Objectiver les états émotionnels : approche métabonomique et quantification d'un biomarqueur salivaire

G. Romoaldo[1,2], S. Hambye[2], V. Tagliatti[1], J-M. Colet[1], B. Blankert[2]
[1] Laboratoire d'Analyse Pharmaceutique
[2] Laboratoire de Biologie Humaine et Toxicologie
Université de Mons Place du Parc, 20 B 7000 Mons

Introduction

Peu de techniques sont décrites pour mesurer de manière physiologique les états émotionnels. Différents biomarqueurs utilisés pour l'évaluation de différents états émotionnels des individus sont documentés dans la littérature[1,2,3].
A partir du fluide oral nous envisageons la quantification de biomarqueurs telle la 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG)
MHPG, un métabolite de la noradrénaline. D'autre part, par un profilage métabonomique nous tentons d'établir des liens entre la fluctuation de la charge cognitive ainsi que de la fatigue et la variabilité de la composition de la salive en terme de métabolites.

Objectifs

Le but de ce travail consiste à identifier et caractériser un biomarqueur ou un faisceau de biomarqueurs, qui permettraient d'objectiver la surcharge cognitive et la fatigue mentale du sujet de manière non invasive.

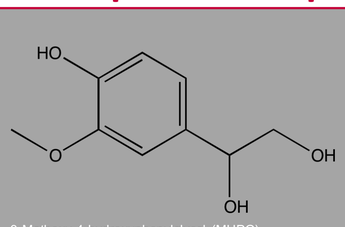
Méthodologie

L'individu sera placé dans différents états émotionnels grâce à un simulateur de conduite. Durant le test, outre le fait de s'adapter aux différentes situations de conduite routière, le sujet sera amené à réciter des litanies à l'endroit et à l'envers. Il devra également réaliser des opérations de calcul simple. Ces tests auront pour but d'augmenter progressivement la charge cognitive et d'engendrer un état de fatigue mentale. Ce dispositif permet en outre la captation de signal vocal des sujets.

Tout au long du test, le sujet effectue une collecte de salive à l'aide de *Salivettes©* selon un protocole déterminé. Ces échantillons sont ensuite centrifugés et conservés à -80°C en attendant d'être analysés.
Il répond également à des tests d'auto-évaluation de son état de charge cognitive.

Mise au point d'une technique de quantification par électrochimie

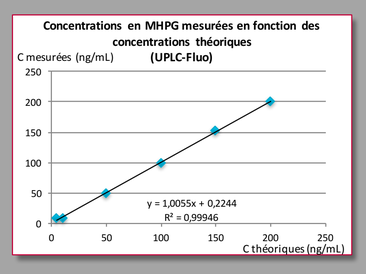
Après consultation approfondie de la littérature, nous avons sélectionné un candidat biomarqueur dont la concentration fluctue en fonction de l'état émotionnel du sujet.
La MHPG, un dérivé de la noradrénaline dont la concentration salivaire est directement proportionnelle à celle du plasma[1].
Nous avons sélectionné ce marqueur car il est corrélé à l'état de fatigue de la charge cognitive du sujet[2, 3, 4].



3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG)

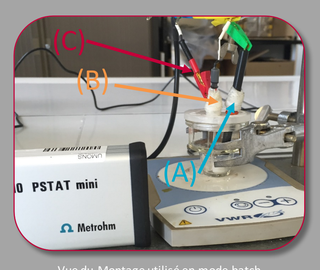
Dans une première approche nous avons mis au point une technique de quantification via UPLC + détecteur de fluorescence. Cette méthode, bien que spécifique, possède une limite de quantification peu basse (LOD : 3,95 ng/mL et LOQ : 13,16 ng/mL) vis à vis de la gamme de concentrations physiologiques moyennes tirées de la littérature (12-26 ng/mL[5,6]).

Nous avons dû nous tourner vers un autre mode de détection. La MHPG étant électrochimiquement active, nous avons choisi d'étudier le comportement de cette molécule dans la salive afin de la quantifier.



Essais préliminaires en électrochimie – mode batch

Cette étape préliminaire identifie les paramètres idéaux pour permettre la quantification de la MHPG par cette technique (pH, potentiel d'oxydation optimal, électrode la plus adaptée…).
Nous avons utilisé une électrode de travail en carbone vitreux (A), une électrode de référence en Ag/AgCl, KCl (3M) (B) et une électrode auxilliaire en platine (C). Les électrodes sont reliées à un potentiostat qui permet de faire varier le potentiel imposé entre elles.

