

2019-2020

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Qualification en D.E.S Ophtalmologie

TEAR METABOGRÉN

Évaluation métabolomique des larmes dans le
syndrome de Sjögren primaire

ASSAD-BORDURE Sophie

Née le 14 juillet 1991 à Paris

Sous la direction de M. le Docteur URBANSKI Geoffrey

Membres du jury

| | | |
|-------------------------------------|--|-----------|
| M. le Professeur Reynier Pascal | | Président |
| M. le Docteur Urbanski Geoffrey | | Directeur |
| M. le Docteur Gohier Philippe | | Membre |
| M. le Docteur Chao de la Barca Juan | | Membre |
| M. le Docteur Lavigne Christian | | Membre |

Soutenue publiquement le :
15 octobre 2020

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Sophie Assad-Bordure
déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiante le **12/09/2020**

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie : Pr Frédéric Lagarce

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

| | | |
|-----------------------------|--|-----------|
| ABRAHAM Pierre | Physiologie | Médecine |
| ANNWEILER Cédric | Gériatrie et biologie du vieillissement | Médecine |
| ASFAR Pierre | Réanimation | Médecine |
| AUBE Christophe | Radiologie et imagerie médicale | Médecine |
| AUGUSTO Jean-François | Néphrologie | Médecine |
| AZZOUZI Abdel Rahmène | Urologie | Médecine |
| BAUFRETON Christophe | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire | Médecine |
| BENOIT Jean-Pierre | Pharmacotechnie | Pharmacie |
| BEYDON Laurent | Anesthésiologie-réanimation | Médecine |
| BIGOT Pierre | Urologie | Médecine |
| BONNEAU Dominique | Génétique | Médecine |
| BOUCHARA Jean-Philippe | Parasitologie et mycologie | Médecine |
| BOUVARD Béatrice | Rhumatologie | Médecine |
| BOURSIER Jérôme | Gastroentérologie ; hépatologie | Médecine |
| BRIET Marie | Pharmacologie | Médecine |
| CAILLIEZ Eric | Médecine générale | Médecine |
| CALES Paul | Gastroentérologue ; hépatologie | Médecine |
| CAMPONE Mario | Cancérologie ; radiothérapie | Médecine |
| CAROLI-BOSC François-xavier | Gastroentérologie ; hépatologie | Médecine |
| CHAPPARD Daniel | Cytologie, embryologie et cytogénétique | Médecine |
| CONNAN Laurent | Médecine générale | Médecine |
| COUTANT Régis | Pédiatrie | Médecine |
| CUSTAUD Marc-Antoine | Physiologie | Médecine |
| DE CASABIANCA Catherine | Médecine Générale | Médecine |
| DESCAMPS Philippe | Gynécologie-obstétrique | Médecine |
| D'ESCATHA Alexis | Médecine et santé au Travail | Médecine |
| DINOMAIS Mickaël | Médecine physique et de réadaptation | Médecine |
| DIQUET Bertrand | Pharmacologie | Médecine |
| DUBEE Vincent | Maladies Infectieuses et Tropicales | Médecine |
| DUCANCELLA Alexandra | Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière | Médecine |

| | | |
|--------------------------|---|-----------|
| DUVAL Olivier | Chimie thérapeutique | Pharmacie |
| DUVERGER Philippe | Pédopsychiatrie | Médecine |
| EVEILLARD Mathieu | Bactériologie-virologie | Pharmacie |
| FAURE Sébastien | Pharmacologie physiologie | Pharmacie |
| FOURNIER Henri-Dominique | Anatomie | Médecine |
| FURBER Alain | Cardiologie | Médecine |
| GAGNADOUX Frédéric | Pneumologie | Médecine |
| GARNIER François | Médecine générale | Médecine |
| GASCOIN Géraldine | Pédiatrie | Médecine |
| GOHIER Bénédicte | Psychiatrie d'adultes | Médecine |
| GUARDIOLA Philippe | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| GUILET David | Chimie analytique | Pharmacie |
| HAMY Antoine | Chirurgie générale | Médecine |
| HENNI Samir | Chirurgie Vasculaire, médecine vasculaire | Médecine |
| HUNAULT-BERGER Mathilde | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| IFRAH Norbert | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| JEANNIN Pascale | Immunologie | Médecine |
| KEMPF Marie | Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière | Médecine |
| LACCOURREYE Laurent | Oto-rhino-laryngologie | Médecine |
| LAGARCE Frédéric | Biopharmacie | Pharmacie |
| LARCHER Gérald | Biochimie et biologie moléculaires | Pharmacie |
| LASOCKI Sigismond | Anesthésiologie-réanimation | Médecine |
| LEGENDRE Guillaume | Gynécologie-obstétrique | Médecine |
| LEGRAND Erick | Rhumatologie | Médecine |
| LERMITE Emilie | Chirurgie générale | Médecine |
| LEROLLE Nicolas | Médecine Intensive-Réanimation | Médecine |
| LUNEL-FABIANI Françoise | Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière | Médecine |
| MARCHAIS Véronique | Bactériologie-virologie | Pharmacie |
| MARTIN Ludovic | Dermato-vénérérologie | Médecine |
| MAY-PANLOUP Pascale | Biologie et médecine du développement et De la reproduction | Médecine |
| MENEI Philippe | Neurochirurgie | Médecine |
| MERCAT Alain | Réanimation | Médecine |
| MERCIER Philippe | Anatomie | Médecine |
| PAPON Nicolas | Parasitologie et mycologie médicale | Pharmacie |
| PASSIRANI Catherine | Chimie générale | Pharmacie |
| PELLIER Isabelle | Pédiatrie | Médecine |
| PETIT Audrey | Médecine et Santé au Travail | Médecine |
| PICQUET Jean | Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire | Médecine |
| PODEVIN Guillaume | Chirurgie infantile | Médecine |
| PROCACCIO Vincent | Génétique | Médecine |
| PRUNIER Delphine | Biochimie et Biologie Moléculaire | Médecine |

| | | |
|------------------------------|--|-----------|
| PRUNIER Fabrice | Cardiologie | Médecine |
| REYNIER Pascal | Biochimie et biologie moléculaire | Médecine |
| RICHARD Isabelle | Médecine physique et de réadaptation | Médecine |
| RICHOMME Pascal | Pharmacognosie | Pharmacie |
| RODIEN Patrice | Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques | Médecine |
| ROQUELAURE Yves | Médecine et santé au travail | Médecine |
| ROUGE-MAILLART Clotilde | Médecine légale et droit de la santé | Médecine |
| ROUSSEAU Audrey | Anatomie et cytologie pathologiques | Médecine |
| ROUSSEAU Pascal | Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique | Médecine |
| ROUSSELET Marie-Christine | Anatomie et cytologie pathologiques | Médecine |
| ROY Pierre-Marie | Thérapeutique | Médecine |
| SAULNIER Patrick | Biophysique et biostatistique | Pharmacie |
| SERAPHIN Denis | Chimie organique | Pharmacie |
| TRZEPIZUR Wojciech | Pneumologie | Médecine |
| UGO Valérie | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| URBAN Thierry | Pneumologie | Médecine |
| VAN BOGAERT Patrick | Pédiatrie | Médecine |
| VENIER-JULIENNE Marie-Claire | Pharmacotechnie | Pharmacie |
| VERNY Christophe | Neurologie | Médecine |
| WILLOTEAUX Serge | Radiologie et imagerie médicale | Médecine |

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

| | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------|
| ANGOULVANT Cécile | Médecine Générale | Médecine |
| BAGLIN Isabelle | Chimie thérapeutique | Pharmacie |
| BASTIAT Guillaume | Biophysique et biostatistique | Pharmacie |
| BEAUVILLAIN Céline | Immunologie | Médecine |
| BELIZNA Cristina | Médecine interne | Médecine |
| BELLANGER William | Médecine générale | Médecine |
| BELONCLE François | Réanimation | Médecine |
| BENOIT Jacqueline | Pharmacologie | Pharmacie |
| BIERE Loïc | Cardiologie | Médecine |
| BLANCHET Odile | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| BOISARD Séverine | Chimie analytique | Pharmacie |
| CAPITAIN Olivier | Cancérologie ; radiothérapie | Médecine |
| CASSEREAU Julien | Neurologie | Médecine |
| CHAO DE LA BARCA | Juan-Manuel | Médecine |

| | | |
|----------------------------|---|-----------|
| CHEVALIER Sylvie | Biologie cellulaire | Médecine |
| CLERE Nicolas | Pharmacologie / physiologie | Pharmacie |
| COLIN Estelle | Génétique | Médecine |
| DERBRE Séverine | Pharmacognosie | Pharmacie |
| DESHAYES Caroline | Bactériologie virologie | Pharmacie |
| FERRE Marc | Biologie moléculaire | Médecine |
| FORTRAT Jacques-Olivier | Physiologie | Médecine |
| HAMEL Jean-François | Biostatistiques, informatique médicale | Médicale |
| HELESBEUX Jean-Jacques | Chimie organique | Pharmacie |
| HINDRE François | Biophysique | Médecine |
| KHIATI Salim | Biochimie et biologie moléculaire | Médecine |
| JOUSSET-THULLIER Nathalie | Médecine légale et droit de la santé | Médecine |
| JUDALET-ILLAND Ghislaine | Médecine Générale | Médecine |
| KUN-DARBOIS Daniel | Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie | Médecine |
| LACOEUILLE Franck | Biophysique et médecine nucléaire | Médecine |
| LEBDAI Souhil | Urologie | Médecine |
| LANDREAU Anne | Botanique/ Mycologie | Pharmacie |
| LEBDAI Souhil | Urologie | Médecine |
| LEGEAY Samuel | Pharmacocinétique | Pharmacie |
| LE RAY-RICHOMME Anne-Marie | Pharmacognosie | Pharmacie |
| LEPELTIER Elise | Chimie générale | Pharmacie |
| LETOURNEL Franck | Biologie cellulaire | Médecine |
| LIBOUBAN Hélène | Histologie | Médecine |
| LUQUE PAZ Damien | Hématologie; Transfusion | Médecine |
| MABILLEAU Guillaume | Histologie, embryologie et cytogénétique | Médecine |
| MALLET Sabine | Chimie Analytique | Pharmacie |
| MAROT Agnès | Parasitologie et mycologie médicale | Pharmacie |
| MESLIER Nicole | Physiologie | Médecine |
| MOUILLIE Jean-Marc | Philosophie | Médecine |
| NAIL BILLAUD Sandrine | Immunologie | Pharmacie |
| PAILHORIES Hélène | Bactériologie-virologie | Médecine |
| PAPON Xavier | Anatomie | Médecine |
| PASCO-PAPON Anne | Radiologie et imagerie médicale | Médecine |
| PECH Brigitte | Pharmacotechnie | Pharmacie |
| PENCHAUD Anne-Laurence | Sociologie | Médecine |
| PIHET Marc | Parasitologie et mycologie | Médecine |
| PY Thibaut | Médecine Générale | Médecine |
| RAMOND-ROQUIN Aline | Médecine Générale | Médecine |
| RINEAU Emmanuel | Anesthésiologie réanimation | Médecine |
| RIOU Jérémie | Biostatistiques | Pharmacie |
| ROGER Emilie | Pharmacotechnie | Pharmacie |
| SAVARY Camille | Pharmacologie-Toxicologie | Pharmacie |
| SCHMITT Françoise | Chirurgie infantile | Médecine |
| SCHINKOWITZ Andréas | Pharmacognosie | Pharmacie |

| | | |
|--------------------------------|--|-----------|
| SPIESSER-ROBELET Laurence | Pharmacie Clinique et Education Thérapeutique | Pharmacie |
| TANGUY-SCHMIDT Aline | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| TESSIER-CAZENEUVE Christine | Médecine Générale | Médecine |
| VENARA Aurélien | Chirurgie générale | Médecine |
| VIAULT Guillaume | Chimie organique | Pharmacie |

PROFESSEURS EMERITES

| | | |
|---------------------|-------------------------------------|----------|
| Philippe MERCIER | Neurochirurgie | Médecine |
| Dominique CHABASSE | Parasitologie et Médecine Tropicale | Médecine |
| Jean-François SUBRA | Néphrologie | Médecine |

AUTRES ENSEIGNANTS

| | | |
|-----------------------|------------------|-----------|
| AUTRET Erwan | Anglais | Médecine |
| BARBEROUSSE Michel | Informatique | Médecine |
| BRUNOIS-DEBU Isabelle | Anglais | Pharmacie |
| CHIKH Yamina | Économie-Gestion | Médecine |
| FISBACH Martine | Anglais | Médecine |
| O'SULLIVAN Kayleigh | Anglais | Médecine |

Mise à jour au 09/12/2019

REMERCIEMENTS

- **Aux membre du jury :**

À monsieur le Professeur Reynier Pascal,

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse. Vous m'avez conseillé et encouragé dès le début de ce projet. Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude.

À monsieur le Docteur Urbanski Geoffrey,

Geoffrey, je te remercie d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse. Merci pour ce beau projet, pour ta disponibilité et pour tes conseils avisés. Tu m'as aidé et accompagné tout au long de ces 3 années de travail, avec beaucoup de patience et je t'en remercie. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À monsieur le Docteur Gohier Philippe,

Merci de m'avoir accueilli avec bienveillance dans votre service. Je vous remercie également pour la formation que j'ai eu l'honneur de recevoir de votre part. Enfin, merci d'avoir accepté de juger mon travail. C'est un plaisir de prolonger mon activité dans le service à vos côtés. Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude.

À monsieur le Docteur Lavigne Christian,

Merci de m'avoir accueilli dans votre service durant mon internat. Vous me faites l'honneur de juger ce travail de thèse et je vous en remercie. Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude.

À monsieur le Docteur Chao de la Barca Manuel Juan,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail de thèse et je vous en remercie. Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude.

REMERCIEMENTS

▪ Aux équipes qui ont accompagné ma formation :

Au service d'Ophtalmologie du CHU d'Angers, qui m'a accueilli depuis mon premier semestre d'internat jusqu'à la fin.

Angélique, merci pour ta richesse intellectuelle, ton implication et ta modestie. Tu es un modèle pour beaucoup d'entre nous.

Aurélien, tu as été mon premier contact angevin. Merci pour ta formation, travailler avec toi fût un plaisir.

Fabien, merci pour ce binôme de dernier semestre !

Merci également aux Dr Hemade, Dr Haution, Dr Leruez, Dr Ebran, Dr Coisy.

Merci pour votre pédagogie et votre enseignement, qui ont rendu ces semestres si formateurs.

À l'équipe paramédicale (secrétaires, infirmières, IBODE, aides-soignantes) qui contribue chaque jour à nous aider à travailler dans les meilleures conditions possibles.

Une pensée pour mes anciens co-internes devenus chefs, avec qui ce fût un plaisir de travailler : Adrien, Mehdi, Bastien, Grégoire et Thomas.

Au service d'Ophtalmologie du CH de Laval, et plus particulièrement au Dr Bihl. Lionel, merci pour ce semestre mayennais et pour ta pédagogie au bloc opératoire, toujours dans la bonne humeur.

Au service d'Ophtalmologie du CH du Mans, merci pour ces deux semestres formateurs.

Au service d'Ophtalmologie du Centre Hospitalier de Saumur, à l'équipe médicale et paramédicale et notamment les IBODE, infirmières de consultation et secrétaires. C'est un plaisir de travailler à vos côtés.

Au service de Médecine Interne du CHU d'Angers, et plus particulièrement aux Dr Lavigne, Dr Beucher, Dr Urbanski et Dr Ghali. Merci pour votre accueil et pour votre formation. Ce fut un plaisir pour moi de travailler au sein de votre équipe. Petite dédicace à la formidable équipe d'internes que nous faisions (Carole, Sophie, Valentin, Mathilde, Aurélie, Aline et Raphaël) et à tous ces nouveaux bébés !

Au service d'ORL du CHU d'Angers, et plus particulièrement aux Pr Laccourreye, Dr Boucher, Dr Brecheteau, Dr Breheret et Dr Bizon. Merci pour ce semestre formateur, avec une équipe d'internes (Pierre P., Pierre R. et Marion) au top !

Au service d'Ophtalmologie de la fondation Rothschild et plus particulièrement aux Pr Cochereau, Dr Titah et Dr Doan : merci pour votre enseignement et pour votre accueil chaleureux.

