



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

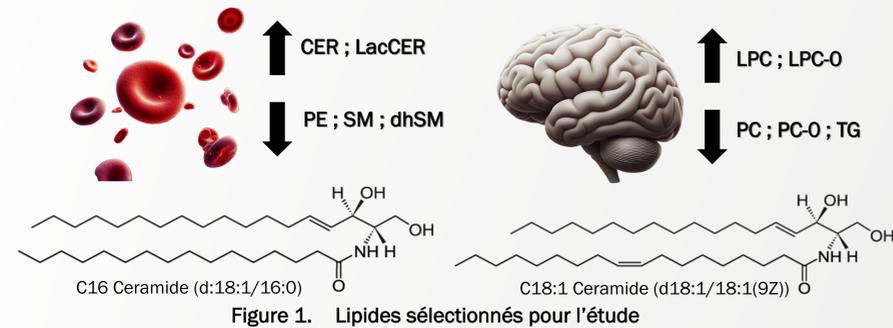
## INTRODUCTION

- 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)



## 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  
 Éluion: 2 x 1 mL d'une solution isopropanol:dichlorométhane (3:7)

## PARAMÈTRES ANALYTIQUES (UPC<sup>2</sup>)

Système utilisé: Waters ACQUITY UPC<sup>2</sup> - MS/MS  
 Colonne: WATERS ACQUITY UPC2 Torus Diol 3 x 100 mm, 1,7 µm  
 Température colonne: 60 °C  
 Débit: 1,2 mL/min

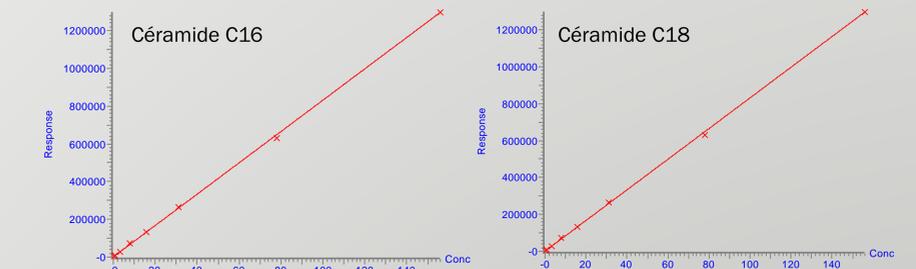
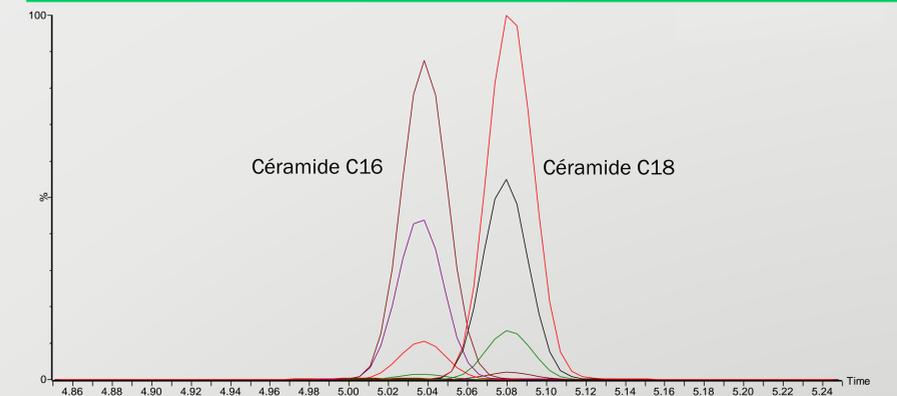
Détecteur: Xevo-TQS micro  
 Mode d'ionisation: ES+  
 Capillaire: 3,0 kV  
 Desolvation temperature: 500 °C  
 Desolvation flow: 400 L/Hr  
 Cone: 0 L/Hr  
 Source temperature: 150 °C



Figure 2. Waters ACQUITY UPC<sup>2</sup> - MS/MS

Phase mobile A: CO<sub>2</sub>  
 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

## LA CHROMATOGRAPHIE À FLUIDE SUPERCRITIQUE (SFC)

- CO<sub>2</sub> 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.)
- CO<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> )
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

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 (UPC<sup>2</sup> - 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