



TRANS
BIO
TECH

Étude des biomarqueurs lipidiques plasmatiques et cérébraux impliqués dans un modèle de dépression chez le rongeur



Mylène Brochu, Catherine Gravel, Sarah Paris-Robidas, Justine Legros, Jean-Philippe Champagne, Carole-Ann Huppé, TransBIOTech, Centre collégial de transfert de technologie, Lévis, Québec, Canada

INTRODUCTION

- La dépression est une maladie mentale qui affecte **4,4% de la population mondiale** (280 millions de personnes) et représente une des principales causes d'invalidité dans le monde.
- Il s'agit d'une maladie **difficile à diagnostiquer** (diagnostic dépendant d'observations cliniques, donc subjectif) et les **erreurs de diagnostic sont fréquentes** (mauvaise médication).
- Des études ont démontré des **modifications au niveau de certaines classes de molécules lipidiques (plasma et sérum)** chez des candidats (animaux et humains) présentant un état dépressif. L'exploitation de ces biomarqueurs pourrait conduire à une amélioration des diagnostics.
- Des variations sont observables entre les résultats de certaines études, d'où l'intérêt d'utiliser des technologies de séparation et de détection à la fine pointe de la technologie.
- L'objectif de cette étude animale est de comparer la composition lipidique dans le plasma et le cerveau entre des rongeurs sains et d'autres exposés à divers stress.
- Une **méthode analytique robuste** a été développée pour quantifier certains lipides dans le plasma et le cerveau. Les résultats de l'étude animale ne sont pas encore disponibles.

LES LIPIDES DANS LE CERVEAU ET LE PLASMA

Composés lipidiques montrant une variation dans le cadre d'une dépression chez le rongeur:

Céramides (CER)	Lactosylcéramide (LacCER)	Phosphatidyléchanolamine (PE)
Spingomyéline (SM)	Dihydrospingomyéline (dhSM)	Lysophosphatidylcholine (LPC)
Triglycérides (TG)	Phosphatidylcholine (PC)	Alkylphosphatidylcholine (PC-O)