REMERCIEMENTS

▪ À ma famille et mes amis

À mes parents : Que dire... Les mots sont faibles pour exprimer l'amour que je vous porte. Merci pour tout. Si je suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Vous m'avez soutenu et accompagné tout au long de ces années parfois difficiles, sans limite et sans faille. Merci pour votre amour, votre éducation, votre tolérance et votre bienveillance. Merci pour ce cocon familial que vous avez su nous créer. C'est le meilleur des remèdes.

Papa, merci pour ta positivité à toute épreuve.

Maman, merci pour ta tendresse, ta sensibilité et tes mots toujours réconfortants. Je vous aime et vous suis tellement reconnaissante.

À mon frère et ma sœur : cette fratrie inégalable. Jo, merci pour ton humour, tes blagues sont toujours entourées d'une tendresse infinie. Nour, ma confidente, ma sœur, merci pour tes conseils, tes râleries qui nous font rire et ton amour. Je vous aime.

À Bao : je suis heureuse que tu fasses partie de notre famille. Je n'aurais pas imaginé meilleure compagne pour Joseph. Je te considère comme ma sœur.

À toute la famille Bordure, en particulier Chantal, Philippe, Emmanuelle, Adrien et Lucas : merci de m'accueillir dans votre famille, les moments partagés ensemble sont toujours heureux. Vous êtes ma deuxième famille.

À toute ma famille, mes oncles et tantes et cousins/cousines : vous m'avez vu évoluer à travers ces longues années d'étude, avec toujours des mots bienveillants et des encouragements. Vivement qu'on fasse tous la fête ensemble.

À mes co-internes :

Maxime : meilleur co-interne! Quel bonheur de travailler avec toi. Merci pour ta gentillesse, ton humour et ton amitié qui m'est très précieuse. C'est un honneur de continuer à travailler à tes côtés.

Valentin : merci pour ta disponibilité et ton aide sans limite lors de mon premier semestre. C'est un plaisir de travailler à tes côtés, toujours dans la bonne humeur. Reste comme tu es, tu es un excellent médecin.

Guillaume : co-interne de choc de Laval ! Merci pour ton humour, tes blagues cachées et ta bonne humeur permanente.

À Camille, Benjamin, Anaïs, Laurie, Thibault, Aude, Anne-Laure, Marin, Tristan, Alix, Matthieu et Khadidja avec qui j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à travailler !

REMERCIEMENTS

À la team angevine : Nina, Seb, Marion, Maxime, Blaise, Marie L., Marie G., Pierre R, Jonathan, Caro, Oli, Arthur, qui rendez notre vie à Angers encore plus agréable !

À mes ami(e)s parisiens :

Maria : sans toi, l'internat à Angers n'aurait pas été le même. Tu es ma famille ici. Merci pour ton amitié, si importante, et vive les soirées devant le bachelor du 1^{ier} semestre avec la tisane au miel.

Ambre et Camille, nous avons traversé les années d'externat et d'internat ensemble, non sans rire et s'amuser. Merci pour votre amitié précieuse, votre humour, tous ces moments partagés ensemble. Vous êtes de vraies amies.

Jaehyo, Guillaume et Lucas : Je suis fière de ce que vous êtes devenus, et heureuse d'être toujours à vos côtés après toutes ces années. Je vous adore !

Camélia : je garde un souvenir mémorable de nos sous colles, de ces longues heures passées en conférence, qui ne seraient pas passées aussi facilement sans nos fous rire.

Chloé et Nesrine : nous nous connaissons depuis le lycée. Quel chemin nous avons parcouru depuis ! Et pourtant nous sommes toujours là, l'une pour l'autre. Merci pour votre amitié.

Berthille : nous avons partagé les aventures poney mongol ensemble, quel plaisir de te connaître !

Baptiste, le parisien devenu nantais, les moments partagés ensemble bien que rares sont toujours heureux !

À Pierre, mon évidence. Nous nous sommes connus le premier jour de l'internat pour ne plus nous quitter. Merci pour ton amour, ton humour, ta présence et ton soutien durant toutes ces années. Je suis fière d'être ton épouse. La vie à tes côtés est tellement plus douce. Je t'aime.

Liste des abréviations

Plan

Liste des abréviations

1. PRÉAMBULE

- 1.1 Épidémiologie
- 1.2 Définition du syndrome sec oculaire
- 1.3 Diagnostic du pSS
- 1.4 Mesure du syndrome sec oculaire
- 1.5 Problématique et objectifs de notre étude

2. RÉSUMÉ

3. INTRODUCTION

4. MATÉRIELS

- 4.1 Considération éthiques
- 4.2 Critères d'inclusion
- 4.3 Critères d'exclusion
- 4.4 Évaluation ophtalmologique
- 4.5 Data collection
- 4.6 Recueil des échantillons de larmes et extraction
- 4.7 Analyse métabolomique
- 4.8 Analyse statistique

5. RÉSULTATS

- 5.1 Caractéristiques cliniques des patients
- 5.2 Résultats de l'analyse métabolomique
 - 5.2.1 *Différence entre les patients pSS et témoins*
 - 5.2.2 *Variations de la signature métabolomique selon l'âge, le sexe et la présence d'anticorps anti-SSA*

6. DISCUSSION

7. CONCLUSION

8. BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIÈRES

ANNEXES

Tear Metabogren : évaluation métabolomique des larmes dans le syndrome de Sjögren primaire

1. PREAMBULE

1.1. Épidémiologie

Le syndrome de Sjögren primaire (pSS) est une des plus fréquentes connectivites. Son incidence a été estimée à 3,9/100000/an dans le comté d'Olmsted aux États Unis d'Amérique (1) et en Slovénie (2). La prévalence est évaluée entre 0,09% et 0,72% dans des populations adultes ce qui représenterait entre 50 000 et 350 000 patients en France (3) et constitue donc un enjeu de santé publique. Le pSS est une maladie systémique et peut se compliquer de diverses atteintes d'organes plus ou moins sévères : neuropathies périphériques, atteintes du système nerveux central, du parenchyme pulmonaire, cytopénies auto-immunes, néphropathies... La plus redoutée étant le lymphome, pour lequel existe un sur-risque important dans le pSS (4). Toutefois, la maladie se caractérise surtout par une infiltration lymphocytaire des glandes exocrines, notamment salivaires et lacrymales, responsable d'un syndrome sec diffus, ce qui en fait la morbidité.

La sécheresse oculaire représente 5 à 35% des motifs de consultation en ophtalmologie avec un sex-ratio de consultants de 9 femmes pour 1 homme (5). Cela constitue souvent le mode de révélation du pSS, les patients se présentant parfois avec des syndromes secs sévères, pouvant avoir des conséquences fonctionnelles et altérant leur qualité de vie.

1.2. Définition du syndrome sec oculaire

L'œil sec est défini comme « une maladie multifactorielle des larmes et de la surface oculaire, entraînant des symptômes d'inconfort, une gêne visuelle et une instabilité lacrymale, avec un risque d'atteinte de la surface oculaire. Il s'accompagne d'une augmentation de l'osmolarité du film lacrymal et d'une inflammation de l'unité fonctionnelle qui constitue la surface oculaire » (6).

Le film lacrymal est une structure élaborée et dynamique composée de 3 couches :

- Une couche lipidique : la plus externe, sécrétée par les glandes de Meibomius, situées dans le tarse : son rôle est la prévention de l'évaporation de la couche mucino-aqueuse, la lubrification de la cornée et des paupières au cours du clignement, le lissage du film lacrymal (ce qui en améliore les qualités optiques) et la protection contre la contamination par le sébum cutané.
- Une couche aqueuse : constituée d'eau à 98%, sécrétée par la glande lacrymale principale (pour la sécrétion réflexe) et les glandes lacrymales accessoires (pour la sécrétion basale). Elle joue un rôle antimicrobien essentiel grâce à un taux élevé de lysozyme et une concentration importante d'anticorps et permet également l'apport de nutriments, d'oxygène et une hydratation cornéenne prévenant la kératinisation qui entraînerait une opacification cornéenne.
- Une couche muqueuse : sécrétée par les cellules à mucus de la conjonctive. Elle constitue la couche la plus profonde du film lacrymal et elle permet l'adhésion du film lacrymal aux cellules épithéliales sous-jacentes.

Chacune de ces couches a son importance et permet au film lacrymal d'assurer ses différentes fonctions : protéger la cornée contre la dessiccation, maintenir une surface réfractive lisse, assurer une protection antimicrobienne et permettre une bonne oxygénation cornéenne.

La définition actuelle sépare classiquement les syndromes secs oculaires en 2 catégories : un déficit quantitatif avec hyposécrétion lacrymale (syndrome de Sjögren, déficience lacrymale, obstruction des canaux lacrymaux, prise de médicaments à effets systémiques tels que les antidépresseurs, les bêta-bloquants, les anti histaminiques) et un déficit qualitatif par excès d'évaporation pouvant être d'origine intrinsèque (anomalies de la statique palpébrale, faible fréquence des clignements, trouble fonctionnel des glandes de Meibomius, atrophie des glandes de Meibomius liées par exemple à un traitement par isorétinöine) ou extrinsèque (déficit en vitamine A, port de lentille de contact, collyres avec conservateurs, maladies inflammatoires de la surface oculaire) (7).

Au-delà des étiologies bien définies des syndromes secs oculaires, il existe également des facteurs de risque parmi lesquels les facteurs hormonaux (ménopause, diminution des hormones sexuelles) et le tabagisme notamment. Les modifications hormonales post-ménopausiques entraîneraient une altération des sécrétions lipidiques des glandes de Meibomius (7).

En pratique, les causes sont souvent intriquées, et il n'est pas rare que plusieurs causes de sécheresse oculaire soient associées chez un même patient. En particulier, chez les patients pSS avec une moyenne d'âge de 50-60 ans (8), l'association de plusieurs causes n'est pas rare (par exemple association d'un pSS et d'une atrophie des glandes de Meibomius dans un contexte post-ménopausique, dysfonctionnement meibomien associé, prise de médicaments pourvoyeurs de syndrome sec tels que les bêta bloquants, les anticholinergiques, ...).

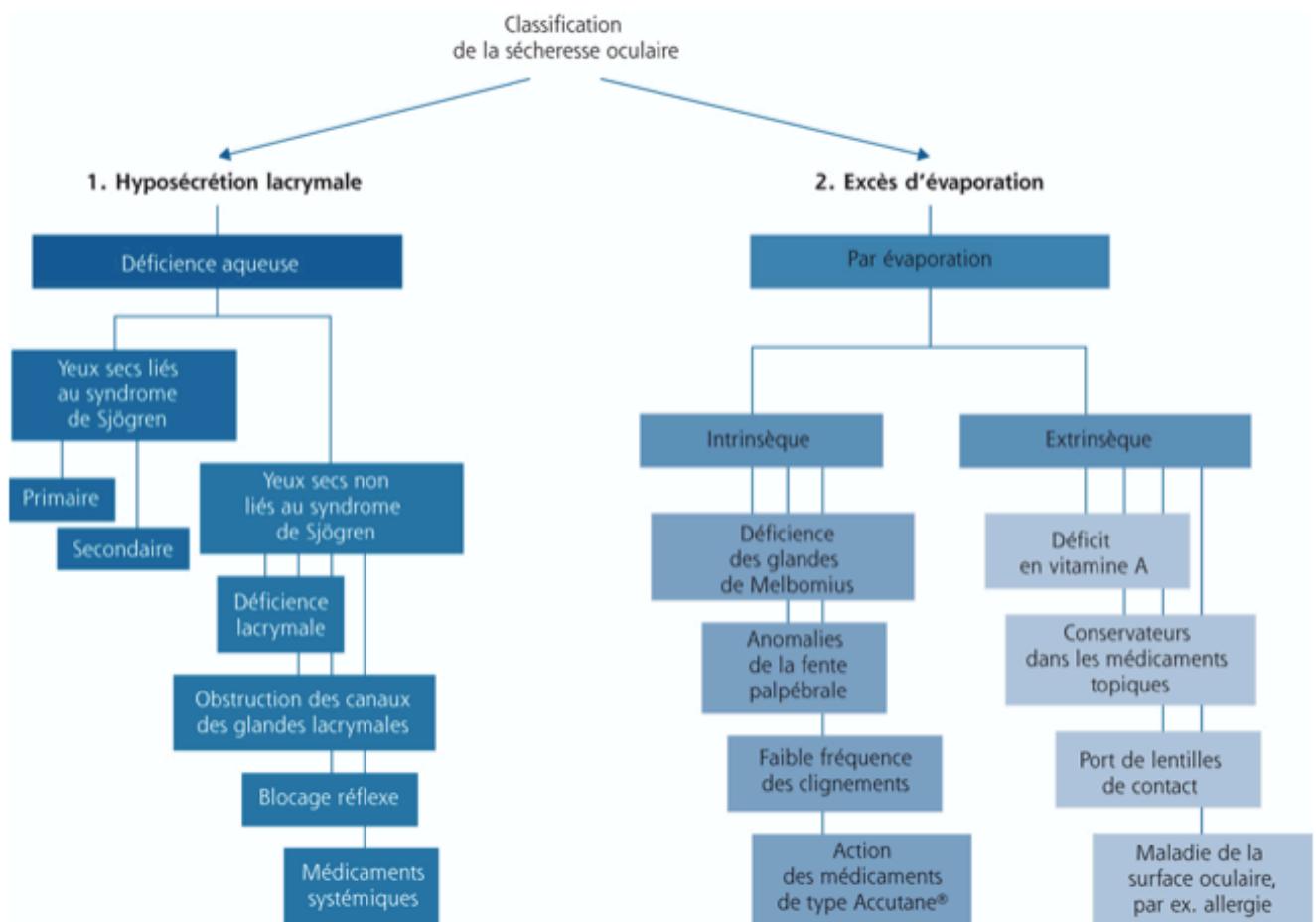


Figure 1 : Classification étiologique du syndrome sec oculaire, d'après Lemp et al. (7)

Le diagnostic du pSS repose sur des critères internationaux de classification. Les critères de classification actuellement en vigueur, dits ACR/EULAR 2016 (4), sont applicables à tout individu présentant un syndrome sec oculaire ou buccal subjectif ou une complication potentiellement relative à un pSS parmi celles détaillées dans le score ESSDAI (9). Le diagnostic de syndrome de Sjögren est retenu devant un score ≥ 4 parmi les 5 critères du tableau I, après élimination des diagnostics différentiels : irradiation de la tête et du cou, infection par le virus de l'hépatite C confirmée par PCR, SIDA, sarcoïdose, amylose, maladie du greffon contre l'hôte, maladie associée aux IgG4.

| Critères | Pondération |
|--|-------------|
| Glande salivaire labiale avec sialadénite lymphocytaire focale et un focus score ≥ 1 focus/ 4 mm^2 | 3 |
| Présence d'anticorps anti-SSA | 3 |
| Ocular Staining Score ≥ 5 (ou score de Van Bijsterveld ≥ 4) sur au moins un œil | 1 |
| Test de Schirmer ≤ 5 mm / 5 minutes sur au moins un œil | 1 |
| Débit salivaire non stimulé $\leq 0,1$ ml/minute | 1 |

Tableau I : Critères de classification ACR/EULAR 2016 du syndrome de Sjögren (4)

1.3. Mesure du syndrome sec oculaire

Parmi les critères de classification ACR/EULAR 2016, 3 tests sont relatifs au syndrome oculaire : le test de Schirmer, l'Ocular Staining Score (OSS) et le score de Van Bijsterveld, ce dernier étant toutefois peu utilisé.

Le test de Schirmer évalue l'aspect quantitatif de la production et permet de confirmer le déficit aqueux du film lacrymal. Une bandelette de papier filtre est placée au sein du cul-de-sac conjonctival inférieur à la jonction entre tiers externe et les deux-tiers internes. Au bout de 5 minutes, le papier filtre est retiré. La longueur humidifiée par les larmes est quantifiée par les graduations du test. Le test est considéré comme normal si l'imprégnation est supérieure à 15

mm, douteux entre 6 et 15 mm, et pathologique si inférieur ou égal à 5 mm (7). Le seuil de 5 mm sur au moins un œil est retenu comme critère diagnostique dans la classification ACR/EULAR 2016.

