



Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N° 3322

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le 3 juillet 2017

par

Ludivine MILHORAT

née le 29 août 1988, à Les Abymes

**Apport de la spectrométrie de masse et de l'imagerie MALDI-TOF
dans l'étude de l'impact de l'obésité sur l'organisme**

Examineurs de la thèse :

M le Professeur BATTU Serge

M^{me} RHOURRI-FRIH Boutayna

M^{me} MARRE-FOURNIER Françoise

Président

Juge

Juge



Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N° 3322

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le 3 juillet 2017

par

Ludivine MILHORAT

née le 29 Août 1988, à Les Abymes

**Contribution of mass spectrometry and MALDI-TOF imaging in the
study of the impact of obesity on the organism**

Examineurs de la thèse :

M le Professeur BATTU Serge

M^{me} RHOURRI-FRIH Boutayna

M^{me} MARRE-FOURNIER Françoise

Président

Juge

Juge



Liste des enseignants

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE



DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR DE LYCEE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

CHEMIN Guillaume	(01.09.2015 au 31.08.2016) BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET CLINIQUE, CANCEROLOGIE
-------------------------	---



FABRE Gabin

01.10.2015 au 31.08.2016)
CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole



Remerciements

A mon président et co-directeur de thèse, Monsieur Serge Battu, pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse, pour votre soutien pendant mes années d'études, notamment lors de mon passage en filière industrie. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

A ma directrice de thèse, Madame Boutayna Rhourri-Frih, pour m'avoir choisie pour ce sujet de stage passionnant, pour avoir accepté de diriger ce travail, et pour le temps que vous m'avez accordé malgré votre planning chargé. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

A Madame Françoise Marre-Fournier, membre du jury, pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, pour votre encadrement et le partage de vos connaissances durant toutes mes années d'études, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A toute l'équipe du CBMN de Bordeaux, de m'avoir accueillie et permis de travailler sur ce projet ambitieux et passionnant. Tout particulièrement à Luc, Corinne et Stéphane pour leur accompagnement pendant le stage. Et un énorme merci à Stéphane pour ces 3h et 11minutes (oui j'ai calculé) du temps que je t'ai volé (en plus des échanges de mails), ton aide a été pour moi très précieuse !

A ma famille : le trajet fût long, et on y croyait pas toujours, mais ça y est voici la dernière étape que vous attendiez ! Merci à vous pour votre soutien pendant toutes ces années. A ma sœur, Didine, pour avoir pris tout le temps de relire mon travail, même les plus techniques, et pour être toujours présente pour moi.

A Stéph, pour notre rencontre sur les bancs de fac (true story), de m'avoir soutenue toutes ces années, et surtout pour être la personne qui croit le plus en moi.

A Marion, pour ton soutien, tes conseils, ton accueil, ta présence, nos soirées, bref à tout (et ce n'est pas peu dire). A Suzy, parce que comme tu le dis si bien : je ne sais pas si je dois te mettre dans la catégorie « belle famille » ou « amie » ^^ !!! Merci à toi également pour ton soutien, ton écoute, ta gentillesse. Une chose est sur les filles : vous allez me manquer.

A Aurore, ma roro, pour cette évidence dès le premier jours. Pour tous tes conseils (dans tous les domaines !), pour ta présence et ton soutien sans faille, pour cette folie que tu sais développer chez moi (ex : BarTerre), et pour tous les autres moments : « à gauche ou à droite », « d'où tu crois qu'il y a une casserole »... la route est encore longue pour nous deux (m m m).

A Amandine, et notre binome « team pompom » de choc ! Pour m'avoir supportée tout le long de ce projet, de m'avoir soutenue et aidée lorsque je n'en pouvais plus, d'être un des 5 piliers de Lyon.

A Gwen, mon Picsou préféré ! Pour la complicité, les fou rires et ton soutien pendant notre mandat, mais également pour être celle qui m'a donné une opportunité en or et permis d'être là où j'en suis (merci maman Jocelyne également).

A Elias, mon future « neuro-cardiologue », pour m'avoir entraîné avec toi dans l'associatif (WESS' Mademoiselle), pour avoir pris le temps de m'écouter me plaindre (notamment en P3), pour avoir relu ce travail (bien que je ne connaisse toujours pas tes commentaires ^^).



A Olivier, pour ton soutien, ton écoute, nos soirées, et toutes les choses fabuleuses que tu me fais découvrir sur Lyon.

Merci à tous les autres limougeauds : ceux rencontrés sur « les bancs de la fac » et qui m'ont suivis pendant toutes ces années, ceux rencontrés fortuitement, parce que votre rencontre m'a comblée, à mes deux bureaux de corpo (ACEMPL 2012-2013 et 2013-2014) pour ces débats sans fin, ces fabuleux moments, cette espérance de vie diminuée. J'espère continuer à partager des moments avec vous.

Merci à tout ceux qui ont pu venir, je sais qu'un lundi de juillet ce n'est pas évident, votre présence me touche.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

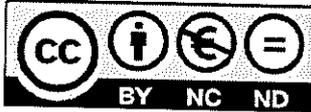


Table des matières

Liste des enseignants.....	4
Remerciements.....	7
Droits d'auteurs.....	9
Table des matières.....	10
Table des illustrations.....	13
Table des tableaux.....	16
Table des abréviations.....	17
Introduction.....	20
I. L'obésité.....	21
I.1. Historique.....	21
I.2. Définition de l'obésité.....	24
I.2.1. Chez l'adulte.....	24
I.2.1.1 Mesures anthropométriques.....	25
I.2.1.2 Mesures physiques d'évaluation.....	26
I.2.2. Chez l'enfant.....	26
I.3. Epidémiologie.....	29
I.3.1. Dans le monde.....	29
I.3.2. En France.....	29
I.4. Physiopathologie.....	31
I.4.1.1 Développement du tissu adipeux sain.....	31
I.4.1.1.1. Le tissu adipeux brun.....	32
I.4.1.1.2. Le tissu adipeux blanc.....	32
I.4.1.2 Modifications structurales du tissu adipeux lors de l'obésité.....	33
I.4.1.3 Etiologie et facteurs de risques.....	33
I.4.1.3.1. Obésité commune.....	34
I.4.1.3.2. Obésité secondaire.....	34
I.4.1.3.3. Obésité infantile.....	35
I.4.1.4 Complications de l'obésité.....	35
I.4.1.4.1. Cardio-vasculaires.....	35
I.4.1.4.2. Métaboliques.....	36
I.4.1.4.3. Respiratoires.....	38
I.4.1.4.4. Digestives.....	39
I.4.1.4.5. Uro-néphrologiques.....	39
I.4.1.4.6. Veineuses et lymphatiques.....	39
I.4.1.4.7. Osteo-articulaires.....	39
I.4.1.4.8. Hormonales.....	40
I.4.1.4.9. Puberté (45).....	40
I.4.1.4.10. Dermatologiques.....	41
I.4.1.4.11. Neurologies, psychologiques et sociales.....	41
I.4.1.4.12. Cancers.....	41
I.4.1.4.12. Cancers.....	41
II. La Spectrométrie de Masse.....	43
II.1. Principe de la spectrométrie de masse.....	43
II.1.1. Le système d'introduction de l'échantillon.....	44



II.1.2. La source d'ionisation.....	44
II.1.2.1 L'ionisation directe (dure).....	44
II.1.2.1.1. Ionisation par Impact Electronique (IE).....	45
II.1.2.1.2. Ionisation Chimique (IC).....	45
II.1.2.2 L'ionisation indirecte (douce).....	46
II.1.2.2.1. Le bombardement par atomes rapides (FAB).....	46
II.1.2.2.2. L'électrospray ou électronébullisation (ESI).....	47
II.1.2.2.3. La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI).....	48
II.1.2.2.4. Spécificités des différentes sources d'ionisation.....	48
II.1.3. L'analyseur.....	49
II.1.3.1 Analyseurs basse résolution.....	51
II.1.3.1.1. L'analyseur magnétique (B).....	51
II.1.3.1.2. Le quadripôles (Q).....	51
II.1.3.2 Analyseurs haute résolution.....	52
II.1.3.2.1. L'ion Trap (IT).....	52
II.1.3.2.2. Time of Flight (TOF).....	52
II.1.3.2.3. FT-ICR.....	54
II.1.3.2.4. Analyseurs hybrides.....	55
II.1.3.2.5. Analyseur en tandem MS/MS : le triple quadripôle.....	56
II.1.4. Le détecteur.....	57
II.1.4.1 Plaque Photographique.....	57
II.1.4.2 Cylindre de Faraday.....	57
II.1.4.3 Multiplicateur d'électrons ou Electron Multiplier Tube (EMT).....	57
II.1.4.4 Multiplicateur de photons ou Microchannel plate (MCP).....	57
II.2. Principe de l'imagerie MALDI.....	58
II.2.1. Préparation et conservation des échantillons.....	59
II.2.2. La matrice.....	61
II.2.2.1 Modes de dépôts de la matrice.....	63
II.2.2.2 La source du MALDI.....	65
II.2.3. Acquisition des données.....	65
II.2.4. Reconstruction de l'image.....	66
III. Application à un model murin.....	67
III.1. Contexte de l'étude.....	67
III.2. Les lipides.....	67
III.2.1. Les Acides Gras (AG).....	68
III.2.2. Les stérides.....	68
III.2.3. Les glycérophospholipides ou phospholipides.....	69
III.2.4. Les sphingolipides.....	71
III.3. L'étude des lipides.....	72
III.3.1. Extraction des lipides.....	72
III.3.2. Séparation des lipides.....	72
III.3.3. Identification et quantification des lipides.....	73
III.3.3.1 Imagerie MALDI.....	73
III.3.3.2 LC-MS/MS en mode MRM.....	73
III.3.3.2.1. Principe.....	73
III.3.3.2.2. Mécanisme de fragmentation.....	74
III.4. Etude expérimentale.....	76
III.4.1. Introduction.....	76



III.4.2. Matériels et méthodes	77
III.4.2.1 Imagerie MALDI	77
III.4.2.1.1. Préparation des échantillons.....	77
III.4.2.1.2. Spectrométrie de masse.....	78
III.4.2.2 LC-MS/MS	78
III.4.2.3 Produits chimiques et réactifs	78
III.4.2.4 Extraction de phospholipides à partir d'une section de tissu.....	78
III.4.2.5 Détermination de la méthode	78
III.4.2.6 RP-HPLC-MS/MS mode MRM (108).....	79
III.4.3. Résultats et discussion	80
III.4.3.1 Analyse lipidique par imagerie MALDI.....	80
III.4.3.1.1. Cerveau.....	80
III.4.3.1.2. Rein.....	82
III.4.3.1.3. Cœur	83
III.4.3.1.4. Intestin.....	85
III.4.3.2 LC-MS/MS	87
III.4.3.2.1. Identification des lipides.....	87
III.4.3.2.2. Quantification des lipides	88
III.4.3.3 Comparaison des deux méthodes d'identification des lipides.....	90
III.4.4. Conclusion.....	91
Conclusion générale et perspectives	94
Références bibliographiques	96
Annexes	105
Serment de Galien	114



Table des illustrations

Figure 1 : Illustration des définitions et seuils du surpoids et de l'obésité de l'enfant selon les courbes de corpulence du PNNS 2010 adoptés à la pratique clinique. On constate que la courbe IOTF-25 est proche de celle des références françaises au 97 ^{ème} percentile, permettant de définir la zone de surpoids dont l'obésité.	28
Figure 2 : Distribution des hommes et des femmes de 18-74 ans selon la corpulence (IMC, Références OMS) et selon l'âge, Etude ENNS, 2006	30
Figure 3 : Distribution des garçons et des filles de 3-17 ans selon la corpulence (IMC, références IOTF) et selon l'âge, étude ENNS, 2006	30
Figure 4 : Premier spectromètre de masse (Thomson J.J Phy. Mag. 1897 – « Thomson's Apparatus for Research on Cathode Rays »)	43
Figure 5 : Structure d'un spectromètre de masse	44
Figure 6 : Schéma d'une source par impact électronique (82).....	45
Figure 7 : Schéma d'une source à Ionisation chimique (82)	46
Figure 8 : Schéma d'une source FAB (82)	47
Figure 9 : Schéma d'une source Electrospray (83).....	47
Figure 10 : Schéma d'une source MALDI (de Hoffman et al, Dunod, 1999).....	48
Figure 11 : Résolution en spectrométrie de masse (84).....	49
Figure 12 : Schéma d'un analyseur Magnétique (Dempster 1918)	51
Figure 13 : Schéma d'un analyseur quadripôle (86)	52
Figure 14 : Schéma d'un analyseur Ion Trap (88)	52
Figure 15 : Schéma d'un analyseur linéaire TOF (90).....	53
Figure 16 : Schéma d'un analyseur TOF en mode réflectron (92)	54
Figure 17 : Schéma d'un analyseur FT-ICR.....	55
Figure 18 : Schéma d'un analyseur hybride Q-TOF (92).....	55
Figure 19 : Schéma d'un analyseur triple quadripôles	56
Figure 20 : Mécanisme du mode MRM.....	57
Figure 21 : Principe de l'imagerie MALDI point par point (94).....	59
Figure 22 : A gauche : organe monté sur le porte organe à l'aide de la colle OCT – A droite : exemple de spectre où la section à analyser est rentrée en contact avec la colle (1100 à 1900 m/z	60
Figure 23 : Comparaison de la cristallisation de 3 matrices SA (a), DHB (b) et HCCA (c) sur une coupe de tissu. Chaque matrice a été appliquée à l'aide d'une micropipette à une concentration de 20 mg/ml dans une solution d'ACN/0,1% TFA dans H ₂ O (97)	62



Figure 24 : Effet de la concentration sur la cristallisation : une matrice de SA (50 :50 ACN/0,1% TFA dans H ₂ O) à des concentrations différentes a été appliquée sur une coupe de tissu, et déposée avec un spot de 0,25 µL (97)	63
Figure 25 : Principe de la désorption/ionisation en MALDI.....	65
Figure 26 : Exemples d'acides gras : à gauche un acide gras polyinsaturé (acide linoléique (C18:2 ω6), à droite un acide gras saturé (acide butyrique (C4:0)).....	68
Figure 27 : Cholestérol.....	69
Figure 28 : Formation d'un acide phosphatidique (PA)	69
Figure 29 : Exemple de la formation d'une phosphatidylcholine à partir d'un acide phosphatidique et d'une choline	70
Figure 30 : Structure des différents phospholipides.....	71
Figure 31 : Sphingosine.....	72
Figure 32 : Exemple d'une phosphatidylcholine à 34 atomes de carbone avec une chaîne saturée à 16 atomes de carbone et une chaîne insaturée à 18 atomes de carbone (PC 34:1 (FA 16:0/18:1))	75
Figure 33 : Exemple de fragmentation d'une phosphatidylcholine composée de deux chaînes d'AG : une chaîne saturée de 16 atomes de carbones et une insaturée à 18 atomes de carbone : PC 34:1 (FA 16:0/18:1).....	75
Figure 34 : Exemple du spectre MS d'une molécule PC 34:1 (FA 16:0/18:1).....	76
Figure 35 : Répartition dans une coupe de cerveau à t0, du lipide m/z 772,68 pour le témoin (a), et pour le FAT (c) ; et du lipide m/z 798,44 pour le témoin (b), et pour le FAT (d)	80
Figure 36 : Comparaison des spectres moyens normalisés du cerveau à t0 chez une souris normale et FAT.....	81
Figure 37 : Répartition dans une coupe de cerveau à t8s, du lipide m/z 734,95 pour le témoin (a), et pour le FAT (c) ; et du lipide m/z 760,72 pour le témoin (b), et pour le FAT (d)	81
Figure 38 : Comparaison des spectres moyens normalisés du cerveau à t8s chez une souris normale et FAT.....	82
Figure 39 : Caractérisation par imagerie Maldi de trois zones d'intérêt au niveau d'une coupe de rein à t0, (a) Image spectrale, (b) image anatomique.....	82
Figure 40 : Comparaison des spectres moyens normalisés du rein à t0 chez une souris normale des trois zones d'intérêt, rouge : medula, bleu : cortex, violet : capsule	83
Figure 41 : Répartition dans une coupe de rein à t16 semaines pour le cortex (a), et la medula (b), des phospholipides.....	83
Figure 42 : Répartition dans une coupe de cœur à t0 pour le témoin (a et b), pour le FAT (c et d), des lipides m/z 723,24 (a et c) et 770,48 (b et d).....	84
Figure 43 : Répartition dans une coupe de cœur à t8s pour le témoin (a et b), pour le FAT (c et d), des lipides m/z 477,34 (en rouge), 616,73 (en vert, b et d), 640,65 (en bleu) et 656,29 (en jaune).....	84
Figure 44 : Comparaison des spectres moyens normalisés du cœur à t8s chez une souris normale et FAT.....	84



Figure 45 : Répartition des deux lipides principaux (592,488 Da en rouge, 781,0669 Da en bleu) dans une coupe de duodénum à t8s, dans l'organe témoin (a) et l'organe FAT (b), et leur spectre associé	85
Figure 46 : Répartition des principaux lipides (495,3531 Da en rouge, 574,7368 Da en bleu, 733,2827 Da en jaune et le 787,486 Da en vert) dans une coupe de jéjunum à t8s, dans l'organe témoin (a) et l'organe FAT (b), et leur spectre associé.....	86
Figure 47 : Répartition des principaux lipides (461,1808 Da en rouge, 572,3422 Da en bleu et le 630,4916 Da en jaune) dans une coupe d'iléon à t8s, dans l'organe témoin (a) et l'organe FAT (b), et leur spectre associé	87
Figure 48 : Etude comparative de la quantité de phospholipide par classe dans le cerveau après huit semaines de régime enrichi en graisse	89
Figure 49 : Etude comparative de la quantité de phospholipide par classe dans le rein et le cœur après huit semaines de régime enrichi en graisse.....	89
Figure 50 : Etude comparative de la quantité de phospholipide par classe dans l'intestin après huit semaines de régime enrichi en graisse	90



Table des tableaux

Tableau 1 : Classification de l'IMC chez l'adulte selon l'OMS	24
Tableau 2 : Valeurs de références selon l'OMS pour la mesure du tour de taille chez les caucasiens (27).....	25
Tableau 3 : Rapport tour de taille sur tour de hanche selon l'OMS	26
Tableau 4 : Valeurs d'IMC selon les Références Françaises chez l'enfant en 1991	27
Tableau 5 : Valeurs d'IMC selon les Références Internationales de l'IOTF chez l'enfant en 2000 (31).....	27
Tableau 6 : Comparaison des valeurs d'IMC selon les courbes de références du Plan National Nutrition Santé (PNNS) depuis 2001	27
Tableau 7 : Comparaison des critères du syndrome métabolique selon l'OMS et le NCEP ATP III (59).....	38
Tableau 8 : Nouvelle définition du syndrome métabolique selon l'International Diabetes Foundation (61).....	38
Tableau 9 : Cancers dont l'incidence rapportée est plus élevée chez les personnes obèses (2).....	41
Tableau 10 : Techniques d'ionisation en spectrométrie de masse	49
Tableau 11 : Caractéristiques des analyseurs en spectrométrie de masse.....	50
Tableau 12 : Principales matrices utilisées	61
Tableau 13 : Synthèse des lipides retrouvés dans l'intestin au cours de l'analyse en imagerie MALDI	87
Tableau 14 : Exemple de transition possible pour le PE(36:4) en infusion en mode négatif ..	88
Tableau 15 : Comparaison des lipides identifiés en MALDI-IMS et en LC-MS/MS.....	91



Table des abréviations

ACN	Acétonitrile
AG ou FA	Acide Gras ou Fatty Acid
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
B	Magnétique
CE-MS	Electrophorèse Capillaire couplée Spectrométrie de Masse
CU	Colite Ulcéreuse
DANI	N,N-dimethylaniline
DHAP	2,6-dihydroxyacetophenone
DHB	Acide 2,5 dihydroxybenzoïque
DNID	Diabète non-insulino dépendant
EMT	Electron Multiplier Tube
ENNS	Enquête Nationale Nutrition Santé
ESI	Electrospray ionisation
FAB	Bombardement par atomes rapides
FT-ICR	Résonance Cyclotronique d'ions à transformée de Fourier
GC-MS	Chromatographie Gazeuse couplée Spectrométrie de Masse
GH	Growth Hormone
HAS	Haute Autorité de Santé
HCCA	Alpha-cyano 4-hydroxycinnamique
HDL	High Density Lipoprotein
HGF	Hepathocyte growth factor
hMADS	Human multipotent adipose-derived stem
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTA	Hypertension artérielle
HTAP	Hypertension Artérielle Pulmonaire
HVG	Hypertrophie Ventriculaire Gauche
IC	Ionisation Chimique
IDF	International Diabetes Foundation
IE	Impact Electronique
IGAS	Inspection Générale de l'Alimentation et de la Santé
IL	Interleukine
IMC / BMI	Indice de masse corporel / Body Mass Index
INCa	Institut Nationale du Cancer
INPES	Institut National de Prévention pour la Santé
IOTF	International Obesity Task Force
IT	Ion Trap
ITO	Oxyde Indium et Etain
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée Spectrométrie de Masse



LPL	Lipoprotéine Lipase
LSIM	Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MALDI-IMS	MALDI Imaging Mass Spectrometry
MC	Maladie de Crohn
MC4R	Melanocortin 4 Receptor
MCP	Microchannel Plate
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Spectrométrie de Masse
NA	Non applicable
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
ObEpi	(Enquête) Obésité Epidémiologie
OCN	Oscillating Capillary Nebilizer
OCT	Optical Cutting Temperature
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Acide phosphatidique
PAD	Pression artérielle diastolique
PAS	Pression artérielle systolique
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Polyéthylenglycol
PFA	Paraformaldéhyde
PG	Phosphatidylglycérol
PL	Phospholipide
PNNS	Plan National Nutrition Santé
POMC	Pro-opiomélanocortine
ppm	partie par million
PS	Phosphatidylsérine
Q	Quadripôle
SA	Acide 3,5-diméthoxy 4-hydroxycinnamique (Acide Sinapinique)
SAHOS	Syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil
SOH	Syndrome obésité-hypoventilation
SOPK	Syndrome des ovaires polykystique
TFA	Acide trifluoroacétique
THAP	2,3,4-trihydroxyacetophenone
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOF	Time of Flight
UV	Ultra-Violet
VGEF	Vascular Endothelial Growth Factor
WC	Tour de taille (Waist Circumference)





Introduction

Le développement économique des pays a permis d'améliorer la disponibilité alimentaire et l'élimination des carences tout en améliorant l'état nutritionnel général de la population (1). Cependant, à l'heure où les pays industrialisés continuent à croître et à produire, l'obésité touche à la fois les enfants et les adultes. Reconnue comme une maladie aux Etats-Unis depuis 1985 par le « National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases » et par le « National Heart, Lung, and Blood Institute » (2), l'obésité est devenue une épidémie mondiale (Organisation Mondiale de la Santé, 1997) (1). Cette maladie chronique (1) a des répercussions aussi bien organiques que psychologiques, ce qui explique sa morbidité et sa mortalité. Les complications dues à l'obésité sont multiples, c'est pourquoi la Recherche se concentre sur la compréhension de ce phénomène devenu l'un des plus graves problèmes de santé publique dans le monde.

L'objectif de ce travail est d'identifier les liens entre l'obésité et la modification de la répartition lipidique structurelle. L'imagerie moléculaire par spectrométrie de masse (MALDI-IMS) est une nouvelle approche prometteuse pour détecter les biomolécules et offre la possibilité de visualiser les lésions et les modifications structurales au niveau moléculaire dans les différents organes. Afin de mettre en évidence ces variations, une méthode de section de tissu associée à une méthode d'analyse d'imagerie ont été développées afin de comparer le profil lipidique des organes d'une souris obèse et d'une souris normale. Cette étude analytique représente la première étape d'un processus qui devrait valider l'utilisation de cette technique pour un diagnostic précoce de certaines pathologies.

Un rappel sur l'obésité, son incidence et ses complications, sont présentées dans une première partie. La deuxième partie de ce travail détaille la spectrométrie de masse et une nouvelle technologie analytique : l'imagerie MALDI. Enfin, l'étude lipidomique sur un modèle murin par imagerie moléculaire par spectrométrie de masse (IMS) est présentée dans une troisième partie. Cette analyse se concentre sur divers organes, dont le cerveau, le cœur, les reins et l'intestin (duodénum, iléon, jéjunum et le colon). Ainsi, une étude comparative de l'IMS entre les organes de souris saines et obèses est réalisée en fonction de l'âge et de l'état physiologique des animaux. Les premiers résultats sont présentés ici.



I. L'obésité

I.1. Historique

Responsable de plusieurs millions de victimes chaque année dans le monde, l'obésité est considérée de nos jours comme un problème mondial de santé publique. Ce phénomène sociétal n'a cependant pas eu la même connotation culturelle au fil des siècles.

Au Moyen-Age, bien qu'aucune définition ne soit établie, une personne obèse est associée à la haute bourgeoisie ou représentant une classe sociale élevée et jouissant d'un accès abondant de nourriture. L'obésité est assimilée au prestige, à la force, mais également à la santé. Les femmes doivent quant à elles, présenter un embonpoint pour plaire : « les belles femmes sont grasses et blanches et tendres ou grasses et tendres et belles » (3). Une distinction entre le gros et le très gros existe. Ainsi, par exemples, ne pouvant monter à cheval, Philippe I^{er} est considéré comme « inapte à la guerre » (4). Les exemples de Guillaume le Conquérant, mort en 1087, et dont on raconte la difficulté de faire rentrer son corps dans son cercueil de par « la graisse fondue à l'intérieur de son corps », ou encore Louis VI dit Louis le Gros, mort en 1137 des suites d'une dysenterie causée par son obésité, démontrent le peu de connaissance sur les dangers associés au surpoids.

Hippocrate fait également la distinction entre la grosseur des athlètes par l'abondance de chair, et l'homme gros par l'abondance de la graisse (5).

