 2013;13: 128.

[7]Kroksveen AC, Opsahl JA, Guldbrandsen A, Kjell-Morten Myhr, Oveland E, TorkildsenØ, Berven FS. Cerebrospinal Fluid Proteomics in Multiple Sclerosis.*BiochimicaEtBiophysicaActa*, 2014, *in press.*

[8]Milo Ron, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity Reviews*, Special Issue on The Environment Geoepidemiology and Autoimmune Diseases, 2010 ; 9(5): A387-94.

[9]Naegele M, Martin R. The Good and the Bad of Neuroinflammation in Multiple Sclerosis. *Handbook of ClinicalNeurology*. 2014 ;122: 59-87.

[10]Magy L. La sclérose en plaques. *Actualités Pharmaceutiques Hospitalières*. 2009 ;5(19): 14-19.

[11]Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet* 372. 2008 ;(9648): 1502-17.

[12]Pettinelli CB,McFarlin DE. Adoptive Transfer of Experimental Allergic Encephalomyelitis in SJL/J Mice after in Vitro Activation of Lymph Node Cells by Myelin Basic Protein: Requirement for Lyt 1+ 2- T Lymphocytes. *Journal of Immunology*. 1981;127(4): 1420-23.

[13]Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlén C, Goverman J. A Pathogenic Role for Myelin-Specific CD8(+) T Cells in a Model for Multiple Sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine.*2001; 194(5): 669-76.

[14]O'connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The Neuroimmunology of Multiple Sclerosis: Possible Roles of T and B Lymphocytes in Immunopathogenesis. *Journal of ClinicalImmunology*. 2001;21(2): 81-92.

[15]Hafler DA. Multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(6): 788-94.

[16]Balcer LJ. Clinical Practice. Optic Neuritis. *The New England Journal of Medicine*. 2006;354(12): 1273-80.

[17]Pearce JM. Lhermitte's sign.*Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2004; 57(7):846.

[18]Selhorst JB, Saul RF. Uhthoff and His Symptom. *Journal of Neuro-Ophthalmology: The Official Journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society.*1995 ;15(2): 63-69.

[19]Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, Diagnostic criteria in Autoimmune diseases 9th International Congress on Autoimmunity. 2014;13(4-5): 518-24.

[20]Ouallet JC, Brochet B. Aspects cliniques, physiopathologiques, et thérapeutiques de la sclérose en plaques. *EMC - Neurologie*. 2004;1(4): 415-57.

[21]Gout O, Bensa C, Assouad R. Actualités thérapeutiques de la sclérose en plaques. *La Revue de Médecine Interne*. 2010; 31(8): 575-80.

[22]Kurtzke JF. Rating Neurologic Impairment in Multiple Sclerosis An Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* . 1983;33(11): 1444-1444.

[23]Pooley RA. AAPM/RSNA physics tutorial for residents: fundamental physics of MR imaging. *Radiographics*. 2005;25(4):1087-1099.

[24]Le Bas JF, Esteve F, Grand S, Rubin C, Remy C, Benabid AL. Spectroscopie RMN et pathologie cérébrale: Applications cliniques. *Journal of neuroradiology*. 1998; 25(1):55-69.

[25]Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E, Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data.*Xenobiotica*. 1999 **:**29(11) :1181-1189.

[26]Davies H. A role for "omics" technologies in food safety assessment.*Food Control*, SAFE FOODS - Towards a new risk analysis framework for food safety. 2010;21(12): 1601-1610.

[27]Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics*. 2007;8(9):1243-1266.

[28]Dunn WB, Goodacre R, Neyses L, Mamas M. Integration of metabolomics in heart disease and diabetes research: current achievements and future outlook. *Bioanalysis*. 2011;3(19):2205-2222.

[29]Blanchet L, Buydens LMC, Wijmenga SS. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *AnalyticaChimicaActa*. 2012;750:82-97.

[30]Meissner A, Van der Plas AA, Van Dasselaar NT, Deelder AM, van Hilten JJ, Mayboroda OA. 1H-NMR metabolic profiling of cerebrospinal fluid in patients with complex regional pain syndrome–related dystonia.*Pain*. 2014;155(1):190-196.

[31]Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nuclear Acids Research*. 2007; 35(1):D521-D526.

[32]Sinclair AJ, Viant MR, Ball AK, Burdon MA, Walker EA, Stewart PM. NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases – a diagnostic tool? *NMR in Biomedicine*. 2010;23(2):123-32.

[33]Schripsema J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochemical Analysis*. 2010;21(1):14–21.

[34]Lenz EM, Wilson ID.Analytical Strategies in Metabonomics.*Journal of Proteome Research*. 2007;6(2):443-458.

[35]Dumas M-E, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, et al. Assessment of Analytical Reproducibility of 1H NMR Spectroscopy Based Metabonomics for Large-Scale Epidemiological Research: the INTERMAP Study. *Analytical Chemistry*. 2006; 78(7):2199–208.

[36]Verpoorte R, Choi YH, Mustafa NR, Kim HK. Metabolomics: back to basics. *Phytochemistry Reviews*. 2008;7(3):525-537.

[37]Reynolds WF, Enríquez RG. Choosing the best pulse sequences, acquisition parameters, postacquisition processing strategies, and probes for natural product structure elucidation by NMR spectroscopy. *Journal of Natural Products*. 2002;65(2):221-244.

[38]Nicholson JK, O'Flynn MP, Sadler PJ, Macleod AF, Juul SM, Sönksen PH. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochemical Journal*. 1984;217(2):365–75.

[39]Blasco H, Corcia P, Moreau C, Veau S, Fournier C, Vourc'h P, et al. 1H-NMR-Based Metabolomic Profiling of CSF in Early Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*. 2010.

[40]Holmes E, Tsang TM. Tabrizi SJ et al. The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders.*NeuroRx.* 2006; 3(3):358-72.

[41]Ringeissen S, Connor SC, Thakkar H, Sweatman BC, Hodson MP, Hutton KA, Kenny SP, McGill P, Nunez DJ, Haselden JN, Waterfield CJ. Identification of potential non-invasive biomarkers of peroxisome proliferation in the rat. *Toxicology*.2004;194(3):246-247.

[42]Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE.Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20(11–12):557–66.

[43] Ikeda T, Kanaya S, Yonetani T, Kobayashi A, Fukusaki E. Prediction of Japanese Green Tea Ranking by Fourier Transform Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2007;55(24):9908–12.

[44]Lutz NW, Maillet S, Nicoli F, Viout P, Cozzone PJ. Further assignment of resonances in 1H NMR spectra of cerebrospinal fluid (CSF).*FEBS Letters*. 1998;425(2):345–51.

[45]Amantonico A, Urban PL, Zenobi R. Analytical Techniques for Single-Cell Metabolomics: State of the Art and Trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;398(6): 2493-2504.

[46]Zhang A, Sun H, et Wang X. Serum Metabolomics as a Novel Diagnostic Approach for Disease: A Systematic Review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012; 404(4): 1239-45.

[47]Hassan-Smith G, Wallace GR, Douglas MR, Sinclair AJ. The role of metabolomics in neurological disease .*Journal of Neuroimmunology, Special Issue on New technologies for biomarker discovery in multiple sclerosis*. 2012;248(1-2): 48-52.

[48]Jové M, Portero-Otín M, Naudí A, Ferrer I, Pamplona R. Metabolomics of Human Brain Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2014; 73(7): 640-57.

[49]Beretta L. Comparative Analysis of the Liver and Plasma Proteomes as a Novel and Powerful Strategy for Hepatocellular Carcinoma Biomarker Discovery.*Cancer Letters*. 2009; 286(1): 134-39.

[50]Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. MetaboliteProfiling: From Diagnostics to SystemsBiology. *Nature Reviews. MolecularCellBiology*. 2004;5(9): 763-69.

[51]Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in Metabolomics--a Review in HumanDiseaseDiagnosis. *AnalyticaChimica Acta*. 2010;659(1-2): 23-33.

[52]Dunckley T, Coon KD, Stephan DA. Discovery and development of biomarkers of neurologicaldisease. *Drug Discovery Today*.2005;10(5): 326-34.

[53]Nicoli F, Vion-Dury J, Confort-Gouny S, Maillet S, Gastaut JL, Cozzone PJ. Cerebrospinal fluid metabolic profiles in multiple sclerosis and degenerative dementias obtained by high resolution proton magnetic resonance spectroscopy. *CompteRendu de l'Académie des Sciences*. 1996; 319(7):623-631.

[54]Dickens AM, Larkin JR, Griffin JL, Cavey A, Matthews L, Turner MR, Wilcock GK, et al. A Type 2 BiomarkerSeparatesRelapsing-RemittingfromSecondaryProgressive Multiple Sclerosis. *Neurology*.2014;83(17): 1492-99.

[55]Reinke SN, Broadhurst DL, Sykes BD, Baker GB, Catz I, Warren KG, Power C. MetabolomicProfiling in Multiple Sclerosis: Insights intoBiomarkers and Pathogenesis. *Multiple Sclerosis*. 2014; 20(10): 1396-1400.

[56]Noga MJ, Dane A, Shi S, Attali A, Van Aken H, Suidgeest E, Tuinstra T, et al. Metabolomics of cerebrospinal fluid reveals changes in the central nervous system metabolism in a rat model of multiple sclerosis. *Metabolomics*. 2012;8(2): 253-63.

[57]Griffin JL, Nicholls AW. Metabolomics as a FunctionalGenomicTool for UnderstandingLipidDysfunction in Diabetes, Obesity and RelatedDisorders.*Pharmacogenomics*.2006; 7(7): 1095-1107.

[58]Sébédio JL, Pujos-Guillot E, Ferrara M. Metabolomics in Evaluation of Glucose Disorders. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2009;12(4): 412-18.

[59]Samuel JL, Schaub MC, Zaugg M, Mamas M, Dunn WB, Swynghedauw B. Genomics in CardiacMetabolism. *CardiovascularResearch*. 2008;79(2): 218-27.

[60]Feala JD. Coquin L, Paternostro G, et McCulloch AD. IntegratingMetabolomics and PhenomicswithSystemsModels of CardiacHypoxia. *Progress in Biophysics and MolecularBiology*. 2008;96(1-3): 209-25.

[61]Lewis GD, Asnani A, Gerszten RE. Application of Metabolomics to CardiovascularBiomarker and PathwayDiscovery. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(2): 117-23.

[62]Claudino WM, Quattrone A,Biganzoli L, Pestrin M, Bertini I, Di Leo A. Metabolomics: AvailableResults, CurrentResearchProjects in Breast Cancer, and Future Applications. *Journal of ClinicalOncology: Official Journal of the American Society of ClinicalOncology*. 2007;25(19): 2840-46.

[63]Griffin JL, Kauppinen RA. A Metabolomics Perspective of HumanBrainTumours. *The FEBS Journal*.2007;274(5): 1132-39.

[64]Jain KK. Cancer Biomarkers: Current Issues and Future Directions. *Current Opinion in MolecularTherapeutics*. 2007;9(6): 563-71.

[65]Lauridsen MB, Bliddal H, Christensen R, Danneskiold-Samsøe B, Bennett R, Keun H, Lindon JC, et al. 1H NMR Spectroscopy-Based Interventional Metabolic Phenotyping: A Cohort Study of Rheumatoid Arthritis Patients.*Journal of Proteome Research*. 2010;9(9): 4545-53.

[66]Madsen RK, Lundstedt T, Gabrielsson J, Sennbro CJ, Alenius GM, Moritz T, Rantapää-Dahlqvist S, Trygg J. Diagnostic Properties of Metabolic Perturbations in RheumatoidArthritis. *ArthritisResearch&Therapy*. 2011;13(1): R19.

[67]Bertini I, Calabrò A, De Carli V, Luchinat C, Nepi S, Porfirio B, Renzi D, Saccenti E, Tenori L. The Metabonomic Signature of CeliacDisease. *Journal of ProteomeResearch*. 2009;8(1): 170-77.

[68]Lutz NW, Cozzone PJ. Metabolic profiling in multiple sclerosis and other disorders by quantitative analysis of cerebrospinal fluid using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2011;12(7):1016-1025.

[69]Fliniaux O, Gaillard G, Lion A, Cailleu D, Mesnard F, Betsou F. Influence of common preanalytical variations on the metabolic profile of serum samples in biobanks. *Journal of Biomolecular NMR*.2011;51(4):457-465.

[70]Avettand-Fenoel V, Celton N, Coulhon MP, Duchassaing D. Étude immunologique des protéines du liquide céphalorachidien dans le contexte de sclérose en plaques : comparaison de techniques qualitatives et quantitatives. *Immuno-analyse &BiologieSpécialisée*. 2002;17(4):242-250.

[71]Wuolikainen A, Hedenström M, Moritz T, Marklund SL, Antti H, Andersen PM. Optimization of procedures for collecting and storing of CSF for studying the metabolome in ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009;10(4):229-236.