L’Ocular Staining Score (OSS) permet une approche plus qualitative du film lacrymal, évaluant la présence et l’intensité de défauts cornéens épithéliaux et conjonctivaux. La quantification de l’OSS passe par l’évaluation de l’atteinte épithéliale cornéenne grâce à un marquage à la fluorescéine et de l’atteinte conjonctivale grâce au vert de lissamine. Les atteintes conjonctivales et cornéennes sont chacune gradées de 0 à 3, selon le nombre de « dots » ou spots de prise du colorant, auxquels s’ajoutent des points supplémentaires en cas de kératite filamentuse, de prise de fluorescéine au centre de la cornée et de patch de prise de colorant, que ce soit au niveau cornéen ou conjonctival. Le score maximal sur chaque œil est donc de 12.

L’OSS est considéré comme anormal lorsqu’il est supérieur ou égal à 3 (10) mais constitue un critère diagnostique du pSS selon les critères ACR/EULAR 2016 lorsqu’il est supérieur ou égal à 5 pour au moins un œil.

| Conjunctiva (Lissamine Green) | | Cornea (Fluorescein) | |
|----------------------------------|--------|-------------------------|------|
| Grade | Dots | Grade | Dots |
| 0 | 0-9 | 0 | 0 |
| 1 | 10-32 | 1 | 1-5 |
| 2 | 33-100 | 2 | 6-30 |
| 3 | >100 | 3 | >30 |

Extra points-fluorescein only:
(Add to fluorescein score)

+1 : patches of confluent staining
+1 : staining in pupillary area
+1 : one or more filaments

Figure 2 : Ocular Staining Score (OSS) (11)

1.4. Problématique et objectifs de l'étude

Le pSS est une maladie de système avec un risque d'atteinte extra-glandulaire, nécessitant un suivi spécifique par un médecin interniste ou un rhumatologue contrairement à la majorité des autres causes de syndromes secs. Néanmoins, porter avec certitude le diagnostic de pSS n'est pas toujours évident.

Dans les formes débutantes, certains items des critères de classification objectivant le syndrome sec oculaire et/ou buccal peuvent manquer. Cette situation peut être problématique notamment lorsque les patients se présentent avec une forme d'emblée compliquée d'une atteinte extra-glandulaire pour laquelle existe un enjeu thérapeutique. Ainsi, l'identification de marqueurs complémentaires pourrait constituer une aide au diagnostic et pourrait permettre éventuellement l'identification précoce des patients présentant un pSS.

Même si les tests sécrétoires permettent théoriquement d'orienter vers un type de syndrome sec (insuffisance lacrymale ou évaporation), la pratique est plus complexe et les situations cliniques souvent composites. Ainsi, même si la pharmacopée des substituts lacrymaux est large, leur efficacité est souvent imparfaite, probablement en raison d'une difficulté à cibler une thérapeutique pour un patient. Par ailleurs, il n'existe pas de substituts lacrymaux ayant été élaborés spécifiquement pour les patients atteints de pSS. Sachant que les mécanismes aboutissant au syndrome sec oculaire peuvent être multiples, une seule thérapeutique peut s'avérer insuffisante voire délétère, par exemple dans le cas de ciclosporine topique utilisée à but immunosupresseur, si les patients ne sont pas ciblés. Ainsi, identifier des biomarqueurs spécifiques du pSS permettrait de mieux cibler les patients et d'adapter les thérapeutiques.

Le métabolome représente la réponse terminale d'un organisme à une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou à tout autre facteur susceptible de perturber son fonctionnement (12). Les larmes étant composées d'une multitude de métabolites (acides aminés, lipides, glucides), l'identification de plusieurs biomarqueurs spécifiques du pSS pourrait permettre d'établir une signature spécifique du pSS en comparaison à d'autres causes de syndromes secs oculaires.

Les objectifs de cette étude sont donc :

- 1/ Rechercher une signature métabolomique au sein des larmes chez des patients présentant un syndrome sec oculaire dans le cadre d'un pSS répondant aux critères ACR/EULAR 2016 en comparaison à des patients présentant un syndrome sec oculaire non attribuable à un pSS et d'origine non auto-immune.
- 2/ Rechercher des variations de la signature métabolomique dans les larmes chez les

patients présentant un pSS selon :

- L'âge et le sexe
- Le statut immunologique : présence ou absence d'anticorps anti-SSA
- La sévérité du syndrome sec oculaire selon les résultats du test de Schirmer, de l'Ocular Staining Score et la présence ou non d'une dysfonction des glandes de Meibomius.

2. RÉSUMÉ

Introduction :

Le diagnostic de syndrome de Sjögren primaire (pSS) repose sur des critères de classification comprenant des tests fonctionnels témoignant d'une atteinte lacrymale évoluée. Or, limiter la destruction des glandes lacrymales est un enjeu majeur pour réduire la morbidité du pSS. Ainsi l'identification de métabolites lacrymaux précocement perturbés pourrait servir de biomarqueur diagnostique. Les objectifs de cette étude étaient de rechercher une signature métabolomique des larmes chez des patients présentant un pSS nouvellement diagnostiqué, en comparaison à des patients présentant un syndrome sec oculaire non lié au pSS, et d'évaluer les variations de cette signature métabolomique selon la sévérité du syndrome sec oculaire.

Méthodes :

Nous avons comparé les compositions en métabolites des larmes de 40 patients pSS à 40 patients contrôles présentant un syndrome sec, par une approche métabolomique ciblée (Kit Biocrates® AbsoluteIDQ p180) selon une technique couplant chromatographie en phase liquide et spectromètre de masse (HPLC-MS/MS). Les larmes étaient recueillies sur bandelettes de test de Schirmer. Le plan d'analyse statistique comportait une étape de sélection de variables par régression logistique avec régularisation de type élastic-net, puis une grid search comparant régression logistique et random forest. L'association de la signature métabolomique et du statut pSS était ensuite analysée selon la sévérité du syndrome sec mesurée par le test de Schirmer, l'Ocular staining score (OSS) et la présence d'une dysfonction meibomienne. Les analyses statistiques ont été menées avec les logiciels R software et SPSS.

Résultats :

Parmi les 188 métabolites testés, nous avons mis en évidence une signature métabolomique composée de 9 métabolites d'intérêt. Les capacités prédictives de la signature métabolomique étaient intéressantes (ROC-AUC 0.83) et restaient spécifiques du pSS après ajustement sur l'âge, le sexe, la présence d'anticorps anti-SSA et la sévérité du syndrome sec. Seule la composante lipidique de la signature variait selon le score OSS ($p=0.015$).

Conclusion :

La signature métabolomique identifiée au sein des larmes de patients pSS, en comparaison à des patients avec d'autres causes de syndromes secs pourrait servir de biomarqueur lacrymal précoce du pSS et identifier des pistes physiopathologiques pour l'élaboration de traitements spécifiques.

3. INTRODUCTION

Le pSS est une des connectivites les plus fréquentes, caractérisé par une infiltration lymphocytaire des glandes exocrines, responsable d'un syndrome sec oculaire et buccal, et pouvant entraîner également des manifestations extra-glandulaires. La sécheresse oculaire est fréquemment le mode de révélation de la maladie. Le pSS serait responsable d'environ 10% des syndromes secs oculaires (13). La sécheresse oculaire est néfaste pour la conjonctive et la cornée, responsable de complications allant de modestes (kératite ponctuée superficielle) à sévères avec retentissement sur l'acuité visuelle (kératite filamentuse, symblépharon) (14).

Le principal mécanisme de sécheresse oculaire dans le pSS est quantitatif par altération de la sécrétion lacrymale aqueuse via une atteinte directe de la glande lacrymale. Cependant, il n'est pas rare qu'une atteinte qualitative du film lacrymal par dysfonctionnement meibomien soit retrouvée. De plus, les patients pSS ayant une moyenne d'âge de 50 à 60 ans, d'autres causes de sécheresse oculaire (iatrogènes notamment) peuvent être associées (15) .

L'efficacité de substituts lacrymaux est souvent imparfaite en raison d'une difficulté à cibler le mécanisme pathologique en cause, les causes de sécheresse chez les patients pSS étant souvent intriquées. A titre d'exemple, des immunosuppresseurs topiques, comme la ciclosporine peuvent être introduits devant des syndromes secs sévères et compliqués pour traiter le caractère inflammatoire de la sécheresse, mais peuvent tout autant aggraver le syndrome sec de par leur iatrogénie. La compréhension des différents mécanismes physiopathologiques régissant le syndrome sec oculaire paraît donc indispensable afin de mettre en œuvre de nouvelles thérapeutiques adaptées.

Dans le même sens, la recherche de biomarqueurs du syndrome sec oculaire se développe et certaines équipes ont mis en évidence l'intérêt de certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF

alpha, alpha 1 anti trypsine, métalloprotéinase 9) (16,17) certaines protéines telles la Proline-rich 4 (18,19) des médiateurs apoptotiques et agents oxydants (20,21).

Toutefois, ces études mélangent souvent les causes de syndrome sec. Or, les perturbations de composition de larmes peuvent notablement différer en fonction de la cause. Particulièrement dans le pSS, l'atteinte des glandes lacrymales diffère des autres causes, en lien avec une infiltration lymphocytaire et une inflammation chronique.

L'approche -omique a permis de radicalement changer notre approche de certaines maladies et particulièrement en ophtalmologie. Des analyses protéomiques et métabolomiques ont ainsi été réalisées sur des larmes (22), mais également sur l'humeur aqueuse (23,24) et sur le vitré (25). Récemment, une signature métabolomique dans le plasma des sujets atteints de pseudoexfoliation capsulaire, première cause de glaucome secondaire, a été mise en évidence (26). L'identification de profils protéomiques et métabolomiques permettrait ainsi de mieux comprendre les pathologies, et d'envisager le développement de nouvelles thérapeutiques.

Chen et al. ont récemment observé une variation du profil métabolomique des larmes chez des patients présentant un syndrome sec oculaire comparativement à des patients contrôles, avec une signature de 34 métabolites discriminants, et notamment l'acide 3-hydroxyanthranilique augmenté chez les malades, métabolite présentant des propriétés anti-oxydantes (22). Galbis Estrada et al. ont également observé des différences de composition métabolomique entre les larmes de patient ayant un syndrome sec comparativement à des témoins sains, ces différences portant sur le glutamate et les lipides, diminués chez les patients ayant un syndrome sec (27).

Une étude protéomique a récemment identifié la métalloprotéinase 3 et la lipocalin-1 comme potentiels biomarqueurs du syndrome sec oculaire chez les patients ayant un syndrome de Sjögren (SS) (28). Toutefois, à notre connaissance, il n'existe aucune étude métabolomique

des larmes spécifiques au pSS. De plus, la plupart des études -omiques sur les larmes comparaient des patients avec syndrome sec oculaire à des témoins sains sans syndrome sec, sans faire de distinction entre les différents mécanismes, ni en fonction de la sévérité du syndrome sec.

La précocité du diagnostic et donc de la prise en charge du pSS pourrait être un élément déterminant à l'avenir pour limiter la progression de la maladie et notamment la destruction des glandes exocrines. Or, dans les critères de classification actuellement en vigueur, les seuils des tests sécrétoires sont bas (29), témoignant d'une atteinte évoluée. Cela rend difficile le diagnostic précoce. Les larmes étant composées d'une multitude de métabolites, l'analyse métabolomique des larmes de patients pSS permettrait d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs spécifiques du pSS, qui pourrait aider à l'avenir au diagnostic précoce et à guider vers des traitements spécifiques.

Les objectifs de cette étude étaient i) de rechercher une signature métabolomique des larmes chez des patients présentant un syndrome sec oculaire dans le cadre d'un pSS répondant aux critères ACR/EULAR 2016 en comparaison à des patients présentant un syndrome sec oculaire non attribuable à un pSS et d'origine non auto-immune, ii) d'évaluer les variations de cette signature métabolomique selon l'âge, le sexe et la sévérité du syndrome sec oculaire.

4. MÉTHODES

4.1. Considérations éthiques

Le protocole METABOGRÉN a été approuvé par le comité éthique du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers (CPP DC2014-2224, AC2014-2329, Bioéthique n°2018/42) et a été mené en accord avec la déclaration d'Helsinki. Le consentement écrit des patients a été recueilli.

4.2. Critères d'inclusion

Nous avons inclus tous les patients ayant consulté dans le service de Médecine interne du CHU d'Angers et qui présentaient un syndrome sec objectif oculaire et/ou buccal entre le 01/05/2017 et le 31/05/2018.

Le syndrome sec oculaire objectif était défini par la positivité du test de Schirmer (résultats \leq 5 mm sur au moins un œil en 5 minutes) et/ou de l'OSS (score \geq 3) et/ou du break-up time test (BUT) (< 10 secondes sur au moins un des deux yeux).

Le syndrome sec buccal objectif était défini par un débit salivaire non stimulé $\leq 1,5$ mL/15 minutes.

Les patients étaient inclus jusqu'à la constitution d'un groupe de 40 cas et d'un groupe de 40 témoins. En l'absence d'équilibre entre le nombre de cas et de témoins, 40 patients étaient sélectionnés au hasard parmi le groupe comprenant plus de 40 sujets.

Les cas étaient les patients répondant aux critères ACR/EULAR 2016 pour le pSS. (cf tableau I)

Les témoins étaient les patients présentant un syndrome sec oculaire et/ou buccal objectif, ne répondant pas aux critères ACR/EULAR 2016 et ne présentant ni anticorps anti-SSA ni anticorps anti-SSB ni focus score ≥ 1 sur la biopsie des glandes salivaires accessoires.

4.3. Critères d'exclusion

Les patients avec un diagnostic connu de pSS étaient exclus.

Les autres critères d'exclusion étaient les suivants : patient présentant un syndrome de Sjögren secondaire, diagnostic d'une autre connectivite (lupus érythémateux systémique, syndrome des antiphospholipides, polyarthrite rhumatoïde, dermatomyosite, polymyosite, sclérodermie, syndrome de Sharp, fasciite de Shulman), diagnostic d'une maladie inflammatoire (sarcoïdose, maladie associée aux IgG4, vascularite à ANCA, périartérite noueuse, maladie de Kawasaki, purpura rhumatoïde, syndrome de Cogan, maladie de Behçet, maladie de Still, microangiopathie thrombotique), diagnostic d'un syndrome sec en lien avec une réaction « graft versus host » (GVH) sur allogreffe, prise d'un traitement immunosupresseur ou immunomodulateur par voie systémique, y compris une corticothérapie > 5 mg par jour depuis plus d'un mois, utilisation de traitements topiques oculaires à effet immunosupresseur, cancer solide (hors cutané non mélanome) actif ou en rémission depuis < 2 ans, lymphome actif ou en rémission depuis < 2 ans, non en lien avec un pSS (i.e. lymphome MALT de la parotide), insuffisance cardiaque systolique à fraction d'éjection du ventricule gauche altérée $\leq 30\%$, hypertension artérielle sévère ou non contrôlée, diabète déséquilibré défini par une HbA1c $> 8\%$, diabète avec microangiopathie sévère,

insuffisance respiratoire chronique nécessitant une oxygénothérapie continue, insuffisance rénale chronique avec Clearance de créatininémie selon MDRD ≤ 30 ml/min/1.73 m², pathologie mitochondriale ou métabolique génétique connue, maladie psychiatrique instable, grossesse en cours, non affiliation à un système de sécurité sociale et patient incapable de fournir un consentement éclairé et écrit pour la participation à la recherche.

4.4. Évaluation ophtalmologique

Les patients inclus bénéficiaient d'une évaluation ophtalmologique standardisée par un même praticien, comprenant la mesure de l'acuité visuelle de loin et de près exprimée selon l'unité log Mar (30), un examen détaillé du segment antérieur et des paupières en lampe à fente et un fond d'œil.

L'analyse quantitative de la sécrétion lacrymale était évaluée à l'aide des bandelettes de Schirmer-Plus (GECIS®, Neung sur Beuvron, France), avec mesure de la longueur de bandelette imprégnée de larmes au bout de 5 minutes. L'évaluation qualitative était faite en lampe à fente par la mesure du BUT (31) et la recherche d'un dysfonctionnement des glandes de Meibomius (32). Une approche globale du syndrome sec oculaire était réalisé par le calcul de l'OSS (11).