D'un point de vue médical, les chirurgiens de l'époque (*homme sans qualification universitaire pratiquant la médecine dans les rues*) n'ont pas encore d'explication sur cette répartition disgracieuse. Cependant, les médecins ayant suivi un enseignement universitaire, orientent déjà les rois vers des « régimes de santé » (6) et, alertent sur les méfaits de l'abondance de nourriture et l'importance de la surveillance du malaise post-prandial.

Quant au très gros, le traité de Guy de Chauliac en 1363, informe que le gros « est chargé en si grand amas de chair et de graisse qu'il ne peut marcher sans fâcherie, ni toucher son fondement, ni chausser ses souliers à cause de la tumeur de son ventre, ni même respirer sans empêchement » (7). Ce traité évoque également pour la première fois, le risque des artères et des veines rendues plus étroites par la masse de chair.

A la Renaissance, les mœurs changent, l'homme gros se voit qualifié de paresseux, d'inintelligent. La gourmandise est un péché, mais la maigreur fait peur. Au XVIII^{ème} siècle, les médecins se basent toujours sur la théorie des humeurs pour soigner l'obésité : par la saignée, la purge. Cependant, l'embonpoint chez l'homme est encore associé à l'opulence financière. Les femmes quant à elles, ne doivent surtout pas présenter un surpoids, signe d'une infirmité tel le dénonce Ambroise Paré (8).



Au siècle des lumières, les mesures commencent à apparaître. On ne reconnaît pas la nécessité de peser un individu, mais les médecins prennent les mensurations de tour de taille pour les cas extrêmes d'obésité. Malheureusement cette mesure ne prend pas en compte la taille de l'individu et donc un comparatif entre les personnes est encore impossible. A cette époque, Georges-Louis Leclerc de Buffon, dans son « Supplément de l'Histoire Naturelle » de 1777, explique la corrélation entre la taille et le poids et définit un exemple de poids « normal » et de poids « excessif » : « un homme de 1,81 m doit peser entre 80 et 90 kg, il est déjà gros s'il pèse 100 kg, trop gros s'il pèse 115 kg et beaucoup trop épais s'il pèse plus de 125 kg » (9).

L'étude de ce phénomène d'embonpoint prend une place de plus en plus importante. Ce n'est qu'au XVIII^{ème} siècle qu'apparaît l'utilisation du mot obésité dans le langage courant (*terme déjà existant mais le mot corpulence était privilégié*). Il est défini par A. Furetière dans son dictionnaire universel comme une « quantité de graisse dans le corps humain, plus considérable que les autres humeurs, et que les parties solides ne le demandent, s'appelle en Médecine obésité. L'obésité n'est pas une surabondance de chair, mais de graisse ; c'est un embonpoint excessif » (10).

L'évolution de la médecine et des mentalités continuant à se développer, au XIX^{ème} siècle, on parle de graisse stockée dans les cellules. Ceci conduit à l'idée que l'obésité peut être causée par un trop grand nombre de cellules adipeuses (2). En 1832, Auguste Quételet est le premier à construire des tables (11) pour rapporter le rapport taille/poids en reprenant les écrits de Buffon et l'étendant aux âges et aux sexes. Ces tables sont établies sur une représentation moyenne de la société, ainsi chaque taille, âge, sexe, correspondent à un poids idéal. Il est cependant important de noter qu'à cette époque, l'idéal n'est pas basé sur l'esthétisme mais sur une moyenne. Au fil du XIX^{ème} siècle, la perception évolue encore avec l'introduction des pesées qui suscite curiosité et moquerie à l'égard des obèses.

Une typologie au sein de l'obésité apparaît ; la grosseur est attribuée au bon-vivant chez les hommes tandis qu'elle est considérée comme un défaut chez la femme. Parallèlement le clivage socio-économique se poursuit, l'homme bourgeois ventripotent n'est pas perçu de la même façon que l'ouvrier obèse.

L'évolution de la chimie, de la médecine, et des sciences permettent également de changer de vision sur la composition de la graisse. La recherche s'intéresse de plus en plus aux lésions organiques pouvant expliquer la présence trop importante de fluide dans le corps.

Avec la publication par Lavoisier en 1778 de sa nomenclature sur les éléments avec l'oxygène, l'hydrogène et le carbone (12), les mentalités évoluent encore. Il explique alors



que l'oxygène est le principal comburant du feu organique. « Les aliments sont pour le corps de l'animal ce que le combustible est pour le poêle » (13). Ce postulat permet à Liebig, en 1840, de classer les aliments en deux catégories : les aliments plastiques (assimilables par les chairs comme la viande animale, la caséine), et les aliments respiratoires (contenant du carbone et participant au feu comme les graisses, l'amidon, le sucre). La graisse proviendrait donc d'un excès de matière non brûlée provoqué soit par une abondance alimentaire soit par une trop grande sédentarité (14).

Après plusieurs siècles d'évolution, un intérêt soudain est porté sur l'esthétisme et le ressenti. Dans la deuxième partie du XIX^{ème} siècle, la personne obèse témoigne, et raconte sa souffrance. Ce ressenti pouvant être accentué par des échecs lors de cures amaigrissantes. La notion de poids idéal devient une évidence. L'introduction de la pesée quotidienne accentue ce phénomène. Cependant, à l'époque, le référentiel de poids idéal est encore controversé. Certains utilisent les tables établies par Quételet, d'autres utilisent les échelles de William Banting ou Louis-Alexandre de Saint Germain. La différence est flagrante entre ces deux référentiels : un individu de 1m68 est normal s'il pèse 63,5 kg (Quételet), est considéré comme normal s'il pèse 80kg (Saint-Germain) (15,16).

Dès 1920, la perception du corps évolue : « seul le muscle est noble ». Le corps devient tonicité, y compris chez la femme. Les propositions de régimes se développent. La médecine s'interroge de plus en plus sur la composition et l'apparition du gras considéré comme « dégoûtant ».

Le 25 Janvier 2005, l'obésité se confronte à la loi par deux adolescents déposant plainte auprès de la cour d'appel de New York en première instance impliquant McDonald's dans la responsabilité de leur obésité (17,18).

Le 27 Février 2007, un décret contraint la France à introduire des « messages sanitaires visant à éviter la progression de l'obésité » dans toute publicité alimentaire (19). Il en découle des Programmes Nationaux Nutrition Santé (PNNS) lancés en 2001, multipliant les messages et les conseils de santé publique, complétés par une « Proposition de loi relative à la prévention et à la lutte contre l'obésité » en 2007-2008 (20).

Au XXI^{ème} siècle, l'obésité a des conséquences négatives sur la santé physique, psychologique et sur l'épanouissement personnel au sein de la société. Actuellement utilisé comme un indice de menace sanitaire (2), l'obésité suscite encore des recherches afin de pallier aux troubles organiques qu'elle peut engendrer.



I.2. Définition de l'obésité

L'obésité est définie selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse qui représente un risque pour la santé » (21). Un déséquilibre de l'équation entre l'apport énergétique et la dépense énergétique en est la principale cause. Ainsi, l'incidence de l'obésité est directement liée à la consommation de graisses alimentaires (représentant 45% de l'apport énergétique quotidien) (22). Cependant, la recherche a indiqué que de nombreux autres facteurs seraient impliqués : des facteurs génétiques, physiologiques et comportementaux (23).

I.2.1. Chez l'adulte

Pour évaluer l'obésité chez l'adulte, l'OMS recommande l'utilisation de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) ou Body Mass Index (BMI) en anglais, selon la formule : poids (kg)/taille au carrée (m).

L'IMC a été proposée par Adolphe de Quételet au XIX^{ème} siècle. Cette méthode s'est avérée être l'une des analyses de mesure les plus pertinentes (24,25). Elle a été élaborée grâce à des enquêtes menées au sein d'une population et reliée au taux de mortalité. Il en découle une table (Annexe 1) permettant de définir le statut pondéral de chaque individu ainsi que la comparaison entre les populations. Elle sert également à identifier les populations à risques (morbidité et mortalité). On retrouve dans le Tableau 1 ci-dessous, la classification du surpoids et de l'obésité en fonction de l'IMC (indépendamment de l'âge mais analogues pour les deux sexes). Cette classification est basée sur l'association entre l'IMC et la mortalité (2). Plus qu'un outil de mesure, l'IMC permet de quantifier l'ensemble de l'état nutritionnel et ainsi permettre d'évaluer la relation entre l'obésité et le cancer (24).

Classification	IMC
Insuffisance pondérale (maigreur)	<18.5
Valeurs de référence	18.5-24.9
Surpoids	≥ 25.0
Surpoids ou Pré-Obésité	25.0 - 29.9
Obésité de Classe I	30.0 - 34.9
Obésité de classe II (sévère)	35.0 - 39.9
Obésité de classe III (massive)	≥ 40.0

Tableau 1 : Classification de l'IMC chez l'adulte selon l'OMS



L'IMC ne permet pas d'apprécier la répartition de la masse grasseuse dans l'organisme. En effet, selon la répartition de celle-ci, les risques encourus ne sont pas les mêmes. Ainsi, on retrouve deux catégories d'obésité : « l'obésité androïde » caractérisée par une répartition abdominale de la graisse, et « l'obésité gynoïde » présentant une répartition plus uniforme de la graisse dans l'organisme.

D'autres techniques directes ou indirectes de mesure de l'obésité sont également utilisées. Elles permettent d'apprécier la répartition inégale entre les individus de la masse grasseuse et de la masse maigre (contrairement à l'IMC qui estime la corpulence d'un individu). On retrouve des mesures anthropométriques et des mesures physiques d'évaluation.

1.2.1.1 Mesures anthropométriques

Ces mesures permettent d'apprécier la répartition entre la masse grasse et la masse maigre, et de définir si un surpoids dû à un excès de graisse existe. Ainsi on retrouve :

La mesure du tour de taille (WC) : la mesure doit se faire debout, à mi-distance entre la crête iliaque et la dernière côte à la fin d'une expiration (Tableau 2). Il est cependant important de préciser que cette mesure est fonction de l'ethnie (Annexe 2).

Homme	Femme	Interprétations (23,26)
≥ 94 cm	≥ 80 cm	Risque accru de complication métabolique : surpoids abdominal
≥ 102 cm	≥ 88 cm	Risque nettement accru de complication métabolique : obésité abdominale

Tableau 2 : Valeurs de références selon l'OMS pour la mesure du tour de taille chez les caucasiens (27)

Il a été constaté qu'en moyenne les hommes ont deux fois plus de graisse abdominale que les femmes non ménopausées (2).

Le tour de hanche : la mesure doit se faire au niveau le plus large, au niveau des fesses. Les valeurs peuvent aller de 45 cm à 300 cm.

Ces deux paramètres permettent d'évaluer la répartition de la masse grasseuse spécifique à l'abdomen, ayant une prévalence non négligeable dans les maladies métaboliques et



vasculaires (28). Ainsi le rapport tour de taille sur tour de hanche permet de déterminer l'excès de graisse abdominale (Tableau 3).

Homme	Femme	Interprétations
>1,0	> 0,85	Excès de graisse abdominale

Tableau 3 : Rapport tour de taille sur tour de hanche selon l'OMS

Le pli cutané : l'utilisation d'un adipomètre permet de mesurer le pourcentage de graisse à partir du pli cutané. La mesure peut se faire pour le pli cutané tricipital permettant de définir le pourcentage de masse grasse, tandis que la mesure du pli cutané sous-scapulaire et supra-iliaque permettent de mesurer la masse grasse totale (29).

1.2.1.2 Mesures physiques d'évaluation

D'autres techniques moins courantes peuvent être utilisées :

L'absorptiométrie biphotonique : elle permet de différencier la masse maigre de la masse grasse en mesurant l'atténuation de deux faisceaux de rayons X lorsqu'ils traversent le corps humain.

L'impédancemétrie corporelle : on mesure la résistance des tissus traversés par un courant de faible intensité à plusieurs fréquences. Les tissus hydratés permettent une meilleure conduction, contrairement aux tissus adipeux. On peut ainsi déterminer la masse maigre et grasse d'un sujet.

En pratique clinique, il est recommandé de commencer l'examen par les mesures de la taille, du poids, du tour de taille et de la tension artérielle. Selon les résultats, il s'en suivra la mesure du tour de hanche et du rythme cardiaque.

1.2.2. Chez l'enfant

Chez l'enfant, l'OMS préconise actuellement l'utilisation des courbes de poids selon la taille jusqu'à 10 ans.

En France, les médecins utilisent ces courbes de poids et de tailles en fonction de l'âge présentes dans le carnet de santé (Annexe 3). Cela permet d'évaluer la croissance statur pondérale mais pas la corpulence. Pour celle-ci, il faut utiliser les trois critères poids, taille et âge (30).

Historiquement les courbes de l'IMC ont été établies en 1982 par Rolland-Cachera et ont été révisées en 1991 (Tableau 4). Ces références délimitent les seuils permettant de catégoriser



les enfants de leur naissance jusqu'à l'âge de 20 ans en 3 catégories : Insuffisance pondérale, normale, surpoids. On ne voit donc pas à l'époque de distinction précise entre le surpoids et l'obésité. Depuis 1995 elles sont incluses dans le carnet de santé. Ces courbes sont des références françaises. Ce n'est qu'en 2000 que l'on voit apparaître des normes internationales éditées par l'International Obesity Task Force (IOTF) qui permettent de définir le seuil entre l'obésité et le surpoids (Tableau 5). Ces courbes ont été obtenues par une étude menée sur 6 pays différents et sont valables pour les enfants de 2 à 18 ans.

Références Françaises (1991)	
IMC < 3 ^{ème} percentiles	Insuffisance pondérale
3 ^{ème} ≤ IMC ≤ 97 ^{ème} percentiles	Normale
IMC > 97 ^{ème} percentiles	Surpoids

Tableau 4 : Valeurs d'IMC selon les Références Françaises chez l'enfant en 1991

Références internationales de l'IOTF (2000)	
IMC ≥ seuil IOTF-25	Surpoids (obésité incluse)
Seuil IOTF-25 < IMC < seuil IOTF-30	Surpoids (obésité exclue)
IMC ≥ seuil IOTF-30	Obésité

Tableau 5 : Valeurs d'IMC selon les Références Internationales de l'IOTF chez l'enfant en 2000 (31)

En France, depuis 2001, les courbes de références ont été choisies en s'appuyant sur les courbes du Plan National Nutrition Santé (PNNS) (Figure 1). Ainsi il est défini deux niveaux dans l'obésité :

Références Françaises (2001)	
97 ^{ème} percentile < IMC < seuil IOTF-30	Obésité de degrés 1
IMC ≥ seuil IOTF-30	Obésité de degrés 2

Tableau 6 : Comparaison des valeurs d'IMC selon les courbes de références du Plan National Nutrition Santé (PNNS) depuis 2001



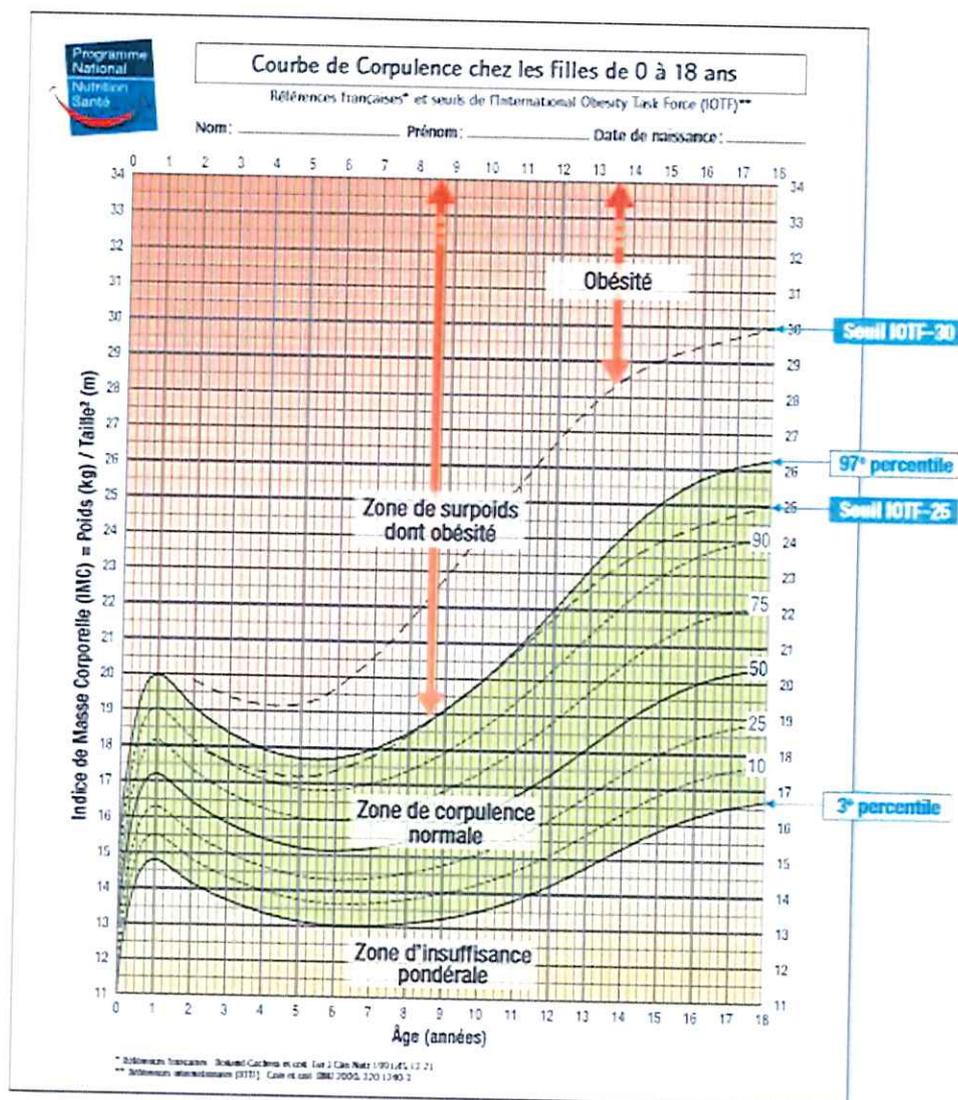


Figure 1 : Illustration des définitions et seuils du surpoids et de l'obésité de l'enfant selon les courbes de corpulence du PNNS 2010 adoptés à la pratique clinique. On constate que la courbe IOTF-25 est proche de celle des références françaises au 97^{ème} percentile, permettant de définir la zone de surpoids dont l'obésité.

I.3. Épidémiologie

I.3.1. Dans le monde

La répartition de l'obésité n'est pas uniforme dans les pays. Elle dépend du sexe, de la région, et du statut professionnel (24). Les statistiques épidémiologiques publiées en 2014 mettent en évidence l'augmentation de l'incidence de l'obésité et du surpoids. En fait, l'obésité est l'un des principaux problèmes sociaux et de santé dans le monde. Aujourd'hui, elle affecte 13 % de la population adulte mondiale dont 11 % d'hommes et 15% de femmes. De plus, le surpoids est estimé à 39 % de la population mondiale adulte avec 38% d'hommes et 40 % de femmes (21).

A l'heure actuelle, l'obésité touche également les enfants. L'étude du National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) de 2011-2012 montre que 16,9% des enfants et adolescents américains âgés de 2 à 19 ans sont obèses et 14,9% sont en surpoids (32).

L'obésité crée des complications telles que les maladies cardiovasculaires (la première cause de décès), le diabète, l'arthrose et le cancer (endomètre, du sein et du côlon) entraînant la mort d'au moins 2,8 millions de personnes chaque année (33).

I.3.2. En France

En France, l'obésité touche également la population. Pour remédier à cela, le gouvernement a demandé en 2000 au Comité de la Santé Publique d'établir un rapport nutritionnel. Cela a contribué en la mise en place de Plans Nationaux Nutrition Santé (PNNS).

Le premier PNNS (2001-2005) est initié et comporte 9 objectifs nutritionnels en termes de santé publique, 9 objectifs nutritionnels spécifiques, et 6 axes stratégiques. L'un de ces objectifs est de diminuer l'incidence et la prévalence de l'obésité. Cependant, l'Enquête Nationale Nutrition Santé (ENNS) de 2006-2007 a permis d'évaluer l'effet du PNNS1. Les résultats de l'ENNS montrent que 57% des hommes (41% en surpoids, et 16,1% obèses) et 41% des femmes adultes (23,8% en surpoids, et 17,6% obèses) (18-74 ans) sont en surpoids ou obèses. La prévalence augmente également avec l'âge (Figure 2). Chez les enfants de 3 à 17 ans, la prévalence de l'obésité est de 3,5% et de 14,3% pour le surpoids, ceci de façon identique selon le sexe (Figure 3).



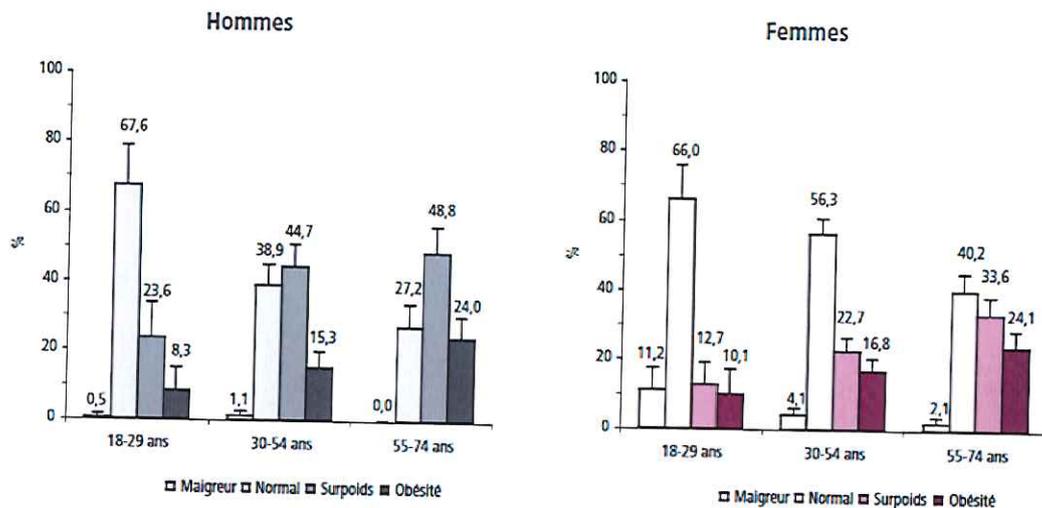


Figure 2 : Distribution des hommes et des femmes de 18-74 ans selon la corpulence (IMC, Références OMS) et selon l'âge, Etude ENNS, 2006

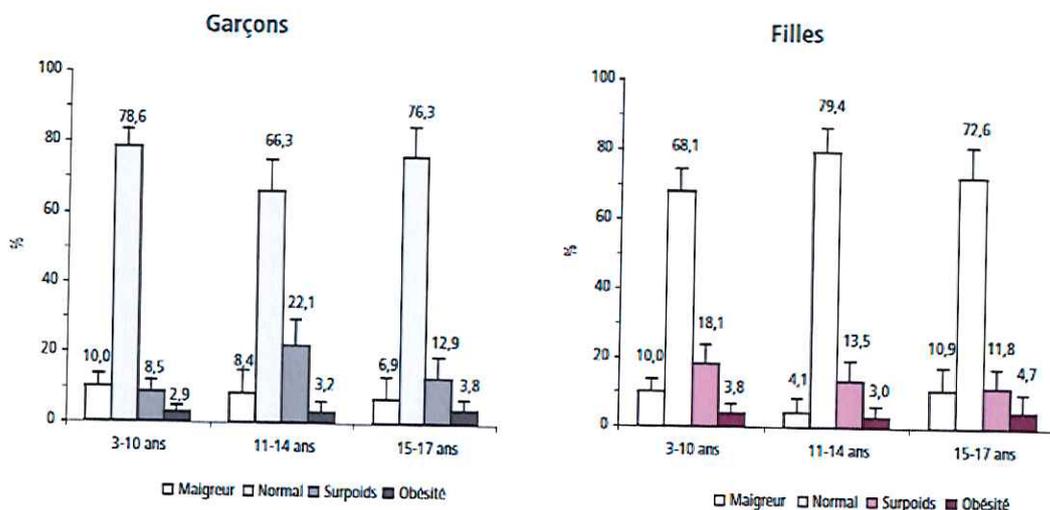


Figure 3 : Distribution des garçons et des filles de 3-17 ans selon la corpulence (IMC, références IOTF) et selon l'âge, étude ENNS, 2006

Selon l'enquête ObEpi de 2006, l'obésité affecte 12,4% de la population française (soit 5,9 millions de personnes) et 29,2% de la population sont en surpoids (soit 13,9 millions de personnes) (20,34).

Il s'en suit un nouveau PNNS (2006-2010), comportant 9 objectifs de santé publique, 10 objectifs spécifiques et 4 axes stratégiques. Au sein de l'objectif n°4, un problème n'est toujours pas résolu : l'image que la société renvoie aux personnes trop maigres ou trop grosses par rapport aux standards.

L'Inspection Générale de l'Alimentation et de la Santé (IGAS) réalise en 2010 un bilan des PNNS. Les objectifs concernant l'obésité ne sont pas atteints : l'obésité infantile est



constante mais ne diminue pas (15-17%), la proportion de personnes en surpoids adultes diminue alors que celle de l'obésité augmente.

Suite à ces constats, le gouvernement décide de retirer du PNNS l'obésité, en créant un Plan Obésité (2010-2013) formé de 4 axes prioritaires stratégiques, 23 mesures et 36 actions.

En 2012, l'obésité touche encore 15% des adultes en France. L'étude Esteban de 2014-2015 est une étude épidémiologique transversale portant sur 1000 enfants (6-17 ans) et sur 4000 adultes (18-74 ans) résidents en France métropolitaine. Elle fait suite à l'ENNS de 2006, et les résultats de cette étude seront diffusés sur l'année 2017. On s'attend à comprendre les habitudes alimentaires, l'activité physique, la prévalence de pathologies chroniques et les facteurs de risques notamment de l'exposition à de nombreuses substances de l'environnement de la population Française.