[72]Goldsmith P, Prasad KR, Ahmad N, Fisher J. 1H NMR spectroscopic study of blood serum for the assessment of liver function in liver transplant patients. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2009;18(4):508-509.
[73]Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*. 2010;5(3):536-549.
[74]Meiboom S, Gill D. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments*. 1958;29(8):688-691.
[75]Mckay RT. How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts in Magnetic Resonance*. 2011;38A(5):197-220.
[76]Ludwig C, Viant MR. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. *Phytochemical Analysis*. 2010;21(1):22-32.
[77]McKenzie JS, Donarski JA, Wilson JC, Charlton AJ. Analysis of complex mixtures using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics.*Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2011;59(4):336-359.
[78]Ebbels TMD, Lindon JC, Coen M. Processing and modeling of nuclear magnetic resonance (NMR) metabolic profiles. *Methods in Molecular Biology*.2011;708:365-388.
[79]Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK, Lindon JC. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Analytical Chemistry*. 2006;78(7):2262-2267.
[80]De Meyer T, Sinnaeve D, Van Gasse B, Rietzschel E-R, De Buyzere ML, Langlois MR. Evaluation of standard and advanced preprocessing methods for the univariate analysis of blood serum 1H-NMR spectra.*Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;398(4):1781-1790.
[81]Savorani F, Tomasi G, Engelsen SB. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *Journal of Magnetic Resonance*. 2010;202(2):190-202.
[82]Defernez M, Colquhoun IJ. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using 1H NMR spectra.*Phytochemistry*. 2003;62(6):1009-1017.
[83]Izquierdo-García JL, Villa P, Kyriazis A, del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Rodriguez I. Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages.*Progress in Nuclear Magnetic ResonanceSpectroscopy*. 2011;59(3):263-270.
[84]Beckwith-Hall BM, Nicholson JK, Nicholls AW, Foxall PJ, Lindon JC, Connor SC. Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal components analysis investigations into biochemical effects of three model hepatotoxins. *Chemical Research in Toxicology*. 1998;11(4):260-272.
[85]Wishart DS, Lewis MJ, Morrissey JA, Flegel MD, Jeroncic K, Xiong Y.The human cerebrospinal fluid metabolome.*Journal of Chromatography B*. 2008;871(2):164-173.
[86]Mandal R, Guo AC, Chaudhary KK, Liu P, Yallou FS, Dong E. Multi-platform characterization of the human cerebrospinal fluid metabolome: a comprehensive and quantitative update. *Genome Medicine*. 2012;4(4):38.
[87]Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the « McDonald Criteria ». *Annals of Neurology*. 2005;58(6):840-846.
[88]Nicholson JK, Wilson ID.High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 1989;21(4-5):449-501.
[89]Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account

for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics.*Analytical Chemistry*. 2006;78(13):4281-4290.

[90]Simone IL, Federico F, Trojano M, Tortorella C, Liguori M, Giannini P. High Resolution Proton Mr Spectroscopy of Cerebrospinal Fluid in Ms Patients. Comparison with Biochemical Changes in Demyelinating Plaques.*Journal of the Neurological Sciences*. 1996;144(1):182-90.

[91]Simone IL, Tortorella C, Federico F, Liguori M, Lucivero V, Giannini P, et al. Axonal damage in multiple sclerosis plaques: a combined magnetic resonance imaging and 1H-magnetic resonance spectroscopy study. *Journal of the Neurological Sciences*. 2001;182(2):143-150.

[92]Regenold WT, Phatak P, Makley MJ, Stone RD, Kling MA. Cerebrospinal fluid evidence of increased extra-mitochondrial glucose metabolism implicates mitochondrial dysfunction in multiple sclerosis disease progression. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008;275(1-2):106-112.

[93]Smolinska A, Attali A, Blanchet L, Ampt K, Tuinstra T, van Aken H, et al. NMR and pattern recognition can distinguish neuroinflammation and peripheral inflammation. *Journal of Proteome Research*. 2011;10(10):4428-4438.

[94]Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(9):942-955.

[95]Hattingen E, Magerkurth J, Pilatus U, Hübers A, Wahl M, Ziemann U. Combined (1)H and (31)P spectroscopy provides new insights into the pathobiochemistry of brain damage in multiple sclerosis. *NMR in Biomedicine*. 2011;24(5):536-546.

[96]Qian J, Herrera JJ, Narayana PA. Neuronal and axonal degeneration in experimental spinal cord injury: in vivo proton magnetic resonance spectroscopy and histology. *Journal of Neurotrauma*. 2010;27(3):599-610.

[97]Sarchielli P, Presciutti O, Tarducci R, Gobbi G, Alberti A, Pelliccioli GP, et al. Localized (1)H magnetic resonance spectroscopy in mainly cortical gray matter of patients with multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 2002;249(7):902-910.

[98]Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis.*Multiple Sclerosis*. 2003;9(6):540-549.

ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques des patients

Numéro	Sexe	âge	Delpech	Bandes surnuméraires	Situation clinique	ISO+/ISO -	MS/non-MS
1	F	59	0.51	0	Paralysie du VI gauche	ISO -	non-MS
2	F	26	0.58	0	Troubles sensitifs hémicorps gauche	ISO -	non-MS
3	F	69	0.56	0	Encéphalite	ISO -	non-MS
4	H	78	0.57	0	polyneuropathie	ISO -	non-MS
5	F	47	0.5	0	hypersignaux sur IRM	ISO -	non-inclus
6	F	78	0.55	0	Myélite	ISO -	non-MS
7	F	30	0.63	0	Vertiges et troubles de la marche	ISO -	non-MS
8	H	57	0.53	0	Diplopie binoculaire avec paralysie du III	ISO -	non-MS
9	F	24	0.58	0	NORB	ISO -	non-MS
10	F	34	0.45	0	Etiologie inconnue	ISO -	non-MS
11	F	29	0.52	0	Etiologie inconnue	ISO -	non-MS
12	F	30	0.5	0	SEP cliniquement définie	ISO -	MS
13	F	44	2.01	7	SEP cliniquement définie	ISO +	MS
14	F	21	0.79	5	SEP cliniquement définie	ISO +	MS
15	F	25	0.98	8	Suspicion de SEP	ISO +	MS
16	F	34	0.93	5	Suspicion de SEP	ISO +	MS
17	F	55	0.8	8	Suspicion de SEP	ISO +	MS
18	F	19	0.7	8	SEP cliniquement définie	ISO +	MS
19	F	50	0.67	4	Suspicion de SEP	ISO +	MS
20	F	50	0.73	3	SEP cliniquement définie forme primaire progressive	ISO +	MS
21	H	31	0.87	4	SEP cliniquement définie	ISO +	MS
22	F	33	0.93	13	SEP cliniquement définie	ISO +	MS
23	F	15	0.99	9	SEP cliniquement définie	ISO +	MS

Annexe 2 : Identification du métabolome du sérum humain et assignation des pics principaux (comparaison au TMSP référencé à 0,00 ppm)

Numéro	Métabolite	Shift (ppm)	Multiplicité	J (Hz)
1	Lipide CH3	0.90-1.00	b	
2	Leucine	0.96	t	6.05
		1.71	m	
		3.74	m	
3	Isoleucine	0.93	t	7.6
4	Valine	0.99	d	6.9
		1.04	d	6.9
		3.67	d	4
5	éthanol	1.18	t	7.1
		3.66	q	
6	Lactate	1.32	d	6.8
		4.11	q	
7	Alanine	1.49	d	
8	2-hydroxybutyrate	1.65	m	
		1.73	m	
9	Acétate	1.92	s	
		3.81		
10	Glycérol	2.03	s	
11	Glutamine	2.13	m	
		2.45	m	
12	Acétone	2.24	s	
13	Glutamate	2.34	m	
14	Créatine	3.03	s	
15	Créatinine	3.05	s	
16	Glucose	3.24	dd	9.3
17	Bétaine	3.26	s	
		3.93	s	
18	Scyllo-inositol	3.35	s	
19	Histidine	3.92	s	
20	Thréonine	3.58	d	4.9
21	Tyrosine	6.89	m	
		7.19	m	
22	Phénylalanine	7.33	d	
		7.38	m	
		7.41	m	

Annexe 3 : Identification du métabolome du LCR humain et assignation des pics (comparaison au TMSP référencé à 0,00 ppm)

Numéro	Métabolite	Shift (ppm)	Multiplicité	J (Hz)
1	Lipide CH3	0.90-1.00		
2	2-hydroxyisovalérate	0.84	d	6.63
		0.98	d	6.25
		2.02	m	
		3.85	d	
3	Isoleucine	0.93	t	7.6
		1.03	d	6.9
		3.67	d	4
4	2-hydroxybutyrate	0.9	t	7.42
		1.66	m	
		1.74	m	
		3.99	dd	
5	Leucine	0.96	t	6.05
		1.71	m	
		3.74	m	
6	3-hydroxyisovalérate	1.27	s	
7	Lactate	1.33	d	6.94
		4.12	q	6.92
8	Alanine	1.49	d	7.24
		3.78	q	
9	Acétate	1.92	s	
10	Glutamine	2.13	m	
		2.45	m	
		3.47	t	6.36
11	Acétone	2.24	s	
12	Acéto-acétate	2.29	s	
		3.45	s	
13	Pyruvate	2.38	S	
14	Citrate	2.55	d	15.7
		2.66	d	9.77, 3.70
15	Diméthylamine	2.72	s	
16	Créatine	3.04	s	
		3.93	s	
17	Créatinine	3.05	s	
		4.06	s	
18	L-phénylalanine	3.13	m	
		4	m	
		7.43	t	
19	Choline	3.2	s	

		3.5	dd	
		4.05	dd	
20	D-Glucose	3.25	dd	9.33, 8.01
		3.53	dd	9.82, 3.77
21	Myo-inositol	3.29	t	
		3.56	dd	
		3.53	t	
		4.07	t	
22	Méthanol	3.36	s	
	β-glucose	4.65	d	
	α-glucose	5.24	d	3.75
23	Formate	8.46	s	

Annexe 4 : Test non paramétrique sur les données métabolomiques du sérum

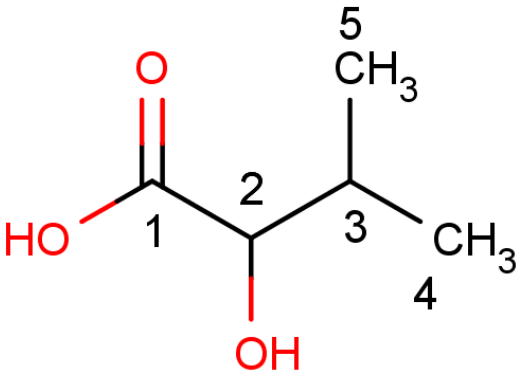
	fin ppm	début ppm	Test Wilcoxon	moyenne non-MS	moyenne MS	p
Formate	8.4511	8.4426	0.6485	0.0004	0.0004	
Tyrosine	7.1967	7.1829	0.0227	0.0008	0.0009	*
B-D-glucose	5.2362	5.2094	0.0122	0.0354	0.0297	*
A-D-glucose	4.6522	4.621	0.0276	0.0174	0.0153	*
Thréonine	4.2628	4.231	0.1286	0.0023	0.0027	
Lactate	4.13	4.0784	1	0.0135	0.0143	
non identifié	4.05	4.041	0.0334	0.0015	0.0018	*
non identifié	3.915	3.8582	0.0078	0.0478	0.0406	**
non identifié	3.8578	3.8001	0.0185	0.0644	0.0557	*
Myo-inositol	3.675	3.6217	0.2545	0.0141	0.0115	
Scyllo-inositol	3.3609	3.3429	0.0575	0.0083	0.0102	
Bétaine	3.264	3.2542	0.1286	0.0042	0.0058	
non identifié	3.2542	3.2077	0.0151	0.0603	0.0531	*
choline	3.198	3.1879	0.1715	0.0019	0.0025	
créatinine	3.0397	3.031	0.0151	0.0024	0.0031	*
Créatine	3.031	3.025	0.4033	0.0023	0.0027	
Diméthylamine	2.7196	2.7133	0.7612	0.0002	0.0002	
Citrate	2.708	2.704	0.0946	0.0002	0.0004	
Glutamine	2.4697	2.4212	0.1489	0.0115	0.0129	
Glutamate	2.1541	2.1002	0.1286	0.0158	0.0185	
2-hydroxybutyrate	1.7523	1.6862	0.0024	0.0035	0.005	**
Alanine	1.4842	1.4532	0.5949	0.0227	0.0241	
Lactate	1.3395	1.3049	0.7612	0.0459	0.047	
lipides CH3	1.3	1.2599	0.1965	0.0119	0.0169	
éthanol	1.2008	1.19	0.0482	0.0005	0.0007	*
valine	1.0473	1.0193	0.0011	0.0088	0.0122	**
valine	1.016	1.0012	0.0078	0.0013	0.002	**
isoleucine	0.99	0.973	0.0014	0.0081	0.0113	**
isoleucine	0.9649	0.9399	0.0014	0.0102	0.0162	**
HDL/VLDL	0.9074	0.8493	0.4474	0.0291	0.0398	

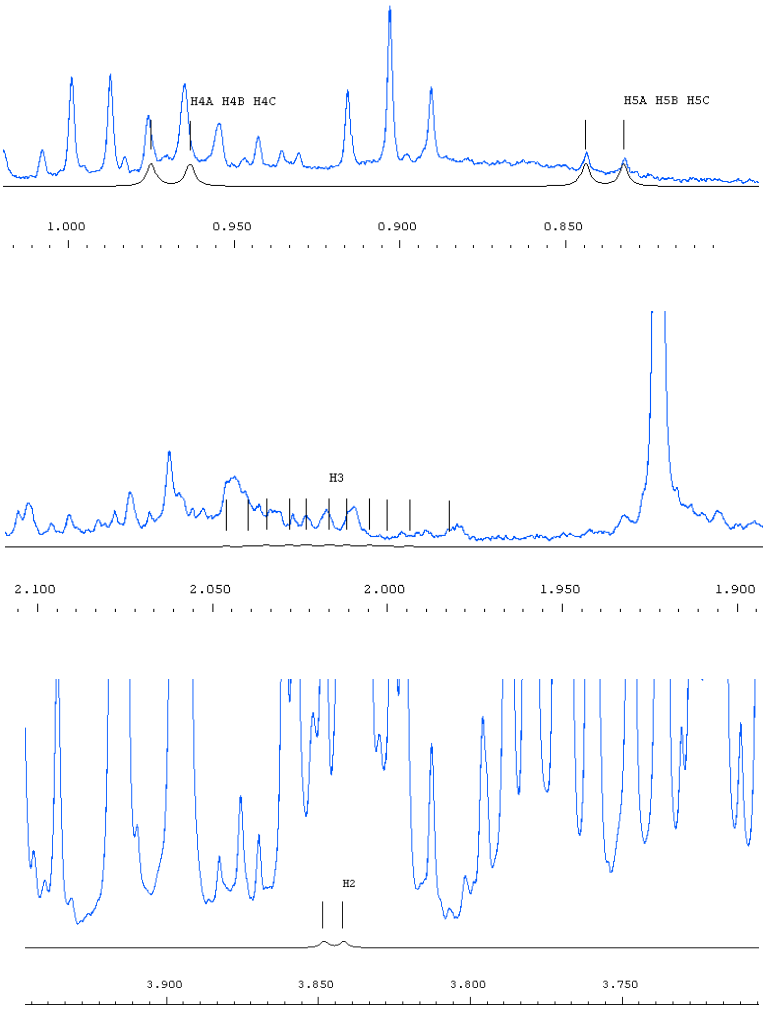
Annexe 5 : Fiches d'identification des métabolites présents dans le LCR