Pour les patients présentant une substitution lacrymale préalable, cette dernière était suspendue 48 heures avant l'évaluation ophtalmologique.

4.5. Data collection

Les autres données recueillies chez les patients inclus étaient le sexe, l'âge, la prise de médicaments à effet anticholinergique (7), la présence d'un tabagisme actif ou sevré.

4.6. Recueil des échantillons de larmes et extraction

Le recueil des échantillons de larmes a été réalisé à l'aide de bandelettes Schirmer-Plus (GECIS®, Neung sur Beuvron, France), dans des conditions stériles. Ce recueil a été réalisé en premier dans l'évaluation ophtalmologique afin de ne pas parasiter l'analyse métabolomique des larmes. Le relevé du test de Schirmer a été effectué à 5 minutes. Ensuite, les bandelettes étaient laissées en place jusqu'à obtention d'un volume minimal de 15 µL (soit une distance de 21 mm) sur les deux bandelettes au total.

Les 2 bandelettes imprégnées de larmes étaient transférées immédiatement dans des tubes Eppendorf® (Hambourg, Allemagne) et stockées à -80°C.

Pour l'extraction des larmes, ces dernières ont été immergées dans 20 µl de méthanol froid puis broyées puis centrifugées à 20000 g à +4°C pendant 5 minutes.

Le surnageant a ensuite été prélevé puis dessiqué et conservé à -80°C. Lors de l'analyse métabolomique, les échantillons ont été repris dans 20 µl de méthanol.

4.7. Analyse métabolomique

L'étude métabolomique a été réalisée sur 80 échantillons de larmes, 40 cas et 40 témoins.

L'analyse a été faite à l'aide d'un kit de 188 métabolites (Kit Biocrates® AbsoluteIDQ p180 (Biocrates® Life Sciences AG, Innsbruck, Austria). Les études ont été réalisées sur le

spectromètre de masse AB Sciex QTRAP 5500 (SCIEX, Villebon sur Yvette, France), permettant avec le kit la quantification de 188 métabolites, incluant 40 acyl-carnitines, 21 acides aminés, 21 amines biogéniques, 90 glycérophospholipides, 15 sphingolipides et la somme des hexoses.

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) était utilisée pour séparer les acides aminés des amines biogéniques avant la quantification par spectrométrie de masse.

Les autres métabolites ont été quantifiés par technique d'analyse en flux d'injection combinée à la spectrométrie de masse (AFI-MS/MS). Tous les réactifs pour l'analyse en LC-MS étaient fournis par VWR (Fontenay-sous-Bois, France) et Merck (Molsheim, France). La préparation des échantillons et les analyses ont été menées en utilisant les recommandations fournisseur.

Trois contrôles qualités à 3 niveaux de concentration, bas (QC1), modéré (QC2), élevé (QC3) étaient utilisés pour vérifier les performances analytiques des dosages. Une série de 7 dilutions des produits de calibration était disposée sur la plaque pour permettre la génération d'une courbe de calibration.

4.8. Analyse statistique

Statistiques générales :

Les données quantitatives étaient présentées en médiane et quartile (1^{ier} et 3^{ème} quartile). Les données qualitatives étaient exprimées en valeur absolue et en pourcentage. Les données quantitatives ont été comparées en utilisant un test t de Student ou un test de Mann-Whitney. Les données qualitatives ont été comparées en utilisant un test du Chi-2 ou un test de Fisher.

Le risque alpha était de 5%. Les analyses ont été menées avec le logiciel R software (version 4.0.1, R-project-org, Vienna, Austria) et SPSS (v23.0, IBM Corp, NY, USA).

Les packages R utilisés étaient : FactoMineR (33) ; Rpart 4.1-15 (34) ; glmnet v4.0-2 (35) ; caret v6.0-86 (36) ; randomForest v4.6-14 (37) ; pROC v1.16.2 (38).

Classement et prétraitement des données :

Les données brutes étaient examinées afin d'éliminer les métabolites présentant moins de 50% des valeurs de concentration dans la gamme de concentration tolérée, à l'exception des métabolites pour lesquels les pourcentage de valeur au-delà de la limite de détection différaient entre les pSS et les contrôles ($p<0.05$). Les concentrations des métabolites étaient ensuite standardisées.

Nous avons d'abord effectué une approche non supervisée à l'aide d'une analyse en composantes principales pour rechercher des regroupements spontanés et des outliers majeurs. En cas d'outliers, les données étaient analysées mais non exclues.

Sélection des métabolites d'intérêt :

Nous avons séparé la population de l'étude en trois jeux avec stratification selon l'âge, le sexe et le statut pSS ou contrôles : un jeu d'entraînement de 34 cas et 34 contrôles, un jeu de validation de 5 cas et 5 contrôles et un jeu de test de 6 cas et 6 contrôles. Pour l'étape de sélection des métabolites d'intérêt, nous avons utilisé une régression logistique avec régularisation de type Elastic-net. Toutes les valeurs du paramètre α de la régularisation type elastic-net ont été testées entre 0 et 1 par pas de 0,01. Après entraînement, tous les modèles étaient ordonnés de façon décroissante selon la valeur de l'aire sous la courbe (area under

curve, AUC) de la courbe ROC (receiver operating curve) des prédictions évaluées sur le jeu de validation.

Le nombre optimal de variables d'intérêt était déterminé en sélectionnant le modèle avec le paramètre α le plus élevé parmi les modèles présentant les meilleures AUC et partageant le même nombre et les mêmes variables d'intérêt.

Entraînement :

Une grid search était effectuée pour les performances entre des modèles linéaires et non linéaires de machine learning sur les variables d'intérêt : régression logistique avec régularisation de type Elastic-net avec un coefficient alpha de 0 à 0,99 (exclusion de la valeur 1 pour ne pas réaliser une nouvelle étape d'exclusion de variables) et les forêts aléatoires. Une analyse par forêt aléatoire a également été effectuée sur tous les metabolites au cours cette étape afin de vérifier que les metabolites précédemment exclus ne comportaient pas une information utile pour la prédiction et perdue lors de l'étape de la sélection des métabolites d'intérêt, en vérifiant l'absence d'augmentation des performances par rapport aux modèles basés sur les variables d'intérêt.

Les modèles étaient comparés selon leur ROC-AUC sur le jeu de validation, sur la base du Lambda plus 1 SE (39). La prédiction finale était effectuée sur le jeu de test à l'aide du modèle avec les performances les plus élevées pour établir la signature métabolomique. Les capacités prédictives (ROC-AUC) des modèles étaient comparées sur les 3 jeux de données (entraînement, validation et test) afin de vérifier la robustesse et la capacité de généralisation du modèle final. L'importance des variables d'intérêt au sein du modèle final était exprimée par le coefficient de régression pour la régression logistique et par l'indice de Gini pour les forêts aléatoires.

Influence du sexe, de l'âge, de la présence d'anticorps anti-SSA et de la sévérité du syndrome sec oculaire sur la signature métabolomique :

Dans un premier temps, nous avons extrait les 2 composantes principales de la signature métabolomique par l'analyse en composante principale (ACP).

L'influence de l'âge, du sexe, de la présence d'anticorps anti-SSA, de la sévérité du syndrome sec oculaire sur la signature métabolomique était analysée à l'aide d'une régression linéaire multiple. La sévérité du syndrome sec oculaire était évaluée selon 4 critères : la valeur du test de Schirmer, la valeur de l'OSS, la présence d'une dysfonction meibomienne et la valeur du BUT. L'âge, le test de Schirmer, la valeur de l'OSS et la valeur du BUT étaient des valeurs quantitatives. Le sexe, la présence ou non d'anticorps anti-SSA et la présence d'une dysfonction meibomienne étaient des variables dichotomiques qualitatives.

Les conditions d'application de la régression linéaire multiple étaient vérifiées : la linéarité était évaluée graphiquement sur un « scatter plot » ; l'indépendance des résidus était vérifiée par un test de Durbin-Watson ; les distributions étaient évaluées graphiquement sur les QQ plots et sur les plots comparant résidus standardisés et non standardisés.

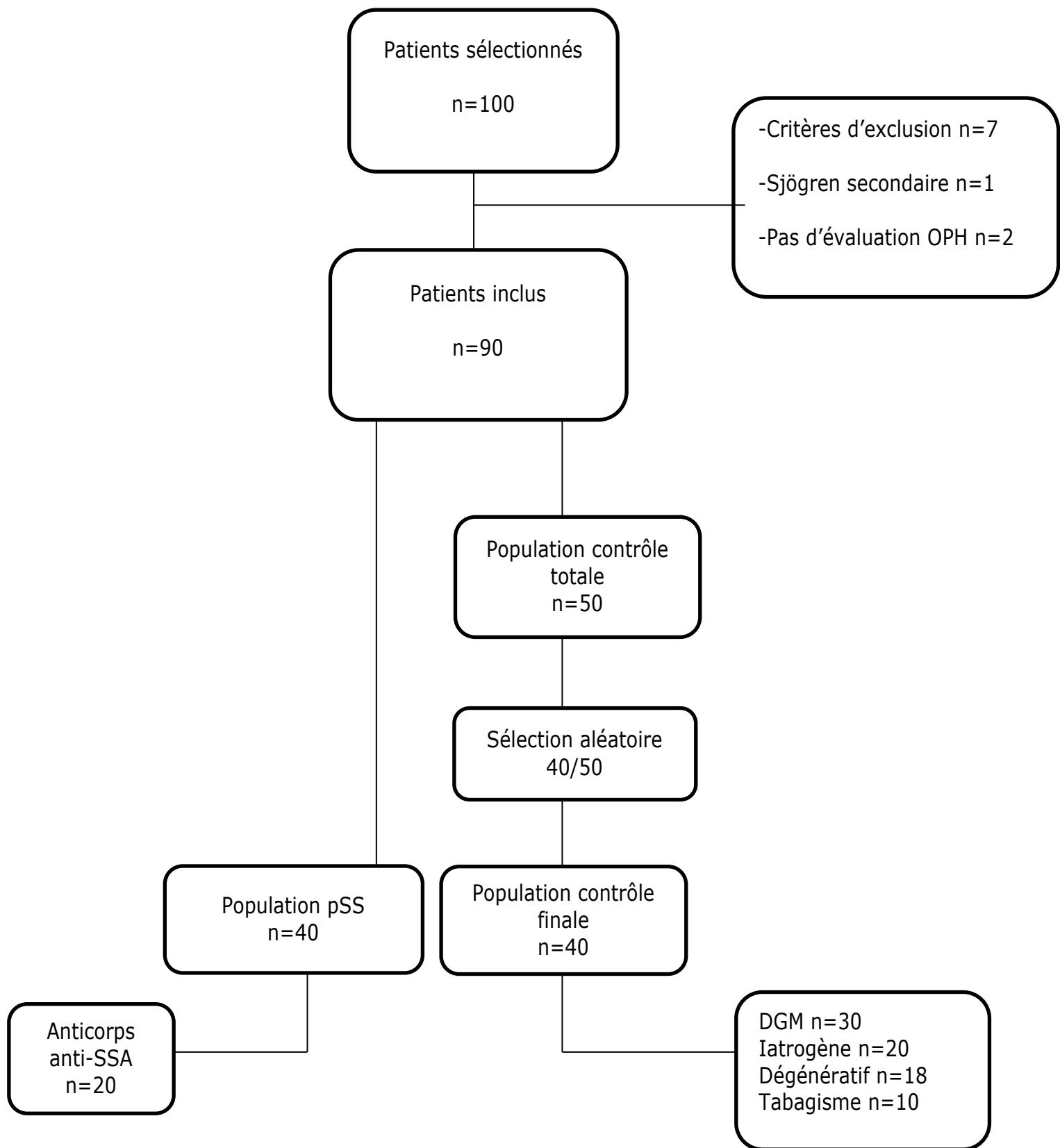


Figure 3 : Flow chart de l'étude

Notes : OPH = ophtalmologique, DGM = dysfonction des glandes de Meibomius

5. RÉSULTATS

5.1. Caractéristiques cliniques des patients

Entre Juin 2017 et Mars 2018, 100 patients étaient sélectionnés pour participer à la cohorte METABOGRÉN, et 90 ont finalement été inclus. La population de l'étude était composée de 40 patients ayant un pSS dont 20 avaient des anticorps anti-SSA, et 50 contrôles avec un syndrome sec d'autre origine. 40 patients parmi les 50 contrôles ont été sélectionnés au hasard.

L'âge médian de la population globale des patients était de 60 ans [49-67]. Le sex-ratio H/F était de 0.16. Les caractéristiques cliniques (âge, sex-ratio) dans les deux groupes ne différaient pas et sont résumées dans le tableau II.

Il n'y avait pas de différence significative sur l'acuité visuelle de loin ($p=0.25$) et sur l'acuité visuelle de près ($p=0.33$) entre les deux groupes.

| | pSS n = 40 | Témoins n = 40 | p-value |
|--|------------------|-------------------|---------|
| <u>Caractéristiques cliniques</u> | | | |
| Femmes | 35 (87.5%) | 34 (85%) | 0.72 |
| Age médian (ans) | 63.5 [52-68] | 58.5 [43.8-67] | 0.31 |
| SSO subjectif | 36 (90%) | 36 (90%) | >0.99 |
| SSB subjectif | 36 (90%) | 35 (87.5%) | >0.99 |
| Tabagisme | 17 (42.5%) | 10 (25%) | 0.1 |
| Iatrogénie | 6 (15%) | 20 (50%) | 0.0008 |
| AV de loin (Log Mar) | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0.25 |
| AV de près (Log Mar) | 0.18 [0.18-0.18] | 0.18 [0.18-0.18] | 0.33 |
| Schirmer's test (mm/5 minutes) | 1 [0-4] | 3.5 [0-9] | 0.007 |
| Grade cornéen OSS | 2 [1-2] | 1 [0-2] | <0.0001 |
| Grade conjonctival OSS | 1 [0.75-2] | 0 [0-1] | <0.0001 |
| OSS médian/oeil | 3 [2-5] | 1 [0-3] | <0.0001 |
| BUT (sec) | 2 [1.75-3] | 3 [2-4] | <0.0001 |
| DGM | 21 (52.5%) | 30 (75%) | 0.04 |
| Kéратite (n) | 37 (92.5%) | 28 (70%) | 0.006 |
| DS (mL/15 min) | 3.2 [1.5-4.8] | 4.3 [1.8-6.6] | 0.12 |
| <u>Critères ACR/EULAR 2016</u> | | | |
| Schirmer ≤ 5 mm/5 minutes* | 39 (97.5%) | 30 (75%) | 0.007 |
| OSS ≥ 5* | 15 (37.5%) | 5 (12.5%) | 0.01 |
| Présence d'anticorps anti SSA | 20 (50%) | 0 | <0.0001 |
| DS ≤ 0,1 mL/min | 11 (27.5%) | 10 (25%) | 0.8 |
| Focus score ≥ 1 focus/4 mm ² | 35 (90%) | 0 | <0.0001 |

Tableau II : Critères ACR/EULAR appliqués aux patients pSS et aux patients témoins

Notes : AV = acuité visuelle, OSS = Ocular Staining Score, DGM = dysfonctionnement des glandes de Meibomius, DS = débit salivaire, BUT = break-up-time, SSO = syndrome sec oculaire, SSB = syndrome sec buccal, * = sur au moins un œil

Dans le groupe contrôle, les causes de sécheresse oculaire étaient, de façon non exclusive, le dysfonctionnement des glandes de Meibomius dans 75% des cas (n=30), une origine dégénérative dans 45% (n=18), les causes iatrogènes dans 50% (n=20) et le tabagisme actif dans 25% (n=10).

Dans le groupe pSS, un dysfonctionnement des glandes de Meibomius était retrouvé chez les patients pSS dans 52.5% des cas (n=21), un tabagisme actif dans 42.5% des cas (n=17) et une composante iatrogène surajoutée dans 15% (n=6).