I.4. Physiopathologie

Le surpoids et l'obésité sont des processus évolutifs. Une phase dynamique de prise de poids, soit durant l'enfance, soit chez les adultes est observée. On parle de phase de constitution. Une phase statique s'en suit, le poids se stabilise, un nouvel équilibre énergétique se met en place. Cependant, l'obésité peut s'aggraver et on observera alors des phases de fluctuations pondérales.

I.4.1.1 Développement du tissu adipeux sain

Au cours du développement normal de l'être humain, deux types de tissus adipeux sont rencontrés : le tissu adipeux brun (surtout présent chez l'enfant), et le tissu adipeux blanc.

Le tissu adipeux apparaît dès la 14^{ème} semaine de grossesse chez le fœtus, et son développement s'intensifie au 3^{ème} trimestre. Il est abondant chez le nouveau-né, et représente 15% de son poids (35). A 6 mois de vie, ce tissu adipeux est estimé à 25% du poids corporel et continue d'augmenter jusqu'à l'âge d'un an. Il diminue ensuite jusqu'à 5-6 ans pour représenter environ 12-16% du poids corporel (36). Il s'en suit d'une période pré-pubertaire avec la présence d'un rebond d'adiposité (37) correspondant en une augmentation de sa masse. Il est quasiment absent chez les mammifères adultes de grandes tailles.

Chez les espèces homéothermes, dont l'homme, ce tissu a pour principale fonction de stocker les réserves énergétiques et de réguler la température corporelle. Il joue en effet un rôle important dans la thermogénèse de repos (ou obligatoire). Il permet donc à un individu au repos et à température ambiante de constituer le métabolisme de base en maintenant le



corps à une température de 37°C. Il joue également un rôle important dans la mobilisation des réserves énergétiques - lors de stress, de froid - et donc dans la thermogénèse adaptative (ou régulatrice ou facultative).

La répartition du tissu adipeux n'est pas la même d'un individu à un autre en fonction de l'âge, du sexe ou due à des pathologies. Mais, d'une façon générale ce tissu est retrouvé en deux localisations principales : hypodermique et intrapéritonéale ou viscérale.

Le tissu adipeux est organisé en lobules séparés par des cloisons de tissus conjonctif lâche. Les lobules sont quant à eux formés d'adipocytes. Ces adipocytes sont des cellules spécialisées dans la synthèse, le stockage et la mobilisation des triglycérides. Les triglycérides proviennent de l'alimentation et sont stockés dans des gouttelettes lipidiques formées elles-mêmes par une bicouche lipidique permettant l'inclusion de molécules hydrophobes dans le cytoplasme des cellules. Ces gouttelettes peuvent avoir une taille variable notamment lors d'une augmentation de la prise alimentaire, elles varient de 10 à 150 µm.

1.4.1.1.1. Le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est principalement présent chez le nouveau-né. Ce tissu est richement vascularisé et innervé. Il contient des gouttelettes lipidiques composées de triglycérides ainsi qu'un très grand nombre de mitochondries permettant l'oxydation des acides gras et donc la production de chaleur. Il présente également des cellules interstitielles : des pré-adipocytes, des cellules endothéliales : des péricytes et des mastocytes. Ce tissu intervient donc dans le processus de thermogénèse. En effet il permet de maintenir le corps des nourrissons à une température de 37°C, on parle de thermogénèse sans frisson du nouveau-né.

1.4.1.1.2. Le tissu adipeux blanc

Le développement du tissu adipeux blanc, ou adipogénèse, se fait en deux étapes. La première est le développement à partir de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes les hMADS (38) de progéniteurs d'adipocytes. La deuxième étape est la différenciation de ces progéniteurs en adipocytes matures.

Chez un individu sain, le tissu adipeux blanc est peu vascularisé et peu innervé. Les adipocytes matures (environ 50%) ont la capacité de stocker les réserves énergétiques sous forme de gouttelettes lipidiques constituées principalement par les triglycérides (39). Cela lui confère différentes fonctions notamment celles de réserve de lipide, d'homéostasie énergétique et de sécrétions de médiateurs.

Le tissu adipeux étant un organe endocrine, des facteurs angiogéniques vont donc être produits notamment le VEGF, la Leptine (dont la concentration augmente pendant l'obésité (40)), l'Angiopoïétine 1, les Adipokines ou encore l'HGF. Cette fonction endocrine lui permet



de jouer un rôle dans la transmission d'information aux muscles, au cerveau, et au cœur. Lors de l'obésité ces informations en sont modifiées.

1.4.1.2 Modifications structurales du tissu adipeux lors de l'obésité

Les adipocytes sont des cellules qui adaptent leur croissance et leur métabolisme en fonction de leur besoin et des signaux extra-cellulaires. N'ayant pas la capacité de se diviser, leur nombre dépend donc de leur capacité d'autorenouvellement (41,42). Lors d'une prise de poids, les adipocytes vont grossir en accumulant d'avantage de lipides. Cependant, cette augmentation de taille n'est parfois pas suffisante. Il va donc s'en suivre un recrutement de précurseurs des adipocytes pour augmenter leur nombre. On parle alors d'hyperplasie. Le tissu adipeux va également subir d'autres modifications, à savoir une augmentation du réseau vasculaire. Il a été démontré qu'une augmentation du réseau vasculaire augmentait la quantité de lipoprotéine lipase (LPL) favorisant l'absorption des lipides et donc leur stockage (43). On constate également une infiltration de macrophages responsables d'une inflammation, d'un remaniement de la matrice extra-cellulaire accompagné d'une fibrose.

Le tissu adipeux peut atteindre jusqu'à 45 kg ou plus chez le sujet obèse (44). On pourra observer une augmentation du nombre d'adipocytes (hyperplasie tissulaire), et/ou une augmentation de la quantité de triglycérides (hypertrophie adipocytaire).

L'augmentation de la masse adipeuse viscérale va augmenter le risque de pathologies comme un diabète de type 2, ou de maladies cardiovasculaires, tandis qu'une augmentation de la masse adipeuse du tissu sous-cutané engendrera moins de risque de développer des maladies associées à l'obésité.

Il a été constaté qu'une hyperplasie du tissu adipeux blanc chez les patients obèses est d'autant plus importante que l'obésité s'est installée précocement, avant l'âge de 10 ans. A contrario, une hypertrophie apparaît comme plus importante lors des obésités apparues plus tardivement (35).

1.4.1.3 Etiologie et facteurs de risques

Un apport calorique excessif associé à une dépense énergétique (les dépenses énergétiques de base et la thermogénèse régulatrice) insuffisante est le moteur principal de l'obésité. Cependant il existe des facteurs multiples expliquant ce phénomène. Ces facteurs peuvent être classés en deux catégories : environnementaux/comportementaux, et génétique/pathologique. On parle alors d'obésité commune ou d'obésité secondaire respectivement.



I.4.1.3.1. Obésité commune

Une modification du régime alimentaire se traduisant souvent par des troubles du comportement alimentaire (boulimie, stress, grande détresse) peut-être la première cause d'obésité. Ainsi, une augmentation des parts énergétiques correspondant à un apport supérieur aux besoins quotidiens (augmentation des portions, consommation d'aliments plus riches, restauration rapide type fastfood) va favoriser l'installation de l'obésité.

Cette modification alimentaire, associée à un changement du mode de vie (diminution de son activité physique, une sédentarité, la télévision, l'utilisation de moyens motorisés, l'arrêt du tabac non accompagné, la consommation d'alcool excessive) sont des facteurs favorisant une diminution des dépenses énergétiques et donc pouvant favoriser le stockage de graisse. L'environnement dans lequel l'individu évolue peut également être responsable d'une prise de poids et donc favoriser la survenue d'une obésité. En effet, des troubles anxieux ou dépressifs dus par exemple à une période de difficulté sociale, professionnelle, économique ou encore le manque de sommeil sont des facteurs à prendre en compte dans l'installation de cette maladie.

I.4.1.3.2. Obésité secondaire

Les obésités secondaires sont issues de troubles organiques ou génétiques ou induites par la prise de médicaments (45). On retrouve des obésités :

D'origine endocrinienne comme l'hypercorticisme, le déficit en GH, ou encore l'hypothyroïdie,

D'origine monogéniques : anomalie du MC4R, mutation du gène de la leptine, mutation du gène récepteur de la leptine, déficit en POMC,

Des Obésités syndromiques : ce sont des maladies génétiques rares avec des signes néonataux précoces comme une hypotonie néonatale favorisant un retard psychomoteur, mental, des troubles sensoriels, un syndrome dysmorphique, ou encore un retard statural. Les principales obésités syndromiques rencontrées sont le syndrome de Prader Willi, une pseudo hypoparathyroïdie, un syndrome de Bardet-Biedl ou le syndrome de l'X fragile,

Des Obésités iatrogéniques : en 2011, l'HAS a publié une liste des médicaments d'usage courant pouvant provoquer une prise de poids (46). Ainsi on retrouve par exemple : les antiépileptiques, les psychotropes et corticoïdes, les antipsychotiques atypiques et neuroleptiques (Rispéridone, Olanzapine), les antiépileptiques et thymorégulateurs (Dépakine®, Tégréto®), certain antidépresseur, les corticothérapies, les chimiothérapies anticancéreuses ou antileucémies,

Des Obésités Hypothalamiques représentées par un syndrome hypothalamique caractérisé par une prise de poids extrêmement rapide pendant l'enfance associé à de nombreux troubles (neurovégétatifs et endocriniens multiples).



1.4.1.3.3. Obésité infantile

L'obésité infantile serait corrélée à plusieurs facteurs. Notamment le poids à la naissance, reflet de la croissance intra-utérine, l'obésité des parents, ou encore les habitudes alimentaires des parents. L'état nutritionnel de la mère peut également être un facteur de risque, ainsi, une femme présentant un diabète gestationnel favorise la survenue de macrosomie, prédisposant l'enfant à une obésité. L'allaitement maternel (47) serait quant à lui, un facteur protecteur (étude Elfe (48)).

La survenue du rebond d'adiposité (49) est un indicateur prédictif de l'obésité (50). En effet, plus le rebond est précoce, plus le risque de développer une obésité est important (37). La précocité du rebond est également corrélée positivement à l'IMC des parents (51). L'analyse de la courbe de corpulence présente dans le carnet de santé, permet de déterminer l'âge et les valeurs d'IMC chez l'enfant. Ce rebond d'adiposité est considéré comme précoce s'il survient avant l'âge de cinq ans, et permet de définir les enfants à risque de surpoids ou d'obésité et ainsi mettre précocement des actions préventives en place auprès des parents. Comme chez l'adulte, l'activité physique et le contexte environnemental (socio-économique et professionnel des parents) et génétique sont également des facteurs de risque.

1.4.1.4 Complications de l'obésité

Les complications dues à l'obésité sont nombreuses et touchent tous les organes. Les principales étant les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 (80% des cas (33)), les dyslipidémies, les maladies respiratoires.

1.4.1.4.1. Cardio-vasculaires

La relation entre obésité et Hypertension artérielle (HTA) a été démontrée dans l'étude de Framingham en 1967 (52), et est actuellement la principale complication rencontrée lors de l'obésité. Elle est dite « primaire » car due à des causes évitables comme le style de vie, et peut être asymptomatique pendant une période relativement longue. Elle est caractérisée par une pression trop importante du sang exercée sur la paroi des vaisseaux sanguins. Une hypertension est déclarée lorsque les valeurs tensionnelles sont supérieures ou égales à 140 mmHg pour la pression artérielle systolique (PAS) et/ou supérieure ou égale à 90 mmHg pour la pression artérielle diastolique (PAD) (53). La pression artérielle systolique correspond à la pression exercée dans les artères lorsque le cœur se contracte (systole) et qu'il éjecte le sang dans le réseau artériel. La pression artérielle diastolique correspond quant à elle à la pression exercée dans les artères quand le cœur se remplit (diastole) entre deux contractions.



Chez un patient obèse, l'HTA s'explique par l'augmentation du tissu adipeux, en particulier viscéral. En effet, il est à noter que l'obésité abdominale est un facteur de risque cardiovasculaire majeur. Cette augmentation de masse grasseuse va à long terme se ressentir sur différents organes comme le cœur, le cerveau (AVC), le rein (insuffisance rénale), les artères (pathologies thromboemboliques) et les yeux (rétinopathies) (54). Ainsi, seraient retrouvés des complications structurelles et fonctionnelles telles qu'une Hypertrophie Ventriculaire Gauche (HVG) (par augmentation de la précharge du cœur), expliquées par une augmentation de la masse du ventricule gauche due en partie à l'augmentation de la quantité de graisse épicaudique et une infiltration grasseuse myocardique. Ou encore une cardiomyopathie de l'obésité (55) : anomalie structurale et hémodynamique aboutissant à une insuffisance cardiaque congestive (par augmentation de la postcharge majorant l'HVG) (56). De plus, un risque accru de fibrillation auriculaire par augmentation de la taille de l'oreillette gauche a également été constaté chez des sujets obèses (57).

Les adipocytes vont sécréter de la leptine qui régule le comportement alimentaire, et par extension l'homéostasie, en agissant sur des récepteurs hypothalamiques. L'augmentation de la concentration plasmatique de leptine va augmenter le tonus sympathique rénal et favoriser l'hypertension (58). Par ailleurs, le foie est le siège de la synthèse de l'angiotensinogène, convertie par la rénine au niveau rénal en angiotensine I et convertie par l'enzyme de conversion en angiotensine II. Cette dernière est un vasoconstricteur puissant qui va donc augmenter la pression artérielle.

1.4.1.4.2. Métaboliques

Des troubles métaboliques sont les principales complications rencontrées chez les patients obèses. On retrouve notamment un syndrome métabolique, une dyslipidémie ou encore un diabète de type II.

Le diabète de type II ou diabète non insulino-dépendant (DNID) est caractérisé par un état hyperglycémique dû soit à une insulino-pénie, soit à une insulino-résistance. L'insulino-résistance est secondaire à l'excès de graisse, et se traduit par une diminution de la sensibilité à l'insuline au niveau périphérique et hépatique. Au niveau périphérique, cette résistance est due à deux types d'anomalies : une diminution du nombre de récepteurs et donc une anomalie de liaison de l'insuline, et une anomalie de l'activité du transport transmembranaire du glucose suite à la liaison de l'insuline à son récepteur. Il en découle un déficit de la captation du glucose par les tissus créant un état d'hyperglycémie. Au niveau hépatique, une insulino-résistance va favoriser la production de glucose entraînant également l'augmentation de la glycémie. Ce phénomène est accentué avec l'obésité, en effet, le tissu adipeux viscéral libère des acides gras libres, qui favorise la synthèse hépatique de



triglycérides, stimulant la néoglucogenèse hépatique. La perturbation de la réponse à l'insuline conduit à une dyslipidémie (2).

Un état de dyslipidémie est donc également retrouvé chez les sujets obèses. Il se caractérise par une augmentation des triglycérides plasmatiques, une diminution de la concentration en HDL-cholestérol et une augmentation des lipoprotéines (LDL-apo-B) (2).

L'association de ces deux facteurs est généralement retrouvée dans le syndrome métabolique, bien que celui-ci ne soit pas nécessairement présent chez les personnes obèses, car il peut apparaître dans d'autres circonstances. Le syndrome métabolique regroupe plusieurs facteurs. Aucune définition internationale n'est établie, on retrouve cependant deux principales définitions (59) : celle de l'OMS (revue en 1999) et celle du National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) (Tableau 7). Des différences apparaissent entre ces deux référentiels. Pour l'OMS, la régulation du glucose est un élément clef, alors que pour le NCEP ATP III, la glycémie à jeun est un facteur de risque à part entière, les diabétiques sont exclus de leur définition car ils sont déjà considérés comme des patients à risques cardiovasculaires. Les critères établis par le NCEP ATP III sont également plus restrictifs en termes de pression artérielle, du taux de HDL-cholestérol, que ceux de l'OMS. De plus, le diagnostic d'obésité se fait sur le tour de taille pour le NCEP ATP III, alors qu'il prend en compte le rapport tour de taille/tour de hanche et/ou l'IMC selon l'OMS.

Facteurs de risque		OMS (1999)		NCEP ATP III (2001)	
		Anomalies de la régulation du glucose (glycémie à jeun, intolérance au glucose ou diabète) et/ou insulino-résistance associée à au moins deux des facteurs de risque suivants		Au moins trois des facteurs de risques suivants	
Pression artérielle (hypertension)		≥ 140/90 mmHg ou traitement antihypertenseur		TAS ≥ 130 mmHg ou TAD ≥ 85 mmHg ou traitement antihypertenseur	
Obésité viscérale ou centrale	Tour de taille	NA		Chez l'homme	Chez la femme
				>102 cm	>88cm
	Rapport tour de taille/tour de hanche	Chez l'homme	Chez la femme	NA	
	>0,9	>0,85			
	IMC	>30 kg/m ²			
Dyslipidémie	Triglycéridémie à jeun	≥ 1,5 g/L ou ≥ 1,7 mmol/L		≥ 1,5 g/L ou ≥ 1,7 mmol/L ou traitement	



	HDL cholestérol	Chez l'homme < 0,35 g/L	Chez la femme < 0,39 g/L	Chez l'homme <0,4 g/L ou <1,03 mmol/L ou traitement	Chez la femme <0,5 g/L ou <1,29 mmol/L ou traitement
Autres		Vitesse excrétion albumine urinaire $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$ ou Rapport albumine/créatinine $\geq 30 \text{ mg}/\text{g}$		Glycémie à jeun : $\geq 1,0 \text{ g}/\text{L}$ ou 5,6 mmol/L ou traitement	

Tableau 7 : Comparaison des critères du syndrome métabolique selon l'OMS et le NCEP ATP III (59)

Sur le plan pratique, l'International Diabetes Foundation (IDF) (60) a établi un consensus depuis 2005, et une nouvelle définition du syndrome métabolique. Ainsi, le diagnostic se pose lorsque l'examen répond à une obésité centrale (définie par un tour de taille spécifique selon l'ethnie, sauf si l'IMC est $> 30\text{kg}/\text{m}^2$, dans ce cas il n'est pas nécessaire de mesurer le tour de taille) et au moins deux des quatre facteurs présentés dans le Tableau 8 :

Facteurs de risques	IDF
Triglycérides	$\geq 150 \text{ mg}/\text{dL}$ (1,7 mmol/L) ou un traitement spécifique
HDL-Cholestérol	< 40 mg/dL (1,03 mmol/L) chez les hommes < 50 mg/dL (1,29 mmol/L) chez les femmes ou un traitement spécifique
Pression artérielle	TAS $\geq 130\text{mmHg}$ ou TAD $\geq 85\text{mmHg}$ ou un traitement antihypertenseur
Glycémie plasmatique à jeun	$\geq 100 \text{ mg}/\text{dL}$ (5,6 mmol/L) Ou précédemment diagnostiqué diabétique de type II

Tableau 8 : Nouvelle définition du syndrome métabolique selon l'International Diabetes Foundation (61)

1.4.1.4.3. Respiratoires

Au niveau des complications respiratoires associées à l'obésité, on retrouve le Syndrome d'Apnées-Hypopnées Obstructives du Sommeil (SAHOS) caractérisé par une réduction ou une interruption de la ventilation pendant le sommeil. Ce trouble se manifeste principalement par deux symptômes : la somnolence diurne et les ronflements nocturnes (62). On retrouve également le Syndrome Obésité-Hypoventilation (SOH) caractérisé par une hypoventilation alvéolaire, ou encore une Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP) expliquée par un dysfonctionnement cardiaque gauche avec une hypertrophie ventriculaire gauche et un trouble de la contractilité myocardique.

Chez le jeune patient obèse (enfant, adolescent), il est important de déceler précocement les complications respiratoires telles que l'asthme (essoufflement, toux, crise de dyspnée), les troubles respiratoires du sommeil dont l'apnée du sommeil (ronflements, réveils nocturnes,



somnolences diurnes) car celles-ci, en plus des complications physiques et organiques, peuvent retentir sur le travail scolaire de l'enfant et favoriser un repli social non négligeable.

I.4.1.4.4. Digestives

L'obésité induit des modifications du fonctionnement du tube digestif, et, est responsable de Maladies Inflammatoires de l'Intestin nommées les MICI, correspondant à des troubles inflammatoires chroniques de l'appareil gastro-intestinal. Cependant ces maladies sont hétérogènes et multifactorielles. Les MICI les plus courantes sont la Maladie de Crohn (MC) et la Colite Ulcéreuse (CU) (63). Un régime alimentaire riche en graisse associé à l'obésité favorisent les MICI (64). En effet, l'hyperpression exercée par une obésité abdominale favorise la détérioration du sphincter inférieur de l'œsophage, favorisant les reflux gastro-œsophagiens et donc l'acidité gastrique. Il a été constaté chez les patients obèses une augmentation systémique de cytokines pro-inflammatoires (l'IL-6, TNF α). Ce phénomène a été également retrouvé chez les patients atteints de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse. Il y a donc probablement une relation entre les deux éléments (65).

Par ailleurs, la prévalence de symptômes digestifs (douleurs abdominales, diarrhées) est augmentée chez les patients avec un IMC ≥ 30 kg/m² (66).

I.4.1.4.5. Uro-néphrologiques

L'obésité entraîne une stéatopathie non alcoolique caractérisée par une accumulation intrahépatique de graisse ou stéatose. Cette pathologie est souvent associée à une inflammation localisée, qui évolue en stéatohépatite puis en fibrose puis en cirrhose pouvant créer à long terme, une insuffisance hépatique ou un carcinome hépatocellulaire (67). De plus, chez les personnes obèses, il est constaté une relation proportionnelle entre l'excès pondéral et l'hypertrophie glomérulaire (68). A long terme, il est également retrouvé une insuffisance rénale chronique avec des lésions sclérotiques des glomérules, favorisant des incontinences urinaires (69).

I.4.1.4.6. Veineuses et lymphatiques

Comme évoqué précédemment, l'obésité va également agir sur les vaisseaux sanguins favorisant par exemple une HTA. Elle peut également provoquer une insuffisance veineuse responsable d'œdème des membres inférieurs, des varices, des ulcères, des dermites ocres ou encore des phlébites (et par extension des embolies pulmonaires) (66).

I.4.1.4.7. Osteo-articulaires

Toute surcharge pondérale a un retentissement sur les articulations. Ainsi il est aisément compréhensible qu'une obésité puisse induire une arthrose de la hanche, ou du genou avec



des douleurs articulaires favorisant la diminution du périmètre de marche, et limiter les activités ainsi que les gestes du quotidien.

Par ailleurs, un excès alimentaire, de graisses ou d'alcool favorisent une hyperuricémie provoquant des pathologies rhumatismales comme la goutte.

Chez l'enfant ou l'adolescent en surpoids ou obèse, il est fréquemment retrouvé une épiphysiolyse de la tête fémorale (66) : il s'agit d'un déplacement en haut et en avant du col fémoral par rapport à la tête suite à l'atteinte du cartilage de conjugaison. On retrouve également le syndrome du pied plat, un genu valgum, un syndrome fémoro-patellaire, des rachialgies, ou encore des troubles de la statique vertébrale (scoliose, cyphose) (45).

1.4.1.4.8. Hormonales

Chez la femme, le surpoids et l'obésité favorisent une diminution de la fertilité (70) de part une altération de la qualité ovocytaire et endométriale, et d'autre part due à l'inhibition de l'ovulation. Il y a en effet, une augmentation des risques de Syndrome des Ovaires Polykystiques (SOPK) et une augmentation de risque de fausses couches.

Au cours de la grossesse (70) de nombreuses complications maternelles et fœtales peuvent être observées. Ainsi, on retrouve chez la femme enceinte un risque accru d'hypertension gestationnelle, de prééclampsie (71), d'accouchement prématuré, de diabète gestationnel, ou encore de troubles thromboemboliques. Les complications fœtales se manifestent quant à elles par des malformations congénitales (défaut du tube neural, hydrocéphalie, fente labiopalatine, anomalie cardiovasculaires), des macrosomies, un risque de décès in utéro, et également une prédisposition de l'enfant à l'obésité plus tard (72).

Chez l'homme il est observé un risque de dysfonctionnement érectile, et de diminution de la spermatogénèse en cas d'obésité (73).

De façon générale, le surpoids et l'obésité augmentent le taux de plusieurs hormones directement impliquées dans la prolifération de cellules cancéreuses (74).

1.4.1.4.9. Puberté (45)

Chez l'enfant et l'adolescent en surpoids ou obèses, on constate une avancée de la puberté, surtout chez la fille, mais également un syndrome des ovaires polykystiques associé à un contexte métabolique (recherche d'une insulino-résistance). Chez les garçons, on retrouve un retard de la puberté, avec des symptômes comme une verge enfouie (taille apparente réduite, verge de taille normale à l'examen, d'où la nécessité d'expliquer et de dédramatiser la situation). Le diagnostic peut également s'orienter vers une suspicion d'hypogonadisme si présence d'un micropénis vrai ou d'une gynécomastie (développement de la glande mammaire chez le garçon).



I.4.1.4.10. Dermatologiques

Chez l'enfant ou l'adolescent il est important de procéder à une inspection de la peau pour déceler toutes complications cutanées (45). La présence de vergetures sur le ventre, les cuisses ou les bras peut être de différents types : rosées, larges et violacées ou verticales pathologiques, et nécessite l'explication du mécanisme d'action d'apparition des vergetures ou la consultation spécialisée d'un endocrinopédiatre. De même une hypertrichose, surtout présent chez la jeune fille, peut expliquer la présence de pilosité excessive des zones sous la dépendance des androgènes. Il faudra alors procéder au dosage des androgènes pour éliminer toute cause hormonale.

On retrouve également chez les personnes obèses des mycoses dans les plis, une hyperpigmentation associée à un épaissement des grands plis (acanthosis nigricans), ou encore une hyperkératose plantaire (57).

I.4.1.4.11. Neurologies, psychologiques et sociales

Dans le cerveau, l'obésité compromet la fonction hippocampique en favorisant l'inflammation (75). Ainsi, les études cliniques suggèrent que l'obésité et le diabète de type 2 compromettent l'intégrité structurelle des régions médiales du lobe temporal impliquées dans la mémoire et confèrent une plus grande vulnérabilité (76).