Ces informations ont été réalisées à partir des comparaisons de nos prélèvements et des bases de données internationales. Pour chaque molécule, il est rapporté sa représentation topologique, les pics significatifs de résonance issus de nos mesures (en bleu), comparés aux pics caractéristiques retrouvés dans les bases de données (en noir), un tableau récapitulatif des shifts, constantes de couplage et les associations aux hydrogènes correspondants, et enfin quelques caractéristiques générales référencées concernant le métabolite. Ces fiches d'identification ont été réalisées pour les métabolites suivants (l'ordre correspond à l'ordre d'apparition sur le spectre de 0 à 10 ppm) :

2-hydroxyisovalérate
2-hydroxybutyrate
L-Leucine
3-hydroxyisovalérate
Lactate
Alanine
Acétate
Glutamine
Acétone
Acéto-acétate
Pyruvate
Citrate
Diméthylamine
Créatine
Créatinine
L-phénylalanine
Choline
D-glucose
Myo-inositol
Méthanol
Formate

2-hydroxyisovalérate





shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's
0.84	d	6.63	5	H5A, H5B, H5C
0.98	d	6.25	4	H4A, H4B, H4B
2.02	m	-	3	H3
3.85	d	ND	2	H2

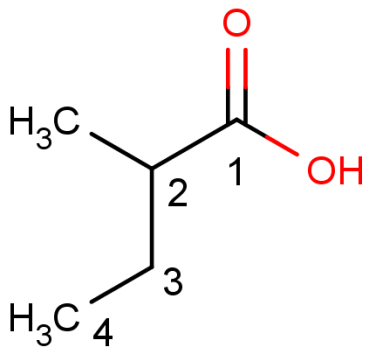
Caractéristiques

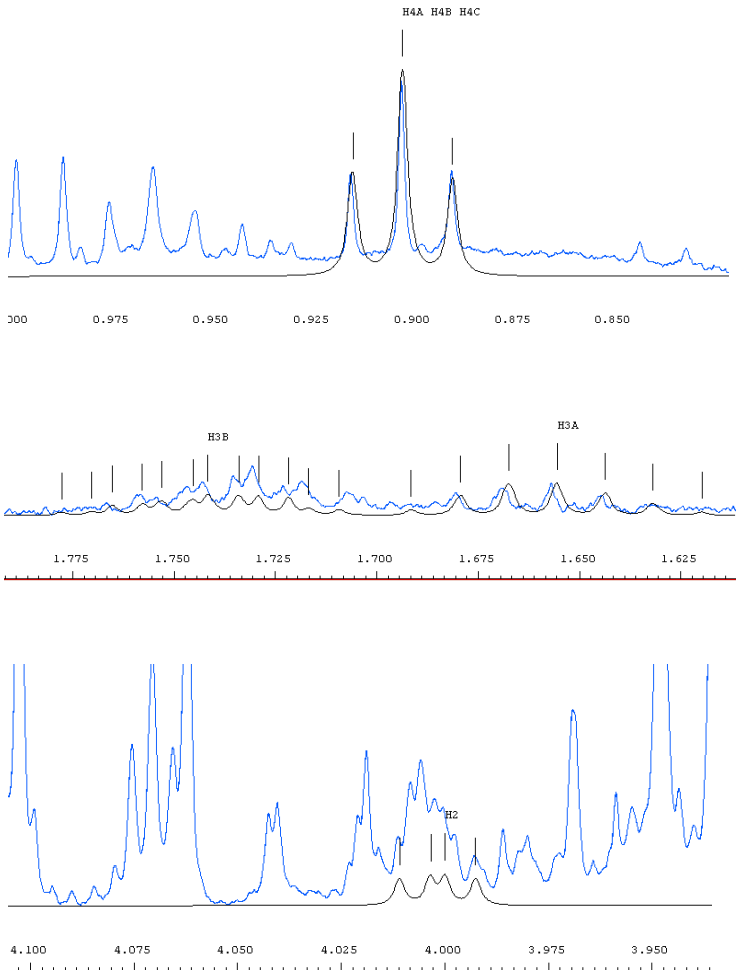
L'acide 2-hydroxyisovalérique, connu aussi sous le nom d'acide 2-hydroxy-3-méthylbutyrique, est un métabolite qui provient généralement de la cétogenèse et du métabolisme de la valine, de la leucine ou de l'isoleucine[1]. On le retrouve dans les urines des patients présentant une cétoacidose ou une acidose lactique[2].

[1]Liebich HM, Först C. Hydroxycarboxylic and Oxocarboxylic Acids in Urine: Products from Branched-Chain Amino Acid Degradation and from Ketogenesis. *Journal of Chromatography*. 1984; 309(2): 225-242.

[2]Landaas S, Jakobs C. The Occurrence of 2-Hydroxyisovaleric Acid in Patients with Lactic Acidosis and Ketoacidosis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 1977; 78(3): 489-493.

2-hydroxybutyrate





shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's
0.903	t	7.42	4	H4A, H4B, H4C
1.655	m		3	H3A
1.742	m		3	H3B
3.997	dd		2	

Caractéristiques

L'acide 2-hydroxybutyrique est un acide organique qui provient de l'alpha-cétobutyrate. L'alpha-cétobutyrate est lui-même issu du métabolisme de la thréonine et de la méthionine, deux acides aminés, et de l'anabolisme du glutathion[1].

L'acide 2-hydroxyturique est relargué par la cystathionine lorsque cette dernière est clivée en cystéine qui est incorporée au glutathion. Le glutathion intervient dans les réactions de détoxifications, notamment suite à un stress oxydatif. Le 2-hydroxyturate est justement un

marqueur précoce de l'insulino-résistance et de l'homéostasie glycémique qui apparait lors d'une augmentation de l'oxydation des lipides et du stress oxydatif[1].

Il a été montré récemment qu'un niveau élevé d'acide 2-hydroxyturique dans le plasma était un bon marqueur du dépistage des stages précoces du diabète de type II[2].

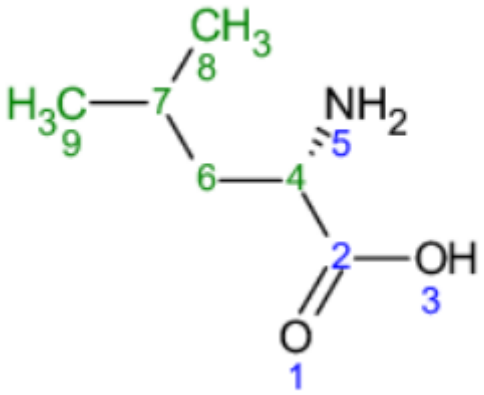
Des études plus anciennes ont également montré que l'augmentation du rapport NADH2/NAD était le facteur le plus important de production du 2-hydroxybutyrate[3].

[1]Gall WE, Beebe K, Lawton KA, Adam KP, Mitchell MW, Nakhle PJ, Ryals JA, et al. Alpha-Hydroxybutyrate Is an Early Biomarker of Insulin Resistance and Glucose Intolerance in a Nondiabetic Population. *PloS One*. 2010; 5(5).

[2]Li X, Xu Z, Lu X, Yang X, Yin P, Kong H, Yu Y, Xu G. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography/time-of-Flight Mass Spectrometry for Metabonomics: Biomarker Discovery for Diabetes Mellitus. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 633(2): 257-262.

[3]Landaas S, Pettersen JE. « Clinical Conditions Associated with Urinary Excretion of 2-Hydroxybutyric Acid ». *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1975; 35(3): 259-266.

L-Leucine



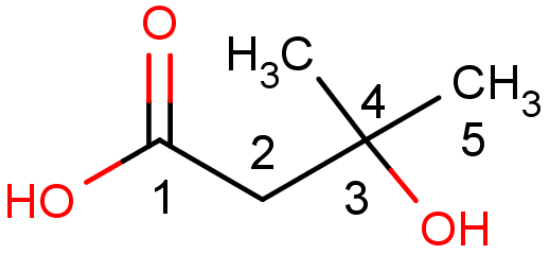
shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	F1 (ppm)
0.96	t	6.05	8, 9	23.65
1.71	m	-	7, 6	
3.74	m	-	4	56.25

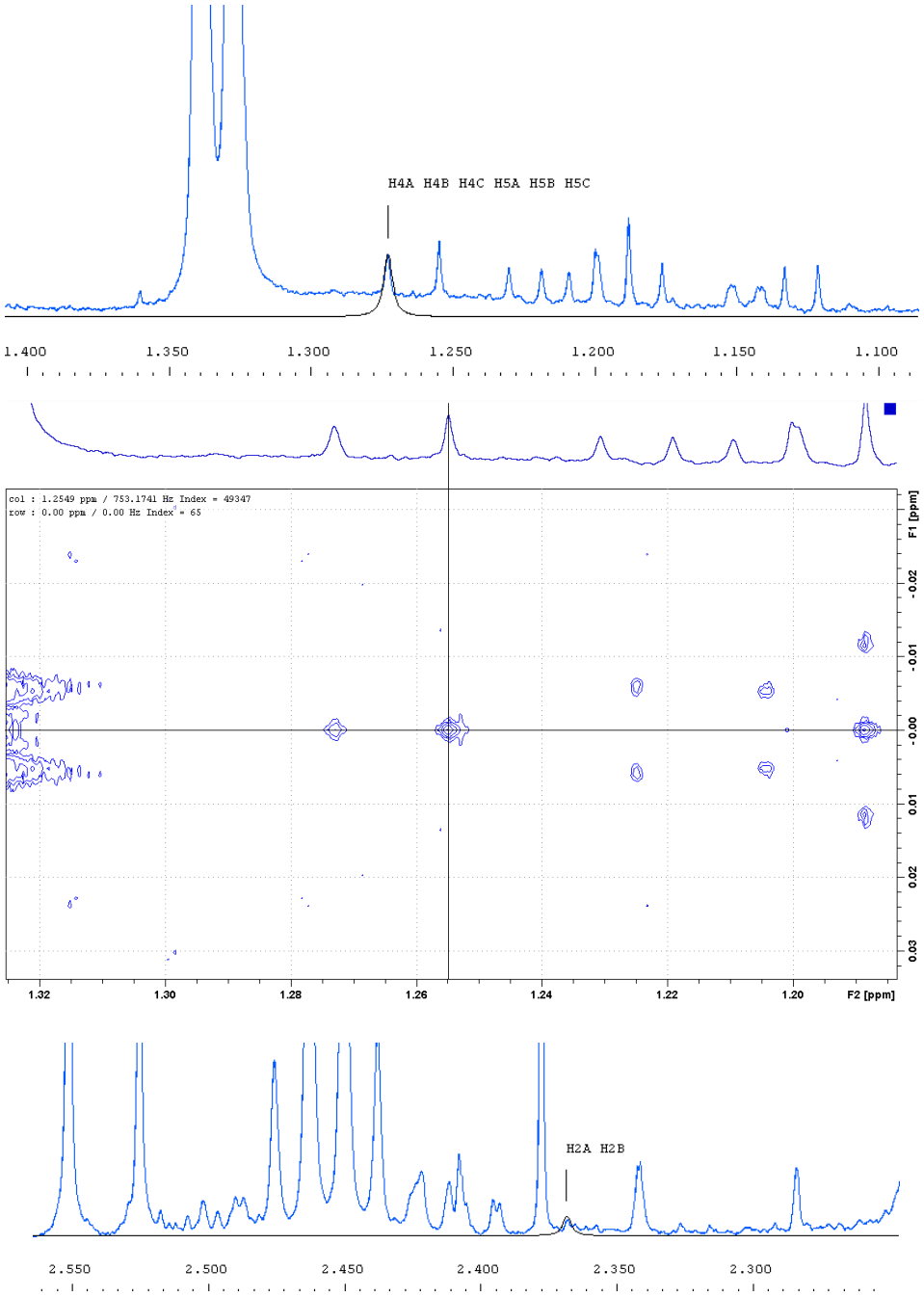
Caractéristiques

La leucine est un acide aminé branché, le plus courant des acides aminés protéinogènes. La valine, l'isoleucine et la leucine font partie de ces acides aminés à chaine branchée. Malgré leur similitude de composition, ces 3 acides aminés ont des rôles métaboliques différents.

Les déficits de ces acides aminés entrainent des symptômes différents. Pour la valine par exemple, sa carence entrainera des perturbations neurologiques, alors que l'isoleucine provoquera des perturbations musculaires.

3-hydroxyisovalérate





shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's
1.27	S	-	4, 5	H4A, H4B, H4C H5A, H5B, H5C
2.37	S	-	3	

Caractéristiques

Le 3-hydroxyisovalérate est un métabolite excrété par les urines. Des taux élevés de ce métabolite correspondent généralement à des déficiences enzymatiques (comme la 3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase ou la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase)[4]. Le métabolisme du 3-hydroxyisovalérate est lié à celui de la biotine.

On peut également retrouver des taux élevés de la 3-hydroxyisovalérate chez les fumeurs[3], ou les patients sous traitement anti-convulsivant de longue durée, type carbamazépine ou phénytoine[2]. Les niveaux élevés peuvent également avoir pour origine une diminution de la filtration rénale de la biotine[1].

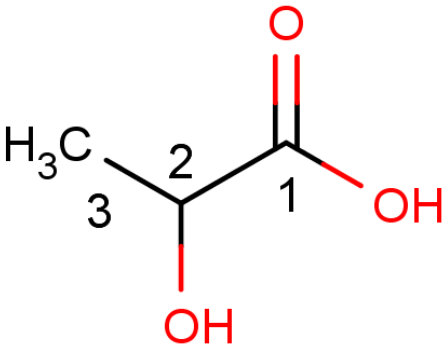
[1]Stratton SL, Bogusiewicz A, Mock MM, Mock NI, Wells AM, Mock DM. Lymphocyte Propionyl-CoA Carboxylase and Its Activation by Biotin Are Sensitive Indicators of Marginal Biotin Deficiency in Humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006; 84(2): 384-388.