5.2. Résultats de l'analyse métabolomique

5.2.1. Différence entre les patients pSS et témoins

Sur les 188 métabolites testés, 84 étaient exclus car en deçà de la limite de détection. L'analyse non supervisée n'a pas révélé de « clusters » spontanément isolés sur l'analyse en composante principale ni de déséquilibre d'outliers. L'étape de la sélection des métabolites d'intérêt par régression logistique avec régularisation de type Elastic-net a mis en évidence parmi les 19 meilleurs modèles (AUC 0.84) 5 modèles (coefficient alpha : 0.72 ; 0.74 ; 0.77 ; 0.79 ; 0.80) avec les 9 mêmes métabolites d'intérêt : la Sérine, l'Asparagine, la Phosphatidylcholine diacyl (PCaa) C42:4, les lysophosphatidylcholines (LysoPC) C18:1, C18:2, C16:1 et les Sphingomyélines (SM) C16:0 et C22:3. Les concentrations des métabolites Sérine, Asparagine et Dopamine étaient réduites dans le groupe pSS alors que celles des PCaa C42:4, LysoPC C16:1, C18:1 et des SM C16:0 et C22:3 étaient augmentées dans le groupe pSS.

| <u>Nom</u> | <u>Coefficient Bêta</u> |
|------------------------|-------------------------|
| PC aa C42 :4 | 0.161045374 |
| SM C22 :3 | 0.106035587 |
| Séroline | -0.092247742 |
| Asparagine | -0.082988029 |
| LysoPC a C18 :1 | 0.065613168 |
| Dopamine | -0.057154509 |
| LysoPC a C18 :2 | 0.032073004 |
| SM C16 :0 | 0.025945291 |
| LysoPC a C16 :1 | 0.008387266 |

Tableau III : Listing des métabolites et de leur coefficient de régression du modèle final

Notes : PC aa = Phosphatidylcholine diacyl, SM = Sphingomyéline, LysoPC = Lysophosphatidylcholine

LysoPC a C18:1
 LysoPC a C16:1
 PC aa C42:4
 SM C22:3
 Asparagine Serine
 SM C16:0 Dopamine

Figure 4 : Wordcloud résumant la signature métabolomique trouvée chez les pSS

Notes : l'importance des métabolites dans la signature métabolomique est représentée par la taille de la typographie selon le coefficient de régression. En bleu : les métabolites avec une concentration réduite chez les patients pSS ; en rouge : les métabolites avec une concentration augmentée chez les patients pSS

Après l'étape de sélection des métabolites d'intérêt, les meilleurs modèles ont été obtenus en utilisant la régression logistique, retrouvant une AUC de 0.84 (9 modèles) à 0.88 (2 modèles) sur le jeu de validation et respectivement 0.81 à 0.82 sur le jeu d'entraînement. En raison du faible nombre de modèles avec une AUC égale à 0.88 et du plus grand écart entre les AUC des jeux d'entraînement et de validation pour ces modèles, avec un potentiel overfitting, les 2 modèles avec une AUC de 0.88 ont été exclus. Nous avons sélectionné le modèle final parmi ceux avec une AUC de 0.84 et la plus petite valeur alpha, afin de garder le maximum d'informations entre les métabolites d'intérêt. Nous avons écarté les modèles non linéaires par forêts aléatoires, que ce soit avec les 9 métabolites ou avec tous les métabolites, en raison d'un overfitting important, avec un écart sur l'AUC entre les jeux d'entraînement (1.00) et validation (0.68).

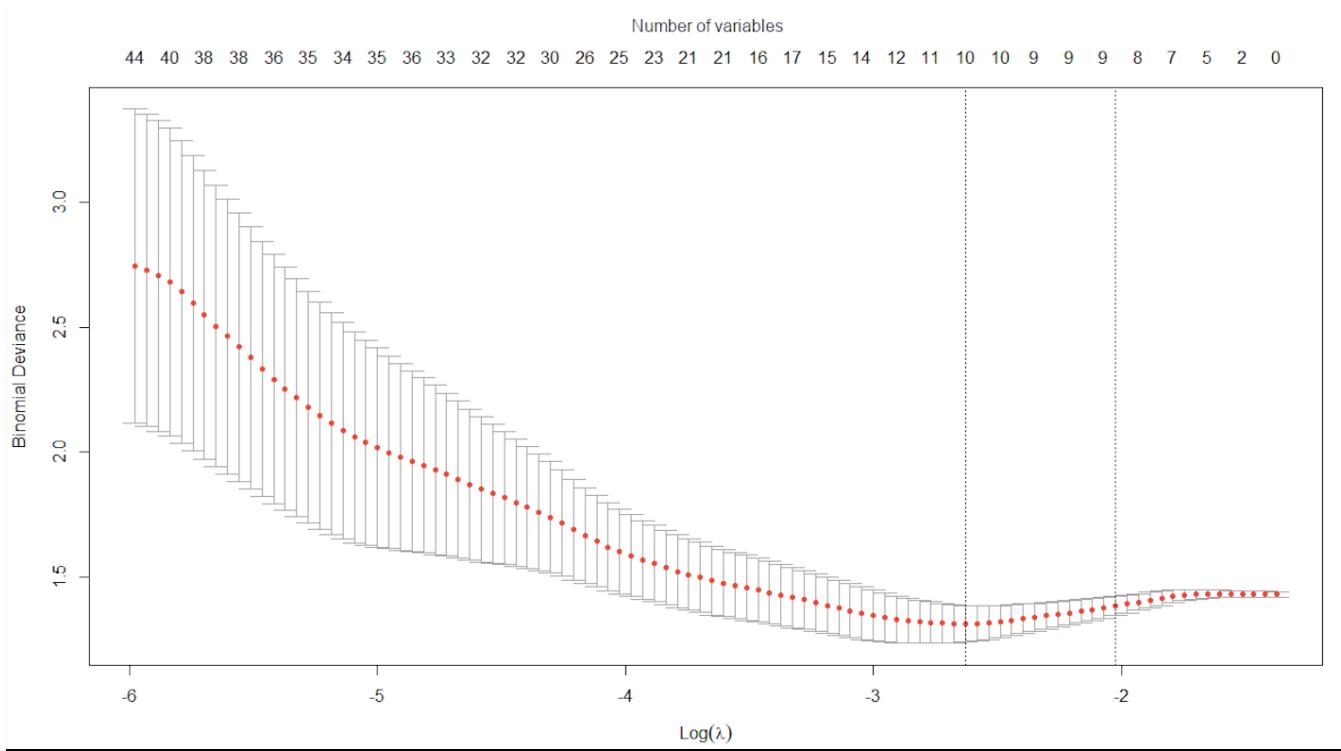


Figure 5 : Évolution des performances des modèles de régression logistique avec régularisation de type elastic-net selon le coefficient λ et le nombre de variables inclus =

| AUC | |
|---------------------------|------|
| Jeu d'entraînement | 0.81 |
| Jeu de validation | 0.84 |
| Jeu de test | 0.83 |

Tableau IV : Modèle final avec comparaison des performances prédictives via la ROC-AUC (Area under the curve ou aire sous la courbe)

5.2.2. Variations de la signature métabolomique selon l'âge, le sexe et la présence d'anticorps anti SSA

L'analyse en composante principale montrait que les 2 premières composantes principales résumaient 75% de la variance des métabolites (PC1 : 53.3%, PC2 : 21.2%). L'information portée par les acides aminés (Sérine et Asparagine) était majoritairement contenue dans PC2 alors que PC1 comportait l'information portée par les lipides (Tableau V).

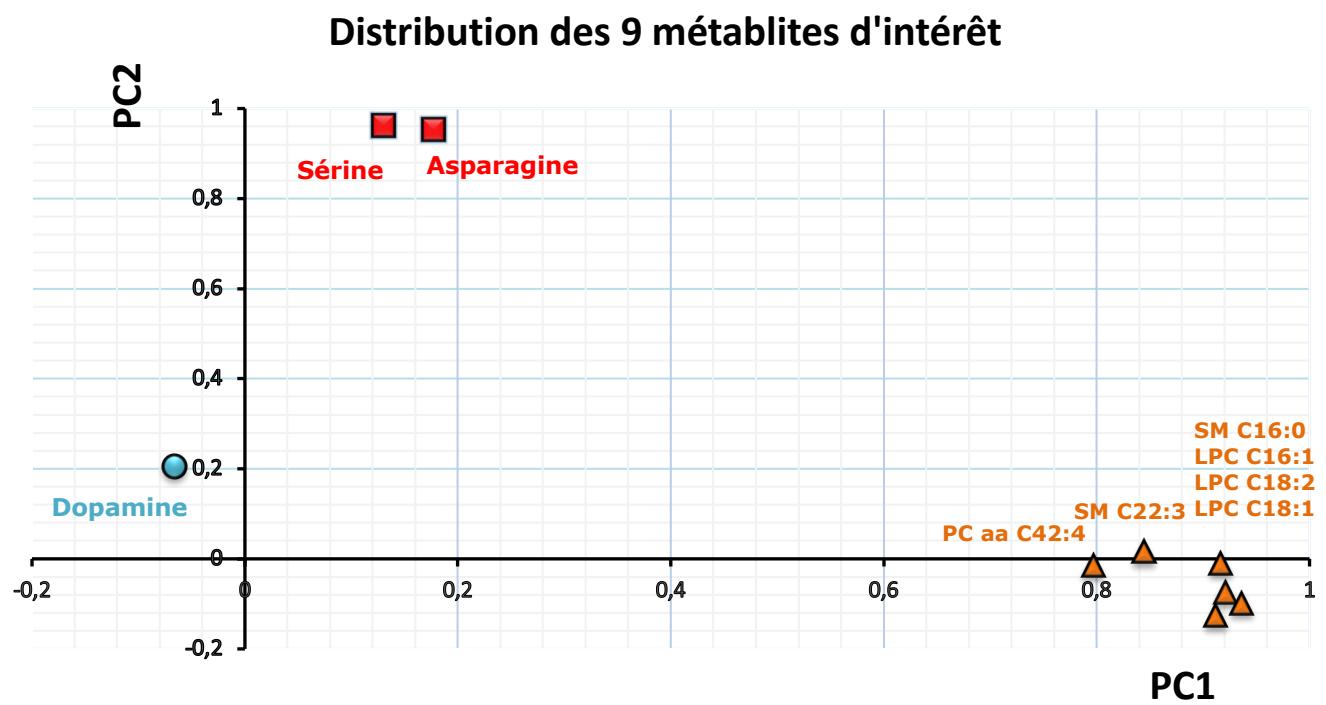


Figure 6 : Représentation graphique de la distribution des 9 métabolites d'intérêts dans les deux composantes principales de la signature métabolomique.

Notes : PC aa = Phosphatidylcholine diacyl, SM = Sphingomyélines, LPC = Lysophosphatidylcholine

L'âge et le sexe n'avaient pas d'influence significative sur l'association entre les PC1 et PC2 et le statut pSS. La présence d'anticorps anti-SSA n'avait pas d'effet sur la PC1. Il existait une tendance sur l'association entre présence d'anticorps anti-SSA et PC2 ($p=0.13$). Pour les analyses suivantes, les analyses sur PC1 étaient ajustées sur l'âge et le sexe et les analyses sur PC2 sur l'âge, le sexe et la présence d'anticorps anti-SSA.

5.2.3. Variations de la signature métabolomique selon le test de Schirmer, le break-up-time, le score OSS et la présence d'un dysfonctionnement meibomien

La valeur du test de Schirmer n'avait pas d'influence significative sur la signature métabolomique sur PC1 ($p=0.17$) ni sur PC2 ($p=0.67$).

La présence d'une dysfonction des glandes de Meibomius n'avait pas d'influence significative sur la signature métabolomique sur PC1 ($p=0.57$) ni sur PC2 ($p=0.42$). De même, la valeur du BUT n'avait pas d'influence significative sur la signature métabolomique sur PC1 ($p=0.44$) ni sur PC2 ($p=0.5$).

Le résultat du score OSS était associé significativement à la PC1 de la signature métabolomique ($p=0.015$).

Après ajustement sur l'âge, le sexe pour PC1 et PC2, sur la présence d'anticorps anti-SSA pour PC2, et successivement sur la valeur du test du Schirmer, la présence d'une DGM, la valeur de l'OSS et la valeur du BUT, le statut pSS était toujours statistiquement associé aux 2 composantes principales à l'exception de la PC1 avec inclusion du score OSS dans le modèle.

| | Anti SSA | Schirmer* | BUT* | DGM* | OSS* |
|--------------------------------|----------|-----------|------|-------|--------------|
| PC1 | 0.78 | 0.17 | 0.44 | 0.57 | 0.015 |
| Signature métabolomique | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.009 | 0.11 |

* : ajustement de la signature sur l'âge et le sexe

| | Anti-SSA | Schirmer** | BUT** | DGM** | OSS** |
|--------------------------------|----------|------------|-------|-------|-------|
| PC2 | 0.13 | 0.67 | 0.50 | 0.42 | 0.06 |
| Signature métabolomique | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.006 |

** : ajustement de la signature sur l'âge, le sexe et la présence d'anticorps anti-SSA

Tableau V : *Influence de la présence d'anticorps anti SSA et des paramètres de sévérité du syndrome sec oculaire sur les 2 composantes principales (PC1 et PC2) de la signature métabolomique par régression linéaire*

Notes : BUT = Break-up-Time, DGM = Dysfonctionnement des glandes de Meibomius, OSS = Ocular Staining Score). Significativité de la signature métabolomique selon le critère ajusté, résumées sur la p-value

6. DISCUSSION

Le pSS est une des plus fréquentes connectivites et serait responsable d'environ 10% des syndromes secs oculaires (13). La sévérité du syndrome sec oculaire dans le pSS justifie de l'identifier spécifiquement. Toutefois, confirmer le diagnostic de pSS dans les formes précoces n'est pas toujours aisé. Connaître plus précisément les perturbations du film lacrymal dans le pSS pourrait permettre d'en améliorer la prise en charge précoce. Une meilleure compréhension des troubles métaboliques des larmes dans le pSS pourrait ainsi permettre d'identifier des biomarqueurs permettant un diagnostic précoce et d'élaborer des traitements spécifiques. Cette étude comparant les profils métabolomiques des larmes de patients présentant un pSS à des contrôles présentant également un syndrome sec oculaire objectif d'autre origine a permis d'identifier 9 métabolites d'intérêt. La signature associant ces 9 métabolites était très spécifique du pSS et variait peu avec la sévérité du syndrome sec.

La population pSS de notre étude présentait des caractéristiques démographiques comparables aux grandes séries de la littérature, avec un âge au diagnostic proche de 60 ans, un sex-ratio de 7 femmes pour un homme, et la présence d'anticorps anti-SSA chez 50% des patients (22,27).

Nous avons identifié une signature métabolomique comportant 9 métabolites sur les larmes des patients pSS, caractérisée par une diminution des acides aminés Sérine et Asparagine, de la Dopamine et une augmentation des PC aa C42:4, LysoPC C18:1, C18:2, C16:1 et des SM C16:0 et C22:3. La signature métabolomique ne variait pas selon l'âge, le sexe ni selon la gravité du syndrome sec oculaire (test de Schirmer, BUT, présence d'une DGM), à l'exception de la composante lipidique (et non les acides aminés et la dopamine) après ajustement selon le score OSS.

Peu d'études ont évalué la composition des larmes de patients présentant un syndrome sec oculaire par une approche métabolomique (22,27,40). De plus, ces études comparaient les patients à des témoins sains, et n'étaient pas spécifiques du pSS, toutes les causes de sécheresse oculaire y étant confondues. Dans notre étude, nous avons fait le choix de comparer prospectivement des patients présentant un pSS à des patients contrôles non sains, présentant également un syndrome sec. Cela se rapproche de la pratique puisque l'intérêt du clinicien dans l'identification d'un biomarqueur serait de pouvoir distinguer sur le plan étiologique 2 patients présentant les mêmes symptômes. Par ailleurs, et comparativement à de précédentes études, notre population de pSS n'incluait que des cas nouvellement diagnostiqués dont la durée d'évolution du syndrome sec était comparable à celle des patients témoins.