L'obésité a également des conséquences sociales avec des difficultés d'embauche, des arrêts de travail fréquents, et par extension une altération de la qualité de vie. En parallèle de ces conséquences sociales, subsistent des conséquences psychologiques avec un sentiment d'exclusion, une augmentation de la mésestime de soi, de l'état dépressif, de l'isolement, et un rejet de son corps.

I.4.1.4.12. Cancers

L'Institut Nationale du Cancer (INCa) reconnaît le lien entre le surpoids et l'obésité et le risque de cancers. En 2000, il estime à 2300 décès imputables à un surpoids ou une obésité (74).

De plus, selon l'OMS, un certain nombre d'étude a mis en évidence l'association positive entre le surpoids et l'incidence de certains cancers (notamment les cancers hormonodépendants et gastro-intestinaux) (Tableau 9).

Population	Type de cancer
Chez la femme : Endomètre, ovaire, sein, col utérin	Cancers hormonodépendants
Chez l'homme : prostate	Cancers hormonodépendants
Chez les deux sexes : colorectal, vésicule biliaire, pancréas, foie et rein	Cancers gastro-intestinaux, hépatiques et rénaux

Tableau 9 : Cancers dont l'incidence rapportée est plus élevée chez les personnes obèses (2)



En effet, des organes tels que les intestins, le cerveau et le foie détectent une augmentation des lipides et de la forme du taux de production de glucose hépatique pour diminuer l'appétit. Ainsi, l'élévation des taux de lipides affecte l'énergie et l'homéostasie du glucose (22). Cette dysrégulation peut-être responsable de maladies telles que le cancer (77).

L'état d'obésité est directement imputable à 27 % chez les hommes et à 29% chez la femme, de cancer du rein. Par ailleurs, une étude cas-témoins a montré que les personnes ayant un IMC élevé ont 5,9 fois plus de risque de développer un carcinome rénal (78). De même, une cohorte dans différentes populations a mis en évidence que les personnes en surpoids ont un risque de développer des maladies rénales plus élevées de 40 % qu'un individu ayant un IMC normal (24).

Le cancer du côlon est la deuxième cause la plus fréquente de décès par cancer dans le monde (79). En 2013, environ 11% des cas de cancer colorectal ont été attribués à la surcharge pondérale et l'obésité en Europe (80). Une alimentation riche en sucres raffinés, faible en fibres et l'inactivité physique sont des déterminants indépendants de la résistance à l'insuline et à l'hyper insulinémie. De ce fait, l'insuline est le médiateur biochimique le mieux établie entre l'obésité et le cancer du côlon. Par ailleurs, on remarque un plus grand risque de cancer du côlon chez les hommes de tout âge et pour les femmes pré-ménopausées qu'il n'y en a chez les femmes ménopausées (81).

Des recherches récentes démontrent qu'il n'y a pas de dépôt de matières grasses dans les poumons, mais une congestion vasculaire, une inflammation et des maladies pulmonaires (24). L'apparition d'un cancer du poumon ne serait donc pas directement favorisée par l'obésité.



II. La Spectrométrie de Masse

La spectrométrie de masse (MS) voit ses applications évoluer depuis une vingtaine d'années, que ce soit dans le domaine de la physique, de la chimie ou encore de la biologie. Bien que récente, son fonctionnement est basé sur des principes physiques connus depuis plus d'un siècle. En effet, en 1897, Joseph John Thomson (1856-1940) découvre les électrons grâce à des études expérimentales menées en milieu gazeux, et reçoit en 1906 le Prix Nobel de physique pour « son travail sur la conductivité électrique des gaz ». Au début du 20^{ème} siècle, il construit le premier spectromètre de masse (Figure 4).

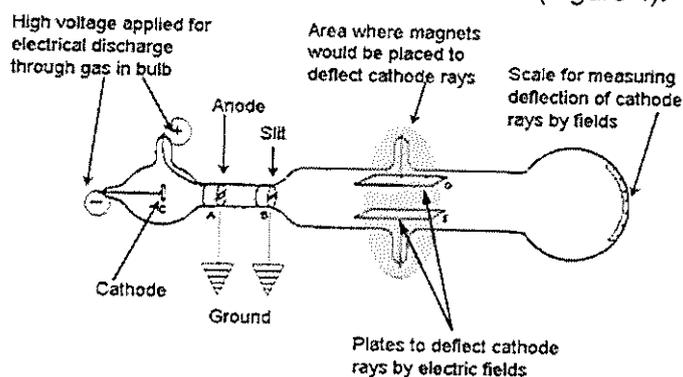


Figure 4 : Premier spectromètre de masse (Thomson J.J. Phy. Mag. 1897 – « Thomson's Apparatus for Research on Cathode Rays »)

En 1922, Francis William Aston (1877-1945), sous la direction de Thomson, reçoit le Prix Nobel de chimie « pour sa découverte, au moyen de son spectromètre de masse, des isotopes d'un grand nombre d'éléments non radioactifs ». En 1918, Arthur Jeffrey Dempster (1886-1950) créa le premier spectromètre de masse magnétique. Celui-ci permet d'ioniser des molécules en phase gazeuse par l'intermédiaire d'un faisceau d'électrons généré par un filament chauffé.

Grâce à ses pionniers, les principes fondamentaux de la MS sont bien connus. Cela a permis de développer de nouvelles sources d'ionisation et de nouveaux analyseurs. L'utilisation de la spectrométrie de masse se diversifie notamment aujourd'hui dans la protéomique.

II.1. Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique qualitative et quantitative.

Elle permet une analyse structurale de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon en les fragmentant et permettant ainsi de remonter à la structure de la molécule.



La spectrométrie de masse permet de séparer des molécules d'intérêt par rapport à leur masse et leur charge. C'est un outil de détection, de dosage et d'identification de composés organiques ou inorganiques.

Le principe de la détection est basé sur l'ionisation d'un échantillon en phase gazeuse, il s'agit d'une technique destructive. Elle permet de recueillir un grand nombre d'information sur la composition de l'échantillon grâce à sa grande sensibilité (limite de détection de l'ordre du picogramme), sa haute résolution et sa rapidité d'analyse.

Un spectromètre de masse est formé de plusieurs éléments organisés en série ayant chacun une fonctionnalité propre (Figure 5). Le principe de la MS repose sur le choix de la source d'ionisation, de l'analyseur et du détecteur.

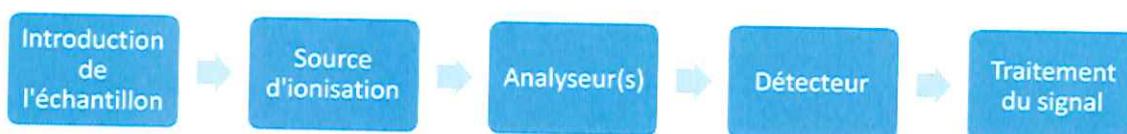


Figure 5 : Structure d'un spectromètre de masse

II.1.1. Le système d'introduction de l'échantillon

Il permet d'introduire soit directement dans la source l'échantillon à analyser sous forme gazeuse (par injection par espace de tête), liquide (injection directe) ou solide (par le biais d'une canne, ou par un dépôt sur plaque) ; soit indirectement par couplage à une autre méthode séparative comme la chromatographie liquide (LC-MS), gazeuse (GC-MS) ou encore l'électrophorèse capillaire (CE-MS).

II.1.2. La source d'ionisation

La source d'ionisation, comme son nom l'indique, permet d'ioniser les molécules présentes au sein de l'échantillon soit par ionisation directe (ou dure), soit par ionisation indirecte (ou douce) utilisant un solvant ou un gaz réactant comme intermédiaire d'ionisation. Les sources d'ionisation sont nombreuses et génèrent des ions selon des principes physiques différents. Le choix de cette source va donc être dépendant du composé, de ses caractéristiques physicochimiques (taille moléculaire, polarité, volatilité), et de l'étude souhaitée (identification structurale ou quantification) (Tableau 10).

II.1.2.1 L'ionisation directe (dure)

L'ionisation directe ou dure permet d'étudier les petites molécules volatiles non thermosensibles. Elle génère des ions moléculaires à nombre impair d'électron qui se fragmentent beaucoup. Elle permet de donner des renseignements sur la structure du composé étudié.

II.1.2.1.1. Ionisation par Impact Electronique (IE)

La première méthode d'ionisation utilisée en MS a été l'ionisation par Impact Electronique (IE). Elle permet de générer un grand nombre de fragments. Le principe repose sur l'ionisation directement dans la source de l'analyte d'intérêt. L'échantillon est déposé sur un filament porté à incandescence. L'évaporation de celui-ci, associé à un bombardement d'électron issu d'un filament de tungstène génère l'ionisation par arrachement d'un électron à la couche de valence du composé à analyser (Figure 6).

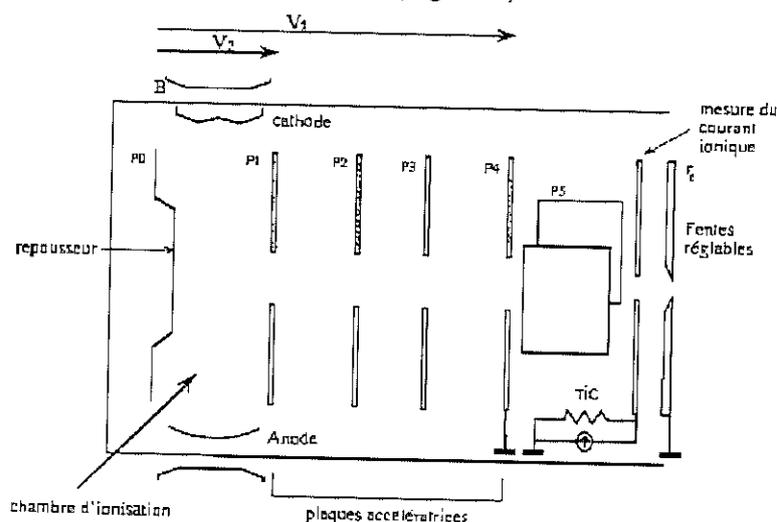


Figure 6 : Schéma d'une source par impact électronique (82)

II.1.2.1.2. Ionisation Chimique (IC)

Les électrons émis par un filament sont accélérés par une différence de potentielle d'environ 400 volts. Ces électrons ionisent les molécules de gaz réactif présentes dans la chambre d'ionisation sous une pression de 1 mmHg. Les ions ainsi formés réagissent avec les molécules du composé introduit à une pression partielle de quelques 10^{-6} mmHg (Figure 7). On retrouve donc une interaction de type ion-molécule. C'est une méthode plus douce que l'IE, et permet d'obtenir des ions quasi moléculaires abondants. Plusieurs types d'ionisation sont rencontrés : par transfert de proton (réaction acide base de Brönsted), par formation d'adduits (les ions s'associent à des molécules polaires), par ionisation chimique par échange de charge (obtention d'un radical cation), ou encore par réaction avec le gaz ionisant.



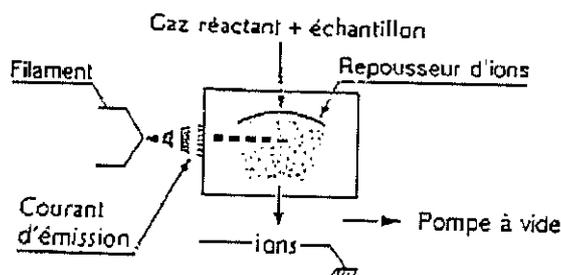


Figure 7 : Schéma d'une source à ionisation chimique (82)

II.1.2.2 L'ionisation indirecte (douce)

Contrairement à l'IE ou à l'IC, dont l'ionisation est réalisée en phase gazeuse, les techniques d'ionisation douce vont s'intéresser aux composés polaires, peu volatils ou thermiquement fragiles. L'ionisation va donc ici se faire selon le principe de désorption, c'est-à-dire, en ionisant et évaporant simultanément l'échantillon avec un transfert rapide d'énergie. Avec ce type de sources, les composés obtenus seront préférentiellement des ions moléculaires à nombre pair d'électron, relativement stables.

II.1.2.2.1. Le bombardement par atomes rapides (FAB)

La source FAB est également appelée LSIM (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry). L'échantillon est dissout dans une matrice liquide (le plus souvent du glycérol) susceptible de céder des protons. Des ions lourds comme l'Argon ou le Xenon sont produits par une cathode froide placée à quelques centimètres de l'échantillon à analyser. Les ions lourds produits lors de la décharge sont accélérés à haute énergie par un potentiel de quelque kV maintenu entre deux électrodes. A la sortie très étroite d'un canon, il se produit un échange de charges donnant des atomes lourds à partir des ions lourds (Figure 8). Cette source est utilisée pour l'analyse de molécules polaires à haut poids moléculaire. Malheureusement cette source donne souvent un bruit de fond non négligeable.



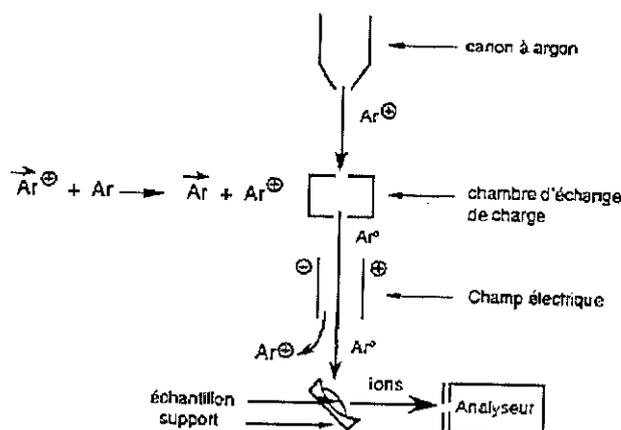


Figure 8 : Schéma d'une source FAB (82)

II.1.2.2.2. L'électrospray ou électronebulisation (ESI)

Le principe de l'ESI repose sur la formation de gouttelettes chargées sous l'effet d'un champ électrique. On observe un effet concentration dépendant, il est ainsi préférable d'utiliser une solution concentrée au débit le plus faible possible. Il fonctionne à basse température à pression atmosphérique (Figure 9). Peu d'énergie interne est communiquée aux ions. Il permet d'extraire des ions de large masse moléculaire (grâce à la multicharge), préférentiellement des molécules polaires. C'est une méthode sensible, mais ne fournit que peu d'information sur la structure et est très sensible à la présence de sels ou additifs, ce qui nécessite impérativement un dessalage préalable.

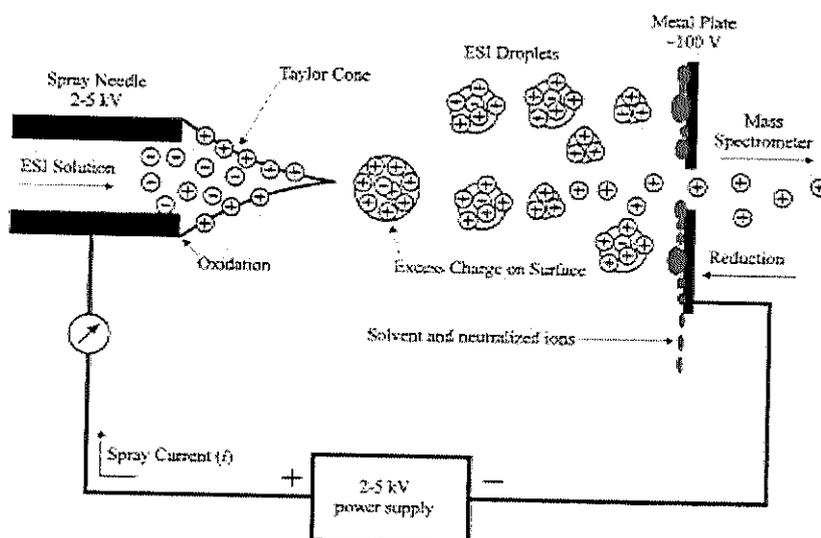


Figure 9 : Schéma d'une source Electrospray (83)

II.1.2.2.3. La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

Un faisceau laser est utilisé dans le domaine de l'UV, pour désorber et ioniser l'échantillon sur une surface métallique conductrice. Les molécules de matrice absorbent l'énergie transmise par le faisceau sous forme de photons, s'excitent et s'ionisent. L'énergie absorbée par la matrice provoque la dissociation et son passage en phase gazeuse. Les molécules de matrice ionisée transfèrent leur charge à l'échantillon (Figure 10). Ce type de source permet principalement la formation d'ions monochargés $(M+H)^+$, ou sous formes d'adduits $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$, et faiblement des ions multichargés $(M+nH)^{n+}$.

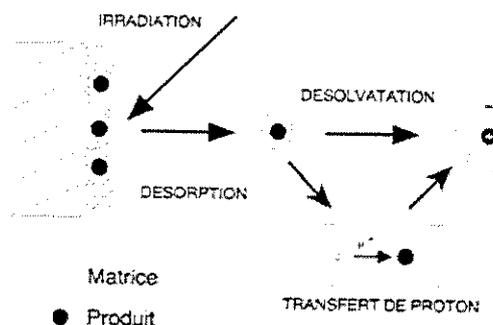


Figure 10 : Schéma d'une source MALDI (de Hoffman et al, Dunod, 1999)

II.1.2.2.4. Spécificités des différentes sources d'ionisation

Type d'ionisation	Nom	Sources utilisées	Ions formés
Ionisation dure (petites molécules volatiles non thermosensibles)	Ionisation par Impact Electronique (IE)	Electrons thermiques	Ion moléculaire : $M + e^- \rightarrow M^{+} + 2e^-$
Ionisation dure/assez douce	Ionisation Chimique (IC)	Gaz réactif	Ion pseudo-moléculaire : $M + HX^+ \rightarrow MH^+ + X$
Ionisation assez douce (molécule < 600 Da)	Ionisation par Bombardement d'atome rapide (FAB)	Ar, Xe, Cs ⁺	Ion pseudo-moléculaire : $M + X \rightarrow [M_n + H]^+$ $M + X^+ \rightarrow [M_n + H]^+ + X$
Ionisation douce – (petites molécules non volatiles, biomolécule polaire)	Ionisation par électronebulisation ou électrospray (ESI)	Potentiel électrique élevé	Ion pseudo-moléculaire : $M \rightarrow [M + nH]^{n+}$
Ionisation douce –	Désorption–	Laser → Photon	Ion pseudo-moléculaire :



Type d'ionisation	Nom	Sources utilisées	Ions formés
(Utilisée en protéomique : biomolécules et complexes non-volatils, d'environ 1300kDa)	Ionisation par laser assistée par matrice (MALDI)		$M \rightarrow [M + H]^+$

Tableau 10 : Techniques d'ionisation en spectrométrie de masse

Les ions formés par la source d'ionisation choisie, sont ensuite dirigés vers l'analyseur grâce à un champ électrostatique.

II.1.3. L'analyseur

L'analyseur va mesurer le rapport de la masse des ions sur leur nombre de valence (m/z). Le vide à l'intérieur de celui-ci doit permettre à chaque ion d'effectuer un libre parcours moyen supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil avant d'être détecté. Ce libre parcours moyen est nécessaire afin d'éviter les collisions entre les ions entraînant leur déviation ou une fragmentation non souhaitée. Il en existe différents types reposant sur un principe physique différent (Tableau 11).

Les principales caractéristiques d'un analyseur reposent sur : sa résolution, sa vitesse d'analyse, sa précision en masse, sa gamme de masse, et sa sensibilité.

La résolution correspond en MS, à la capacité de l'instrument à distinguer deux signaux voisins, mais également la finesse des pics. Ainsi, plus la résolution est élevée, plus deux pics distincts sont proches. Elle correspond donc au rapport $m/\Delta m$ avec m la masse de l'ion, et Δm la différence minimale entre le pic considéré et son voisin le plus proche (Figure 11).

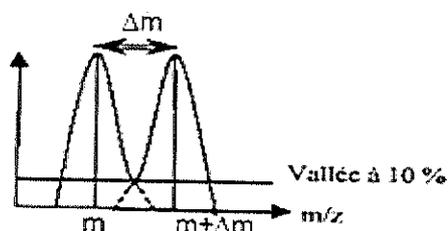


Figure 11 : Résolution en spectrométrie de masse (84)

Les analyseurs peuvent être regroupés en deux catégories : ceux à basse résolution (quadripôle, le piège à ion), ou à haute résolution (TOF, Orbitrap ou encore le FT-ICR). Les analyseurs à haute résolution vont permettre de mesurer la masse exacte des analytes.

Analyseur	Champ électrostatique permettant de diriger les ions à l'analyseur	Résolution	Gamme m/z	Vide dans l'analyseur
Quadripôle (Q)	Quelques volts	Basse résolution 2000	4000-8000	10^{-6} mbar
Magnétique (B)	Plusieurs dizaines de volts	Basse résolution 2000	20000	10^{-7} mbar
Ion Trap (IT)	Quelques volts	Haute résolution 5000	6000	10^{-5} mbar
Time of Flight (TOF)	Plusieurs dizaines de volts	Haute résolution 20000	500000 - 1000000	10^{-7} mbar
Résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FT-ICR)	Quelques volts	Haute résolution 1000000	25000	10^{-9} mbar

Tableau 11 : Caractéristiques des analyseurs en spectrométrie de masse

La vitesse d'analyse ou scan rate, correspond à la rapidité avec laquelle se fait l'acquisition d'un spectre. Elle est exprimée en Hertz (Hz) et donne donc le nombre de spectre obtenu par seconde.

La gamme de masse, ou mass range, représente la fenêtre de masse définie par le rapport m/z le plus bas et le plus haut, mesurable par le spectromètre de masse.

La précision de la mesure correspond quant à elle à la différence entre la masse calculée et la masse mesurée (exprimée en ppm ou en pourcentage), elle est directement corrélée à la résolution.

Enfin, la sensibilité correspond à la limite inférieure de la quantité d'ions qui peut être détectée. Par extension cela correspond à la quantité d'analyte qui peut être analysée.



II.1.3.1 Analyseurs basse résolution

II.1.3.1.1. L'analyseur magnétique (B)

L'analyseur magnétique (B) est le plus ancien. Dempster en 1918 met au point un spectromètre à secteur magnétique dit à simple focalisation ou focalisation directionnelle (Figure 12). Quelques années plus tard, apparaît le spectromètre à double focalisation, permettant une déflexion des ions dans un champ magnétique et électrostatique.

Le principe de cet analyseur repose sur une particule de masse m et de charge q , possédant une énergie cinétique $E_c = \frac{1}{2} mv^2$. La force centripète due au champs magnétique B et la force centrifuge qui l'équilibre font adopter à la particule une trajectoire circulaire uniforme (85).

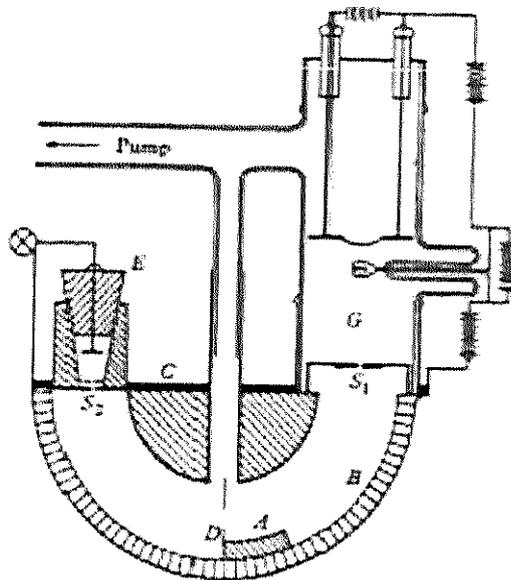


Figure 12 : Schéma d'un analyseur Magnétique (Dempster 1918)
A : zone analytique formée par un aimant ; B, C : parois de la chambre à vide ; D : diaphragme destiné à l'élimination des ions réfléchis ; E : détecteur ; G : source d'ions

II.1.3.1.2. Le quadripôles (Q)

Le quadripôle (Q) est apparu dans les années 50. Il est constitué de 4 électrodes cylindriques couplées deux à deux selon un potentiel électrique composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V . Les ions sont soumis à une force résultante de ces deux champs électriques (Figure 13).



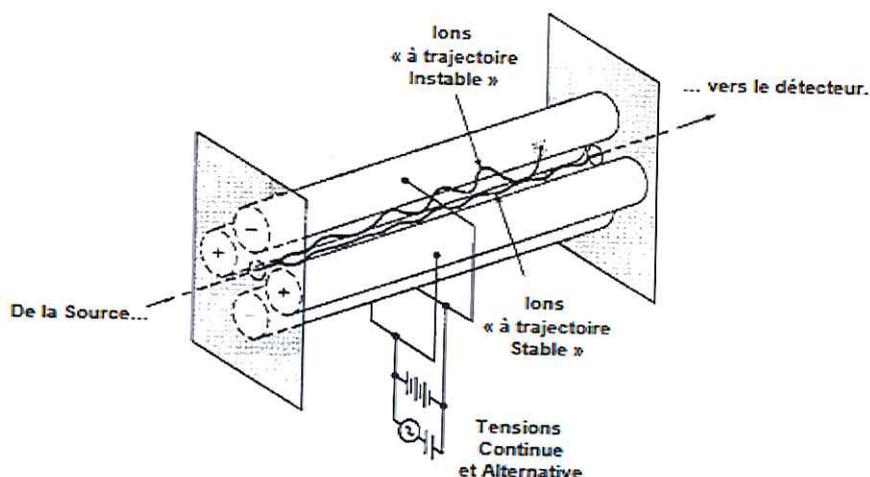


Figure 13 : Schéma d'un analyseur quadripôle (86)

II.1.3.2 Analyseurs haute résolution

II.1.3.2.1. L'ion Trap (IT)

L'analyseur Ion Trap (IT) dérive du quadripôle. Les 4 électrodes sont remplacées par une électrode annulaire recouverte d'une électrode hyperbolique en « chapeau » (Figure 14). Un courant continu et un courant alternatif sont appliqués sur ces électrodes. A l'intérieur du dispositif, les ions sont confinés et suivent une trajectoire oscillante en forme de « huit » régis par l'équation de Mathieu (87). Pour réduire la trajectoire des ions, un gaz à basse pression (He) est introduit. L'ion Trap est une technique sensible et spécifique.