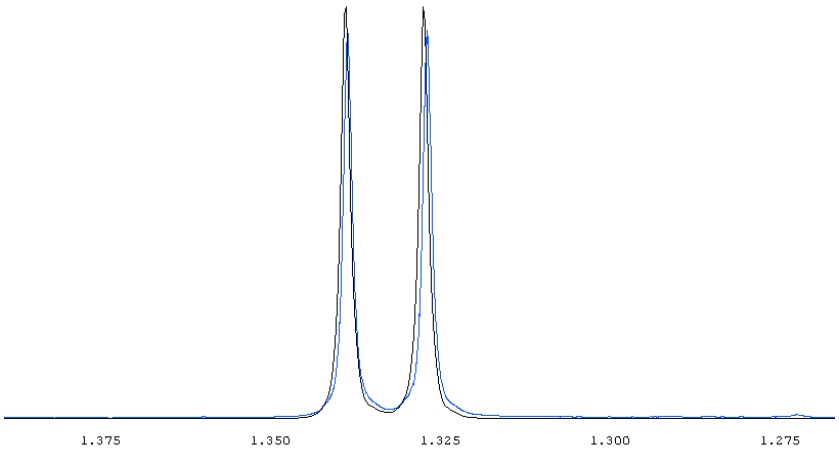
[2]Mock DM, Mock NI, Nelson RP, Lombard KA. Disturbances in Biotin Metabolism in Children Undergoing Long-Term Anticonvulsant Therapy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 1998; 26(3): 245-250.

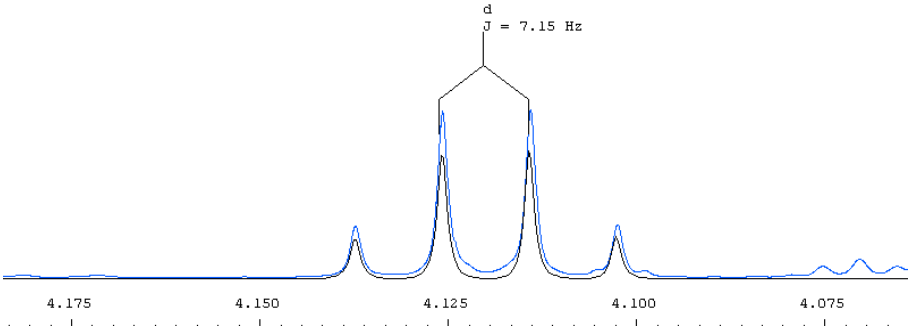
[3]Sealey WM, Teague AM, Stratton SL, Mock DM. Smoking Accelerates Biotin Catabolism in Women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80(4): 932-935.

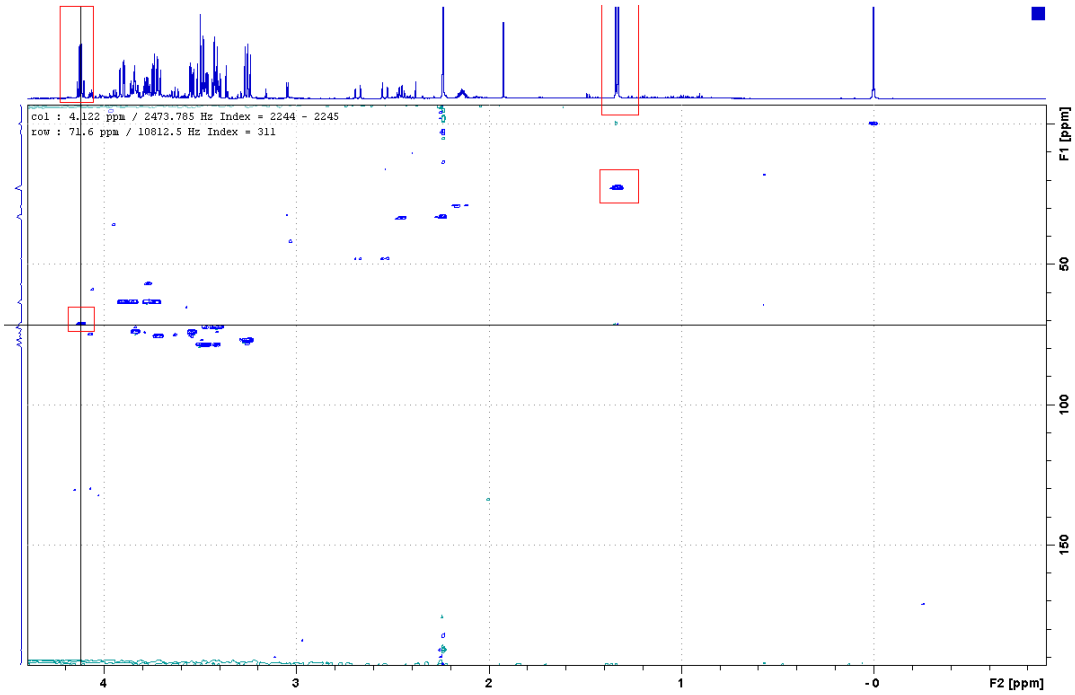
[4]Bannwart C, Wermuth B, Baumgartner R, Suormala T, Weismann UN. Isolated Biotin-Resistant Deficiency of 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Presenting as a Clinically Severe Form in a Newborn with Fatal Outcome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1992; 15(6): 863-868.

Lactate









Shift 1H (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	C13 (ppm)
1.33	d	6.94	3	H3A, H3B, H3C	22.82
4.12	q	6.94, 6.92	2	H2	71.26

Caractéristiques

L'acide lactique ou acide 2-hydroxypropanoïque est un acide organique impliqué dans de nombreux processus biochimiques. C'est un acide alpha-hydroxylé. Le lactate est un sel de cet acide. Il est produit par les muscles durant les phases d'effort intense. On retrouve également le lactate dans les processus énergétiques, et notamment dans le cycle oxydatif de la glycolyse, où il est produit par fermentation lactique lorsque la consommation des sucres est supérieure à l'apport en oxygène. C'est le cas lors des efforts intenses.

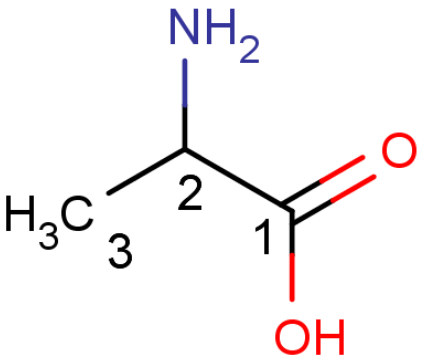
La mesure du taux de lactate est un bon indicateur de l'état d'un patient de réanimation. S'il est élevé, le niveau de lactate est révélateur d'un mauvais fonctionnement du métabolisme énergétique, et peut-être considéré comme un marqueur précoce d'un état potentiellement réversible[1].

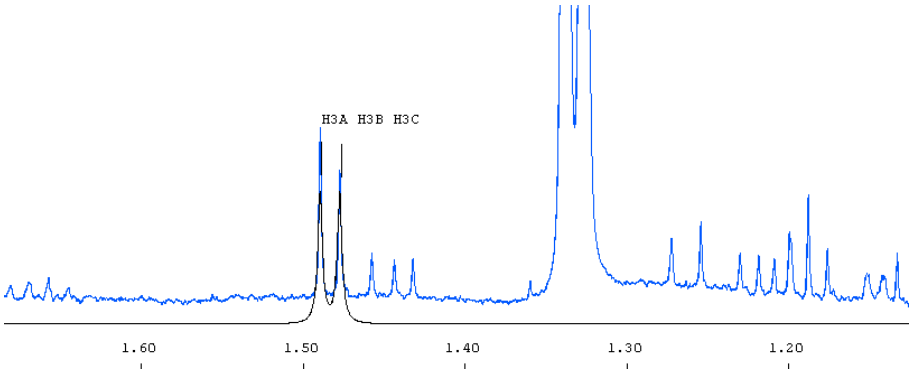
En ce qui concerne les tumeurs malignes, le lactate peut s'avérer être un métabolite de choix en ce qui concerne leur classification. Ainsi, en fonction de la lésion, les niveaux de lactate peuvent être relativement bas ou extrêmement élevés[2].

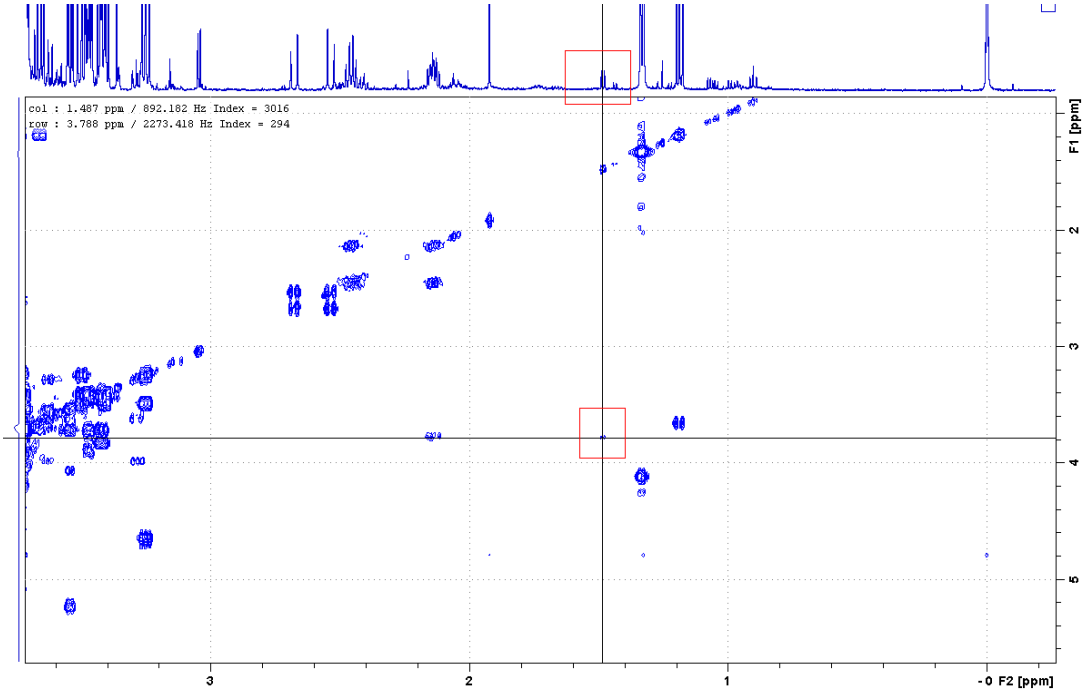
[1]Valenza F, Aletti G, Fossali T, Chevallard G, Sacconi F, Irace M, Gattinoni L. Lactate as a Marker of Energy Failure in Critically Ill Patients: Hypothesis. *Critical Care*. 2005; 9(6): 588-593.

[2]Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W. Lactate in Solid Malignant Tumors: Potential Basis of a Metabolic Classification in Clinical Oncology. *Current Medicinal Chemistry*. 2004; 11(16): 2195-2204.

Alanine







shift 1H (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	13C (ppm)
1.49	d	7.24	3	H3A, H3B, H3C	19.03
3.78	q	-	2	H2	53.56

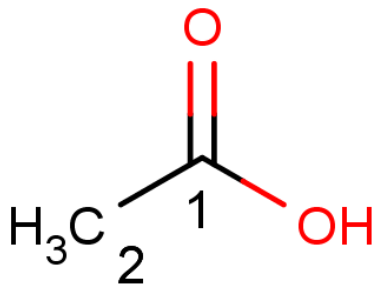
Caractéristiques

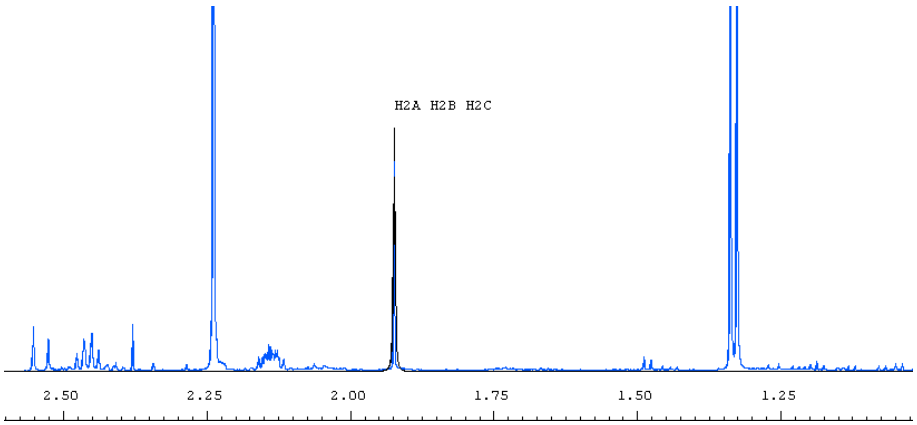
La L-Alanine est un acide-aminé non essentiel, qui provient de la conversion d'un glutamate, par un processus appelé transamination. L'alanine est un acteur majeur dans la régulation du métabolisme du glucose. Sa concentration dans le muscle est très importante, et c'est un des

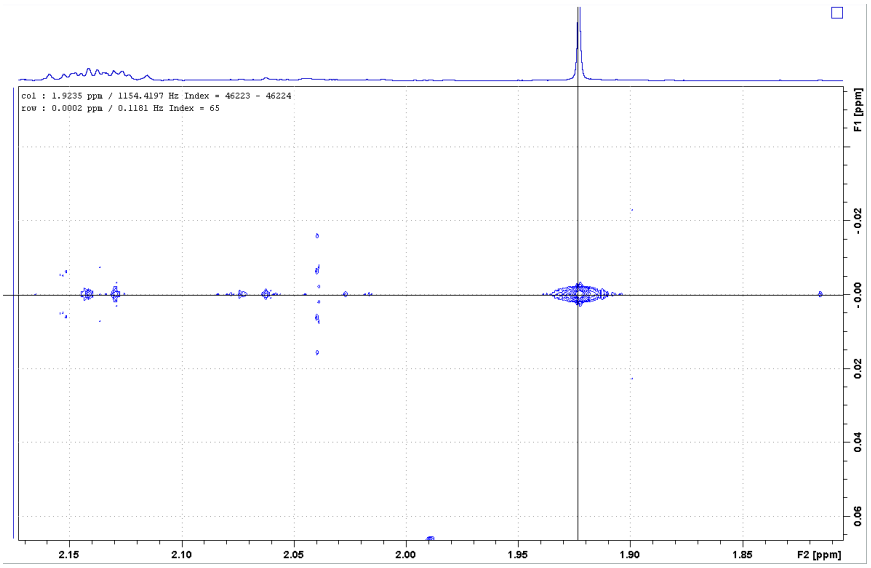
plus importants acides aminés relargués par le muscle, fonctionnant comme source d'énergie principale. Dans le foie, l'alanine se transforme en pyruvate. L'alanine-aminotransférase (ALAT) catalyse la réaction dans laquelle le groupement aminé de l'alanine est transféré àl'α-cétoglutarate.

