Évaluer les états émotionnels : profilage métabonomique et quantification d'un biomarqueur salivaire

G. Romoaldo[1,2], S. Hambye[1], V. Tagliatti[2], J-M. Colet[2], B. Blankert[1]

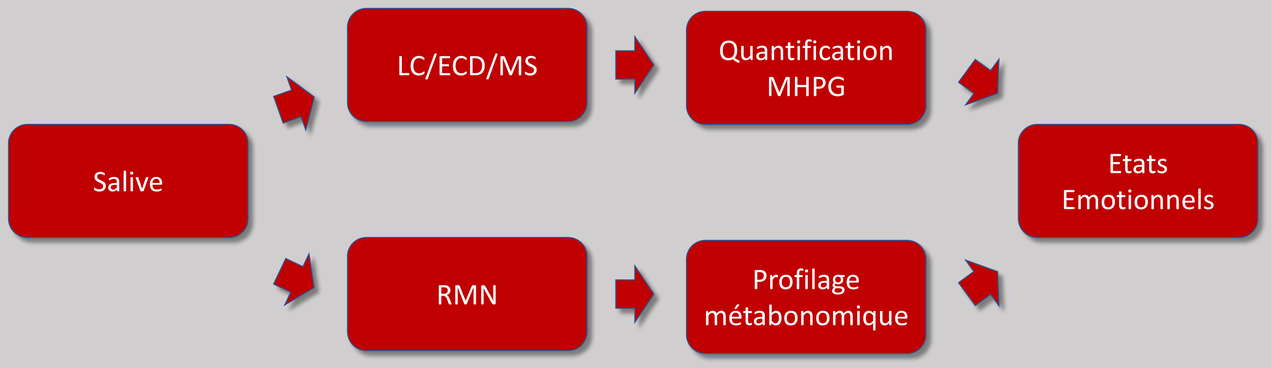
[1] Laboratoire d'Analyse pharmaceutique - [2] Laboratoire de Biologie Humaine et Toxicologie

Université de Mons - Place du Parc, 20 B 7000 Mons, Belgique

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), 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 du stress ainsi que de la fatigue et la variabilité de la composition de la salive en terme de métabolites.



Methodes

Quantification d'un Biomarqueur : MHPG

La MHPG est 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 stress, de fatigue et à la charge cognitive du sujet[2, 3, 4].

La MHPG étant électrochimiquement active, nous avons choisi d'étudier le comportement électrochimique de cette molécule dans la salive afin de la quantifier.

Première étape de travail en mode batch, système à trois électrodes (GC, Ag/AgCl/Pt) dans cellule de 5mL : détermination des conditions idéales en terme de tampon, de pH et de potentiel d'oxydation (Fig. 2 et 3)

Deuxième étape : transfert de cette méthode vers une séparation par UPLC avec détection électrochimique sur cellule électrochimique en flux ultraquantitative (Antec). Les produits d'oxydation sont ensuite détectés et identifiés par MS.

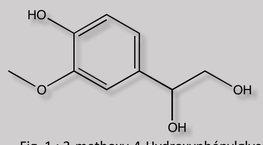


Fig. 1 : 3-methoxy-4-Hydroxyphénylglycol (MHPG)

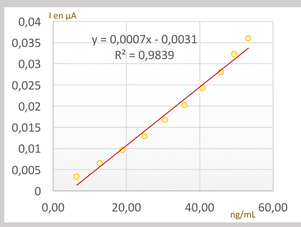


Fig. 2 : Droite de calibration : Intensité du courant en fonction de [MHPG] - Milieu utilisé: tampon acétate 0,05M pH 3,61 - Gamme de linéarité : 7 à 53 ng/mL

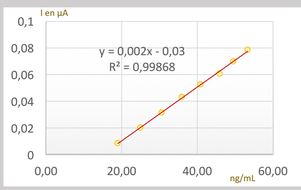
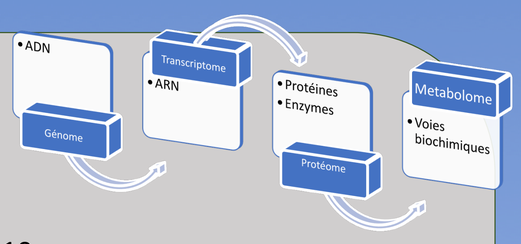


Fig. 3 :Droite de calibration : intensité du courant en fonction de [MHPG] - milieu : salive artificielle Gamme de linéarité : 19 à 53 ng/mL

Profilage métabonomique



Contexte : étude préliminaire sur un groupe de 10 étudiants en condition de repos et à la sortie d'un examen.

Préparation de la salive

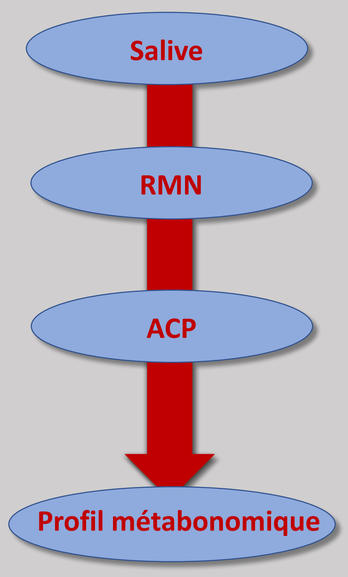
Ultrafiltration (membrane 3KDa) par centrifugation (14000g) des échantillons (meilleure condition par comparaison avec la lyophilisation et la salive brute cf. Fig. 5)

Passage RMN NOESY Presat 128 scans

(500µL de salive + 150 µL d'un mélange tampon phosphate/TSP/Azide de Na dans D_2O)

Analyse des résultats

Comparaison des spectres RMN par Analyse en composante principale (ACP) sur SIMCA P+.