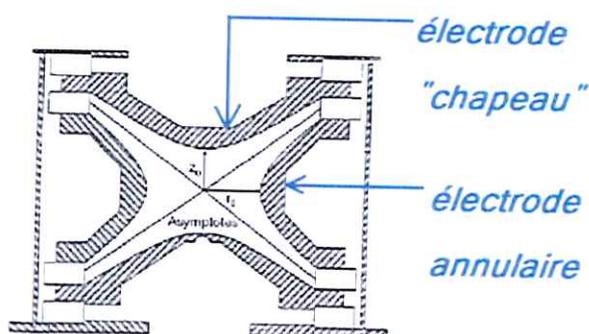


Figure 14 : Schéma d'un analyseur Ion Trap (88)

II.1.3.2.2. Time of Flight (TOF)

L'analyseur Time of Flight (TOF) mesure le temps de vol des ions. Le principe repose sur l'analogie entre le rapport masse sur charge (m/z) des ions formés et leur énergie cinétique.

Une différence de potentielle (V_0) est appliquée à la sortie de la source (89). Cette tension confère une énergie cinétique aux ions telle que :

$$\begin{aligned} 1/2mv^2 &= zV_0 \\ \text{et } v &= d/t \\ \text{d'où } m/z &= 2V_0t^2/d^2 \\ \text{ou encore } t &= d(m/z)^{1/2} / ((1/2V_0)^{1/2}) \end{aligned}$$

Avec :

m : la masse de l'ion,
 d : la distance à parcourir,
 t : le temps,
 V_0 : le potentiel appliqué
 z : la charge

Si V_0 et d sont des constantes, il y a une corrélation directe entre le temps de vol de l'ion et son rapport m/z .

À énergie cinétique égale, un ion léger sera donc plus rapidement détecté qu'un ion lourd. Ainsi on retrouve le principe de l'analyseur linéaire (Figure 15).

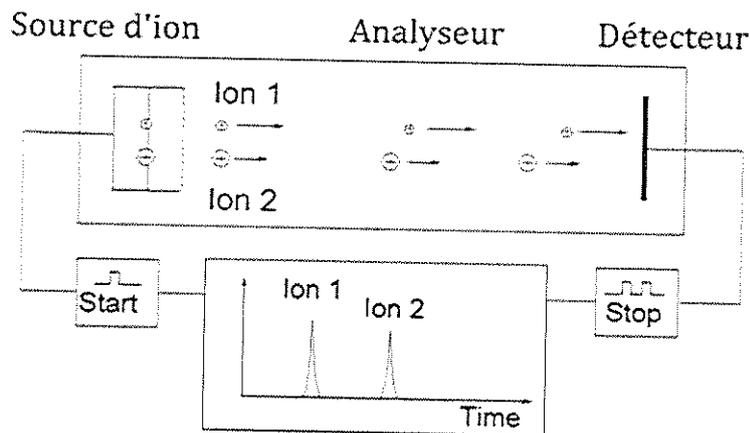


Figure 15 : Schéma d'un analyseur linéaire TOF (90)

Cependant, ce type d'analyseur TOF n'est pas suffisamment résolutif. Pour améliorer cela, la dispersion de l'énergie cinétique peut-être atténuée en utilisant, en extrémité du tube de vol, un miroir électrostatique ou réflectron (91) pour re-focaliser les ions de même masse mais ayant une énergie cinétique différente afin de synchroniser leurs arrivés au niveau du détecteur (Figure 16). Ainsi, la résolution pourra atteindre 20000 pour un rapport $m/z < 10000$.



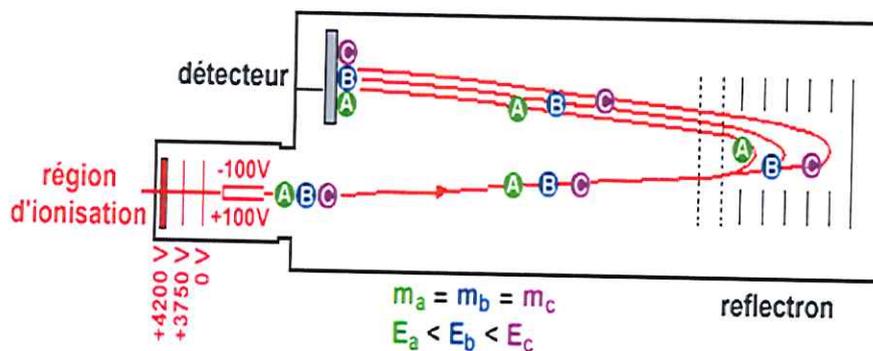


Figure 16 : Schéma d'un analyseur TOF en mode réflectron (92)

Ce type d'analyseur permet donc une mesure plus précise, et permettra notamment de séparer des composés de masse très proches. Si on utilise une source MALDI, le t_0 peut être compté au moment du tir laser.

II.1.3.2.3. FT-ICR

Le cyclotron ou Résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FT-ICR) est un analyseur à haute précision de mesure de masse et à haute résolution.

Le piège ionique ICR permet de piéger les ions dans un champ magnétique par des électrodes où des faibles tensions sont appliquées. Ce mouvement de rotation est appelé « mouvement cyclotronique » et sa fréquence ne dépend que du champ magnétique et du rapport masse sur charge, elle est indépendante de la vitesse initiale (Figure 17). Si la vitesse des ions est faible et le champ intense, le rayon de courbure devient petit. L'ion sera piégé sur une trajectoire circulaire résultant d'un équilibre entre deux forces centripète F et centrifuge F' (93). La transformée de Fourier va consister à exciter simultanément tous les ions présents dans la cellule par un balayage rapide d'une large gamme de fréquence dans moins de $10 \cdot 10^{-6}$ s.

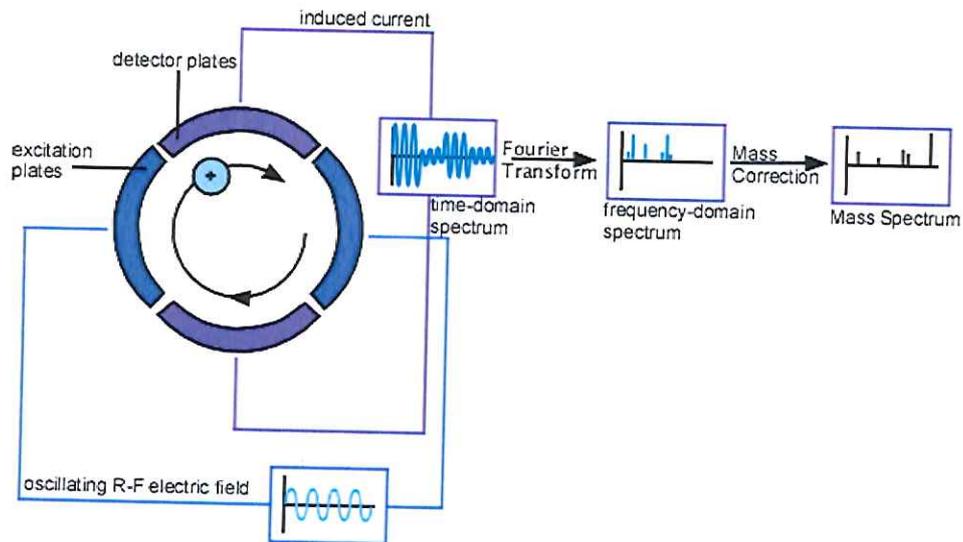


Figure 17 : Schéma d'un analyseur FT-ICR

C'est donc un instrument de très grande performance, utilisé dans des domaines variés (sciences, pharmacie, chimie).

II.1.3.2.4. Analyseurs hybrides

Les analyseurs hybrides permettent de coupler plusieurs analyseurs (MS-MS et MSⁿ) en associant leur point fort tout en évitant la combinaison de leur faiblesse. On obtiendra alors des spectres de masse à plusieurs dimensions. Il en existe différents types : l'analyseur Quadripôle/piège à ions quadripolaire ; Piège à ions quadripolaire/temps de vol ; Piège à ions/FT-ICR ou Piège à ions/Orbitrap ou encore le Quadripôle/temps de vol (Q-TOF). Ce dernier étant largement utilisé en protéomique.

L'analyseur hybride Q-TOF est constitué d'un double quadripôle (Q1 et Q2) associé à un analyseur à temps de vol (Q3) (Figure 18). Les ions formés par la source (MALDI ou nanospray) sont focalisés, sélectionnés et fragmentés dans le quadripôle. Les ions ainsi formés sont ensuite dirigés par « paquets » vers le tube à temps de vol. On parle d'analyse « pulsée ». Ce type d'analyseur permet d'associer l'efficacité du quadripôle et la bonne résolution du TOF.

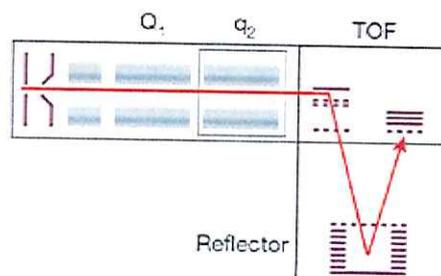


Figure 18 : Schéma d'un analyseur hybride Q-TOF (92)

II.1.3.2.5. Analyseur en tandem MS/MS : le triple quadripôle

Les analyseurs en tandem MS/MS permettent également de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Le principe repose sur une première séparation, puis une cellule de collision va fragmenter ces ions, enfin le dernier analyseur va séparer les ions ainsi fragmentés.

Comme son nom l'indique, le triple quadripôle est donc constitué de 3 quadripôles en série (Figure 19), chacun ayant une fonction propre. Le premier quadripôle (Q1) va sélectionner l'ion à fragmenter (ion précurseur ou ion parent). Le deuxième analyseur (Q2) aussi appelé cellule de collision, va présélectionner une ou plusieurs collisions grâce à un gaz inerte. Enfin, le troisième analyseur (Q3) va analyser les fragments générés (ion fils). Le but est donc de mettre en évidence des ions parents en balayant la fenêtre de masse choisie et en n'enregistrant que les fragments issus des ions parents.

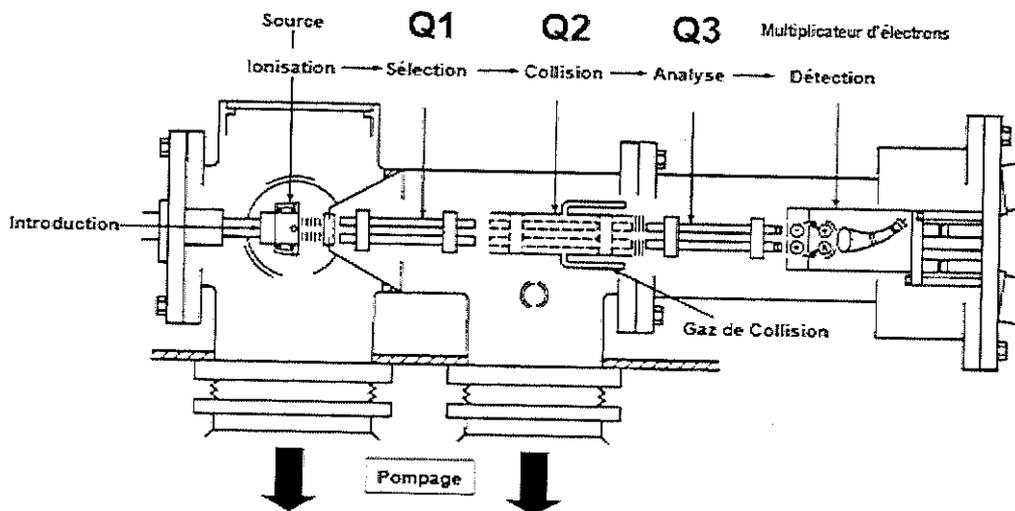


Figure 19 : Schéma d'un analyseur triple quadripôles

Ce type d'analyseur peut être utilisé selon différents modes. Le mode descendant est le plus couramment utilisé et permet d'obtenir des informations structurales. Le spectre obtenu représente les ions précurseurs (ions parents) et ses fragments (ions fils). Le mode ascendant permet de mettre en évidence des ions ayant des particularités communes. Pour cela, le premier analyseur balaye une gamme de masse, le deuxième sera focalisé sur un seul rapport m/z . En mode pertes de neutres, le premier et dernier quadripôle balayent la fenêtre de masse choisie, la cellule de collision permet quant à elle de ne sélectionner que les écarts de masse à détecter après collision. Enfin, le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) est préférentiellement utilisé pour la quantification, et dérive du mode descendant (Figure 20). Le premier analyseur permet de sélectionner l'ion parent d'intérêt



qui sera ensuite fragmenté dans la cellule de collision. Le second analyseur sera quant à lui focalisé sur les ions fils. On observera alors une double sélectivité.

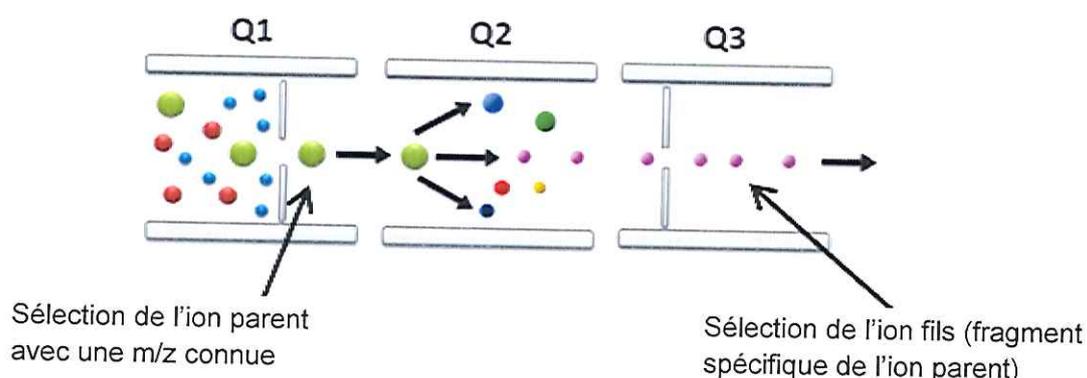


Figure 20 : Mécanisme du mode MRM

II.1.4. Le détecteur

Un détecteur a pour rôle de compter les ions préalablement formés et séparés. Il permet de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. L'efficacité d'un spectromètre de masse correspond à la proportion des ions produits qui arrivent effectivement jusqu'au détecteur.

II.1.4.1 Plaque Photographique

Ce type de détecteur est historique. Il s'agit d'une plaque en verre recouverte d'une émulsion de bromure d'argent. L'impact des ions va impressionner la plaque, laissant une trace noire fonction de l'intensité de ceux-ci. Il est très peu sensible.

II.1.4.2 Cylindre de Faraday

Le cylindre de Faraday permet de transférer la charge de l'ion détecté sur une surface conductrice. Le signal est ensuite amplifié. Ce détecteur est peu sensible, et présente un bruit de fond important.

II.1.4.3 Multiplicateur d'électrons ou Electron Multiplier Tube (EMT)

Le multiplicateur d'électron est le détecteur le plus courant. Le signal est amplifié par la formation d'électrons secondaires à l'aide de tubes en verre dopés au plomb appelés dynodes. Ce détecteur présente l'avantage d'avoir une bonne sensibilité, un balayage rapide mais il a une durée de vie limitée.

II.1.4.4 Multiplicateur de photons ou Microchannel plate (MCP)

Le principe de ce détecteur repose sur le dopage du signal par la formation d'électrons secondaires (dynode). Ceux-ci sont accélérés vers l'écran phosphorescent où ils sont

convertis en photons. Ces photons sont ensuite détectés par le photomultiplicateur. Il présente une bonne sensibilité, mais un balayage moins rapide que photomultiplicateur d'électrons.

II.2. Principe de l'imagerie MALDI

Le principe de l'imagerie MALDI par spectrométrie de masse, ou MALDI-IMS, est de pouvoir analyser directement un échantillon solide déposé sur un support. Cette technique permet d'apprécier la répartition structurale de biomolécules au sein de l'échantillon, sans préparation préalable de celui-ci, par extraction ou encore par purification. L'analyte, sous forme solide, doit d'abord être ionisé. Les ions ainsi formés seront ensuite séparés en fonction du rapport m/z sous vide poussé avant d'être détectés.

L'analyse en MALDI-IMS se fait en plusieurs étapes. En premier lieu, l'échantillon est déposé sur une cible MALDI (une surface métallique ou une lame d'oxyde d'indium et d'étain (ITO)). Une seconde étape consiste à appliquer une matrice sur l'ensemble de la cible, permettant l'ionisation des biomolécules. La troisième étape consiste à scanner l'échantillon par un faisceau laser ou ionique, se déplaçant selon une distance et une intensité prédéfinie. Plusieurs spectres de masse sont donc enregistrés. Un logiciel de traitement des données va permettre de représenter le spectre moyen correspondant à la superposition des spectres enregistrés. Enfin, l'obtention de l'image se fera par la superposition des spectres. Cette image est fonction de l'intensité du signal. On aura donc une image en couleur fonction de la répartition de la biomolécule au sein de l'échantillon étudié (Figure 21).

Ces quatre principales étapes ont donc un rôle crucial dans la formation, la séparation et la détection des ions formés. La qualité des spectres, et donc des images obtenues, sera fonction du type de matrice utilisée, mais également de l'analyseur couplé à la source MALDI.

Pour l'étude de matière biologique, différents analyseurs couplés au MALDI sont utilisés : le MALDI-IT, ou encore le MALDI-Q-TOF. Cependant, de par sa grande sensibilité, sa rapidité d'analyse et sa gamme de masse en théorie illimitée, l'analyseur TOF couplé au MALDI offre une grande performance pour l'analyse de biomolécules notamment les protéines. Pour les molécules de poids moléculaire inférieur, tels que les lipides, les médicaments et les métabolites, l'analyse est préférentiellement réalisée en mode réflectron sur un instrument en tandem (TOF/TOF) (94).



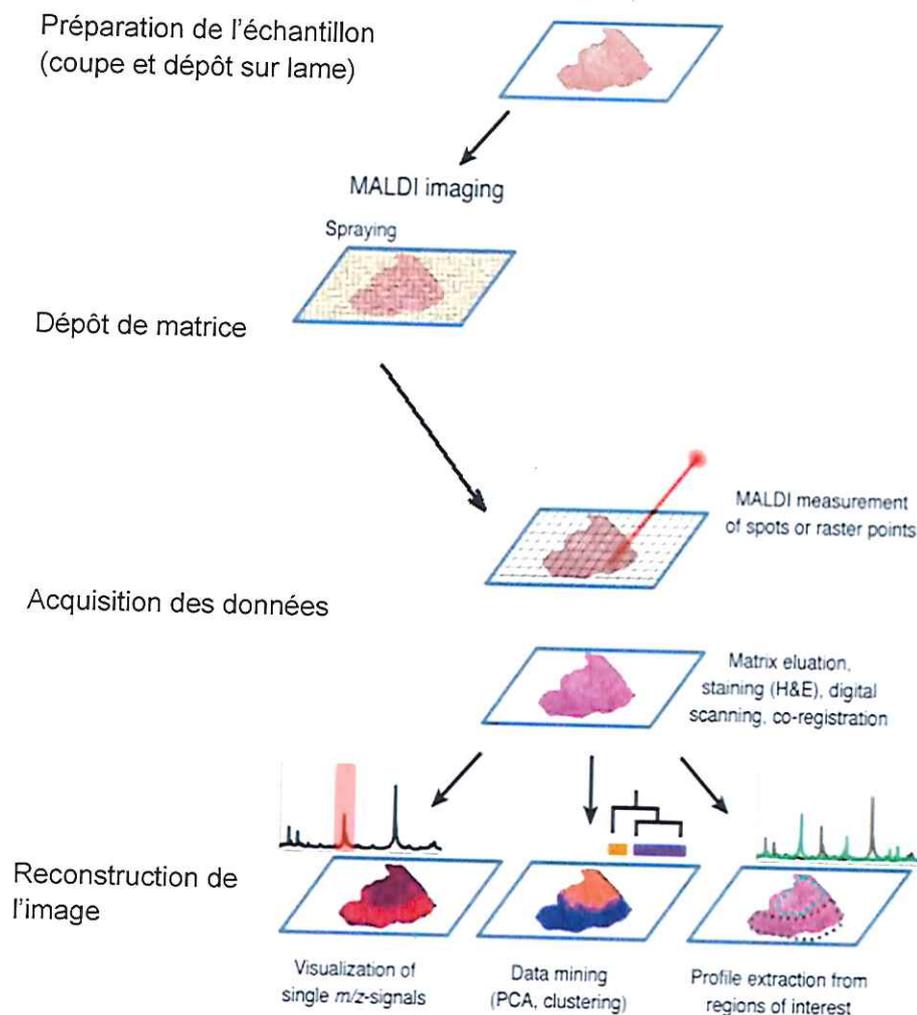


Figure 21 : Principe de l'imagerie MALDI point par point (94)

II.2.1. Préparation et conservation des échantillons

La préparation et la conservation de l'échantillon vont conditionner l'acquisition des spectres, leurs qualités et leurs reproductibilités. Le prélèvement des organes est la première étape clef. En effet, l'intégrité de l'organe doit-être maintenue, de la dissection à l'analyse. Pour cela, plusieurs méthodes de conservation sont possibles. Le choix de la technique va dépendre de la durée de conservation de l'échantillon ainsi que sa compatibilité pour l'analyse en MALDI-IMS.

Après dissection, les échantillons peuvent être conservés en utilisant trois techniques : la congélation directe, la congélation après l'utilisation d'un fixateur et la congélation après inclusion dans la paraffine. Le choix de la méthode va dépendre du type d'organe à

conserver. En effet, pour les organes dits « creux » telle que l'intestin, l'inclusion dans la paraffine est une méthode de choix pour maintenir l'intégrité de la structure circulaire. Pour les autres organes, la congélation directe à -80°C est préconisée. Celle-ci a l'avantage de ne pas provoquer d'interférences analytiques lors de l'analyse par spectrométrie de masse. La congélation après utilisation d'un fixateur est quant à elle préférentiellement utilisée pour la conservation sur une longue période. En effet, le temps de conservation de l'échantillon est également un facteur limitant à l'obtention de spectres de qualité. Lors d'une congélation directe à -80°C pendant plus de 6 mois, il a été démontré une délocalisation des lipides présents dans l'échantillon. Une étape de lavage sera alors nécessaire afin d'éliminer ces lipides (95). On utilise le Paraformaldéhyde (PFA) ou encore le formol. La conservation par fixation ou par inclusion augmentent la stabilité des échantillons au fil du temps tout en préservant l'intégrité des structures. Cependant, ces méthodes entraînent des difficultés lors de l'analyse par spectrométrie de masse (96).

Les organes ainsi congelés seront ensuite découpés au cryostat selon une épaisseur variant de 5 à $20\mu\text{m}$. L'échantillon est fixé sur un support par de la colle OCT (Optical Cutting Temperature) ou « tissue teck », composée de polyéthylèneglycol (PEG) (Figure 22). La colle peut provoquer une perte des signaux provenant de la coupe. Dans certains cas, cette suppression peut affecter près de 50% des signaux. Il est donc nécessaire que la section à analyser ne rentre pas en contact avec la colle (97) (Figure 22).

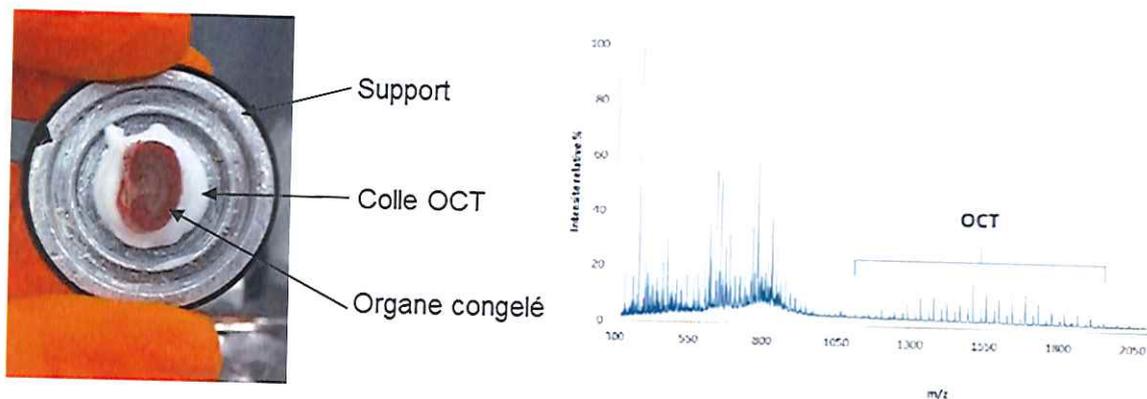


Figure 22 : A gauche : organe monté sur le porte organe à l'aide de la colle OCT – A droite : exemple de spectre où la section à analyser est rentrée en contact avec la colle (1100 à 1900 m/z)

La coupe est directement percolée sur un support conducteur. L'utilisation de supports transparents conducteurs tels que des lames de verre recouvertes d'Oxyde d'Indium et d'étain (ITO), permet de ne pas modifier les propriétés du champ électrique. Les lames sont ensuite séchées et conservées sous vide avant l'application de matrice.

II.2.2. La matrice

La matrice est un composé organique aromatique de faible poids moléculaire qui a la propriété d'absorber à la longueur d'onde du laser (337 nm). Elle absorbe l'énergie du laser et la transfère sous forme d'énergie d'ionisation par transfert de proton. On parle alors d'intermédiaire d'ionisation. Elle favorise également la désorption en séparant les molécules, en réduisant les forces intermoléculaires.

Plusieurs types de matrices existent, solides ou liquides. Parmi les matrices liquides, on retrouve des matrices dites « classiques », et des matrices « ioniques » correspondants à un mélange équimolaire de matrice acide (alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) ou l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (SA)) avec des bases organiques (pyridine ou l'aniline) et (Tableau 12).