Le métabolisme normal de l'alanine, comme celui des autres acides aminés, est dépendant d'enzymes contenant de la vitamine B6. Enfin, l'alanine, comme le GABA, la taurine ou la glycine, est un neurotransmetteur inhibiteur du cerveau.

Acétate





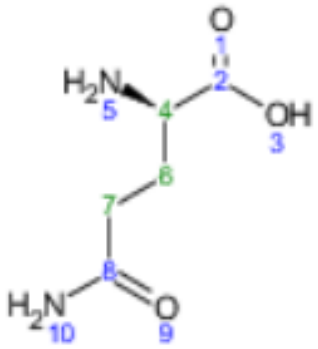


shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's
1.92	S	-	2	H2A, H2B, H2C

Caractéristiques

L'acide acétique est une des plus simples acides carboxyliques. C'est un réactif chimique très utilisé, par exemple pour la production de bouteilles plastiques, film photographique… Dans l'industrie alimentaire, l'acide acétique est utilisé comme régulateur de l'acidité. L'acide acétique intervient dans le métabolisme des lipides et des glucides, en liant avec le coenzyme A.

Glutamine



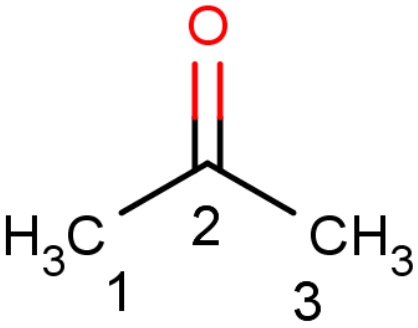
shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	F1 (ppm)
2.13	m	-	6	29.05
2.45	m	-	7	33.66
3.47	t	6.36	4	56.98

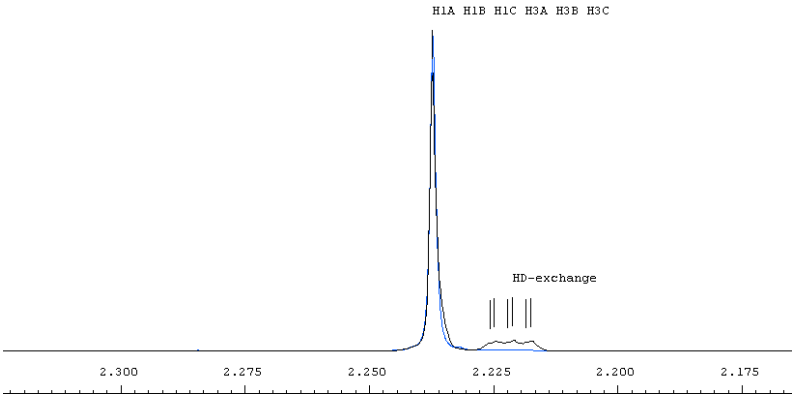
Caractéristiques

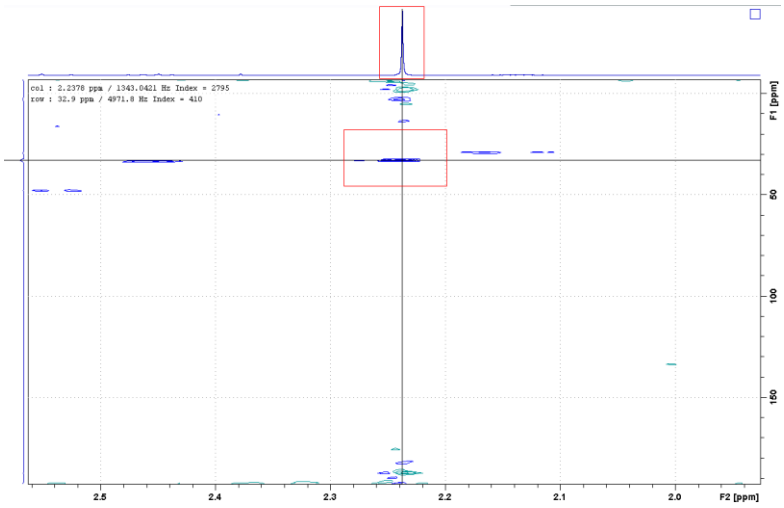
La glutamine est un acide-aminé naturel non essentiel, présent abondamment dans le corps humain, et participant à de très nombreux processus métaboliques. C'est le principal transporteur d'amine dans le corps humain, grâce à sa participation dans le métabolisme de l'azote. C'est un donneur d'azote, qui permet la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

En effet, il participe à la transformation organique de l'ammoniac grâce à la conversion d'un acide glutamique en glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine est également une importante source d'énergie pour de nombreuses cellules. Il est formé à partir du remplacement de la chaine latérale d'un acide glutamique par une amine.

Acétone







shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	13C (ppm)
2.24	S	-	1, 3	H1A, H1B, H1C H3A, H3B, H3C	32.9

Caractéristiques

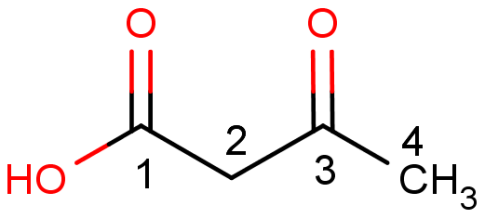
L'acétone est un corps cétonique produit pendant la cétogénèse. Son rôle physiologique n'est pas clairement défini. Un des rôles proposés pourrait être de servir de tampon pH dans certaines conditions métaboliques, notamment celles conduisant à une accumulation d'acide acétoacétique, et une dérégulation du pH[1].

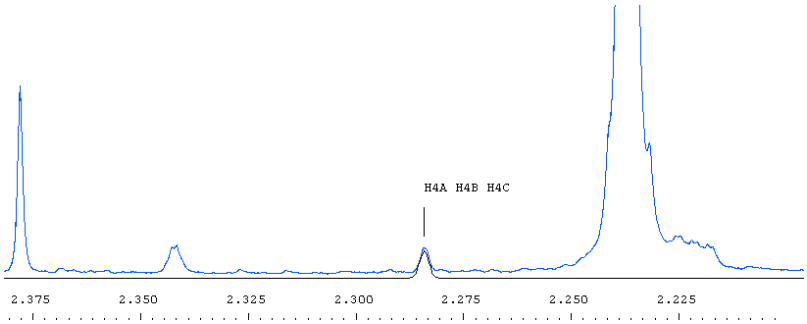
Dans l'industrie chimique, l'acétone peut servir de solvant, très soluble dans l'eau, l'éthanol ou l'éther. C'est un produit irritant, dont l'inhalation peut conduire à une hépatotoxicité.

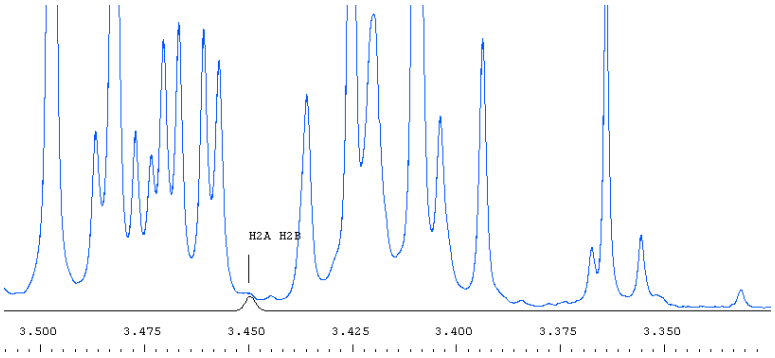
Dans notre échantillon, c'est une contamination exogène, il n'est pas naturellement présent. Nous ne le retrouverons d'ailleurs dans un seul échantillon parmi tous ceux analysés.

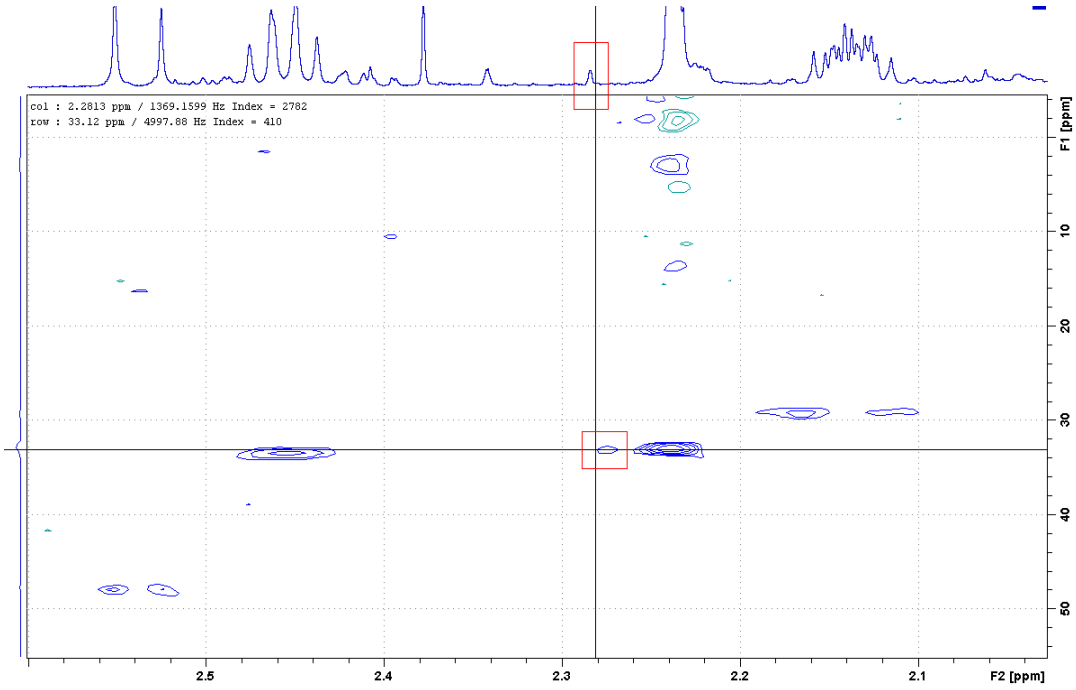
[1]Kalapos MP. Possible Physiological Roles of Acetone Metabolism in Humans. *Medical Hypotheses*. 1999;53(3): 236-242.

Acéto-acétate









shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	13C (ppm)
2.29	s	-	4	H4A, H4B, H4C	33.1
3.45	s	-	2	H2A, H2B	-

Caractéristiques

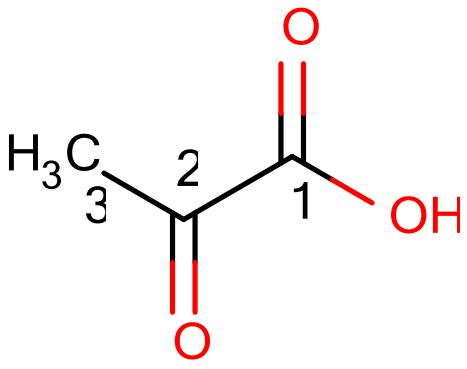
L'acéto-acétate est un acide organique faible produit par le foie chez l'homme dans certaines conditions métaboliques. C'est un corps cétonique, qui intervient dans la cétogénèse ou voie des corps cétoniques. Cette voie est sollicitée notamment lors d'un jeune prolongé ou d'un diabète, d'une acidocétose. L'acéto-acétate est converti partiellement en acétone par une décarboxylation, et il est excrété par les urines ou la respiration.

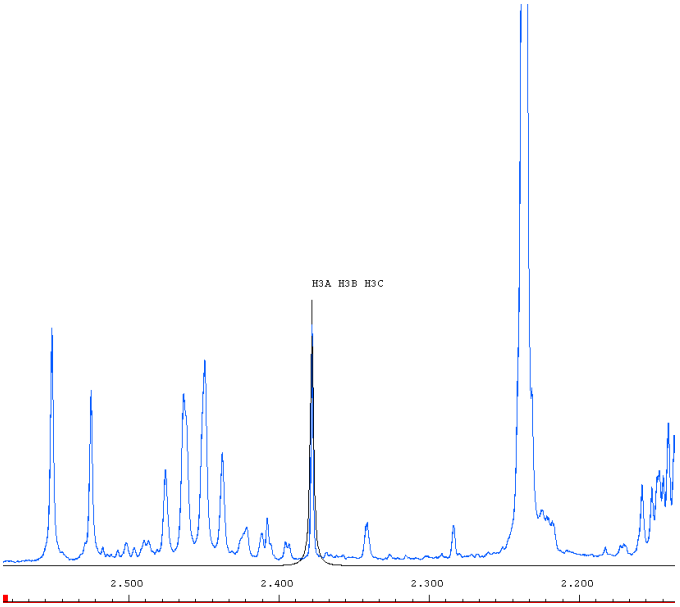
L'acéto-acétate est un métabolite important intervenant dans le métabolisme énergétique des tissus extra-hépatiques, spécialement le cerveau ou les poumons, lorsque l'organisme ne peut plus utiliser ses réserves de glucose. L'acéto-acétate permet également la formation d'acétoactéyl-CoA ou d'acétyl-CoA nécessaires à la synthèse du cholestérol, des acides gras ou des lipides.