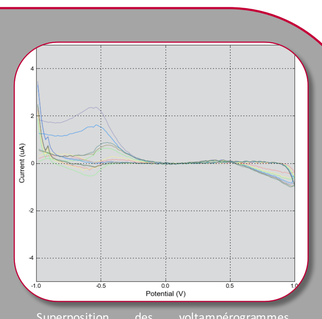


Vue du Montage utilisé en mode batch

Potentiels d'oxydation de la MHPG en fonction du pH			
Concentration (ng/mL)	pH 3,6	pH 4	pH 5
2,45	-0,48	-0,70	-0,69
4,8	-0,475	-0,72	-0,68
7,07	-0,53	-0,73	-0,70
9,3	-0,54	-0,73	-0,68
13,4	-0,55	-0,74	-0,70
15,3	-0,55	-0,73	-0,69
17,25	-0,55	-0,73	-0,68
Moyenne	-0,52	-0,73	-0,69
Ecart-Type	0,03	0,01	0,01

Voltampérométrie cyclique – mode batch

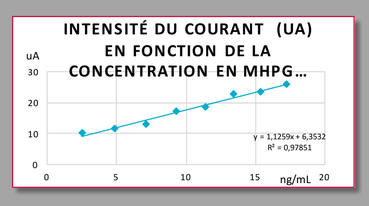
La voltampérométrie cyclique de la MHPG montre un pic d'oxydation réversible à -0,52V à pH 3,6, à -0,73V à pH 4 et à -0,69V à pH 5. Aucun autre pic n'est identifié Le potentiel d'oxydation semble évoluer vers des valeurs négatives lorsque le pH augmente. Cette influence du pH doit faire l'objet de manipulations ultérieures afin de comprendre le mécanisme fin d'oxydation de la MHPG.



Superposition des voltampérogrammes cycliques pour des concentrations croissantes en MHPG dans un tampon acétate de pH 3,6

Ampérométrie – mode batch

De manière préliminaire, nous avons sélectionné la valeur de potentiel d'oxydation de -0,5V à pH 3,6 car elle nous permet de mettre en évidence pour l'instant une meilleure relation linéaire entre les différents résultats obtenus (courbe bleue R^2 de 0,978) et ce pour une gamme de concentration allant de 2,45 à 17,25 ng/mL pour une LOQ de 5,6 ng/mL.

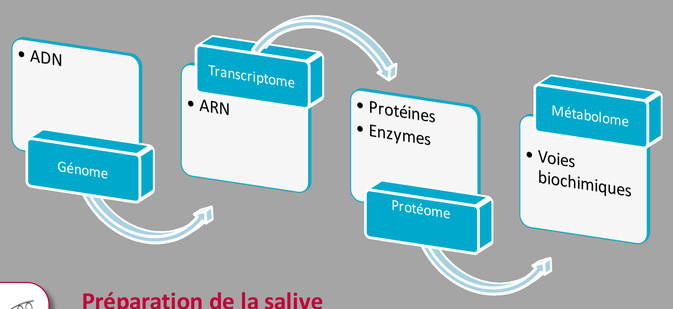


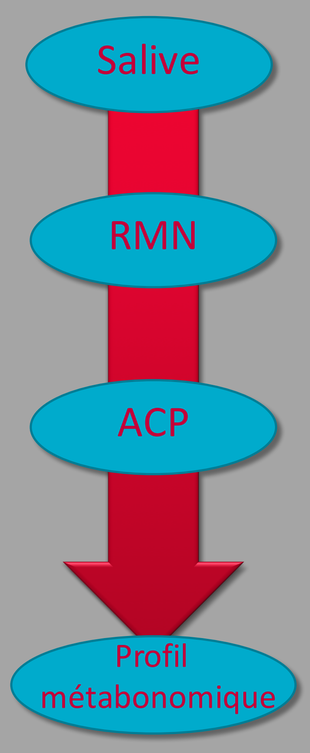
Analyse LC-EC

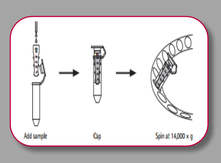
Dans une prochaine étape, nous allons coupler notre détection électrochimique à une chromatographie liquide afin d'analyser en routine les échantillons prélevés. Cette méthode devra être à même de séparer avec sélectivité la MHPG et de la quantifier dans la gamme de concentration la plus faible possible et ce en adéquation avec les concentrations physiologiques connues. Elle fera l'objet à l'étape ultime d'une validation analytique.

