

## Combinaison d'approches globale, semi-globales et ciblées pour l'analyse lipidomique du cerveau de rats traités au LPS : apport à l'étude de la maladie d'Alzheimer

M. Gaudin(1,2,3) • A. Abdel Jaoued(2) • L. Imbert(4) • D. Libong(4) • P. Chaminade(4) • E. Massicot(2)  
D. Touboul(1) • N. Auzeil(2) • O. Laprèvote(1,2)

(1)Centre de Recherche, Inst. de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette • (2)Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Fac. des Scs Pharmaceutiques et Biologiques, Univ. Paris Descartes • (3)Division Métabolisme, Technologie Servier, Orléans • 4 Groupe de Chimie Analytique de Paris Sud, Univ. Paris-Sud, Châtenay-Malabry

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par l'installation progressive d'une démence sénile, par l'apparition de plaques amyloïdes, d'une hyperphosphorylation de la protéine Tau et de pertes neuronales. L'origine et la succession des événements pathologiques aboutissant aux symptômes de la MA sont mal connues. Le développement de modèles animaux est nécessaire à la compréhension de la pathogenèse de la MA, et aussi à la recherche de biomarqueurs et à de nouveaux traitements. Nous avons montré que des rats traités par du lipopolysaccharide (LPS) présentent une inflammation cérébrale associée à un stress oxydant à l'origine d'un déficit mnésique[1] ; il s'agit donc d'un modèle potentiel d'étude de la MA. Cette maladie est aussi caractérisée par une altération de la composition et du métabolisme lipidique, notamment un déficit cérébral en plasmalogènes[2] et sulfatides[3] ainsi qu'une élévation des céramides. De plus, le taux plasmatique de sphingomyélines et de céramides[4] serait un indicateur précoce de la progression de la MA. Enfin, le cholestérol semble avoir un rôle important mais à ce jour encore mal compris. Afin d'établir le profil lipidique cérébral de rats traités par du LPS, nous présentons une stratégie d'analyse comprenant l'extraction des lipides totaux à partir de coupes de cerveau et leur identification par couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse. L'analyse par spectrométrie de masse est fondée sur la combinaison de trois approches présentant des degrés de sélectivité croissant. Une approche dite globale utilise le couplage de la chromatographie liquide en phase normale afin de séparer les lipides par classes. Leur détection est assurée par spectrométrie de masse après photoionisation à pression atmosphérique (APPI). Cette méthode permet l'identification, sans a priori, de lipides de polarité très variée, allant des triterpènes apolaires aux phospholipides polaires. L'APPI permet d'obtenir une meilleure sensibilité qu'en Electrospray (ESI) pour la plupart des lipides peu polaires. Par ailleurs, une fragmentation induite en source fournit des informations structurales, qui en complément du temps de rétention chromatographique, conduisent à l'identification de la classe du lipide, mais aussi à la détermination de la nature des chaînes d'acide gras.

Cependant, la quantité considérable de données générées par la méthode globale peut compliquer le traitement chimiométrique par analyse statistique multivariée. L'utilisation de méthodes permettant de cibler un nombre plus restreint de molécules simplifie l'analyse des données. En outre, elle permet l'observation de modifications plus fines du lipidome. A cette fin, une approche semi-globale a été développée et appliquée à l'identification des six classes de lipides suivantes : phosphatidylcholines et sphingomyélines, phosphatidyléthanolamines, phosphatidylsérines, phosphatidylinositols et céramides. Après séparation par chromatographie liquide en phase inverse, les lipides sont sélectionnés par balayages spécifiques, ions précurseurs et pertes de neutres, à l'aide d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle. L'utilisation d'une voie de fragmentation adaptée permet alors de détecter sélectivement les lipides appartenant à une classe déterminée. L'approche semi-globale permet d'obtenir des informations sur le nombre total de carbones et d'insaturations des chaînes d'acide gras ainsi que sur d'éventuelles modifications telles qu'une oxydation. De plus, cette méthode offre une meilleure sensibilité que l'approche globale. Enfin, une approche ciblée, sensible et spécifique, fondée sur l'utilisation des modes Selected Ion Monitoring (SIM) et Selected Reaction Monitoring (SRM) du triple quadripôle a été développée. Elle a été appliquée à l'analyse ciblée de certains lipides dans les familles suivantes : sulfatides, sulfatides hydroxylés, stéroïdes et oxystéroïdes. L'ensemble de ces méthodes a permis d'obtenir des informations sur le profil lipidique du cerveau chez le rat sain et celui du rat traité par le LPS. La comparaison de ces profils, grâce à une analyse statistique multivariée, devrait permettre d'identifier l'impact des phénomènes de neuroinflammation et de stress oxydant associés à l'infection par le LPS, sur le lipidome cérébral du rat.

[1] Noble et al. *Neuroscience Letters*, 2007, 424(2):106-110

[2] Han X et al. D.W. *Journal of Neurochemistry*, 2001, 77:1168-1180

[3] Han et al. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 82(4):809-818

[4] Mielke MM et al. *Neurobiological Aging*, 2010 ; 31(1):17-24