Dans les poumons, l'acétoacétate sert plus que le glucose en tant que précurseur de la synthèse des phospholipides pulmonaires. Les lipides synthétisés, et particulièrement la dipalmityl phosphatidylcholine, sont incorporés dans le surfactant, et ont un rôle dans les premiers jours de la vie[1].

[1]Yeh YY, Sheehan PM. Preferential Utilization of Ketone Bodies in the Brain and Lung of Newborn Rats. *Federation Proceedings*. 1985; 44(7) : 2352-2358.

Pyruvate





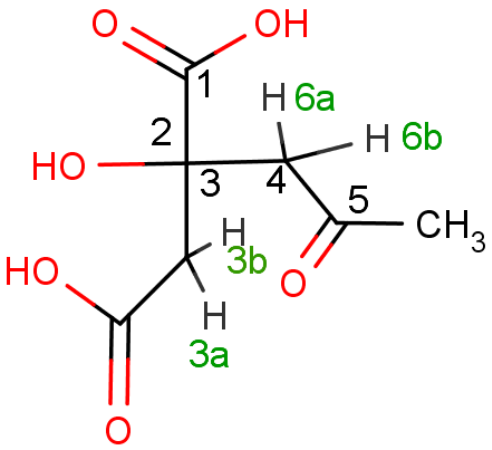
Shift 1H (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	13 C (ppm)
2.38	s	-	6	H3A, H3B, H3C	

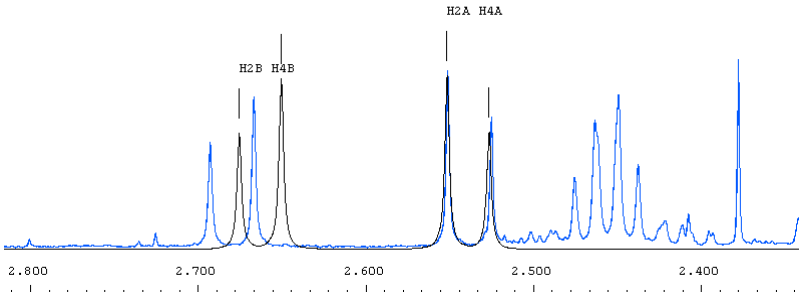
Caractéristiques

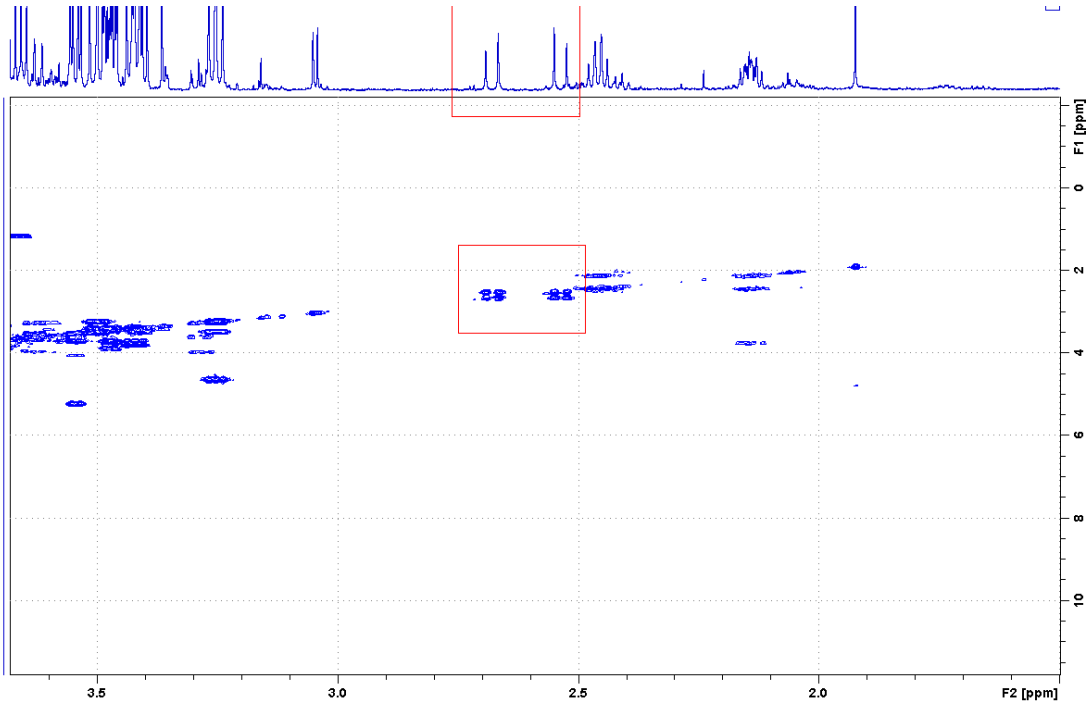
L'acide pyruvique est un métabolite qui fait partie du métabolisme des glucides (c'est le produit final de la glycolyse), du métabolisme énergétique par son intervention dans le cycle de Krebs, du métabolisme des protéines ou encore des acides gras. On le retrouve notamment dans le muscle avec l'acide lactique. C'est donc un métabolite majeur au carrefour de plusieurs voies métaboliques. D'un point de vue chimie organique, c'est un alpha-cétoacide, c'est-à-dire qu'il porte une fonction acide carboxylique et une fonction cétone.

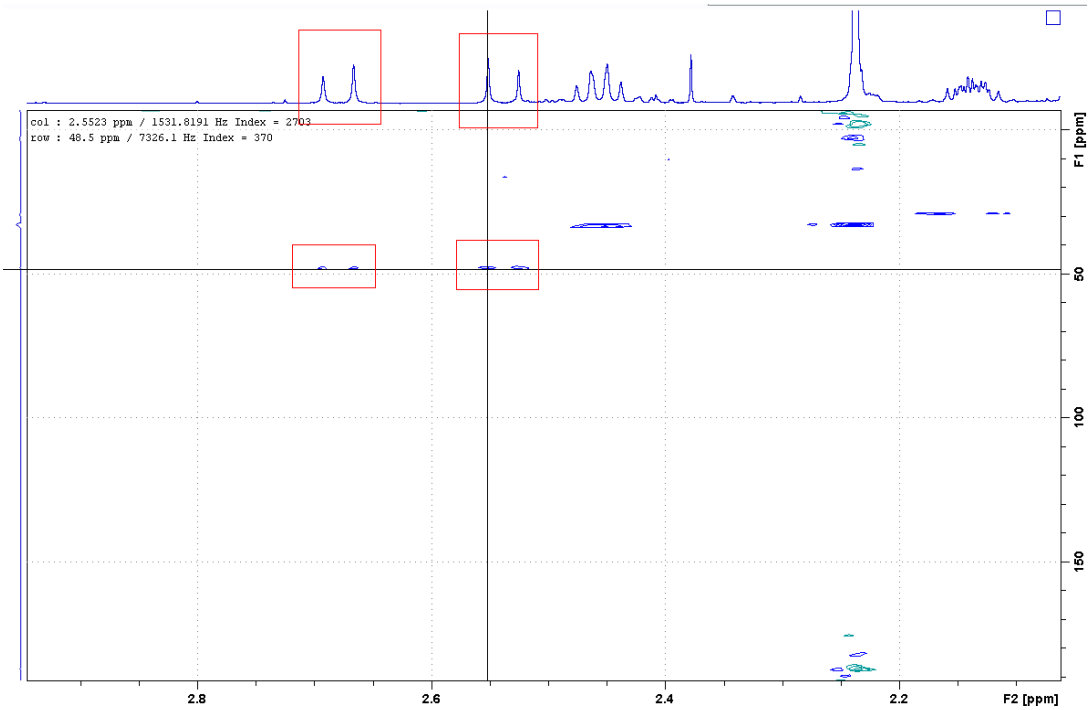
Son oxydation peut-être retardée lors d'un déficit en thiamine, ce qui provoque son accumulation dans les tissus, et particulièrement dans le tissu nerveux.

Acide citrique







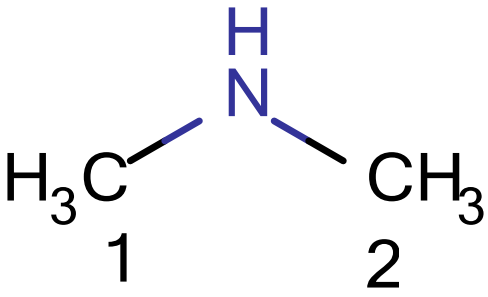


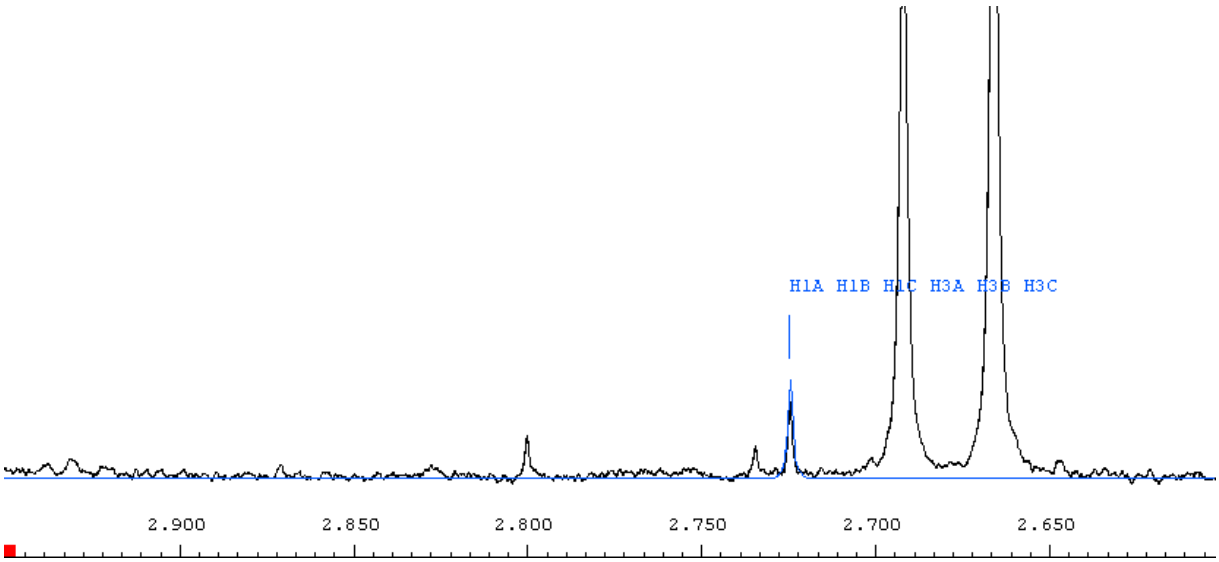
shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	F1 (ppm)
2.55	d	15.7	3, 6	6a, 3a	48,2
2.66	d	9.77, 3.70	6, 3	6a, 3a	48,2

Caractéristiques

L'acide citrique est un acide faible formé à partir du cycle de l'acide tricarboxylique ou apporté par la nourriture. L'excrétion urinaire du citrate est un outil permettant le diagnostique différentiel des calculs rénaux, maladies rénales, et il joue un rôle dans les pathologies osseuses. L'acide citrique est retrouvé dans les agrumes, notamment dans les citrons, où on peut en retrouver près de 8% de la masse sèche du fruit. Il est utilisé comme conservateur naturel, mais également pour acidifier les aliments et les boissons. Les sels d'acide citrique sont utilisés comme anticoagulant, étant donné leur capacité à chélater le calcium.

Diméthylamine





shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	F1 (ppm)
2.72	s	-	2, 3	37.3

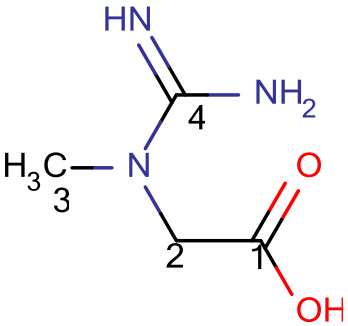
Caractéristiques

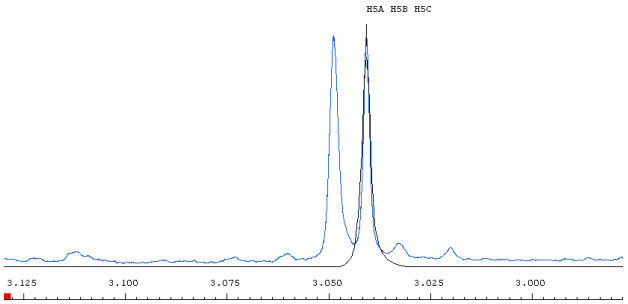
Le diméthylamine est une amine organique secondaire. On le retrouve fréquemment dans les urines chez l'homme. Le diméthylamine est utilisée dans l'industrie chimique, comme agent colorant ou dans les savons par exemple.

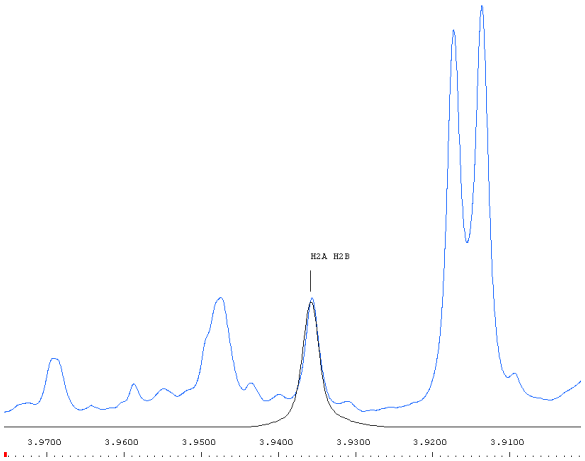
Il est apporté par l'alimentation. Sa concentration urinaire augmente chez les individus qui ont consommé du poisson ou des produits de la mer, comme du calmar, du merlan, de l'aiglefin, de la sardine ou de la morue[1].