La signature métabolomique de notre étude comportait 9 métabolites, dont 2 acides aminés, la Sérine et l'Asparagine, tous 2 diminués chez les patients pSS. Une autre étude mettait en également en évidence une diminution du taux de sérine chez les patients présentant un syndrome sec oculaire, sans proposer de mécanisme explicatif à cette diminution (40). Dans cet article, les causes du syndrome sec oculaire n'étaient pas précisées mais, sachant que le pSS représenterait 10% des causes (13), il est possible que l'étude ait inclus des patients pSS. La sérine est un acide aminé non essentiel, précurseur de la glycine et de la cystéine, qui sont des composants du glutathion, connu pour ses propriétés anti oxydantes (41). De même, l'asparagine est un acide aminé précurseur de l'aspartate et du glutamate, ce dernier étant également un constituant du glutathion (42). L'oxydation du glutathion par la glutathion peroxydase permet de limiter la formation de radicaux libres. Or une diminution de la glutathione peroxydase semble présente chez les patients présentant un pSS (43) ce qui favoriserait le développement d'un syndrome sec sévère et donc de lésions du segment

antérieur, via un stress oxydatif non compensé. La physiopathologie du pSS impliquant des mécanismes inflammatoires chroniques, l'hypothèse d'un rôle de la diminution des acides aminés Sérine et Asparagine dans la présence du stress oxydatif paraît séduisante. En plus d'être spécifique du pSS, la signature métabolomique de notre étude ne variait pas sur la composante relative aux acides aminés selon la sévérité du syndrome sec oculaire. Cela constitue un élément fort pour penser que la diminution de la Sérine et de l'Asparagine serait spécifique du pSS.

La signature métabolomique de notre étude comportait aussi une amine biogène, la dopamine, un neurotransmetteur synthétisé à partir de la phényalanine et de la tyrosine, précurseur des catécholamines. Elle a un rôle important dans le système nerveux central, et participe à la régulation de nombreux comportements et notamment des mouvements spontanés. La dopamine est surtout connue pour son implication dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson, caractérisée par une destruction des neurones dopaminergiques (44), mais il a également été décrit une implication de la dopamine dans les maladies oculaires telles que la myopie forte et le glaucome (45). Elle est de plus facilement dosable dans les larmes (45). Dans notre étude, le taux de Dopamine était diminué chez les patients pSS comparativement aux patients contrôles. Dans la maladie de Parkinson, la diminution du taux de dopamine serait associée à une diminution de la fréquence des clignements oculaires (46), responsable d'un syndrome sec oculaire, d'une part par diminution du temps de rupture du film lacrymal via une diminution de sécrétion lipidique par les glandes de Meibomius (dont la sécrétion est déclenchée par les clignements) (11) et d'autre part par une diminution de la sécrétion lacrymale (47). Cette seconde hypothèse est cependant controversée, d'autres auteurs n'ayant pas constaté de réduction des résultats du test de Schirmer chez les patients parkinsoniens. La baisse du taux de dopamine serait donc liée à la DGM de façon « mécanique » en réduisant

la fréquence de clignement palpébral (48). Or, il s'avère que Ju et al. ont mis en évidence que les patients ayant un syndrome de Sjögren seraient plus à risque de développer une maladie de Parkinson, les mécanismes de cette association étant encore incertains pour les auteurs (49). Deux études rapportaient des concentrations de dopamine plus élevées dans les larmes comparativement au sérum, émettant l'hypothèse d'une synthèse locale de la dopamine par la glande lacrymale (45,50). Cela pourrait peut-être lier le syndrome de Sjögren et la maladie de Parkinson. Concernant spécifiquement le pSS et selon les données de la littérature, nous pourrions ainsi faire l'hypothèse que dans le pSS, l'atteinte primitive de la glande lacrymale entraînerait une baisse de sécrétion de dopamine et donc une diminution des clignements oculaires responsable d'un dysfonctionnement meibomien, fréquemment retrouvé chez les patients pSS. Cela expliquerait ainsi la mixité du syndrome sec oculaire dans le pSS. En effet, dans notre population, 50% des patients pSS présentaient un dysfonctionnement meibomien. La présence d'un dysfonctionnement meibomien chez les patients pSS est largement décrite dans la littérature. Leur meibum serait de moins bonne qualité et sécrété en plus faible quantité. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce dysfonctionnement meibomien chez les patients pSS : un déficit en androgène, retrouvé chez les patients pSS (51), qui entraînerait une occlusion et une métaplasie des orifices glandulaires meibomiens ainsi qu'une altération de la composition du meibum (52), un mécanisme auto-immun lié au pSS avec une infiltration lymphocytaire de la conjonctive tarsale où se trouvent les glandes de Meibomius (53), et enfin un mécanisme atrophique (15). Ces hypothèses n'ont toutefois pas été confirmées. Toutefois, une récente étude ne montrait pas d'association entre l'atteinte morphologique des glandes de Meibomius et la sévérité du syndrome sec oculaire (54). Dans notre étude, l'ajustement de la signature selon la présence d'un dysfonctionnement meibomien ne modifiait pas l'association avec le pSS.

La signature métabolomique de notre étude comportait 6 lipides : 4 glycérophospholipides (PC C42:4, LysoPC C18:1, C18:2, C16:1) et deux sphingolipides (SM C16:0 et C22:3), tous augmentés chez les patients pSS. Pour rappel, le film lipidique constitue la couche la plus externe des larmes et est sécrété par les glandes de Meibomius.

Cette couche lipidique est composée à 85% d'une phase non polaire (esters de cholestérols en majorité) et à 15% d'une phase polaire composée essentiellement de phospholipides et de sphingolipides (55). En 2011, Lam et al. constataient également une augmentation des concentrations de LysoPC C18:1, C18:2 et de la SM C16:0 dans le meibum de patients présentant un syndrome sec oculaire en comparaison à des témoins sains (56). Les causes précises des syndromes secs oculaires n'étaient pas précisées. Les auteurs attribuaient l'élévation du taux de lysophospholipides à une augmentation de l'activité phospholipase A2, qui via l'hydrolyse des phospholipides, déclencheait une cascade de réactions inflammatoires, source du syndrome sec oculaire. Dans cet article, les auteurs rapportaient en revanche une diminution des concentrations de LysoPC et de la SM chez les patients présentant un syndrome sec oculaire plus sévère, la sévérité du syndrome sec étant gradée selon le score OSDI. A contrario, dans notre étude, la composante lipidique de la signature métabolomique était positivement corrélée au score OSS.

Une étude plus récente sur des patients présentant un syndrome sec oculaire ne rapportait pas de différence de composition lipidique des larmes entre les patients présentant une sécheresse par déficit aqueux comparativement aux syndromes sec évaporatifs liés à un dysfonctionnement meibomien. Cette étude montrait que les concentrations de lysophosphatidylcholines étaient corrélées positivement au test de Schirmer, autrement dit que la sécrétion de ces lipides étaient augmentée avec la sécrétion lacrymale, émettant l'hypothèse d'une origine glandulaire lacrymale de ces lipides (57). Sachant que l'atteinte de la glande lacrymale est importante dans le pSS, et au vu des résultats de cette étude, nous

aurions dû observer une diminution des taux de glycérophospholipides dans le groupe pSS, ce qui n'était pas le cas dans notre étude. Or, l'association entre la signature métabolomique de notre étude et le statut pSS ne variait pas sur la composante relative aux lipides selon les résultats du test de Schirmer. En effet, seul le score OSS faisait disparaître cette association et uniquement sur la composante lipidique. De ces résultats, nous pourrions avancer d'une part l'hypothèse que les glycérophospholipides identifiés sur notre signature métabolomique seraient spécifiques du pSS, l'étude rapportée ci-dessus n'était pas spécifique du pSS, et d'autre part qu'ils reflèteraient la sévérité du syndrome sec oculaire, étant donné que la composante lipidique de la signature varie selon le score OSS.

Sur le plan statistique, la meilleure relation pour représenter le lien entre le statut pSS et la signature métabolomique dans notre étude était linéaire, les performances des modèles de régression logistique étant supérieures à celles des forêts aléatoires. De plus, les performances du modèle final étaient similaires sur les 3 jeux de données, ce qui indiquait l'absence d'overfitting sur le jeu d'entraînement, et la robustesse de la signature métabolomique pour prédire le pSS.

Notre étude a donc permis d'identifier une signature métabolomique composée de 9 métabolites au sein des larmes, fortement spécifique chez des patients présentant un syndrome de Sjögren nouvellement diagnostiqué en comparaison à des patients témoins non sains présentant également un syndrome sec. L'ajustement de la signature selon la sévérité du syndrome sec ou ses composantes ne faisait pas varier la significativité de son association avec le pSS, à l'exception de la composante relative aux 6 lipides et uniquement sur le test OSS. Ces résultats sont d'une importance majeure car le syndrome sec oculaire étant plus sévère dans le pSS (14), la signature métabolomique aurait pu être simplement liée à la plus grande sévérité du syndrome sec.

Cette signature pourrait constituer un biomarqueur dans le pSS, et notamment la composante liée aux acides aminés, totalement indépendante de la sévérité du syndrome sec. Par ailleurs, les 9 métabolites pourraient constituer des cibles d'intérêt pour découvrir des voies thérapeutiques nouvelles et cibler spécifiquement les troubles propres au pSS. Enfin, l'identification de biomarqueurs précoce du pSS pourrait faciliter le diagnostic précoce et limite la morbidité du pSS lié à l'atteinte des glandes lacrymales.

7. CONCLUSION

Nous avons identifié une signature métabolomique dans les larmes de patients pSS comparativement à d'autres syndromes secs oculaires d'origine non auto-immune. Ces métabolites identifiés pourraient servir de biomarqueur éventuel pour le diagnostic et la thérapeutique des syndromes secs oculaires relatifs au pSS.

8. BIBLIOGRAPHIE

1. Pillemer SR, Matteson EL, Jacobsson LT, Martens PB, Melton LJ, O'Fallon WM, et al. Incidence of physician-diagnosed primary Sjögren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc.* juin 2001;76(6):593-9.
2. Plesivcnik Novljan M, Rozman B, Hocevar A, Grmek M, Kveder T, Tomsic M. Incidence of primary Sjögren's syndrome in Slovenia. *Ann Rheum Dis.* juill 2004;63(7):874-6.
3. Patel R, Shahane A. The epidemiology of Sjögren's syndrome. *Clin Epidemiol.* 2014;6:247-55.
4. Shibuski CH, Shibuski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Primary Sjögren's Syndrome: A Consensus and Data-Driven Methodology Involving Three International Patient Cohorts. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* janv 2017;69(1):35-45.
5. McDonnell PJ, Pflugfelder SC, Stern ME, Hardten DR, Conway T, Villanueva L, et al. Study design and baseline findings from the progression of ocular findings (PROOF) natural history study of dry eye. *BMC Ophthalmol.* 28 déc 2017;17(1):265.
6. Définition et classification de la sécheresse oculaire : rapport du sous-comité de définition et classification du DEWS (Dry Eye workshop) international (2007). avr 2007;
7. Rapport SFO Surface oculaire.
8. Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* nov 2015;74(11):1983-9.
9. Seror R, Bowman SJ, Brito-Zeron P, Theander E, Bootsma H, Tzioufas A, et al. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI): a user guide. *RMD Open.* 2015;1(1):e000022.
10. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria

proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis. juin 2002;61(6):554-8.

11. Whitcher JP, Shibuski CH, Shibuski SC, Heidenreich AM, Kitagawa K, Zhang S, et al. A simplified quantitative method for assessing keratoconjunctivitis sicca from the Sjögren's Syndrome International Registry. Am J Ophthalmol. mars 2010;149(3):405-15.
12. Kohler I, Verhoeven A, Derkx RJ, Giera M. Analytical pitfalls and challenges in clinical metabolomics. Bioanalysis. juill 2016;8(14):1509-32.
13. Kuklinski E, Asbell PA. Sjögren's syndrome from the perspective of ophthalmology. Clin Immunol Orlando Fla. sept 2017;182:55-61.
14. Akpek EK, Bunya VY, Saldanha IJ. Sjögren's Syndrome: More Than Just Dry Eye. Cornea. mai 2019;38(5):658-61.
15. Chen X, Utheim ØA, Xiao J, Adil MY, Stojanovic A, Tashbayev B, et al. Meibomian gland features in a Norwegian cohort of patients with primary Sjögren's syndrome. PloS One. 2017;12(9):e0184284.
16. Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. Invest Ophthalmol Vis Sci. 29 sept 2011;52(10):7725-30.
17. Yang S, Lee HJ, Kim D-Y, Shin S, Barabino S, Chung S-H. The Use of Conjunctival Staining to Measure Ocular Surface Inflammation in Patients With Dry Eye. Cornea. juin 2019;38(6):698-705.
18. Aluru SV, Agarwal S, Srinivasan B, Iyer GK, Rajappa SM, Tatoo U, et al. Lacrimal proline rich 4 (LPRR4) protein in the tear fluid is a potential biomarker of dry eye syndrome. PloS One. 2012;7(12):e51979.
19. Saijyothi AV, Angayarkanni N, Syama C, Utpal T, Shweta A, Bhaskar S, et al. Two dimensional electrophoretic analysis of human tears: collection method in dry eye syndrome.

Electrophoresis. oct 2010;31(20):3420-7.

20. Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol.* févr 2009;147(2):198-205. e1.
21. Milner MS, Beckman KA, Luchs JI, Allen QB, Awdeh RM, Berdahl J, et al. Dysfunctional tear syndrome: dry eye disease and associated tear film disorders - new strategies for diagnosis and treatment. *Curr Opin Ophthalmol.* janv 2017;27 Suppl 1:3-47.
22. Chen X, Rao J, Zheng Z, Yu Y, Lou S, Liu L, et al. Integrated Tear Proteome and Metabolome Reveal Panels of Inflammatory-Related Molecules via Key Regulatory Pathways in Dry Eye Syndrome. *J Proteome Res.* 3 mai 2019;18(5):2321-30.
23. Kliuchnikova AA, Samokhina NI, Ilina IY, Karpov DS, Pyatnitskiy MA, Kuznetsova KG, et al. Human aqueous humor proteome in cataract, glaucoma, and pseudoexfoliation syndrome. *Proteomics.* 2016;16(13):1938-46.
24. Ji Y, Rao J, Rong X, Lou S, Zheng Z, Lu Y. Metabolic characterization of human aqueous humor in relation to high myopia. *Exp Eye Res.* 2017;159:147-55.
25. Mahajan VB, Skeie JM. Translational vitreous proteomics. *Proteomics Clin Appl.* avr 2014;8(3-4):204-8.
26. Leruez S, Bresson T, Chao de la Barca JM, Marill A, de Saint Martin G, Buisset A, et al. A Plasma Metabolomic Signature of the Exfoliation Syndrome Involves Amino Acids, Acylcarnitines, and Polyamines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 févr 2018;59(2):1025-32.
27. Galbis-Estrada C, Martinez-Castillo S, Morales JM, Vivar-Llopis B, Monleón D, Díaz-Llopis M, et al. Differential effects of dry eye disorders on metabolomic profile by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *BioMed Res Int.* 2014;2014:542549.
28. Kuo M-T, Fang P-C, Chao T-L, Chen A, Lai Y-H, Huang Y-T, et al. Tear Proteomics Approach to Monitoring Sjögren Syndrome or Dry Eye Disease. *Int J Mol Sci.* 19 avr 2019;20(8).
29. Lacombe V, Lacout C, Lozac'h P, Ghali A, Gury A, Lavigne C, et al. Unstimulated whole

saliva flow for diagnosis of primary Sjögren's syndrome: time to revisit the threshold? *Arthritis Res Ther.* 24 2020;22(1):38.

30. Bailey IL, Lovie JE. New design principles for visual acuity letter charts. *Am J Optom Physiol Opt.* nov 1976;53(11):740-5.

31. Abelson MB, Ousler GW, Nally LA, Welch D, Krenzer K. Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506(Pt B):1121-5.

32. Asiedu K, Kyei S, Dzasimatu SK, Morny EKA. Meibomian Gland Dysfunction in a Youthful Clinical Sample in Ghana. *Optom Vis Sci Off Publ Am Acad Optom.* 2018;95(4):349-53.

33. Lê S, Josse J, Husson F. **FactoMineR** : An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw [Internet]*. 2008 [cité 13 sept 2020];25(1). Disponible sur: <http://www.jstatsoft.org/v25/i01/>

34. <https://cran.r-project.org/web/packages/rpart/index.html>.