Profilage métabonomique

La métabonomique est l'étude globale des métabolites (poids moléculaire < 1000 Da) à partir de fluides ou de tissus biologiques.
Cette étude, réalisée à l'aide de techniques de résonnance magnétique nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse, permet d'établir un profil correspondant à l'état physiologique d'un système, d'un organe ou d'un tissu.
L'établissement de ces profils permet d'identifier des signatures métaboliques ou des biomarqueurs impliqués dans les phénomènes étudiés.



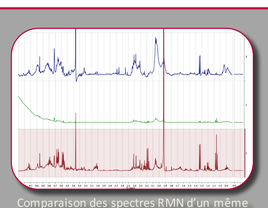




Préparation de la salive

La préparation de l'échantillon débute par une micro centrifugation filtrante pour libérer la salive de ses plus grosses molécules (protéines) afin d'améliorer la qualité du signal en RMN. S'ensuit l'ajout d'un tampon phosphate et d'une référence (TSP) deutérés.

L'échantillon est analysé par RMN avec une séquence NOESY couplée à une présaturation afin d'atténuer le signal de l'eau.

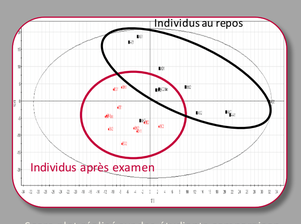

Comparaison des spectres RMN d'un même échantillon de salive :1 : micro filtration,, 2 : Lyophilisation , 3 : Sans préparation particulière

Spectres RMN

Le spectre obtenu, contient les signaux émis par chacune des molécules présentes dans l'échantillon.
Ce spectre est ensuite traité par des techniques d'analyse multivariées (Analyses en composantes principales)

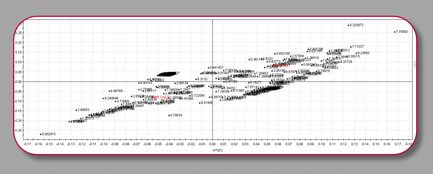
Score plot et loadings plot

Le score plot classe les différents échantillons en fonction de leur contenu en métabolites. Les loadings quant à eux sont l'expression de tous les signaux du spectre RMN, c'est à dire l'ensemble des métabolites présents dans les échantillons.
Cette représentation permet ainsi de distinguer des groupes d'individus, de rendre compte de l'évolution du profil métabolique au cours du temps.



Score plot réalisé sur des étudiants comparaison situation de repos par rapport à la sortie d'un examen

Comparaison des Profils Métaboliques d'étudiant à la sortie d'un examen par rapport à une situation de repos	
Plus intense	Alpha hydroxy n butyrate / n Butyrate
	Propionate
	Beta hydroxybutyrate
	Alphahydroxybutyrate / hydroxyvalérate
	Acétate
	Proline
	Valine / acétoacétate / alpha amino butyrate
	5 aminopentanoate
	Arabinose
Moins intense	Lactate
	Glucose
	Allantoïne
	Urée
	3,4 dihydroxymandelate


Loadings plot réalisé sur des étudiants (comparaison situation de repos par rapport à la sortie d'un examen)

Conclusion et perspectives

Nous proposons ici une double approche innovante à partir de la salive.
D'abord, une approche non ciblée avec le profilage métabonomique et ensuite, une approche plus spécifique avec la quantification d'un biomarqueur, la MHPG.
Les tests de simulation avec collecte de salive sont en cours et permettront de mesurer précisément la fatigue mentale en mettant en parallèle différents paramètres physiologiques avec l'analyse de la salive et la prise de voix des sujets.

Références

1. M. Mitona et al. In Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 2008
2. K. Okuno et al. In Psychiatry Res. , vol. 186, no. 2–3, pp. 326–32, Apr. 2011
3. H. Okamura et al. In Int. J. Psychophysiol. vol. 78, no. 3, pp. 209–14, Dec. 2010
4. T. Okumura et al. In J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. vol. 694, no. 2, pp. 305–316, Jul. 1997
5. S. Yamada et al. In Psychiatry Research pp. 217–223, 2000
6. Li et al. In Biological psychology 73, 209–211, 2006