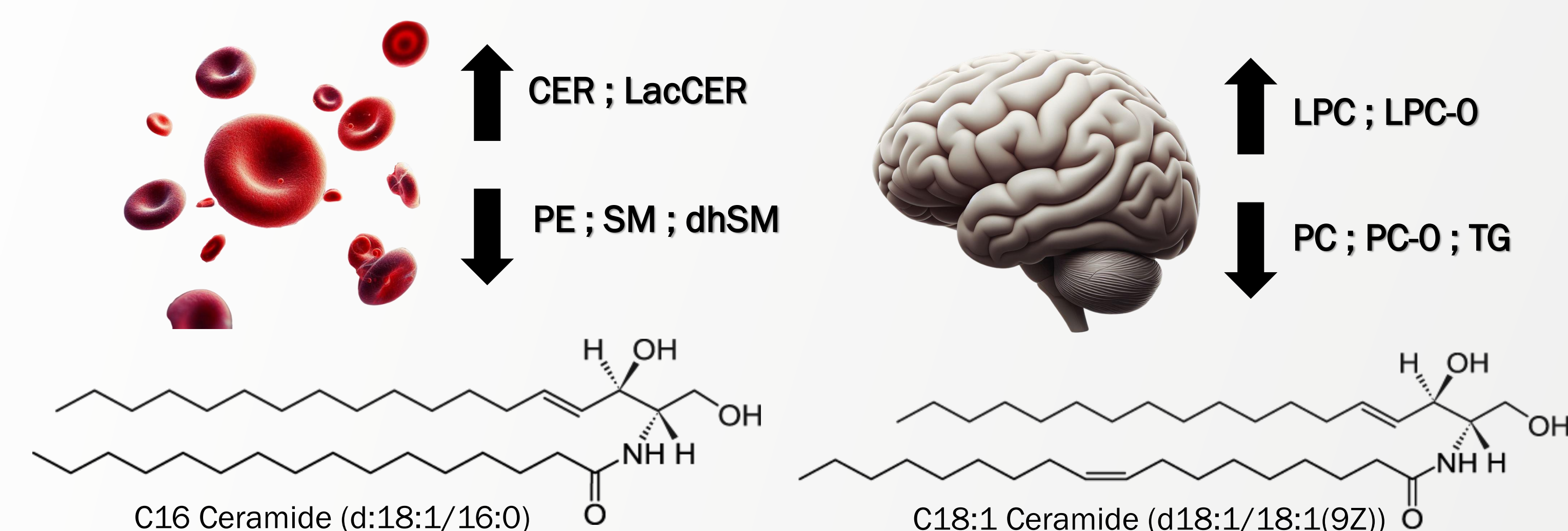


Figure 1. Lipides sélectionnés pour l'étude

LA CHROMATOGRAPHIE À FLUIDE SUPERCRITIQUE (SFC)

- CO₂ en phase supercritique est le principal solvant de la phase mobile (pression 100 à 400 fois la pression atmosphérique)
- Des co-solvants sont utilisés pour moduler propriétés de la phase mobile (méthanol, éthanol, etc.)
- CO₂ supercritique: fluide très compressible, variation de pression modifie densité du solvant, ce qui modifie rétention de l'analyte
- Uniquement en variant la pression, un gradient peut être créé (sans co-solvant)

	Normale	Inverse	Convergence*
Phase stationnaire	Polaire	Non-polaire	Variable
Phase mobile	Peu polaire	Polaire	Non-polaire (principalement CO ₂)
Composés élués en premier	Non-polaires	Polaires	Non-Polaires

* Beaucoup de paramètres à considérer, mais utilisée comme une phase normale.

Tableau 1. Comparaison de différents types de chromatographie

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Cerveau

- Peser 50 mg de cerveau préalablement homogénéisé dans un tube precellys CK-14 et ajouter 500 µL de chloroforme, puis homogénéiser à 6500 RPM pendant 15 sec.
- Transférer la totalité dans un tube à centrifugation en verre jetable, rincer le tube precellys avec 500 µL de chloroforme et transférer dans le tube à centrifugation.
- Ajouter 2 mL de méthanol et vortexer 5 sec.
- Ajouter 1 mL de solution de NaCl à 0,73% et 1 mL de chloroforme et vortexer 5 sec et centrifuger à 2600G pendant 5 min. à température pièce.
- Récouter la phase du bas et transférer dans un tube de verre jetable.
- Refaire une deuxième extraction avec 1 mL de chloroforme et combiner dans le tube de verre jetable.
- Évaporer à sec sous azote à 30 °C, puis reprendre avec 500 µL de dichlorométhane.
- Procéder à la purification sur silice (SPE).
- Reprendre avec 1 mL de la solution Heptane:IPA (9:1).

Plasma

- Transférer 50 µL de plasma dans un tube de verre à centrifugation, ajouter 2 mL de la solution MeOH:Chloroforme (2:1), puis vortexer 5 sec.
- Ajouter 500 µL de chloroforme et 500 µL de NaCl 0,73%, vortexer 5 sec. puis centrifuger 5 min. à 2600G à température pièce.
- Transférer la phase du bas dans un tube en verre jetable et extraire une deuxième fois avec 1 mL de chloroforme.
- Combiner les extraits dans le tube de verre, évaporer à sec sous azote à 30 °C, puis reprendre avec 500 µL de dichlorométhane.
- Procéder à la purification sur silice (SPE).
- Reprendre avec 1 mL de la solution Heptane:IPA (9:1).