35. glmnet v4.0-2 (Jerome Friedman, Trevor Hastie, Robert Tibshirani (2010). Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software*, 33(1), 1-22.

36. <https://cran.r-project.org/web/packages/caret/index.html>.

37. Liaw, Wiener. Classification and Regression by randomForest Andy Liaw and Matthew Wiener. *R news.* 3 déc 2002;2(3):18-22.

38. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 17 mars 2011;12:77.

39. Breiman, Friedman, Stone, and Olshen's Classification and Regression Trees (1984).

40. Jiang Y, Yang C, Zheng Y, Liu Y, Chen Y. A Set of Global Metabolomic Biomarker Candidates to Predict the Risk of Dry Eye Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:344.

41. Gao X, Lee K, Reid MA, Sanderson SM, Qiu C, Li S, et al. Serine Availability Influences

Mitochondrial Dynamics and Function through Lipid Metabolism. Cell Rep. 27 2018;22(13):3507-20.

42. Rehbolz CM, Yu B, Zheng Z, Chang P, Tin A, Köttgen A, et al. Serum metabolomic profile of incident diabetes. *Diabetologia*. 2018;61(5):1046-54.
43. Cejková J, Ardan T, Simonová Z, Cejka C, Malec J, Dotrelová D, et al. Decreased expression of antioxidant enzymes in the conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome) and its possible contribution to the development of ocular surface oxidative injuries. *Histol Histopathol*. 2008;23(12):1477-83.
44. Miller DB, O'Callaghan JP. Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. *Metabolism*. mars 2015;64(3 Suppl 1):S40-46.
45. Sharma NS, Acharya SK, Nair AP, Matalia J, Shetty R, Ghosh A, et al. Dopamine levels in human tear fluid. *Indian J Ophthalmol*. janv 2019;67(1):38-41.
46. Taylor JR, Elsworth JD, Lawrence MS, Sladek JR, Roth RH, Redmond DE. Spontaneous blink rates correlate with dopamine levels in the caudate nucleus of MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol*. juill 1999;158(1):214-20.
47. Bagheri H, Berlan M, Senard JM, Rascol O, Montastruc JL. Lacrimation in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*. févr 1994;17(1):89-91.
48. Bioussé V, Skibell BC, Watts RL, Loupe DN, Drews-Botsch C, Newman NJ. Ophthalmologic features of Parkinson's disease. *Neurology*. 27 janv 2004;62(2):177-80.
49. Ju U-H, Liu F-C, Lin C-S, Huang W-Y, Lin T-Y, Shen C-H, et al. Risk of Parkinson disease in Sjögren syndrome administered ineffective immunosuppressant therapies: A nationwide population-based study. *Medicine (Baltimore)*. avr 2019;98(14):e14984.
50. Martin XD, Brennan MC. Dopamine and its metabolites in human tears. *Eur J Ophthalmol*. juin 1993;3(2):83-8.
51. Sullivan DA, Bélanger A, Cermak JM, Bérubé R, Papas AS, Sullivan RM, et al. Are women

- with Sjögren's syndrome androgen-deficient? *J Rheumatol.* nov 2003;30(11):2413-9.
52. Sullivan DA, Dana R, Sullivan RM, Krenzer KL, Sahin A, Arica B, et al. Meibomian Gland Dysfunction in Primary and Secondary Sjögren Syndrome. *Ophthalmic Res.* 2018;59(4):193-205.
53. Shimazaki J, Goto E, Ono M, Shimmura S, Tsubota K. Meibomian gland dysfunction in patients with Sjögren syndrome. *Ophthalmology.* août 1998;105(8):1485-8.
54. Daniel E, Pistilli M, Ying G-S, Bunya VY, Massaro-Giordano M, Asbell PA, et al. Association of meibomian gland morphology with symptoms and signs of dry eye disease in the Dry Eye Assessment and Management (DREAM) study. *Ocul Surf.* 25 août 2020;
55. DEBBASCH C, POULIQUEN P. Compte rendu de 3rd International conference on the lacrynmal gland tear film and dry eye syndromes, congrès de Maui, novembre 2000. *Revue Sicca* n°15, eds La librairie Médicale, Laboratoires Théa.
56. Lam SM, Tong L, Yong SS, Li B, Chaurasia SS, Shui G, et al. Meibum lipid composition in Asians with dry eye disease. *PLoS One.* 2011;6(10):e24339.
57. Lam SM, Tong L, Reux B, Duan X, Petznick A, Yong SS, et al. Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structure-specific lipid alterations in dry eye syndrome. *J Lipid Res.* févr 2014;55(2):299-306.

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : <i>Classification étiologique du syndrome sec oculaire, d'après Lemp et al. (7)</i> | 5 |
| Figure 2 : <i>Ocular Staining Score (OSS) (11)</i> | 8 |
| Figure 3 : <i>Flow chart de l'étude</i> | 24 |
| Figure 4 : <i>Wordcloud résumant la signature métabolomique trouvée chez les pSS</i> | 29 |
| Figure 5 : <i>Évolution des performances des modèles de régression logistique avec régularisation de type elastic-net selon le coefficient Lambda et le nombre de variables inclus</i> | 30 |
| Figure 6 : <i>Représentation graphique de la distribution des 9 métabolites d'intérêts dans les deux composantes principales de la signature métabolomique.</i> | 31 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I : Critères de classification ACR/EULAR 2016 du syndrome de Sjögren (4) | 6 |
| Tableau II : Critères ACR/EULAR appliqués aux patients pSS et aux patients témoins | 26 |
| Tableau III : Listing des métabolites et de leur coefficient de régression du modèle final | 28 |
| Tableau IV : Modèle final avec comparaison des performances prédictives via la ROC-AUC (Area under the curve ou aire sous la courbe) | 30 |
| Tableau V: Influence de la présence d'anticorps anti SSA et des paramètres de sévérité du syndrome sec oculaire sur les 2 composantes principales (PC1 et PC2) de la signature métabolomique par régression linéaire | 33 |

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| 1. PREAMBULE | 2 |
| 1.2. Définition du syndrome sec oculaire | 3 |
| 1.3. Mesure du syndrome sec oculaire..... | 6 |
| 1.4. Problématique et objectifs de l'étude | 8 |
| 2. RÉSUMÉ | 11 |
| 3. INTRODUCTION | 13 |
| 4. MÉTHODES | 16 |
| 4.1. <i>Considérations éthiques</i> | 16 |
| 4.2. <i>Critères d'inclusion</i> | 16 |
| 4.3. <i>Critères d'exclusion</i> | 17 |
| 4.4. <i>Évaluation ophtalmologique</i> | 18 |
| 4.5. <i>Data collection</i> | 19 |
| 4.6. <i>Recueil des échantillons de larmes et extraction</i> | 19 |
| 4.7. <i>Analyse métabolomique</i> | 19 |
| 4.8. <i>Analyse statistique</i> | 20 |
| 5. RÉSULTATS | 25 |
| 5.1. <i>Caractéristiques cliniques des patients</i> | 25 |
| 5.2. <i>Résultats de l'analyse métabolomique</i> | 27 |
| 5.2.1. <i>Différence entre les patients pSS et témoins</i> | 27 |
| 5.2.2. <i>Variations de la signature métabolomique selon l'âge, le sexe et la présence d'anticorps anti SSA</i> | |
| 31 | |
| 5.2.3. <i>Variations de la signature métabolomique selon le test de Schirmer, le break-up-time, le score OSS et la présence d'un dysfonctionnement meibomien</i> | 32 |
| 6. DISCUSSION | 34 |
| 7. CONCLUSION | 40 |
| 8. BIBLIOGRAPHIE..... | 41 |
| Liste des figures | 47 |
| Liste des tableaux..... | 48 |
| Annexes..... | I |

Annexes

Annexe 1 : Lettre d'information au patient majeur MALADIES AUTOIMMUNES

| | | |
|--|--|--|
| Centre Ressources Biologiques (CRB) | Lettre d'information au patient majeur MALADIES AUTOIMMUNES | Ref : CRB-0118-FO-199 V02 Version : 02 Applicable le : 23-10-2015 |
| | |  |

INCLUSION DANS UNE COHORTE POUR UN PROGRAMME DE RECHERCHE SUR LES "MALADIES AUTOIMMUNES" PATIENT MAJEUR

Promoteur : CHU d'Angers – 4 rue Larrey – 49 933 Angers cedex 9

Centre de Ressources Biologiques : Dr Odile Blanchet 02 41 35 53 53

Madame, Monsieur

Vous êtes actuellement suivi(e) ou hospitalisé(e) au CHU d'Angers. Vous êtes invité(e) à participer à la constitution d'une cohorte (groupement d'importance variable de personnes) intégrant les données médicales de patients et une collection d'échantillons biologiques associée. Cette cohorte intitulée "MALADIES AUTOIMMUNES" permettra de développer un programme de recherche sur les maladies auto-immunes. Vous trouverez ci-après des informations sur cette cohorte et sur sa collection d'échantillons biologiques, sur votre rôle dans cette cohorte, les contraintes et les bénéfices liés à votre éventuelle participation à cette cohorte, ainsi que sur la procédure de consentement.

Quel est l'objectif de ce programme : Cohorte "MALADIES AUTOIMMUNES" ?

L'objectif de cette cohorte et de la collection biologique associée est de permettre d'améliorer les connaissances scientifiques autour des maladies auto-immunes.

Les maladies auto- immunes peuvent toucher à la fois l'enfant et l'adulte et se manifester par un ensemble de symptômes variés. Ces maladies sont appelées systémiques parce qu'elles sont susceptibles d'atteindre de nombreux organes différents comme par exemple la peau, les articulations, les muscles, le rein, le cœur, le poumon, le tube digestif, le système nerveux central ou périphérique ou les cellules sanguines. Elles sont appelées auto-immunes parce qu'elles sont la conséquence d'une réponse du système immunitaire contre des composants de l'organisme. Ces maladies s'accompagnent de la présence de nombreux auto-anticorps dans le sérum des patients et la présence de cette diversité d'anticorps freine considérablement la compréhension de la maladie. Les maladies auto-immunes sont caractérisées par leur mécanisme qui est l'auto-immunité. Notre système immunitaire est un ensemble d'organes ou tissus, de cellules spécialisées et de molécules. Il est chargé de lutter contre les agents étrangers. Ce système est donc capable de distinguer ce qui est notre organisme (le soi) et ce qui est étranger (le non soi). Cette capacité est le fruit des mécanismes de tolérance qui «éduquent le système immunitaire ». Dans certaines circonstances pathologiques, ces mécanismes sont débordés, notre système immunitaire peut reconnaître des constituants de notre organisme comme étranger, c'est l'auto-immunité. Si ces mécanismes sont délétères pour l'organisme, on parle de maladies auto-immunes : le système immunitaire détruit des composants de l'organisme qu'il doit normalement défendre.

Les connaissances actuelles et la compréhension de la maladie ne permettent pas de proposer des traitements curatifs et une meilleure connaissance des mécanismes dans ces maladies est indispensable pour une meilleure prise en charge.

Notre projet propose de constituer une vaste cohorte de patients avec réalisation d'une banque de sérum, plasma et d'ADN notamment. L'intérêt d'une telle cohorte est de réunir des patients avec des caractéristiques communes dans un ensemble hétérogène pour essayer de repérer des points communs et de comprendre des mécanismes communs de la maladie en étudiant l'histoire clinique et les échantillons biologiques de ces patients.

Les études utilisant vos échantillons pourront porter sur divers facteurs biologiques y compris génétiques concernant par exemple un nouveau marqueur de votre maladie, de façon



prospective ou rétrospective, c'est-à-dire après leur découverte, ou après la connaissance d'une nouvelle application notamment pour le traitement de ces maladies. La cohorte comporte également le recueil des données de votre dossier médical telles que l'imagerie médicale (radiologie, endoscopie, histologie) dont l'interprétation pourrait changer en fonction de l'évolution des connaissances médicales.

La finalité peut être clinique (intérêt pour vous seul) et/ou pour la recherche (connaissance des maladies).

Comment se déroulera ce programme? Quel sera votre rôle ?

Il débute par votre information et le recueil de votre consentement.

Un prélèvement biologique sanguin est nécessaire au diagnostic de votre maladie. Nous vous proposons que des tubes de sang supplémentaires soient prélevés et conservés pour des projets de recherche. Si vous acceptez cette proposition, des échantillons de sérum, de plasma, des cellules de votre sang seront conservés, congelés pour des analyses ultérieures et notamment pour constituer une banque d'acides nucléiques (ADN, ARN). Ceci permettra de réaliser des analyses plus spécialisées pour mieux comprendre votre maladie actuelle. Ces analyses seront réalisées au cours de projets de recherche portant sur les maladies auto-immunes.

Dans certains cas pour faire le diagnostic de votre maladie, il est nécessaire de pratiquer une ou des biopsies prévue(s) dans la prise en charge clinique et diagnostique habituelle de votre maladie (biopsie hépatique, rénale....). Un reliquat de tissu résultant de la biopsie, non utilisé pour le diagnostic de votre maladie, pourra éventuellement être conservé au sein du Centre de Ressources Biologiques.

Les données cliniques et personnelles liées à ces échantillons seront protégées par un codage effectué par le Centre de Ressources Biologiques du CHU d'Angers.

Vos prélèvements sont susceptibles d'être analysés pour la détection de maladies transmissibles (hépatites, HIV....).

Ces échantillons pourront de même être cédés à un autre laboratoire de recherche, public ou privé, pour des études complémentaires ayant la même thématique, les maladies auto-immunes ceci sous forme anonyme ; votre nom ne sera en aucun cas révélé.

Si besoin, ces prélèvements pourront être renouvelés lors de l'un de vos prochains passages dans le service, sauf opposition de votre part et toujours en lien avec une prise en charge habituelle de votre maladie (suivi de la maladie).

La réalisation de cette cohorte et la collection biologique associée n'engagera aucun frais supplémentaire pour vous.

Quels sont les contraintes et les risques liés à ce programme ?

Aucune contrainte supplémentaire n'existe pour votre participation à cette cohorte par rapport à une prise en charge normale. Les risques associés au prélèvement sanguin sont faibles et de courte durée. Les ponctions et/ou les biopsies tissulaires seront faites en même temps qu'une demande d'analyse entrant dans la prise en charge habituelle de votre maladie.

Quels sont les bénéfices attendus ?

Votre participation à cette cohorte "MALADIES AUTOIMMUNES " n'apporte aucun avantage immédiat pour vous par rapport à une prise en charge normale des patients dans notre service.



Pour nous médecins, votre participation à cette cohorte permettra d'améliorer les connaissances médicales autour de ces maladies.

Protection des personnes participant à cette cohorte et à la collection biologique associée

La constitution de cette cohorte et de la collection biologique associée sera menée conformément aux lois n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique et n°2012-300 du 4 mars 2012 relative aux recherches sur la personne humaine.

Le Comité de Protection des Personnes d'Angers ouest II (CPP) a émis le 24/11/2015 un avis favorable à la mise en œuvre de cette cohorte.

Le promoteur de cette cohorte, à savoir le CHU d'Angers, a contracté une assurance spécifique auprès de la société d'assurance SHAM (N° 127 051) pour couvrir les risques et les dommages liés à la constitution de cette cohorte.

Toutes les informations que vous souhaiterez obtenir ultérieurement concernant cette cohorte vous seront communiquées dans la mesure du possible par le médecin investigateur.

Toute nouvelle information disponible pouvant éventuellement modifier votre décision de participation vous sera rapportée.

Vous pourrez être informé(e) du résultat global à la fin du programme de recherche développé à partir de cette cohorte et de la collection biologique associée.

Votre consentement ne dégage ni le Centre Hospitalier Universitaire d'Angers ni les investigateurs de leurs responsabilités. Tous les coûts inhérents à cette cohorte seront à la charge du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers.

Droit de refuser ou de se retirer de cette cohorte et de la collection biologique associée

Votre participation est totalement volontaire et vous êtes libre de refuser de participer à cette cohorte ou de l'interrompre à tout moment sans avoir à vous justifier et sans aucun préjudice volontaire quant à la qualité de votre prise en charge médicale.

Si vous acceptez de participer, il vous sera demandé de signer un consentement de participation avant toute action dans le cadre de cette cohorte. La signature du formulaire de consentement n'affecte aucunement vos droits légaux.