Matrices	Type de Matrice	Utilisation
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB)	Classique	Polymères, Peptides, Protéines, Lipides
Les dérivés d'acides cinnamiques : - Alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) - Acide férulique - Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (SA)	Classique	Lipides, Protéines, Peptides Protéines, Peptides
Les polyhydroxyacetophénones : - 2,3,4-trihydroxyacetophenone (THAP) - 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP)	Classique	Lipides
Alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) + N,N-diméthylaniline (DANI)	Ionique (98)	Protéines

Tableau 12 : Principales matrices utilisées

L'utilisation de matrice liquide permet d'améliorer l'homogénéité des dépôts. Pour cela on utilise préférentiellement l'éthanol, l'acétonitrile ou l'eau comme solvant de matrice. Les matrices ioniques permettent une cristallisation homogène, augmentent le nombre d'ions détectés et donc favorisent des signaux plus intenses (99,100).

La matrice doit être dissoute avant le dépôt dans des solvants organiques. Lors du dépôt, la matrice co-cristallise au contact de l'analyte (formation de cristaux ou d'un réseau cristallin) permettant d'éviter toute délocalisation de molécule. La formation de cristaux hétérogènes rendra plus difficile l'analyse, d'où la nécessité de sélectionner une matrice adaptée en fonction du type de biomolécules à détecter (Figure 23).

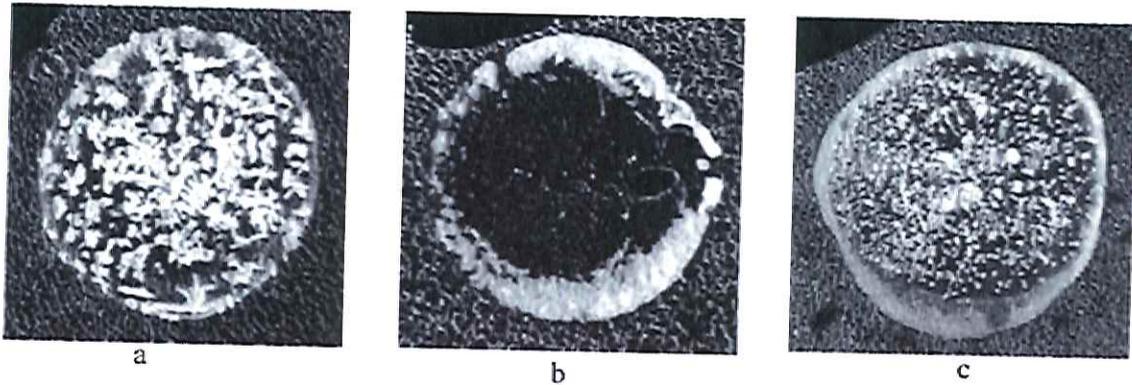


Figure 23 : Comparaison de la cristallisation de 3 matrices SA (a), DHB (b) et HCCA (c) sur une coupe de tissu. Chaque matrice a été appliquée à l'aide d'une micropipette à une concentration de 20 mg/ml dans une solution d'ACN/0,1% TFA dans H₂O (97)

Par ailleurs, le choix de la concentration est également un paramètre critique. Il a été montré qu'une matrice saturée améliorerait la résolution tout en diminuant le bruit de fond (signal/bruit) (Figure 24).



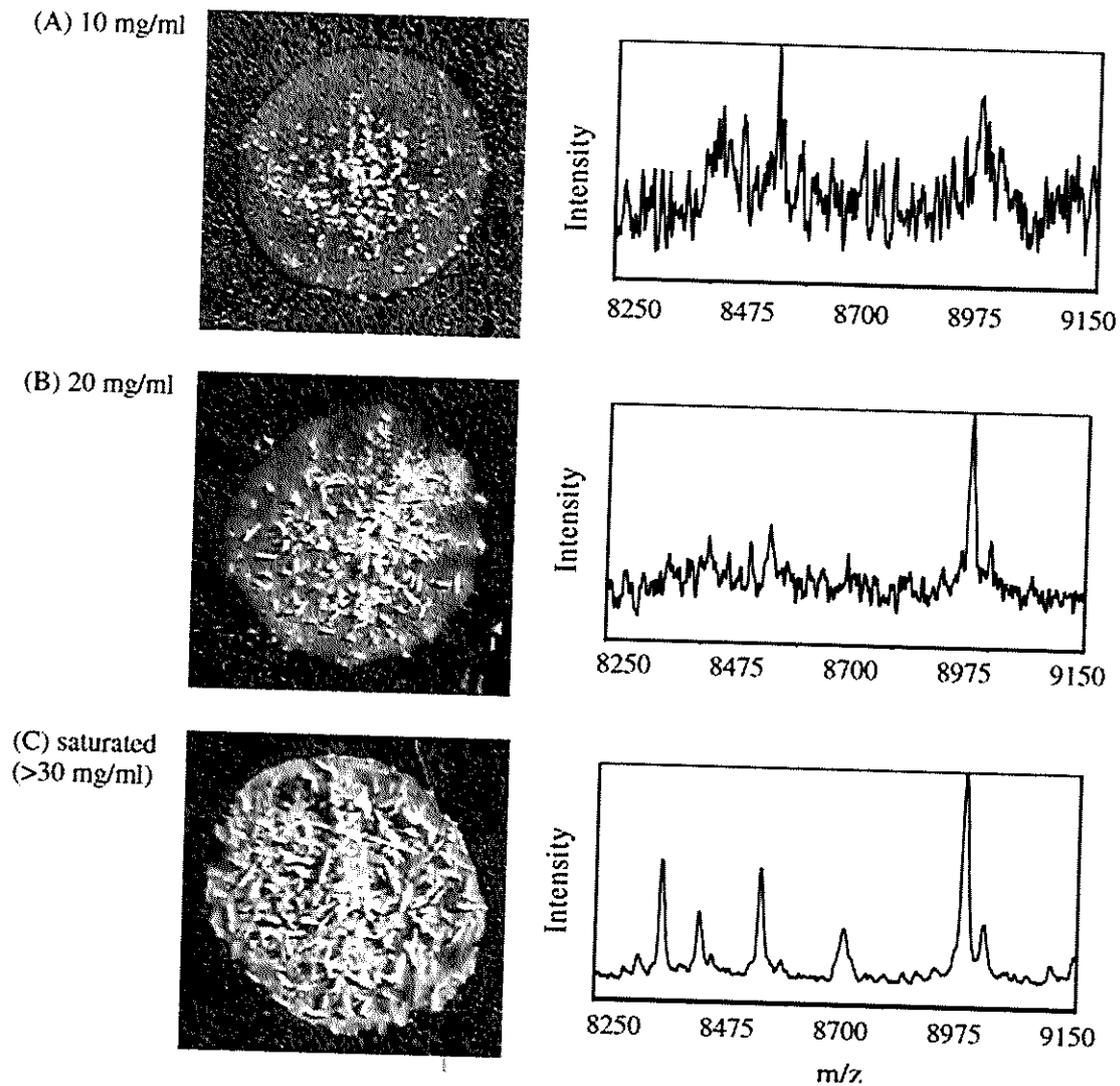


Figure 24 : Effet de la concentration sur la cristallisation : une matrice de SA (50 :50 ACN/0,1% TFA dans H₂O) à des concentrations différentes a été appliquée sur une coupe de tissu, et déposée avec un spot de 0,25 μ L (97)

Le choix de la matrice est donc une étape critique dans l'analyse MALDI. Elle conditionne la cristallisation, la classe de biomolécules détectées, la formation d'adduits, et donc par extension la qualité des spectres. Leur stabilité dans le temps, leur résistance aux tirs lasers (reproductibilité) et enfin de leur affinité avec les molécules d'intérêts vont directement impacter les paramètres du spectromètre de masse à savoir : la reproductibilité, la sensibilité et la résolution spatiale.

II.2.2.1 Modes de dépôts de la matrice

Il existe différentes méthodes de dépôt de la matrice, celles-ci vont conditionner la qualité de la désorption/ionisation.

Le dépôt peut se faire de façon manuelle par micro-pipette ou nébuliseur manuel. Ce type de dépôt à l'avantage d'être le moins couteux. Cependant, l'homogénéité du dépôt n'est pas garantie et la délocalisation des molécules au sein de la coupe peut être importante. L'acquisition de l'image sera donc compromise.

On retrouve également un dépôt dit automatisé. Celui-ci peut se faire soit par spotting (dépôt par goutte) soit par spraying (dépôt par nébulisation). Le spotting utilise un appareil créant des micro-impulsions électriques envoyant des micro-gouttes de matrice sur une surface de l'échantillon déterminée par l'opérateur. Le dépôt par spot délimite donc les zones analysables en MALDI. Un dépôt non-homogène de la matrice sur l'échantillon peut être retrouvé, ainsi qu'une éventuelle perte de résolution spatiale (si le laser a un diamètre supérieur à celui du spot). Le spraying permet de déposer la matrice sur toute la surface de l'échantillon de façon plus ou moins homogène. Différents types de sprayer sont commercialisés :

- Sprayer pneumatique (97): le spray est manuel, et ne permet donc pas d'assurer la reproductibilité et la qualité des dépôts
- Sprayer par impulsion électrique (ex : ImagePrep) : il présente une bonne homogénéité dans le dépôt mais possède une reproductibilité pouvant être mise en doute d'une lame à une autre, ceci notamment du fait de préparation de matrice à chaque nouveau spraying
- L'Oscillating Capillary Nebilizer (OCN) permettant un dépôt homogène, une meilleure reproductibilité et une bonne sensibilité

Les conditions de réalisation du dépôt par spraying doivent être optimisées. En effet, la distance entre le spray et l'échantillon ; le débit du spray ; la durée du spraying et le nombre de cycle appliqué sont des paramètres pouvant influencer la qualité du dépôt. Cependant, les nouveaux instruments mis en place permettent de contrôler ces paramètres et donc d'assurer une bonne reproductibilité.

Enfin, une méthode de dépôt par sublimation est également en cours de développement (101). Le principe est de placer un échantillon et une matrice en poudre, dans une chambre étanche sous vide avec l'échantillon, le tout maintenue contre une surface froide. L'appareil est ensuite abaissé dans un bain chauffé, ce qui entraîne une sublimation de la matrice en poudre sur la surface d'échantillon de tissu refroidie (102). Cette technique est rapportée comme une méthode hautement efficace pour la détection de lipides dans les tissus par MALDI-IMS en raison de l'homogénéité du dépôt de cristaux matriciels, de la délocalisation minimale des analytes et donc l'optimisation de la reproductibilité des images (103).



II.2.2.2 La source du MALDI

Comme expliqué précédemment, la source MALDI va permettre la formation des ions. Le MALDI permet d'étudier des ions de haut poids moléculaire. Suite au dépôt de la matrice, lors de l'évaporation du solvant, la matrice co-cristallise avec l'analyte. L'impulsion laser provoque localement un échauffement du dépôt et des micro explosions. Cet échauffement entraîne des collisions et le transfert de charges de la matrice à l'échantillon (Figure 25).

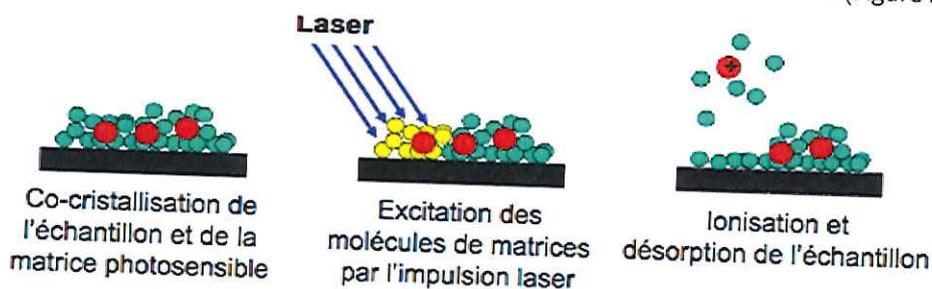


Figure 25 : Principe de la désorption/ionisation en MALDI

Les espèces détectées après ionisation sont principalement des ions mono-chargés. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation en mode positif ou négatif. En ionisation en mode positif les espèces sont sous forme protonées $[M+H]^+$ mais, lors de la présence de sels dans l'analyte elles peuvent aussi être cationisées. On détectera alors des complexes $[M+Na]^+$ ou encore $[M+K]^+$ allant pour une plage de détection de 30 à 3000 m/z. Alors qu'en ionisation négative les espèces les plus présentes seront sous forme $[M-H]^-$.

II.2.3. Acquisition des données

L'acquisition des données va non seulement dépendre des étapes précédentes, mais également du temps d'acquisition. Celui-ci est en lien direct avec la résolution spatiale, la fréquence des tirs laser, mais également de la taille de l'échantillon. La résolution spatiale correspond au nombre de points à acquérir sur l'échantillon. La fréquence des tirs laser correspond au nombre de coups par unité de temps.

La taille du faisceau laser va également influencer l'acquisition des données en agissant sur la résolution spatiale. Celle-ci est importante en MALDI-IMS car elle permet d'assurer la corrélation entre l'irradiation et la position sur l'échantillon. Le diamètre du faisceau (exprimé en pourcentage ou en micromètre) va déterminer le pas entre chaque point et donc le temps requis pour déplacer l'échantillon entre chaque point d'analyse.

Le temps d'acquisition des données peut ainsi varier de quelques heures à quelques jours. Cependant, il est important de limiter ce temps d'acquisition afin d'éviter toute dégradation

de l'échantillon par évaporation de la matrice, échauffement avec délocalisation des molécules d'intérêts au sein de l'échantillon.

Enfin, chaque spectre collecté représente la moyenne de plusieurs tirs laser pour obtenir une représentation statistique de la zone analysée (96). Schématiquement on retrouve un tir laser pour un spectre.

II.2.4. Reconstruction de l'image

La reconstruction de l'image est réalisée grâce à des logiciels de traitements des données performants (ex : Fleximaging). Ils permettent d'enregistrer les coordonnées planaires (x ;y) de chaque points analysés et de reconstruire la localisation précise sur le tissu (104). On comprend l'importance de la préparation de l'échantillon, notamment pour l'étude de tissus, où la surface de l'échantillon doit être plane et représentative du tissu à étudier. Ceci permettra d'éviter toute perte de résolution imputable à la forme de l'échantillon.

La qualité de l'image va être conditionnée par les étapes précédentes, notamment par le traitement des spectres. Il peut être nécessaire de lisser les spectres, d'appliquer des filtres afin d'éliminer le bruit de fond, de normaliser les spectres, ou encore, de définir un seuil en-dessous et au-dessus duquel le signal sera considéré comme nul.

La reconstruction de l'image s'appuie sur la localisation de chaque masse et l'intensité du signal obtenu en chaque point. Cela permet de définir un pixel de couleur ou d'intensité de couleur. L'ensemble de ces pixels donnera une image de couleur représentative de la répartition des biomolécules étudiées.



III. Application à un model murin

Ce travail a été réalisé au laboratoire de spectrométrie de masse CBMN à l'Université de Bordeaux.

III.1. Contexte de l'étude

Nous avons mis en évidence, dans la première partie de ce manuscrit, que l'obésité a de nombreux impacts sur l'ensemble des organes et sur les fonctions vitales de l'organisme. L'objectif de ce travail de recherche était donc d'identifier les liens entre l'obésité et la modification de la répartition lipidique structurelle.

Les lipides sont essentiels à la régulation et au contrôle des fonctions cellulaires. Ils sont également impliqués dans certaines maladies (105). Il existe par ailleurs, différentes méthodes permettant leurs identifications et leurs quantifications. L'analyse peut se réaliser directement sur un tissu, en imagerie MALDI (cf Partie II), ou après préparation de l'échantillon, par extraction puis séparation. Dans ce dernier cas, de nombreuses méthodes analytiques ont été développées comme la chromatographie sur couche mince (TLC) (106), la chromatographie en phase gazeuse (GC) (107), et la chromatographie liquide (LC) (107,108). Cette dernière est une méthode séparable de choix. Son association à la spectrométrie de masse (MS) (108,109) offre une meilleure méthode en termes de sensibilité, de spécificité, et de précision (110).

Une présentation des différentes familles de lipides, et leur mode d'analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse seront d'abord expliqués, avant de présenter l'étude expérimentale.

III.2. Les lipides

Les lipides appartiennent à une classe de biomolécules présents aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Ce sont des petites molécules hydrophobes, composées principalement de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Chez les êtres vivants, cette classe de biomolécule est très variée en termes de structure et de fonction. Les lipides ont un rôle de stockage de l'énergie (sous forme de triglycérides), mais également un rôle structural (sous forme principalement de phospholipides) (111).

L'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) définit 8 groupes de lipides, fonction de leurs squelettes hydrocarbonés : les acides gras (AG), les acyglycérols (ou glycérides), les phosphoacylglycérols (ou phosphoglycérides), les sphingolipides, les stérols (et stéroïdes), les prénols, les polykétides et les saccharolipides (ou glycolipides).



Notre étude s'est intéressée uniquement aux lipides structuraux (présent dans les membranes plasmiques), et ceux ionisables par les méthodes utilisées.

III.2.1. Les Acides Gras (AG)

La synthèse des AG est cytosolique, à partir d'un précurseur d'origine mitochondriale, l'acétylcoenzyme A. Ces lipides sont des acides carboxyliques (R-COOH), dont le radical R est une chaîne d'hydrocarbure aliphatique de longueur variable. Les AG saturés ayant un nombre pair de carbone (4 à 36) sont présents dans le règne animal, végétal et microbien. Les AG insaturés ont une longueur de chaîne carbonée de 16 à 20 carbones et sont retrouvés essentiellement dans le règne végétal et animal (Figure 26). Dans les graisses animales ou dans les lipides microbiens, on retrouve des AG avec un nombre impair de carbone.

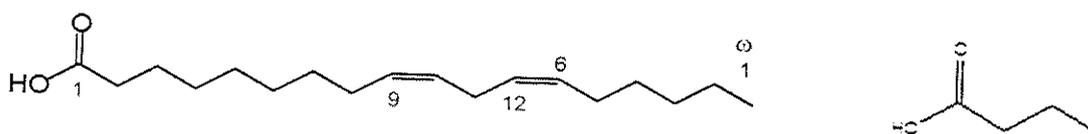


Figure 26 : Exemples d'acides gras : à gauche un acide gras polyinsaturé (acide linoléique (C18:2 ω6), à droite un acide gras saturé (acide butyrique (C4:0))

Les AG ont de nombreuses propriétés physiques et chimiques. Leur solubilité dépend de la longueur de la chaîne carbonée. En effet, un AG est formé de deux parties : une tête polaire (COOH) et une queue apolaire ou hydrophobe (groupement R). Cette configuration explique sa capacité d'organisation en film moléculaire ou en bicouche à l'interface eau-air ou encore en micelle dans les milieux biologiques aqueux par exemple.

Les AG rentrent dans la composition des autres familles de lipides, dans les systèmes membranaires (surtout les AG saturés), et sont également pour certains, des précurseurs de messagers cellulaires (réponse inflammatoire par exemple).

III.2.2. Les stérides

Les stérides sont formés par l'estérification d'acides gras par des stérols. Ces derniers sont des alcools dérivant d'un noyau stéroïdes formés par la condensation de 4 cycles. Cette classe de lipide est principalement représentée par le cholestérol (Figure 27), monoalcool secondaire polycyclique insaturé.

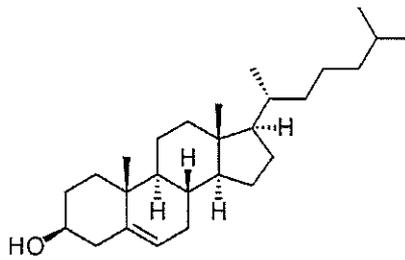


Figure 27 : Cholestérol

Le cholestérol est présent dans les membranes des cellules en association avec d'autres lipides. Il est très abondant dans le tissu nerveux, le rein, la peau et le foie. C'est un composé facilement estérifiable, présent sous deux formes dans l'organisme : estérifiée (dans les tissus), et libre. Le cholestérol est transporté avec les lipides par des lipoprotéines. Cette molécule est également le précurseur de nombreuses hormones stéroïdes sexuelles et corticosurrénales. Un dérèglement du métabolisme et une mauvaise élimination biliaire conduisent à la formation de calculs, au dépôt dans certains tissus et sur la paroi des vaisseaux sanguins responsable d'athérosclérose.

III.2.3. Les glycérophospholipides ou phospholipides

Cette famille de lipide est synthétisée dans le cytosol du réticulum endoplasmique lisse. Ils sont formés à partir d'un acide phosphatidique (Figure 28), estérifié sur la fonction acide phosphorique par un alcool aminé (sérine, éthanolamine, choline) ou un polyol non azoté (glycérol, inositol) (Figure 29).

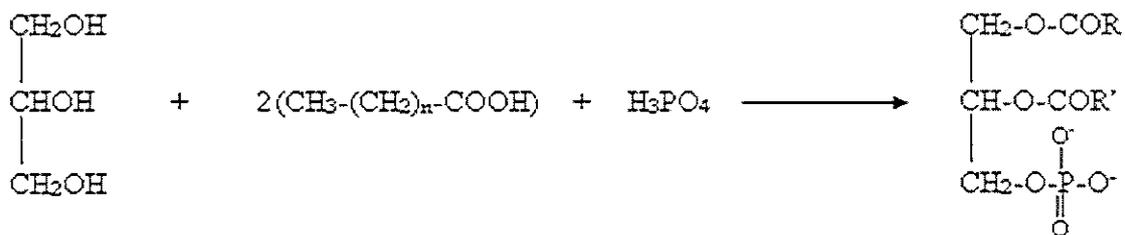


Figure 28 : Formation d'un acide phosphatidique (PA)



Ces lipides sont des aminodiol à 18 atomes de carbone synthétisés dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse des cellules eucaryotes (Figure 31).

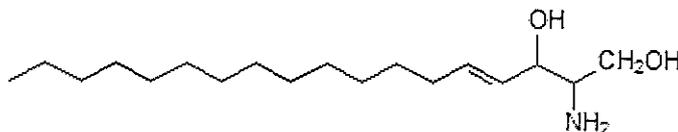


Figure 31 : Sphingosine

L'amidification de la sphingosine par un AG de 16 à 24 atomes de carbone saturé ou mono-insaturé donne un précurseur commun à cette famille, appelé céramide.

Les céramides sont des composés important du système nerveux central. Elles sont notamment impliquées dans le développement neuronal, et dans l'induction de l'apoptose.

Des sous-classes de sphingosine se distinguent par l'estérification de la fonction alcool primaire de celle-ci. Ainsi, la sphingomyéline est formée d'une céramide liée à une phosphocholine ou d'une phosphoéthanolamine. Ce composé est majoritaire dans le cerveau en tant que constituant de la gaine de myéline. On retrouve également des glycolipides formés par une sphingosine, un AG et un ose (β -D-Galactose ou un β -D-Glucose), ou une chaîne de plusieurs oses et dérivés d'oses.

III.3. L'étude des lipides

Comme expliqué précédemment, l'étude des lipides peut se faire soit directement au sein d'un tissu (MALDI-IMS), soit après préparation de l'échantillon.

III.3.1. Extraction des lipides

L'extraction des lipides d'intérêts est une étape clef pour l'identification et à la quantification de ces derniers. Les différentes méthodes utilisées actuellement reposent sur une extraction liquide/liquide en utilisant des mélanges de solvants de polarité différente et non miscibles entre eux de type chloroforme/méthanol, ou encore hexane/isopropanol. Cette extraction va aboutir à la formation de deux phases, dans lesquelles les lipides se seront répartis en fonction de leur affinité avec le solvant (degrés d'hydrophobicité et de polarité).

III.3.2. Séparation des lipides

Une méthode séparative va ensuite permettre de séparer les lipides les uns des autres, obtenus dans une même phase. Pour cela, différentes techniques peuvent être utilisées comme mentionné précédemment.



La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une méthode de choix de séparation. Cette méthode repose sur l'interaction des molécules d'intérêts avec la phase stationnaire solide (une colonne, formée de particules de silice sphériques) et avec la phase mobile (constituée d'un mélange de solvant permettant l'élution des composés). La séparation peut se réaliser en phase normale (NP-HPLC) ou en phase inverse (RP-HPLC) selon la phase stationnaire choisie. En NP-HPLC, la phase stationnaire est polaire et acide. La silice comporte des groupements silanols ou siloxanes. Des interactions faibles de type liaison hydrogènes se réalisent donc, permettant la rétention de composés polaires et/ou acides. Cette phase stationnaire est préférentiellement choisie pour l'études des lipides neutres, les triglycérides et les phospholipides acides (112). En RP-HPLC, la silice est greffée par de longues chaînes aliphatiques (C3 à C18) donnant son caractère hydrophobe et apolaire. Les interactions qui auront lieu seront de type hydrophobe. Cette technique est essentiellement utilisée pour la séparation des lipides hydrophobes, et permet de différencier les phospholipides en fonction de leur chaîne d'AG.

Comme expliqué en deuxième partie de ce travail, ces méthodes de séparations peuvent être couplées à une analyse en spectrométrie de masse permettant l'identification et la quantification des molécules d'intérêts.

III.3.3. Identification et quantification des lipides

III.3.3.1 Imagerie MALDI

Pour l'étude de biomolécules comme les lipides, l'analyse est préférentiellement réalisée en mode réflectron sur un instrument en tandem (TOF/TOF) couplé à une source MALDI (94). Cet instrument permet donc une identification et une quantification relative des substances étudiées.

III.3.3.2 LC-MS/MS en mode MRM

III.3.3.2.1. Principe

L'analyse des lipides en spectrométrie de masse peut se faire par infusion directe ou par couplage chromatographique.

L'infusion directe consiste à injecter directement l'échantillon dans la source d'ionisation, sans séparation préalable (113). Cette méthode permet d'effectuer un screening de l'échantillon dans un temps court d'analyse, et d'adapter directement les paramètres de l'instrument.

Le couplage spectrométrie de masse – chromatographique liquide est une technique idéale pour étudier les composés au sein d'une même famille (114). En effet, la partie

chromatographique va permettre de séparer les composés, et la partie MS/MS va quant à elle faire la distinction entre des composés de même masse, donc élués en même temps.