Purification sur silice (SPE) - SPE Waters Sep-Pak Silica 100 mg, 1 mL

Conditionnement: 2 mL de dichlorométhane
 Introduction de l'échantillon: Déposer l'échantillon sur la cartouche
 Lavage: 1 mL de dichlorométhane
 Éluition: 2 x 1 mL d'une solution isopropanol:dichlorométhane (3:7)

PARAMÈTRES ANALYTIQUES (UPC²)

Système utilisé: Waters ACQUITY UPC² - MS/MS

Colonne: WATERS ACQUITY UPC2 Torus Diol 3 x 100 mm, 1,7 µm

Température colonne: 60 °C

Débit: 1,2 mL/min

Détecteur: Xevo-TQS micro

Mode d'ionisation: ES+

Capillaire: 3,0 kV

Desolvation temperature: 500 °C

Desolvation flow: 400 L/Hr

Cone: 0 L/Hr

Source temperature: 150 °C



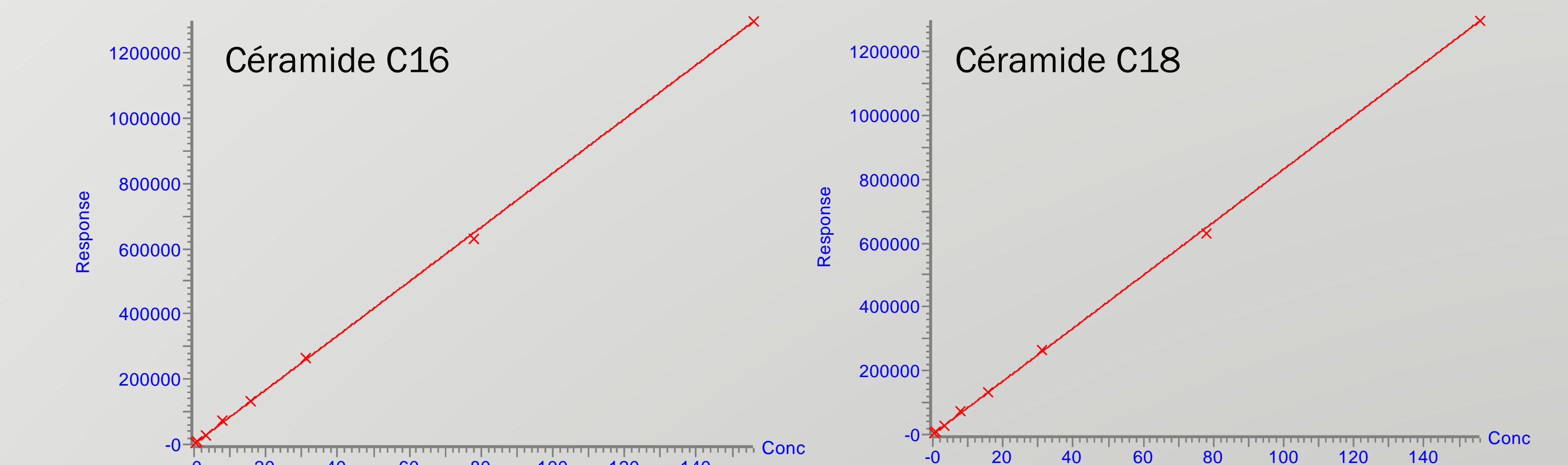
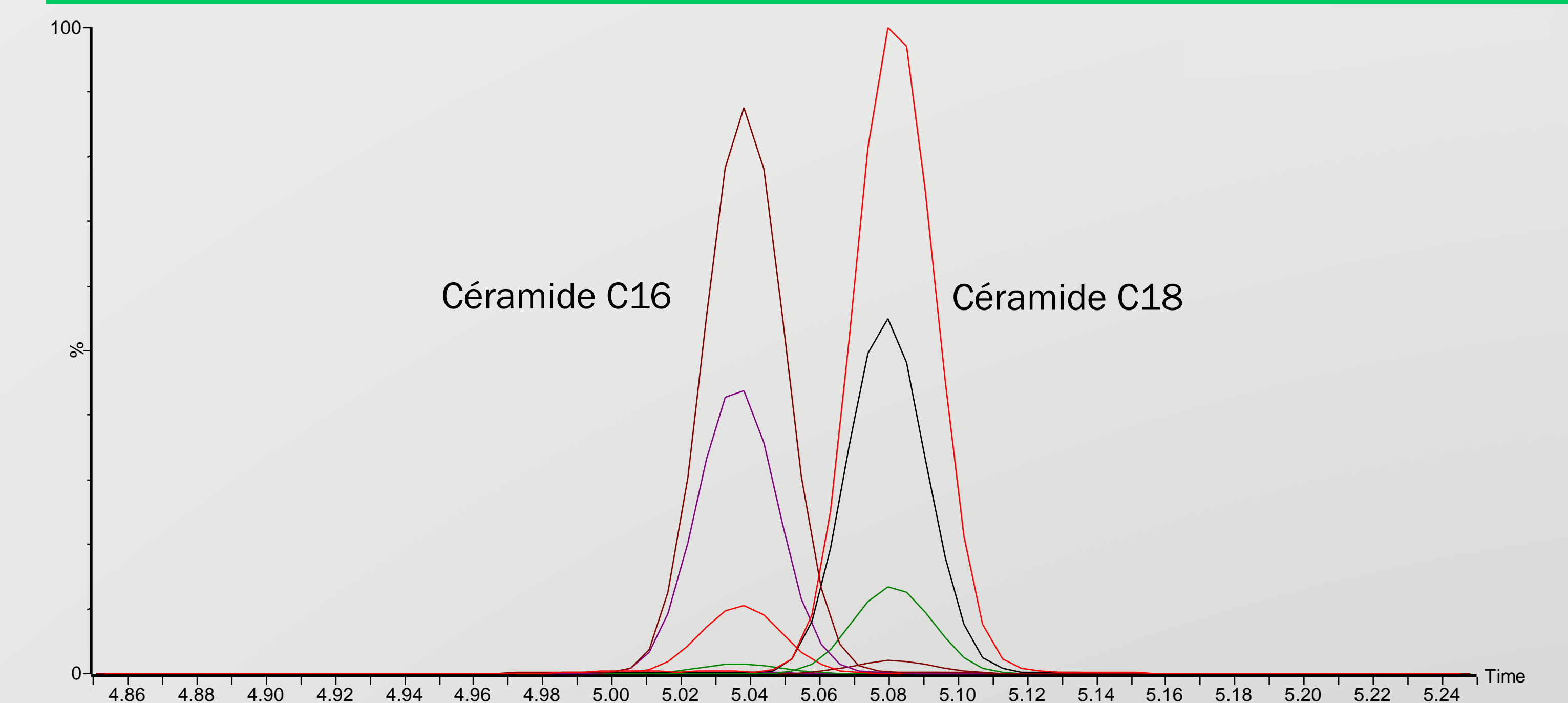
Figure 2. Waters ACQUITY UPC² - MS/MS

Phase mobile A: CO₂

Phase mobile B: Méthanol + 10 mM Acétate d'ammonium

Gradient: 99% à 89% A sur 4 min; 89% à 49% A sur 4min; 49% à 99%; 49% de A pendant 1 min; 49% à 99% A sur 1 minute (séquence sur 12 minutes)

MÉTHODE



Standard le plus dilué: 0,50 ng/mL

Standard le plus concentré: 200 ng/mL

Molécule	Récupération (%)	
	Plasma	Cerveau
C16 Ceramide(d:8:1/16:0)	109	108
C18:1 Ceramide (d18:1/18:1(9Z))	95	106

Tableau 2. % récupération des céramides dans les matrices de développement

CONCLUSIONS

- ❖ La chromatographie à fluide supercritique (UPC² - MS/MS) s'est avérée très efficace pour quantifier les céramides sélectionnés dans les matrices de développement.
- ❖ La méthode développée permet de détecter les céramides dans des concentrations de l'ordre du ng/mL.
- ❖ Les tests de récupération dans les matrices de développement (plasma et cerveau) ont permis de démontrer l'efficacité de la méthode de préparation des échantillons.

Ce projet a été financé dans le cadre d'un programme de subvention PART du MES