Le médecin investigateur et/ou le promoteur peuvent interrompre à tout moment votre participation s'ils estiment que les procédures ne sont pas respectées, ou pour des raisons médicales, administratives ou autres.

Vous pouvez refuser que les échantillons biologiques qui vous concernent soient conservés et vous pouvez demander à tout moment que ces échantillons soient détruits.

Confidentialité

Votre participation à cette cohorte et les données recueillies, lors des différents projets de recherche, vous concernant resteront strictement confidentielles. Toutefois, les Autorités de Santé ainsi que les personnes mandatées par le promoteur, c'est-à-dire le CHU d'Angers, pourront avoir un accès direct à votre dossier médical afin de vérifier que cette cohorte et sa collection biologique associée sont effectuées en conformité avec la législation en vigueur et les réglementations des Autorités de Santé.

Les informations provenant des données enregistrées sur votre dossier ne seront utilisées que dans le cadre du programme de recherche associé à cette cohorte, les



publications qui en découlent le seront sous une forme codée. Votre identité ne sera jamais révélée.

Les données enregistrées feront l'objet d'un traitement informatisé. La base de données associée à ce projet fait l'objet d'une déclaration à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL). Votre droit d'accès et de rectification, prévu par la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (Loi n° 78-17, version consolidée au 7 août 2008), pourra s'exercer dans les conditions prévues par la réglementation à tout moment auprès des responsables de cette cohorte. Vous pourrez exercer ce droit directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix.

**Pour toute question, vous pouvez contacter
Le Médecin investigateur-**

Médecin investigateur

Nom :

Prénom :

Tel :

Date :

Signature :

*Ce document vous appartient et vous pouvez le communiquer à
votre médecin traitant ou à vos proches pour avis*

Fait en 2 exemplaires originaux, datés et signés.

- Un exemplaire conservé par la personne donnant son consentement
- Un exemplaire conservé par le responsable de la recherche (dossier patient).

Annexe 2 : Consentement patient majeur MALADIES AUTOIMMUNES

| | | |
|--|---|---|
| Centre Ressources Biologiques (CRB) | Consentement patient majeur MALADIES AUTOIMMUNES | Ref : CRB-0118-FO-200 V02 Version : 02 Applicable le : 23-10-2015 |
| | |  |

PARTICIPATION A LA CONSTITUTION D'UNE COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES DE "MALADIES AUTO-IMMUNES" PATIENT MAJEUR

NOM du patient :Prénom.....
Date de naissance :/...../.....
Adresse :

Etiquette
Patient

Le Médecin investigateur m'a proposé de participer à la constitution d'une cohorte et d'une collection d'échantillons biologiques associée organisées par le Centre Hospitalier Universitaire d'ANGERS, dans un programme de recherche intitulé "Maladies Auto-immunes".

Il m'a précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser, que cela n'aura pas de conséquence sur la qualité de mes soins et ne changera pas nos relations pour mon traitement.

Après lecture de la lettre d'information, je déclare :

1% Avoir été informé(e) par le Dr..... conformément à la loi N°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique

- de la nature de l'étude de recherche clinique et de ses objectifs, notamment la possibilité de pouvoir disposer de l'étude de mes caractéristiques génétiques.
- de la proposition de conserver, les échantillons de mes prélèvements au CRB du CHU d'Angers pour une durée illimitée.
- que mes prélèvements sont susceptibles d'être analysés pour la détection de maladies transmissibles (hépatites, HIV....).
- que mes échantillons et les données personnelles (cliniques et/ou ethniques), associées me concernant seront conservées sous forme codée.
- que mes échantillons peuvent être cédés à d'autres chercheurs publics ou privés du territoire national ou international, pour des projets de recherche scientifique ou de développement tout en garantissant la confidentialité de mes données.

2% Avoir noté que ce programme et la conservation des échantillons qui y est associée, a reçu pour sa mise en œuvre, un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Angers Ouest II le 24/11/2015.

3% Avoir reçu toutes les réponses souhaitées à mes questions et avoir noté que ma participation à cette recherche est totalement libre. Si je le désire, je pourrai à tout moment arrêter ma participation.

4% Avoir noté que je suis libre à tout moment de demander la destruction de mes échantillons.



5^e Avoir noté que les données cliniques et ethniques me concernant resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par des personnes collaborant à la recherche et éventuellement un représentant des Autorités de Santé. A aucun moment les données personnelles me concernant n'apparaîtront en cas de publication des résultats des travaux de recherche.

6^e Avoir été informé (e) conformément à la loi que certaines données nominatives me concernant feront pour ce programme l'objet d'un traitement informatisé en vertu de la loi "Informatique et Libertés" du 6 janvier 1978 (version consolidée au 16/10/2013). J'ai été informé(e) de la nature des informations transmises, de la finalité du traitement des données, de mon droit d'accès et de rectification par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix, de mon droit de m'opposer au traitement automatisé des données me concernant.

Compte tenu de toutes les informations reçues, j'accepte librement et volontairement :

- DE PARTICIPER A CE PROGRAMME ET AUX RECHERCHES ASSOCIEES
OUI NON
- DE PARTICIPER AUX RECHERCHES ASSOCIEES AVEC ETUDE DE CERTAINES CARACTERISTIQUES GENETIQUES
OUI NON
- QUE MES ECHANTILLONS SOIENT CONSERVES AU CRB DU CHU D'ANGERS
OUI NON
- QUE MES ECHANTILLONS ET LES DONNEES ASSOCIEES PUISSENT ETRE CEDES POUR ETRE UTILISES DANS D'AUTRES PROGRAMMES DE RECHERCHE
OUI NON

Le sujet participant au programme

Nom : Nom :

Prénom : Prénom :

Date : Date :

Signature

Signature

Le médecin investigateur du programme

Un exemplaire original signé de ce formulaire de consentement et une copie de la lettre d'information m'ont été fournis.

Fait en 3 exemplaires originaux, datés et signés.

- Un exemplaire conservé par la personne donnant son consentement
- Un exemplaire conservé par le Centre de Ressources Biologiques du CHU d'Angers
- Un exemplaire conservé par le médecin investigateur de la recherche (dans le dossier patient).

Annexe 3 : Feuille de route des prélèvements de larmes Protocole TEAR METABOGREN

| | | |
|--|---|--|
| Centre Ressources Biologiques (CRB) | Feuille de route de prélèvement de larmes «Protocole METABOGREN» | Ref : CRB-0118-FO-252 V01 Version : 01 Applicable le : 16-01-2018  |
|--|---|--|

| | | |
|----------------------------------|--|--|
| C | Centre : CHU d'Angers Collection : Maladies auto-immunes Investigateur : Dr G.URBANSKI (57901) | Services : Médecine interne Projet : METABOGREN Tél : 54003 (secrétaire) |
| Etiquette identification patient | | |

| | | | |
|--|---|---|-------------|
| ETAPE 1 (SERVICE CLINIQUE) : PRELEVEMENT DES LARMES | | | |
| <i>Remplir une feuille par patient</i> | | | |
| Nom du préleveur : | | Fonction : | Tél : |
| Signature : | | | |
| Date de prélèvement : __ __ __ __ __ | | Heure : __ h __ min | |
| Identifier le cryotube de manière anonyme en utilisant un stylo indélébile : | | | |
| Initials patient (N → Nom et P → Prénom) + type (Larmes) + Date du prélèvement | | | |
| Nombre et type de tubes à prélever | | Numéro code-barres sur l'étiquette | |
| <input type="checkbox"/> 1 Cryotube avec bandelettes imprégnées de larmes | | __ __ __ __ __ __ | |
| Date de congélation en azote : __ __ __ __ __ | | Heure : __ h __ min | |
| Commentaires éventuels : | | | |
| => LE PRELEVEMENT DOIT ETRE ACHEMINE AU CRB AVANT 16H30 (DANS L'AZOTE) | | | |
|  | |  | |
| ETAPE 2 (AU CRB) : TRANSFERT AU CRB - CONSERVATION AZOTE | | | |
| Initials du technicien __ __ | Date et heure : __ __ __ __ __ __ à __ h __ __ | Signature : | |
| Contrôle à réception : <input type="checkbox"/> Conforme <input type="checkbox"/> Non-conforme | | | |
| Enregistrement et stockage des échantillons | | | |
| Type d'échantillons reçus | Identification TD Biobank | Heure de stockage dans l'azote | |
| Cryotube de bandelettes imprégnées de larmes | __ __ __ __ __ __ | __ h __ __ | |
| Commentaires en cas d'anomalie : | | | |

COMITE de PROTECTION des PERSONNES

CPP OUEST II - ANGERS

Angers, le 23 novembre 2015

Le Comité a été saisi d'une demande d'avis pour le dossier de collection d'échantillons biologiques intitulé « Collection Maladies Autoimmunes»

n° identification du Dossier de Déclaration : DC-2014-2224

n° identification du Dossier d'Autorisation : AC-2014-2329

n° identification CPP : CB 2015/12

Promoteur : Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9

La délibération a été conduite le mardi 13 octobre 2015 sur les documents suivants :

- le courrier de soumission du dossier daté du 30 septembre 2015.
- la lettre d'information au patient majeur, version n°1 datée du 2 octobre 2015.
- le formulaire de consentement du patient majeur, version n°1 datée du 2 octobre 2015.
- la lettre d'information aux parents de patient mineur, version n°1 datée du 2 octobre 2015.
- le formulaire de consentement du patient mineur, version n°1 datée du 2 octobre 2015.

Ont participé les membres suivants mais seuls les membres titulaires ont délibéré :

- **Recherche biomédicale** : Mesdames Armand (T), Meslier (T) et Thépot-Seegers (T). Messieurs Boussicault (S), Diquet (T) et Lasocki (S).
- **Infirmier** : Madame Poirier (T), Monsieur Béduneau (S).
- **Ethique** : Monsieur Moriceau (T).
- **Psychologue** : Madame Courtillié (T).
- **Juriste** : Mesdames Lambert-Wiber (S), E. Pineau (S) et V. Pineau (T), Monsieur Rangé (T).
- **Association agréée de malades** : Madame Cartron-Launay (T).

Le comité a émis un AVIS FAVORABLE à la constitution de cette collection d'échantillons biologiques après réception le 5 novembre 2015 des documents suivants :

- le courrier de réponses du Centre de Ressources Biologiques aux remarques du comité daté du 23 octobre 2015.
- la lettre d'information au patient majeur, version n°2 datée du 23 octobre 2015.
- le formulaire de consentement du patient majeur, version n°2 datée du 23 octobre 2015.
- la lettre d'information aux parent de patient mineur, version n°2 datée du 23 octobre 2015.
- le formulaire de consentement du patient mineur, version n°2 datée du 23 octobre 2015.

Dr Nicole Meslier
Présidente du CPP Ouest II

Secrétariat :
CHU Angers
49933 Angers Cedex 9
Tél : 02 41 35 52 15
Fax : 02 41 35 54 00

**Dossier Collection Biologique
n° CPP CB 2015/12**

Madame Estelle Echard
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche
Direction Générale de la Recherche
et de l'Innovation - Département Santé
1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

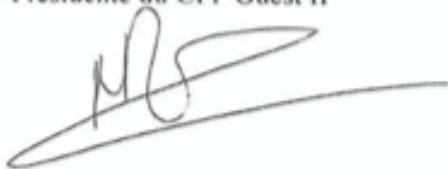
Angers, le 23 novembre 2015

Madame,

Vous trouverez ci-joint l'avis favorable du CPP Ouest II concernant le dossier de collection d'échantillons biologiques intitulé : : « **Maladies Autoimmunes** » déclaré sous les n° **DC-2014-2224 et AC-2014-2329**.

Je vous prie de croire, Madame, en l'expression de mes salutations distinguées.

Dr Nicole Meslier
Présidente du CPP Ouest II



Copie :
Dr Odile Blanchet – CRB – CHU Angers

Tear Metabogren : évaluation métabolomique des larmes dans le syndrome de Sjögren primaire

RÉSUMÉ

Introduction : Le diagnostic de syndrome de Sjögren primaire (pSS) repose sur des critères de classification comprenant des tests lacrymaux témoignant d'une atteinte lacrymale évoluée. Or, limiter la destruction des glandes lacrymales est un enjeu majeur pour réduire la morbidité du pSS. Ainsi l'identification de métabolites lacrymaux précocement perturbés pourrait servir de biomarqueur diagnostique. Les objectifs étaient de rechercher une signature métabolomique des larmes chez des patients présentant un pSS nouvellement diagnostiqué en comparaison à des patients présentant un syndrome sec oculaire non lié au pSS, et d'évaluer les variations de cette signature métabolomique selon la sévérité du syndrome sec oculaire.

Sujets et Méthodes : Nous avons comparé les compositions en métabolites des larmes de 40 patients pSS à 40 patients contrôles présentant un syndrome sec, par une approche métabolomique ciblée (Kit Biocrates® AbsoluteIDQ p180) selon une technique couplant chromatographie en phase liquide et spectromètre de masse (HPLC-MS/MS). Les larmes étaient recueillies sur bandelettes de test de Schirmer. Le plan d'analyse statistique comportait une étape de sélection de variables par régression logistique avec régularisation de type élastic-net, puis une grid search comparant régression logistique et random forest. L'association de la signature métabolomique et du statut pSS était ensuite analysée selon la sévérité du syndrome sec mesurée par le test de Schirmer, l'Ocular staining score (OSS) et la présence d'une dysfonction meibomienne. Les analyses statistiques ont été menées avec les logiciels R software et SPSS.

Résultats : Parmi les 188 métabolites testés, nous avons mis en évidence une signature métabolomique composée de 9 métabolites d'intérêt. Les capacités prédictives de la signature métabolomique étaient intéressantes (ROC-AUC 0.83) et restait spécifique du pSS après ajustement sur l'âge, le sexe, la présence d'anticorps anti-SSA et la sévérité du syndrome sec. Seule la composante lipidique de la signature variait selon le score OSS ($p=0.015$). selon le score OSS ($p=0.015$).

Conclusion : La signature métabolomique identifiée au sein des larmes de patients pSS, en comparaison à des patients avec d'autres causes de syndromes secs pourrait servir de biomarqueur lacrymal précoce du pSS et identifier des pistes physiopathologiques pour l'élaboration de traitements spécifiques.

Mots-clés : pSS, larmes, métabolomique, OSS

ABSTRACT

Tear Metabogren : Tears metabolomic analysis in primary Sjögren syndrome

Introduction : The diagnosis of primary Sjögren (pSS) is based on classification criteria that include tear tests indicating advanced tear injury. Or, limiting the destruction of the lacrimal glands is a major issue in reducing the morbidity of pSS. Thus, the identification of early disrupted tear metabolites could serve as a diagnostic biomarker. The objectives of this study were to look for a metabolomic signature of tears in patients with newly diagnosed pSS, in comparison to patients with dry eye syndrome unrelated to pSS and to evaluate the variations of this metabolomic signature according to the severity of the dry eye syndrome.

Subjects and methods : We compared the metabolite compositions of the tears of 40 pSS patients to 40 control patients with dry eye syndrome by a targeted metabolomic approach (Biocrates® AbsoluteIDQ p180 Kit) using a technique combining liquid chromatography and mass spectrometer (HPLC-MS/MS). Tears were collected on Schirmer's test strips. The statistical analysis plan included a step of selecting regression and random forest. The association of metabolomic signature and pSS status was then analyzed according to the severity of the dry eye syndrome measured by the Schirmer test, the Ocular staining score (OSS) and the presence of meibomian dysfunction. Statistical analyzes were carried out with R software and SPSS software.

Results : Among the 188 metabolites tested, we identified a metabolomic signature composed of 9 metabolites of interest. The predictive capacities of the metabolomic signature were interesting (ROC-AUC 0.83) and remained specific for pSS after adjustment for age, sex, presence of anti-SSA antibodies and severity of dry eye syndrome. Only the lipid component of the signature varied according to the OSS score ($p=0.015$).

Conclusion : The metabolomic signature identified within the tears of pSS patients, in comparison to patients with other causes of dry eye syndromes could serve as an early tear biomarker of pSS and identify pathophysiological avenues for the development of specific treatments.

Keywords : pSS, tears, metabolomic, OSS