La source d'ionisation principalement utilisée est la source ESI (cf partie II). Celle-ci fonctionne à température ambiante et à pression atmosphérique permettant d'être une bonne interface pour l'obtention d'ion en phase gazeuse à partir d'un liquide. Le mode MRM va quant à lui permettre de suivre spécifiquement une réaction de fragmentation afin d'identifier et de quantifier spécifiquement chaque espèce au sein de la même famille (cf partie II).

III.3.3.2.2. Mécanisme de fragmentation

Comme évoqué précédemment, les lipides structuraux sont majoritairement les glycérophospholipides. Notre étude lipidomique s'est donc concentrée sur cette classe de lipides. Un phospholipide est formé de différentes parties, à savoir une tête polaire : comprenant un phosphate et un alcool aminé (sérine, éthanolamine, choline) ou un polyol non azoté (glycérol, inositol) ; et deux chaînes d'AG.

En spectrométrie de masse, ces lipides vont se fragmenter à différents endroits de la molécule, donnant des fragments plus ou moins spécifique, et plus ou moins probable. Ainsi nous pourrions retrouver (Figure 32) :

- un fragment correspondant à la choline, avec une masse de 87,16 Da
- un fragment correspondant à la tête du phospholipide, ayant une masse de 184,1 Da
- un fragment comportant la tête +glycérol : 257,22 Da
- enfin 4 fragmentations différentes sur les chaînes d'AG (notée FA) comme représenté dans la Figure 33 ci-dessous :

- une première fragmentation peut se produire en position **A** : ainsi la molécule ayant une masse de 760,59 Da va perdre 18 atomes de carbones, 1 atome d'oxygène et 33 atomes d'hydrogène. Le composé ainsi fragmenté aura donc une masse de 496,34 Da (perte d'un fragment de 264,25 Da),

- une deuxième fragmentation pourra se produire en **B** (perte d'un fragment de 238,23 Da), une autre en **C** (perte d'un fragment de 282,26 Da) et encore une autre en **D** (perte d'un fragment de 256,24 Da).



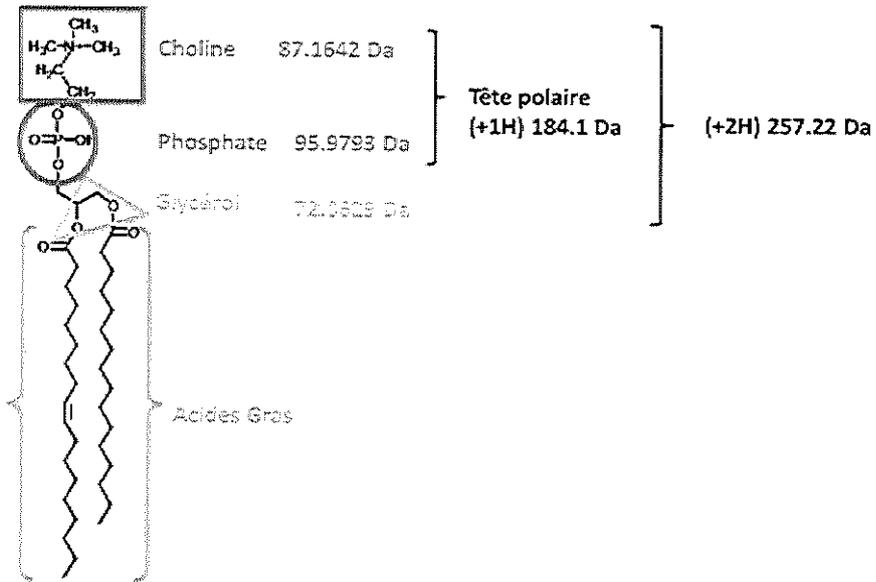


Figure 32 : Exemple d'une phosphatidylcholine à 34 atomes de carbone avec une chaîne saturée à 16 atomes de carbone et une chaîne insaturée à 18 atomes de carbone (PC 34:1 (FA 16:0/18:1))

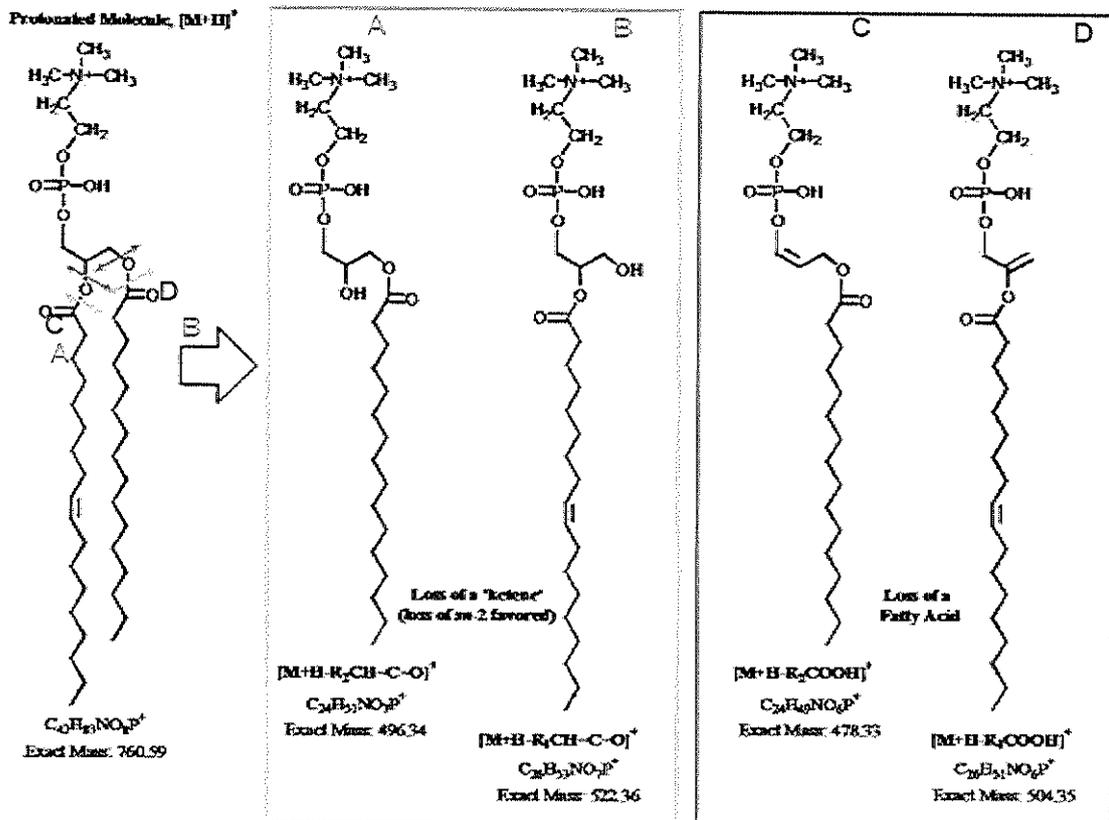


Figure 33 : Exemple de fragmentation d'une phosphatidylcholine composée de deux chaînes d'AG : une chaîne saturée de 16 atomes de carbone et une insaturée à 18 atomes de carbone : PC 34:1 (FA 16:0/18:1)



L'analyse en MS de cette molécule donnerait le spectre présenté en Figure 34. On constate un pic majoritaire à 760,59 m/z, correspondant à notre molécule, un autre à 184,00 caractéristique du fragment « choline + phosphate ».

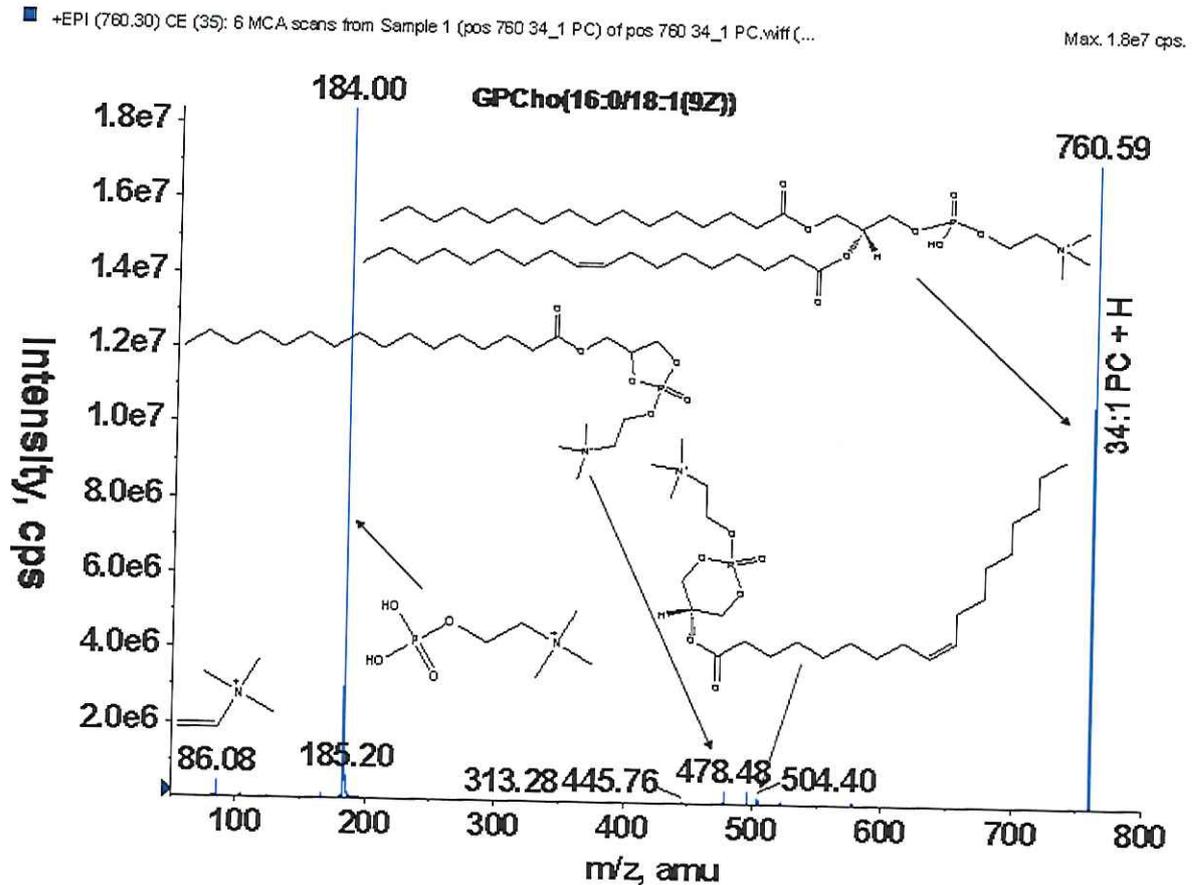


Figure 34 : Exemple du spectre MS d'une molécule PC 34:1 (FA 16:0/18:1)

III.4. Etude expérimentale

III.4.1. Introduction

Notre étude lipidomique s'est portée sur un modèle murin en utilisant l'imagerie moléculaire par spectrométrie de masse, axée sur divers organes, afin d'évaluer l'impact d'un régime alimentaire gras sur ces derniers.

Une étude comparative entre souris saines et obèses a été réalisée selon l'âge et l'état physiologique de l'animal. Le modèle murin a été choisi pour sa disponibilité (expérimentation socialement et éthiquement acceptée), son faible coût, sa manipulation aisée, et sa corrélation, par de nombreux aspects, au corps humain. Ainsi, nous avons étudié 2 groupes de 3 souris chacun (soit n=12), à deux âges différents. Dans chaque groupe, les souris ont

grandi avec une alimentation normale pour 3 d'entre elles (souris dites « normales »), et une alimentation enrichie en graisse pour les 3 autres (souris obèses dites « FAT »). La première analyse s'est faite à 3 jours de vie (correspondant au t0 de notre étude), la deuxième à 8 semaines de vie (t8s de l'étude).

Pour cette étude, une méthode de section de tissu a été développée, ainsi qu'une méthode d'analyse d'imagerie, afin de permettre la comparaison du profil lipidique des organes. Cette technique offre la possibilité de visualiser les lésions et les modifications structurales au niveau moléculaire dans différents organes (100,108,115). Les résultats obtenus en imagerie MALDI ont été comparés à une étude quantitative du profil lipidique total des mêmes organes en utilisant une approche quantitative LC-MS/MS en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

III.4.2. Matériels et méthodes

III.4.2.1 Imagerie MALDI

III.4.2.1.1. Préparation des échantillons

Chirurgie animale et préparation des tissus

Des souris mâles CHOW ont été sacrifiées. Les différents organes ont été prélevés comme le cerveau, le cœur, les reins et l'intestin (duodénum, iléon, jéjunum et du colon). Les organes creux ont été remplis de cellulose 1,5 % afin de maintenir l'apparence du tissu et d'éviter les délocalisations. L'ensemble des tissus ont été transportés dans de la neige carbonique et conservés à -80°C.

Sections de tissus

Des sections de tissu de 10 µm ont été obtenues par cryostat. La température de l'enceinte était de -20°C. Ces sections ont ensuite été déposées sur des lames en verre conductrice enduite d'indium tin oxyde (ITO) et fixées avec la chaleur du corps. Les lames ont été séchées et conservées sous vide.

Dépôt de la matrice

Une matrice d'acide α -cyano-hydroxycinnamique (HCCA) a été déposée par un système de pulvérisation vibratoire (ImagePrep Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Allemagne). Une solution de matrice HCCA (7g/L) a été préparée dans un mélange d'acétonitrile/acide trifluoroacétique (ACN/TFA) 0,2%, (5:5, v/v) et a été soniquée pendant 10 min.



III.4.2.1.2. Spectrométrie de masse

L'analyse tissulaire a été effectuée en Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Allemagne). L'Ultraflex est équipé d'un laser Smartbeam 2 avec un taux de répétition de 200 Hz.

Étalonnage externe

La résolution spatiale de l'instrument de Bruker Ultraflex est de 80 μm . Environ 3000 positions irradiées sont enregistrées pour un tissu complet, avec 250 tirs laser par position. Le logiciel réalise un spectre de masse moyen à chaque position sur la section de tissu. Les spectres ont été obtenus en mode réflectron positive et analysés au sein d'une gamme de masse allant de 300 à 1000 Da, avec une suppression des ions de masses inférieures à 200 Da. Une normalisation du courant ionique totale des spectres a été réalisée sur le pic caractéristique de la matrice à 379,45 Da. La puissance du laser a été fixée à 55 % pour l'intestin et 51 % pour les autres organes. Le logiciel Flex-Imaging ver 4.0 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Allemagne) a été utilisé pour la reconstruction de l'image.

III.4.2.2 LC-MS/MS

III.4.2.3 Produits chimiques et réactifs

Les solvants utilisés en chromatographie liquide (méthanol, isopropanol, acétonitrile et chloroforme), étaient de qualité HPLC et achetés chez Sigma-Aldrich, tout comme l'acétate d'ammonium, l'acide formique et la solution de NH_4OH (28,0-30,0 % de NH_3 base). Les standards internes de lipides comprenant des chaînes d'AG de 14:0 à 26:0 (PA, PS, PI, PG, PE et PC) provenaient de lipides polaires Avanti (Alabaster, AL, USA) ainsi que les standards internes de lipides avec des insaturations (PA(18:0/18:1), PA(18:0/18:2), PA(18:2/18:2), PC(18:0/18:1) et PC(18:0/18:2)).

III.4.2.4 Extraction de phospholipides à partir d'une section de tissu

L'extraction de phospholipides a été réalisée selon Ejsing et al. (115). Les lysats de cellules (dans 200 μL d'acétate d'ammonium 180 mM, pH 8) ont été extraits avec 990 μL de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 17:1 (v/v) afin d'éliminer les lipides apolaires. Ensuite, la phase aqueuse a été re-extraite avec 990 μL de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 (v/v) pour isoler les lipides polaires dans la phase organique. Cet extrait de phospholipides a été, par la suite, séché sous vide. Ces lysats ont été réalisés en triple exemplaires pour l'analyse en LC-MS/MS.

III.4.2.5 Détermination de la méthode

Les phospholipides extraits ont ensuite été dissous dans 400 μL de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2, v/v) + de l'acétate d'ammonium 8 mM. Chaque échantillon a été infusé dans la source électrospray TurboV du spectromètre de masse QTRAP® 5500 (AB Sciex, Concord, Ontario,



Canada), avec un débit de 7 μLmin^{-1} . Les expériences ESI-MS/MS (Precursor Ion Scans (PIS)) ont été effectuées en mode négatif (PE, PS, PA, PI, PG) et en mode d'ions positifs (PC) avec une commutation rapide de polarité de 50 ms et une vitesse de balayage de 200 Da/s. L'azote a été utilisé comme gaz rideau. La tension de l'aiguille a été fixée à -4500 ou +5500 V. Le potentiel de declustering était -100 V ou 100 V. Une méthode de standardisation interne a été réalisée à l'aide d'un mélange de standards (ES Tuning Mix (AB Sciex) : dans chaque lysat a été incorporé 20 μL de standards interne, à une concentration de 10 μM chacun). Le gaz de collision était de l'azote, et l'énergie de collision a été fixée à -50 ou 50 eV. La gamme de masse allant de 400 à 900 Da est mesurée pendant 2,5 ms. Les expériences réalisées en MS/MS comprenaient : 1 scan de l'ion précurseur en mode positif, 23 scans de l'ion précurseur en mode négatif. Les espèces de phospholipides ont été identifiées à l'aide du logiciel Lipid View (v1.0, AB Sciex).

III.4.2.6 RP-HPLC-MS/MS mode MRM (108)

Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées en mode MRM avec le même modèle de spectromètre de masse QTRAP® 5500 (AB Sciex) couplé à un système LC (Ultimate 3000, Dionex). Des extraits de phospholipides ont été dissous dans 20 μL de solvant A. Des analyses ont été obtenues en mode négatif (PE, PS, PA, PI, PG) et en mode positif (PC) avec une commutation rapide de polarité (50 ms). L'azote a été utilisé comme gaz rideau (réglé sur 15), le gaz1 (réglé sur 20) et le gaz2 (réglé sur 0). La tension de l'aiguille était de -4 500 ou +5 500 V sans aiguille de chauffage. Le potentiel de declustering a été ajusté entre -180 et -85 V ou réglé à +40 V. Le temps de remplissage de piège a été fixé à 3 ms en mode positif ions et 5 ms en mode d'ions négatifs. Le gaz de collision était également de l'azote. L'énergie de collision a varié de -48 à -62 eV et +47 eV. La gamme de masse de l'instrument a été fixé à m/z 400-900 Da. Les espèces de phospholipides ont été identifiées à l'aide du logiciel Lipid View (v1.0, AB Sciex) en utilisant à la fois le temps de rétention des standards internes et les masses des ions caractéristiques de chaque lipide. L'intégration des pics LC a été déterminée à l'aide du logiciel MultiQuant (v2.1, AB Sciex).

Les séparations en phase inverse ont été réalisées à 40°C sur une colonne de Synergi Fusion-RP 150 x 1 mm, avec une porosité de 80 Å, 4 μm particules (Phenomenex) en mode gradient. L'éluant A était $\text{CH}_3\text{OH}/\text{isopropanol}/\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 % d'acide formique à 0,028 % NH_4OH . L'éluant B était de l'isopropanol + 0,2 % d'acide formique + 0,028 % NH_4OH (109). Le programme de gradient d'éluant était : 0 min, 30 % B ; 5min, 50 % B ; 30 min, 80 % B ; 31-41 min, 95 % B ; 42-47 min, 5 % B ; 52-62 min, 30 % B. Le débit était de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, et des volumes de 5 μL d'échantillons ont été injectés. Le mode MRM, a permis la combinaison de



la détection d'ions précurseurs et d'ions fragments principaux. Le couplage à l'HPLC a permis d'identifier chaque molécule par leur temps de rétention et leur rapport m/z.

III.4.3. Résultats et discussion

III.4.3.1 Analyse lipidique par imagerie MALDI

Les résultats ont été obtenus par MALDI-TOF/TOF Ultraflex III avec une matrice alpha-cyano 4-hydroxycinnamique (HCCA), en mode positif. Pour chaque organe, un comparatif entre deux groupes de 3 souris a été réalisé à deux âges différents. Les souris témoins et celles ayant subis un régime gras sont respectivement nommées « normal » et « FAT ». La première étude s'est réalisée à 3 jours de vie des animaux, notée « t0 ». La deuxième expérience a été effectuée au bout de 8 semaines de vie des souris, appelé « t8s » pour notre étude.

L'analyse à t0 a permis de vérifier l'absence de modification structurale due à l'alimentation enrichie en graisse. Par ailleurs, ces études ont permis de sélectionner les lipides représentatifs de chaque structure afin de suivre leur évolution au cours de la deuxième expérience (à t8s).

Dans ce travail nous ne présenterons que les résultats à t0 pour un organe (le rein), afin d'expliquer le principe, et développerons les résultats de la deuxième expérience à t8s pour tous les organes étudiés.

III.4.3.1.1. Cerveau

L'analyse en imagerie MALDI à t0 montre un profil lipidique similaire entre les deux populations. Les lipides majoritairement détectés se trouvent dans une gamme de masse allant de 700 à 900 Da. Cette zone semble donc être caractéristique de l'organe (Figure 35).

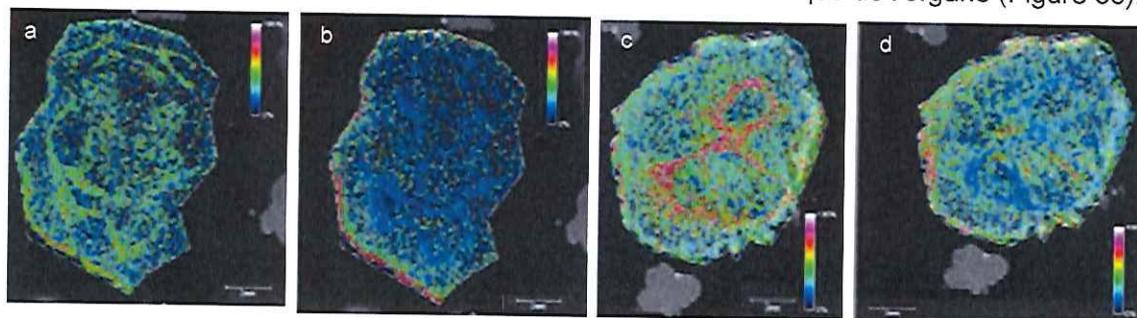


Figure 35 : Répartition dans une coupe de cerveau à t0, du lipide m/z 772,68 pour le témoin (a), et pour le FAT (c) ; et du lipide m/z 798,44 pour le témoin (b), et pour le FAT (d)

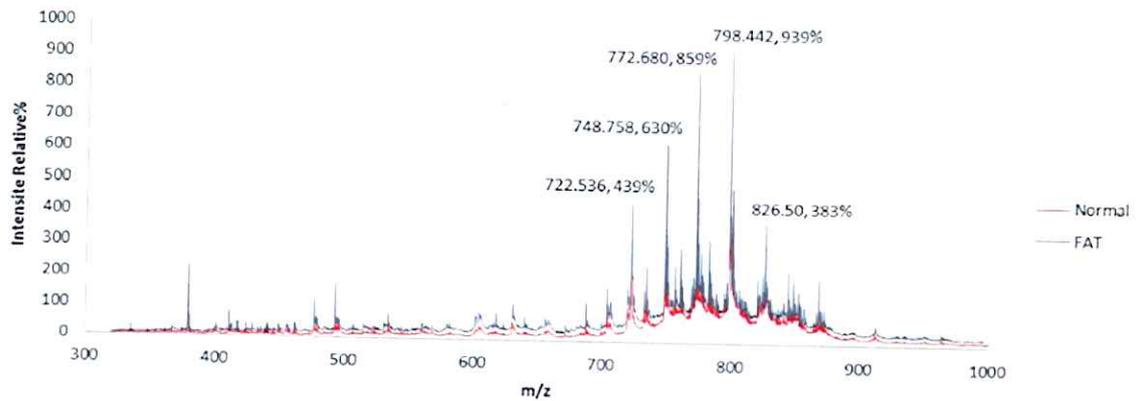


Figure 36 : Comparaison des spectres moyens normalisés du cerveau à t0 chez une souris normale et FAT

Un décalage cependant en intensité est à noter (Figure 36). Celui-ci peut être dû à une mauvaise application de la matrice sur l'échantillon, ou une différence de la profondeur de la coupe induisant un biais au niveau de l'image.

Après huit semaines de régime enrichi en graisse, les cerveaux analysés montrent un profil similaire à l'analyse t0 avec cependant une expression augmentée pour le cerveau témoin, de deux lipides (m/z 734,95 et 760,72) (Figure 37, Figure 38).