[1]Mitchell SC, Zhang AQ, Smith RL. Dimethylamine and Diet. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(5): 1734-1738.

Créatine





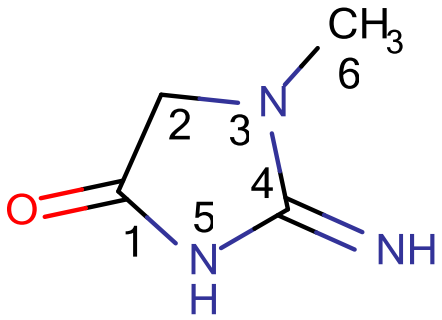


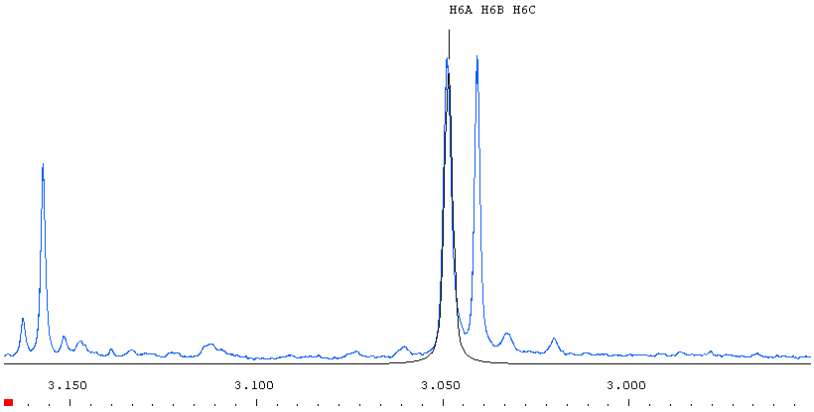
shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	F1 (ppm)
3.04	s	-	3	5a, 5b , 5c	39.6
3.93	s	-	2	2a, 2b	56.3

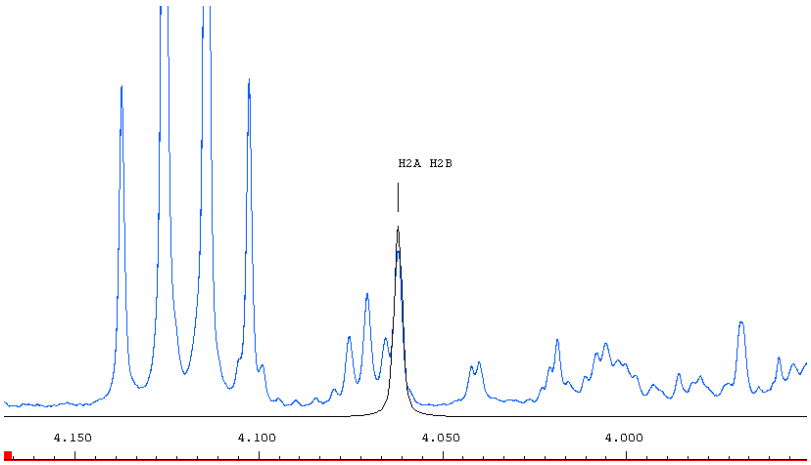
Caractéristiques

La créatine est un acide aminé que l'on peut retrouver dans l'urine. Dans le tissu musculaire, la créatine est généralement sous forme de phosphocréatine. La créatine est excrétée sous forme de créatinine, son métabolite issu du catabolisme. La créatine intervient dans le métabolisme énergétique. Un phosphate provenant de l'ATP, et qui représente une réserve énergétique importante, est transféré sur la créatine pour former la phosphocréatine. La réaction, réversible, est catalysée par la créatine kinase. La créatine est formée dans le foie, à partir principalement de 3 acides aminés : l'arginine, la glycine et la méthionine. Elle est stockée pour la majorité dans le muscle squelettique (95%), le reste se trouvant dans le cerveau ou le cœur.

Créatinine





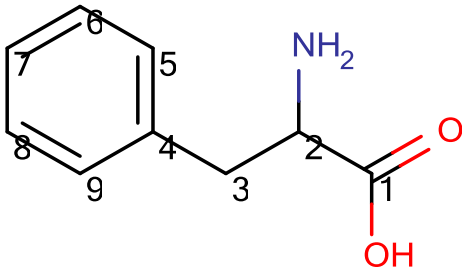


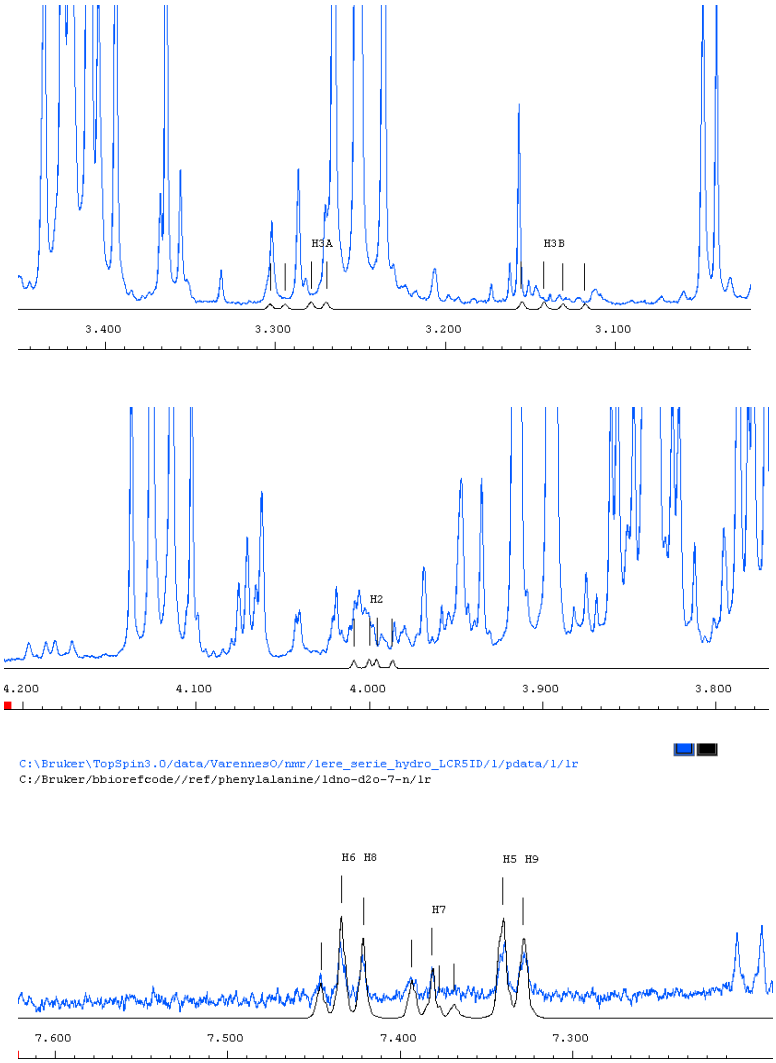
shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	F1 (ppm)
3.05	s	-	6	6a, 6b, 6c	32.2
4.06	s	-	2	2a, 2b	59

Caractéristiques

La créatine est un produit du catabolisme de la créatine phosphate dans le muscle. La déshydration (perte de H20) sur la créatine entraîne la formation de la créatinine. La créatine est métabolisée par les reins, les muscles, le foie et le pancréas. Elle est transportée jusqu'aux reins par le plasma, où elle est éliminée par filtration glomérulaire et excrétion tubulaire partielle. Elle est produite de manière constante par le corps, et sa concentration sérique est un test simple pour évaluer la fonction rénale. Les valeurs de référence sont de 45-90 µmol/l pour les femmes et de 60-110 µmol/l pour les hommes.

L-phénylalanine





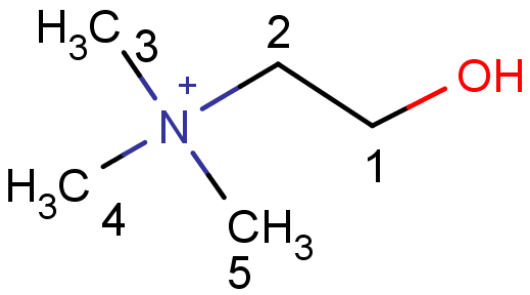
Shift 1H (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	13C (ppm)
3.13	m	-	3	H3A, H3B	ND
4.00	m	-	2	H2	ND
7.34	d	7.05	5, 9	H5, H9	ND
7.38	m	-	7	H7	ND
7.43	t	8.23	6, 8	H6, H8	ND

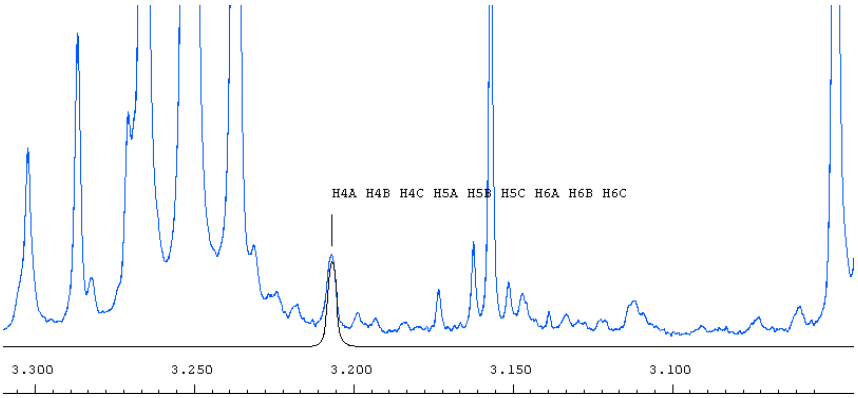
Caractéristiques

La phénylalanine est un acide-aminé essentiel, aromatique et non polaire. Il participe à la formation des catécholamines, c'est-à-dire la dopamine, la tyramine, l'adrénaline ou la noradrénaline, grâce à l'action de la phénylalanine hydroxylase, qui le transforme en tyrosine, précurseur des catécholamines. On le retrouve dans l'alimentation, et notamment les produits riches en protéines, comme les viandes ou le fromage. Les patients atteints de phénylcétonurie, maladie génétique grave, entraîne une concentration plasmatique de la phénylalanine de près de 400 fois supérieure à la normale. Cette concentration élevée est due au déficit enzymatique de la PAH ou phénylalanine hydroxylase.

Ces patients souffrent de troubles neuropsychologiques graves, puisque la phénylalanine en excès pénètre dans le cerveau et altère la substance blanche. Le patient doit suivre en régime pauvre en phénylalanine.

Choline



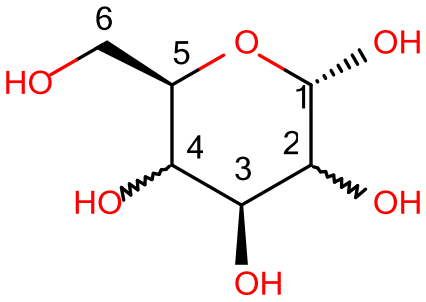


Shift 1H (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's
3.21	s	-	3, 4, 5	H3A, H3B, H3C H4A, H4B, H4C H5A, H5B, H5C
3.5	dd	ND	3	
4.05	dd	ND	2	

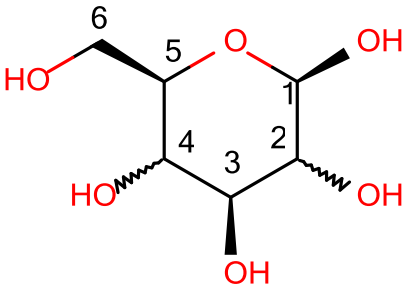
Caractéristiques

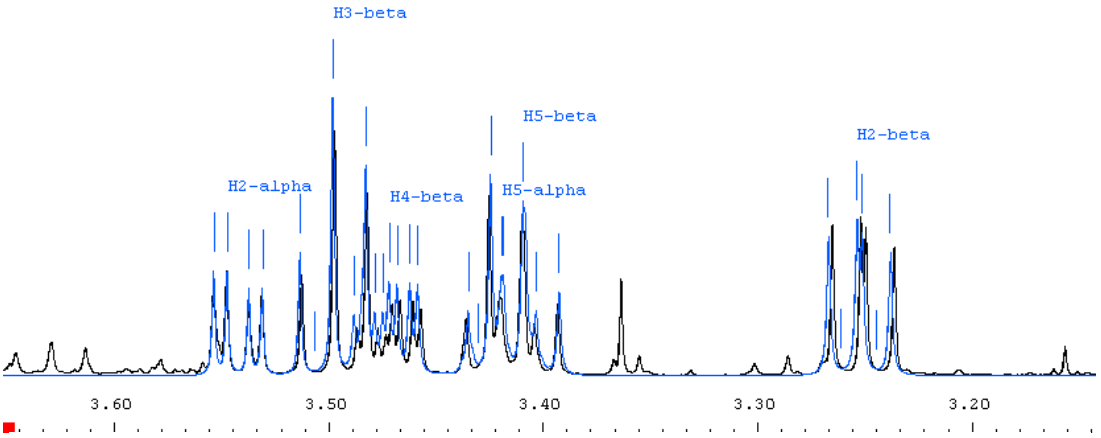
La choline est un précurseur important de l'acétylcholine, donneur de méthyl dans de nombreux processus métaboliques, et surtout dans le métabolisme des lipides. La choline est considérée comme une vitamine essentielle. Le lait, les œufs et les noix sont riches en choline. La plupart de la choline est retrouvée sous forme de phospholipides, que l'on appelle phosphatidylcholine ou lécithine. Un déficit en choline peut conduire à une élévation du niveau d'ALAT dans le sérum, et est associé à une augmentation de l'incidence du cancer du foie.