Résultats

Quantification MHPG

Première étape

Potentiel d'oxydation : **+0,75V** sélectionné par voltampérométrie cyclique (Fig.4).

Transfert de méthode (en cours)

UPLC-ECD-MS : Phase mobile : gradient ACN : 5% > H_20 : 5%

Temps d'analyse 6 min

Débit 0,200 mL /min

Conditions électrochimiques :

Reactor cell : électrode GC

Potentiel d'oxydation E_0 calculé par rapport à l'électrode de référence Pd/H_2(Hyref © - Antec) : **+0,50V**

L'analyse de solutions standard de MHPG (Fig. 5 et 6) permet d'obtenir un bon signal. La méthode doit encore être optimisée de manière à obtenir une droite de calibration en vue d'une validation ultérieure sur des échantillons de salive.

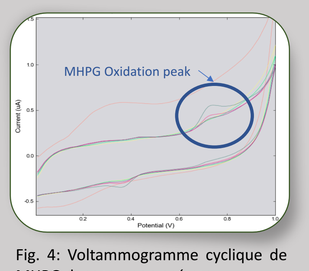


Fig. 4: Voltammogramme cyclique de MHPG dans tampon acétate 0,05 M - pH = 3,6 - Scan 0 à + 1 V (0,1 V/s)

Potentiels d'oxydation de la MHPG en fonction du pH (V)			
Concentration (ng/mL)	pH 3,6	pH 4	pH 5
2,45	+ 0,70	+ 0,74	+ 0,69
4,80	+ 0,72	+ 0,75	+ 0,71
7,07	+ 0,71	+ 0,74	+ 0,70
9,30	+ 0,72	+ 0,74	+ 0,71
13,40	+ 0,73	+ 0,71	+ 0,7
15,30	+ 0,72	+ 0,72	+ 0,69
17,25	+ 0,72	+ 0,72	+ 0,72
Moyenne	+ 0,72	+ 0,73	+ 0,70

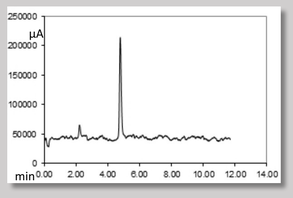


Fig. 5 : Chromatogramme obtenu sur le Roxy avec E_0 = 0,50V Suite à l'injection de 10µL de solution aqueuse standard à 100ng/mL de MHPG.

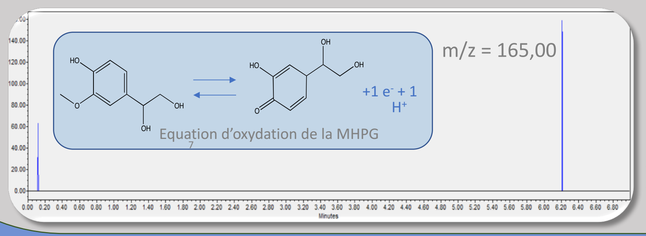


Fig. 6 : Superposition des chromatogrammes SIR@165,00 Da du Blanc (eau mQ) et d'une solution aqueuse standard à 100 ng/mL de MHPG

Profilage métabonomique

La comparaison des spectres RMN (Fig.7) par ACP (Fig. 8) a permis d'établir la discrimination de deux groupes distincts correspondants à chacune des conditions évaluées.

L'analyse des *loadings plots* correspondants (Fig. 9) permet d'identifier les métabolites qui s'expriment de façon plus intense et qui sont susceptibles d'être responsable de la discrimination des deux groupes.

Les métabolites identifiés sont présentés dans le tableau ci dessous.

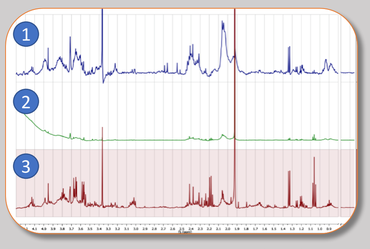


Fig. 7 : Comparaison des spectres RMN d'un même échantillon de salive :
1 : Ultra filtration 2 : Lyophilisation , 3 : Sans préparation particulière

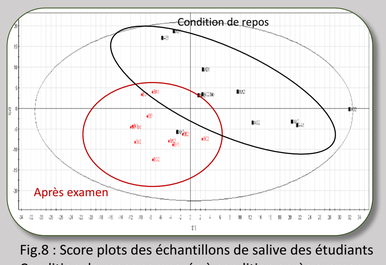


Fig.8 : Score plots des échantillons de salive des étudiants Condition de repos comparée à condition après examen.

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

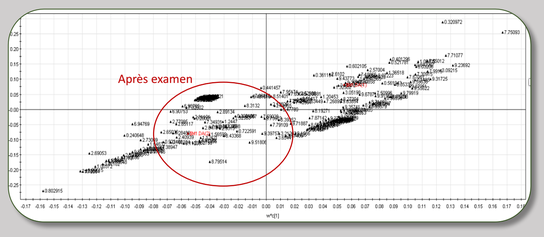


Fig. 9 : Loadings plots de tous les métabolites des étudiants dans les deux conditions.
Les métabolites situés dans la zone "après examen" sont susceptibles d'être responsables de la dichotomie de ces deux conditions expérimentales.

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. Une méthode de quantification basée sur une méthode UPLC/ED/MS est en cours de développement et pourra être employée en routine après validation dans les semaines à venir.

Les tests de simulation avec collecte de salive sont en cours et permettront de mesurer précisément la fatigue mentale et le stress en mettant en parallèle différents paramètres physiologiques avec l'analyse de la salive, du rythme cardiaque et de la 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