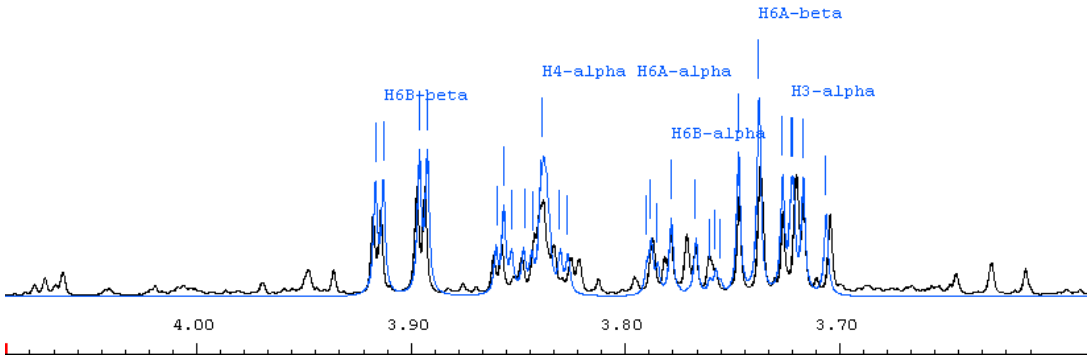
Alpha D-glucose



Bêta D-glucose







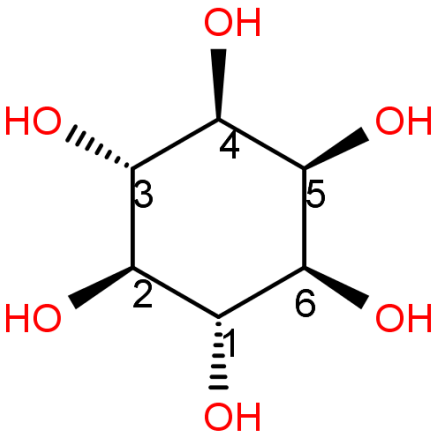
Shift 1H (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	C13 (ppm)
3.25	dd	9.33, 8.01	2	2β	76.93
3.41	m	-	5	5α, 5β	72.41
3.47	m	-	4	4β	78.65
3.50	m	-	3	3β	78.65
3.54	dd	9.82, 3.77	2	2β	74.31
3.74	m	-	3, 6	3α, 6Aβ, 6Bα	63.38
3.84	m	-	4, 6	4α, 6Aα	63.38
3.89	dd	12.22, 2.21	6	6Bβ	63.56
4.65	d	7.92	1	1β	98.71
5.24	d	3.75	1	1α	94.91

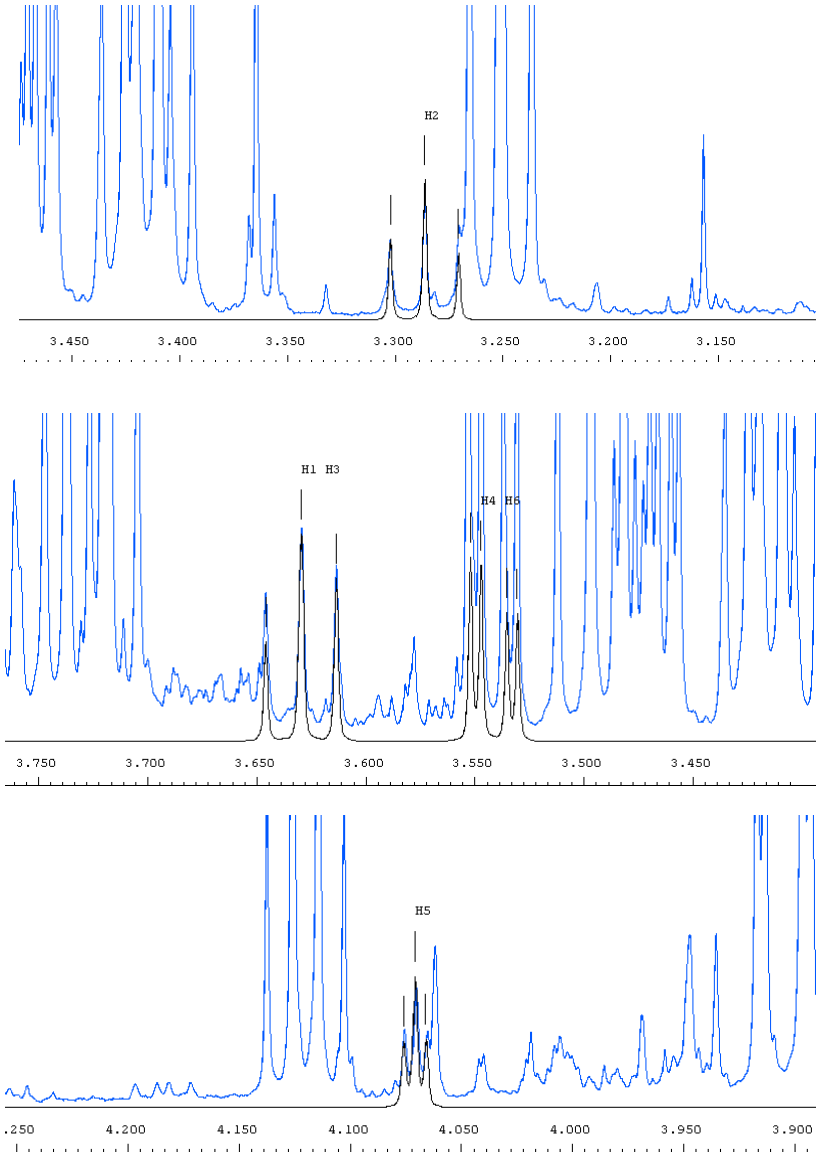
Caractéristiques

Le glucose est un monosaccharide, qui est composé de 6 atomes de Carbone et d'un groupe aldéhyde : c'est un aldohexose. Le glucose est la première source d'énergie de l'organisme, qui est directement assimilable, contrairement au saccharose. Le glucose est la principale source d'énergie pour le cerveau, c'est la raison pour laquelle on en trouve dans le LCR. Il est stocké sous forme polymérique de glycogène, et est libéré lors de la glycogénolyse. Le glucose peut avoir une origine endogène, en étant produit par le foie et les reins à partir d'intermédiaire comme le pyruvate et le glycérol. C'est ce qu'on appelle la néoglucogénèse.

On retrouve le glucose dans l'alimentation, et notamment dans les fruits, ou dans les plantes.

Myo-inositol





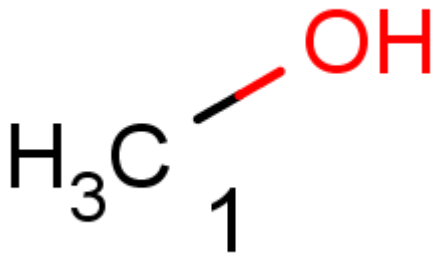
Shift 1H (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	H's	13C (ppm)
3.29	t	9.41	2	H2	ND
3.56	dd	9.77, 3.70	6, 4	H4, H6	ND
3.53	t	9.85	3, 1	H1, H3	ND
4.07	t	2.87	5	H5	ND

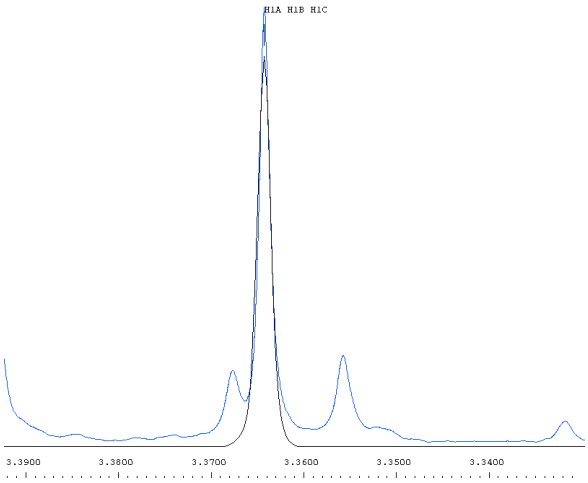
Caractéristiques

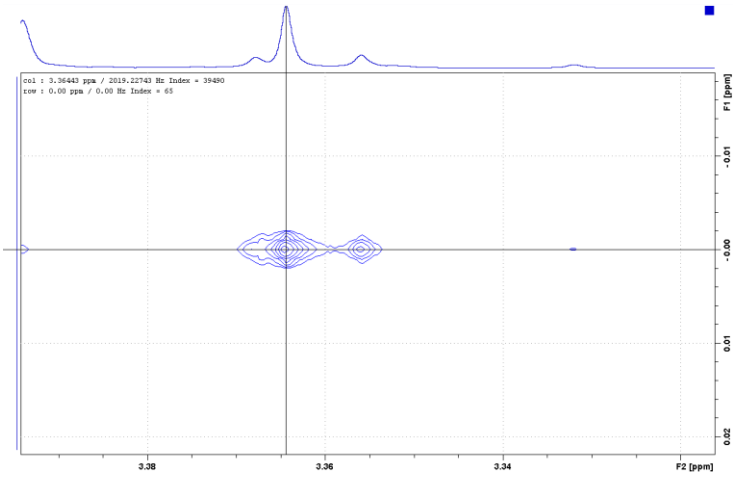
Le myoinositol est un alcool polycyclique qui joue un rôle important en tant que second messager, qu'on peut retrouver sous forme d'inositol phosphate, de phosphatidylinositol et de phosphatidylinositol phosphate. Le myoinositol est le principal stéréoisomère de l'inositol, qui dérive du glucose. Il existe 9 stéréoisomères possible de l'inositol.

On le retrouve fréquemment dans la nourriture, et particulièrement dans les céréales et le blé.

Méthanol







Shift 1H (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	13C (ppm)
3.36	s	-	2	51.74

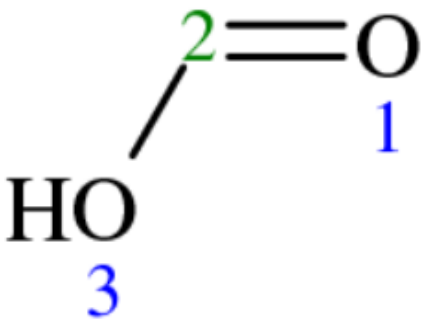
Caractéristiques

Le méthanol est le plus simple des alcools, léger, volatil, et toxique. Le méthanol peut-être à l'origine d'intoxication accidentelle, ou de suicide. Sa toxicité est due aux composés produits par l'activité de l'alcool déshydrogénase (ADH) et de l'aldéhyde déshydrogénase[1]. Le méthanol est présent dans le corps naturellement, et il est produit lors de la dégradation de composés organiques. On en trouve généralement dans les fruits et les légumes frais, ainsi que dans les jus de fruits. Il provient dans ce cas de la dégradation de la pectine par la pectinestérase et la pectate lyase.

Dans l'industrie chimique, il est utilisé comme solvant.

[1]Mégarbane B, Borron SW, Baud FJ. Current Recommendations for Treatment of Severe Toxic Alcohol Poisonings. *Intensive Care Medicine*. 2005; 31(2): 189-195.

Formate



shift (ppm)	type	J (Hz)	Numéro	
8.46	s		2	Confirmation avec Cosy

Caractéristiques

L'acide formique est aussi appelé acide méthanoïque, c'est le plus simple des acides carboxyliques. Le formate est un de ses sels. Il peut subir une oxydation pour devenir du dioxyde de carbone. L'acide formique est un sous-produit lors de la formation de l'acétate. On s'en sert dans les industries textiles, le tannage, l'alimentaire en tant qu'additif E236 par exemple. En médecine, la mesure urinaire des formiates permet de détecter un empoisonnement par le méthanol.

L'acide formique est présent chez les insectes, comme les hyménoptères, les abeilles ou les fourmis.

L'approche métabolomique par RMN pour la recherche de biomarqueurs : une étude comparative *in vitro* du Liquide Céphalo-Rachidien et du sérum de patients atteints de Sclérose en Plaques

Résumé : La Sclérose en Plaques (SEP) est une pathologie démyélinisante, qui touche principalement le système nerveux central. Le diagnostic de la SEP reste délicat à poser, car les manifestations cliniques sont proches d'autres pathologies neurodégénératives. Pour affirmer le diagnostic de SEP, il faut que le patient subisse plusieurs crises dans le temps (critère temporel), et que les lésions diagnostiquées par l'imagerie par résonance magnétique (IRM) soient évolutives (critère spatial). Un critère biochimique, en plus de ces manifestations cliniques, basé sur une mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'IgG et une isoélectrofocalisation des immunoglobulines, permet d'appuyer le diagnostic. Notre analyse comparative par RMN 1H de séra et de LCR a été conduite chez 10 patients témoins et 12 patients atteints de sclérose en plaques. L'analyse multivariée sur les données spectrales du sérum, afin de rechercher des métabolites discriminants en fonction des conditions pathologiques, a permis de révéler l'augmentation de petits acides aminés (Isoleucine, valine, tyrosine), du 2-hydroxybutyrate et la diminution du glucose dans le groupe sclérose en plaques. Ces métabolites pourraient être de futurs biomarqueurs de la maladie.

Mots-clés: Liquide cérébrospinal, sérum, métabolomique, sclérose en plaques.

A comparative analysis *in vitro* of Cerebrospinal Fluid and serum in Multiple Sclerosis Patients by NMR metabolomic approach

Abstract : Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease which affects specially the central nervous system. The MS diagnosis is difficult to confirm, because the clinical aspects are similar to some neurological diseases. To confirm the diagnosis of MS, the patient has to manifest a temporal criteria (an increase in the number of crisis in time) and a spatial criteria (an increase of the number of neurological lesions visible in MRI). A biochemical criterion, in addition to the clinical manifestations, based on the evidence of the immunoglobulin isoelectric focusing, could confirm the diagnosis. The comparative analysis with 1H NMR of sera and CSF performed on 10 healthy patients and 12 MS patients. Wewill conduct amultivariateanalysis ofspectral data, to search fordiscriminatingmetabolitesaccording topathological conditions. An increase in amino-acids such as isoleucine, valine and tyrosine, then in 2-hydroxybutyrate and the decrease of glucose were observed in the serum of MS patients. They could become interesting biomarkers of the disease.

Keywords : cerebrospinal fluid, serum, metabolomic, Multiple Sclerosis.

UNIVERSITÉ de Picardie Jules Verne

BIOPI Plantes & Innovation