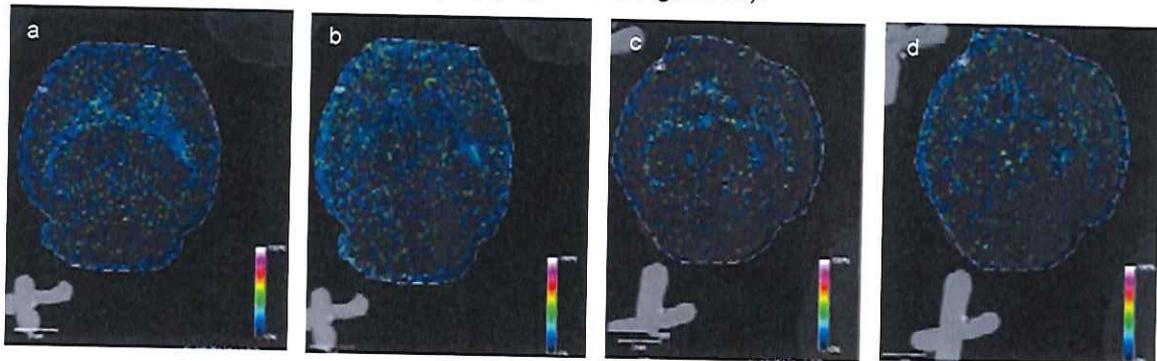


Figure 37 : Répartition dans une coupe de cerveau à t8s, du lipide m/z 734,95 pour le témoin (a), et pour le FAT (c) ; et du lipide m/z 760,72 pour le témoin (b), et pour le FAT (d)

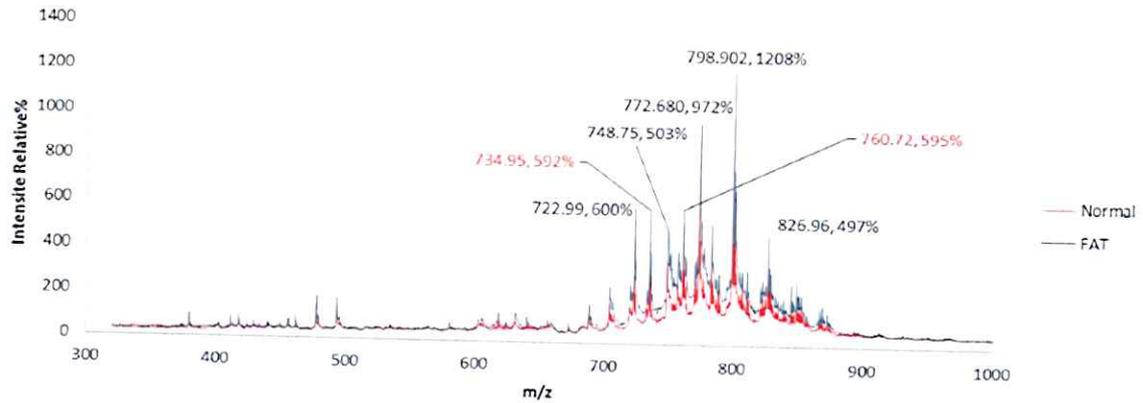


Figure 38 : Comparaison des spectres moyens normalisés du cerveau à t8s chez une souris normale et FAT

III.4.3.1.2. Rein

Lors de l'analyse en imagerie MALDI à t0, permis de délimiter trois zones anatomiques d'intérêt : le cortex, la médula et la capsule (Figure 39, Figure 40).

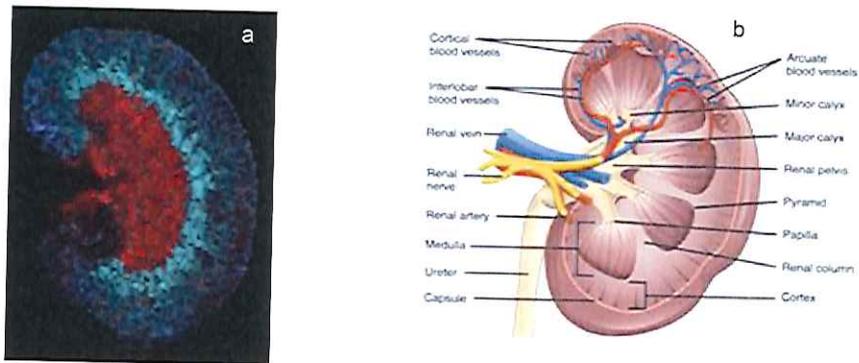


Figure 39 : Caractérisation par imagerie Maldi de trois zones d'intérêt au niveau d'une coupe de rein à t0, (a) Image spectrale, (b) image anatomique

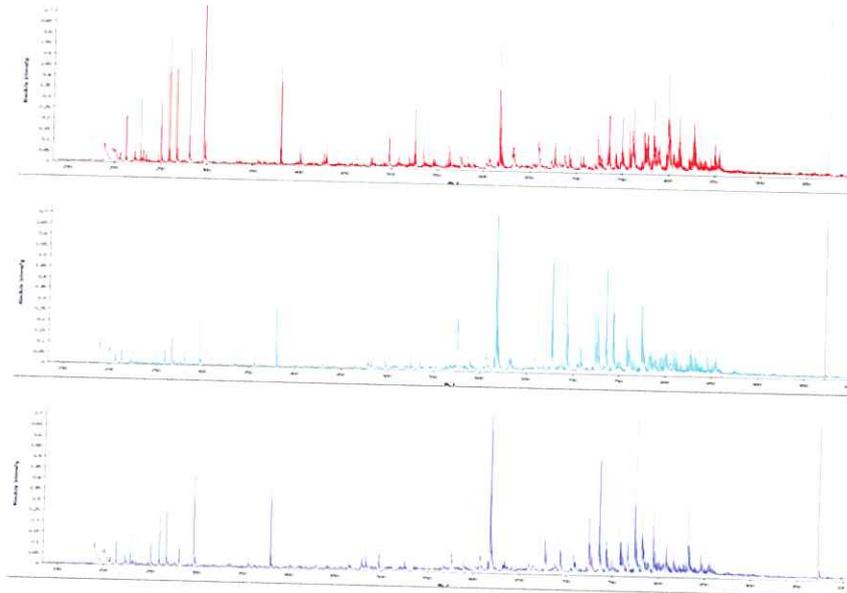


Figure 40 : Comparaison des spectres moyens normalisés du rein à t0 chez une souris normale des trois zones d'intérêt, rouge : medula, bleu : cortex, violet : capsule

Après huit semaines de régime enrichi en graisse, les analyses montrent d'autres lipides majoritairement présents dans l'échantillon FAT. Cette étude a été reprise par la suite (par Gianluca Sighinolfi), les résultats après 16 semaines de régimes enrichis en graisse sont présentés ici. Les images obtenues en imagerie MALDI montrent la différence de répartition de ces lipides au sein de l'organe (Figure 41).

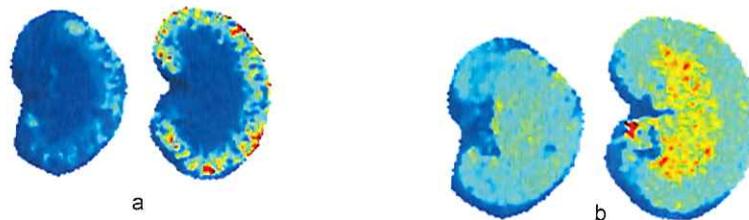


Figure 41 : Répartition dans une coupe de rein à t16 semaines pour le cortex (a), et la medula (b), des phospholipides

III.4.3.1.3. Cœur

L'analyse à t0 a montré des profils lipidiques similaires entre les deux populations étudiées. Cela confirme l'absence de modification structurale après 3 jours de régime enrichi en graisse. Deux pics en particulier semblaient être caractéristique de la structure (m/z 723,24 ; 770,48). En effet, leur répartition au sein du cœur semble complémentaire (Figure 42).

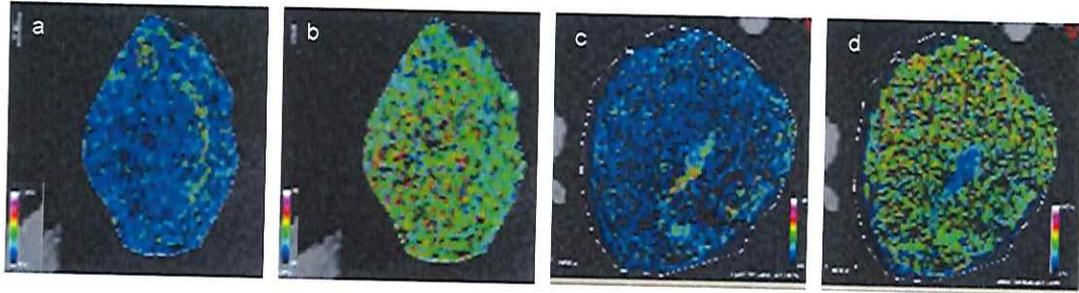


Figure 42 : Répartition dans une coupe de cœur à t0 pour le témoin (a et b), pour le FAT (c et d), des lipides m/z 723,24 (a et c) et 770,48 (b et d)

L'expérience à t8s, a quant à elle mis en évidence d'autres lipides, avec une répartition inhomogène entre les deux populations (Figure 44). Le lipide à 616,73 Da se retrouve diffusé au sein des ventricules (Figure 43).

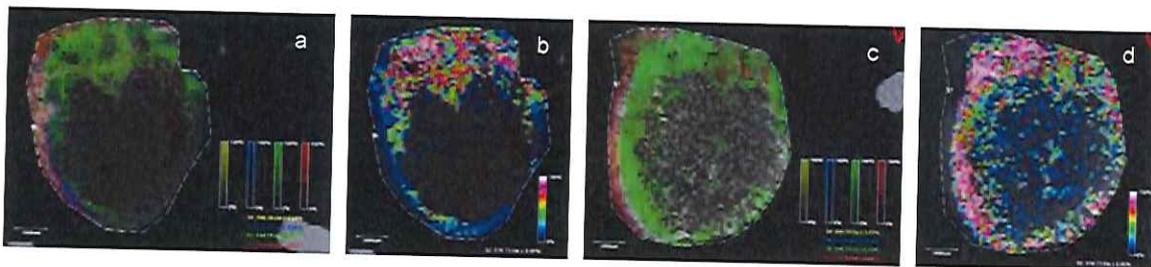


Figure 43 : Répartition dans une coupe de cœur à t8s pour le témoin (a et b), pour le FAT (c et d), des lipides m/z 477,34 (en rouge), 616,73 (en vert, b et d), 640,65 (en bleu) et 656,29 (en jaune)

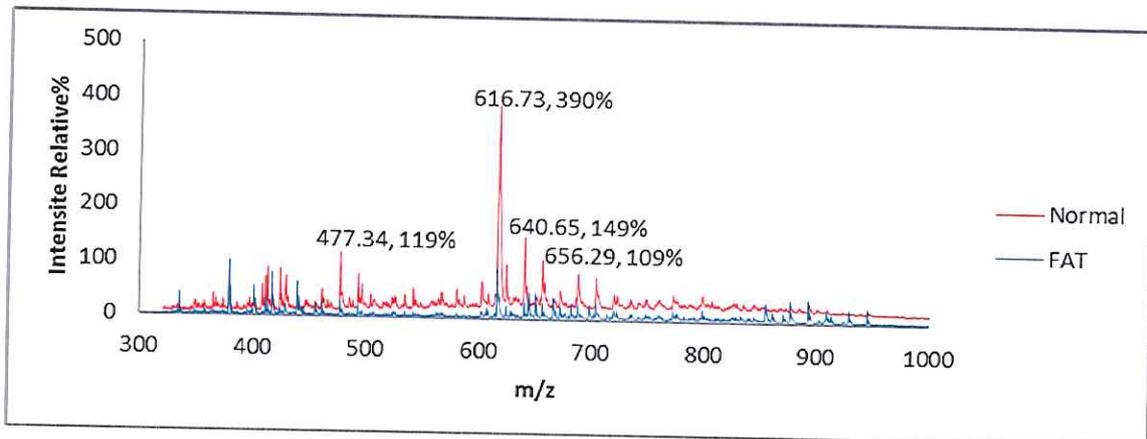


Figure 44 : Comparaison des spectres moyens normalisés du cœur à t8s chez une souris normale et FAT

III.4.3.1.4. Intestin

L'intestin est une partie du tube digestif constitué de plusieurs structures. L'étude en imagerie MALDI s'est réalisée sur l'intestin grêle, comprenant le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

Les analyses réalisées sur le duodénum montrent la prédominance de deux pics (m/z 592,488, en rouge et 781,0669 en bleu) chez les deux individus (Figure 45). Cependant, le pic de masse 592,488 Da est présent dans la paroi interne de l'organe, il correspond à la lumière du duodénum. On constate néanmoins une différence d'épaisseur de la paroi intestinale (en bleu), en effet, chez la souris témoin (a), la paroi est épaisse, alors que pour la souris FAT (b), la paroi est plus fine.

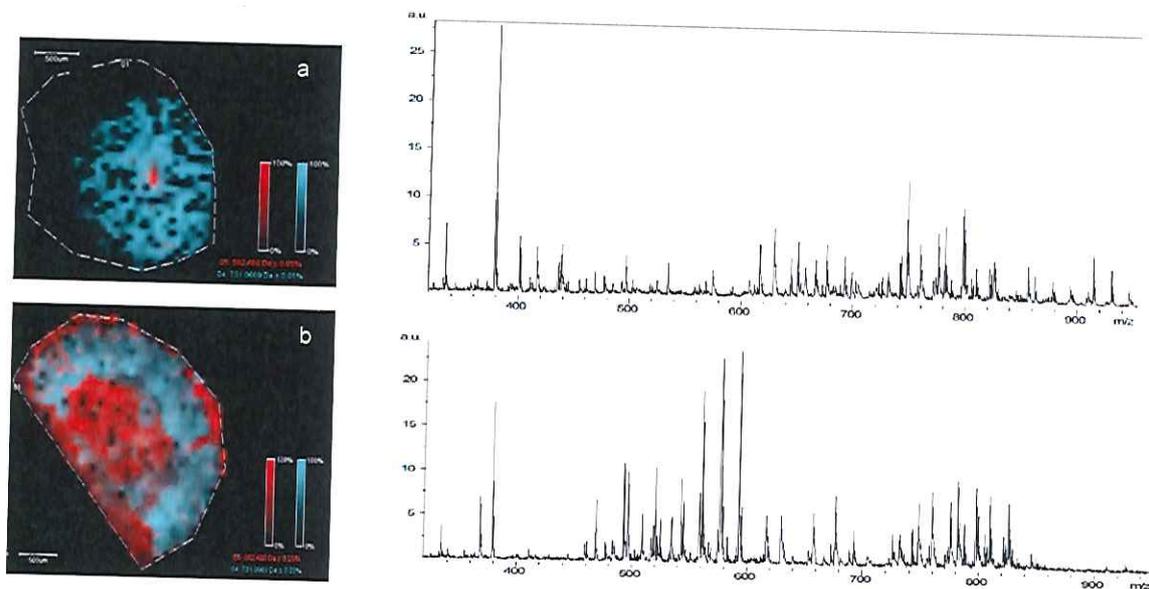


Figure 45 : Répartition des deux lipides principaux (592,488 Da en rouge, 781,0669 Da en bleu) dans une coupe de duodénum à t8s, dans l'organe témoin (a) et l'organe FAT (b), et leur spectre associé

L'étude du Jéjunum met en évidence quatre pics caractéristiques (Figure 46). Trois d'entre eux sont répartis dans la paroi du jéjunum (m/z 495,3531 ; 733,2847 et 787,486), et le dernier est présent dans la lumière (m/z 574,7368). L'intensité et la répartition sont différentes entre la souris de contrôle et la souris grasse. De plus, une diffusion du lipide (m/z 733,2847) est observée dans le jéjunum de l'échantillon FAT (Figure 46b). On constate également que le lipide caractéristique de la paroi (787,486 Da (en vert)), est réparti sur une zone plus mince pour la souris FAT (b) que pour la souris témoin (a).

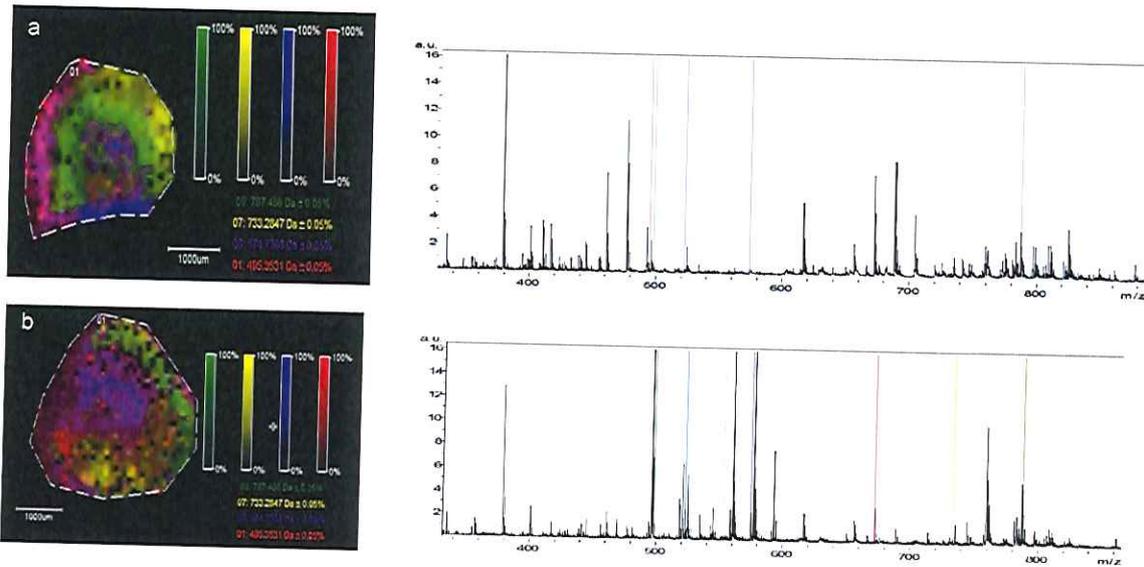


Figure 46 : Répartition des principaux lipides (495,3531 Da en rouge, 574,7368 Da en bleu, 733,2827 Da en jaune et le 787,486 Da en vert) dans une coupe de jéjunum à t8s, dans l'organe témoin (a) et l'organe FAT (b), et leur spectre associé

Au niveau de l'Iléon du témoin (Figure 47a), trois lipides sont représentatifs de la structure : 461,1808 Da (paroi externe et lumière de l'organe) ; le 572,3422 Da présent en faible proportion dans la lumière et le 630,4916 Da qui est lui représentatif de la membrane interne de l'organe. La même répartition est observée entre l'organe de la souris témoin (Figure 47a) et celui de la souris FAT (Figure 47b). Cependant, une différence d'intensité est observée entre ces deux coupes pour le lipide 572,3422 Da (largement plus représenté pour la souris FAT).

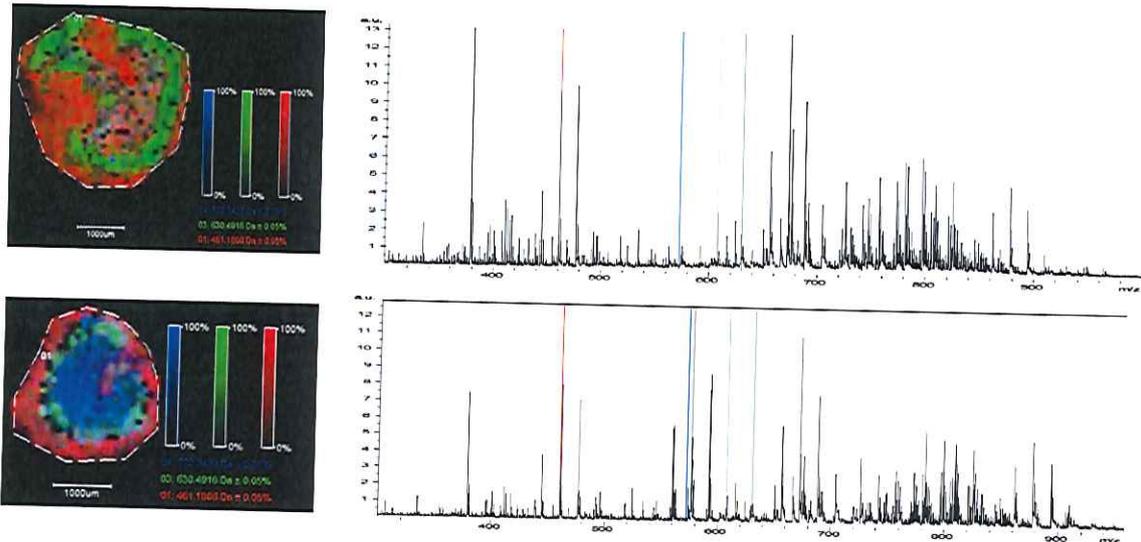


Figure 47 : Répartition des principaux lipides (461,1808 Da en rouge, 572,3422 Da en bleu et le 630,4916 Da en jaune) dans une coupe d'iléon à t8s, dans l'organe témoin (a) et l'organe FAT (b), et leur spectre associé

Les principaux lipides caractéristiques de chaque organe sont retrouvés dans le Tableau 13. Ces espèces ont été retrouvées dans les deux temps de l'analyse (t0 et t8s) mais à des proportions différentes.

	MALDI-IMS	
	t0	t8s
DUODENUM	592.488	592.488
	781.0669	781.0669
JEJUNUM	495.3531	495.3531
	574.7368	574.7368
	733.2847	733.2847
	787.486	787.486
ILEON	461.1808	461.1808
	572.3422	572.3422
	630.4916	630.4916

Tableau 13 : Synthèse des lipides retrouvés dans l'intestin au cours de l'analyse en imagerie MALDI

III.4.3.2 LC-MS/MS

III.4.3.2.1. Identification des lipides

Choix de la méthode

L'analyse en infusion a permis de réaliser un screening et de déterminer la méthode. Pour cela, une solution de standards de phospholipides (présentant des chaînes d'AG de 24 à 36 atomes de carbone avec jusqu'à 4 insaturations), a été directement injectés dans la source ESI. L'analyse s'est faite en mode positif pour les PC, et en mode négatif pour les PE, PS, PA, PI, PG. L'identification des lipides s'est faite par le mode « precursor ion scan » (PIS)

permettant de choisir les transitions à suivre. Par exemple, le lipide PE (36:4) possède une masse de 738,5 Da. Lors de sa fragmentation il va donner deux fragments spécifiques : 255,2 Da correspondant à la perte d'un AG 16:0, et un autre à 303,2 Da caractéristique de l'AG 20:4 (Tableau 14). L'analyse en LC-MS/MS sera calibrée pour suivre spécifiquement ces deux transitions.

Sample ID (m/z)	PIS (m/z)	Polarité	Nom du lipide	(ScanName)
738,5	255,2	Négative	PE 36:4	(FA 16:0)
738,5	303,2	Négative	PE 36:4	(FA 20:4)

Tableau 14 : Exemple de transition possible pour le PE(36:4) en infusion en mode négatif

RP-HPLC-MS/MS

L'analyse en LC-MS/MS va permettre de séparer dans un premier temps les phospholipides, puis dans un second temps les fragmenter. Ainsi, cette méthode permet une double sélectivité par le temps de rétention et la transition en masse de chaque lipide. L'analyse s'est d'abord faite sur les standards puis sur les lysats des organes (Annexe 4-8).

III.4.3.2.2. Quantification des lipides

La méthode LC-MS/MS permet de quantifier les lipides au sein des échantillons. Pour cela, une méthode de standardisation interne a été choisie. Un mix de standards (PA, PC, PE, PG, PI et PS) a été incorporé dans les échantillons à une concentration connue. Les résultats ont été obtenus sur l'étude t8s.

Cette analyse montre que dans le cerveau, les phospholipides les plus abondants sont les PS et les PC. On retrouve également en plus faible quantité des PA et des PE. Cependant, au cours du processus d'obésité, la quantité de PS diminue (Figure 48). Cette classe de phospholipide est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, notamment dans les phénomènes d'apoptose. Cette variation pourrait induire des dysfonctionnements cognitifs.



Cerveau

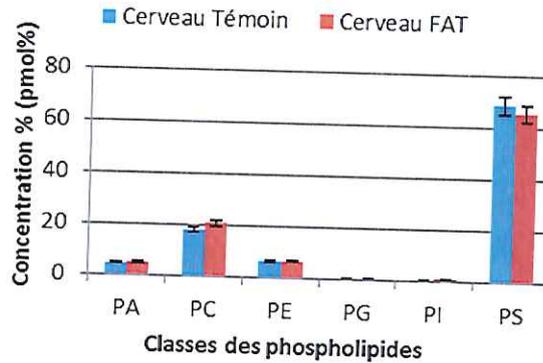
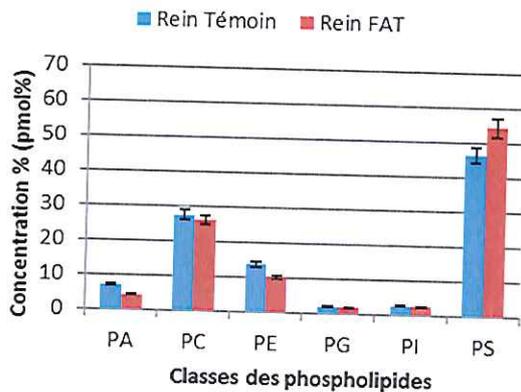


Figure 48 : Etude comparative de la quantité de phospholipide par classe dans le cerveau après huit semaines de régime enrichi en graisse

L'étude sur le rein montre la présence d'une grande quantité de PS, mais également de PC, PE et PA. Chez le sujet obèse, la quantité de PS est significativement augmentée. De même pour le cœur, la classe de PS est majoritaire et augmentée dans le cas d'un régime enrichie en graisse. La quantité de PC est quant à elle diminuée (Figure 49).

Rein



Coeur

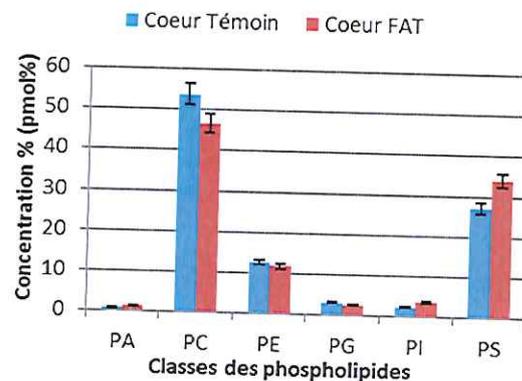


Figure 49 : Etude comparative de la quantité de phospholipide par classe dans le rein et le cœur après huit semaines de régime enrichi en graisse

Au niveau de l'intestin cette étude montre une différence très significative entre les deux populations (Figure 50). En effet, dans le duodénum les phospholipides majoritaires sont les PA et les PC. Cependant, chez les individus obèses, nous constatons une forte augmentation de la proportion de PC et une forte diminution de PA. Dans le jéjunum témoin, les PA sont les phospholipides les plus abondants. Après huit semaines de régime gras, les

autres classes de lipides augmentent significativement. Dans l'iléon les PA et les PS sont les espèces majoritaires à l'état sain, mais après une prise de poids, cette répartition est nettement inversée. Enfin, dans le colon, on retrouve principalement des PS et des PA, mais au cours de l'obésité cette dernière classe augmente fortement.

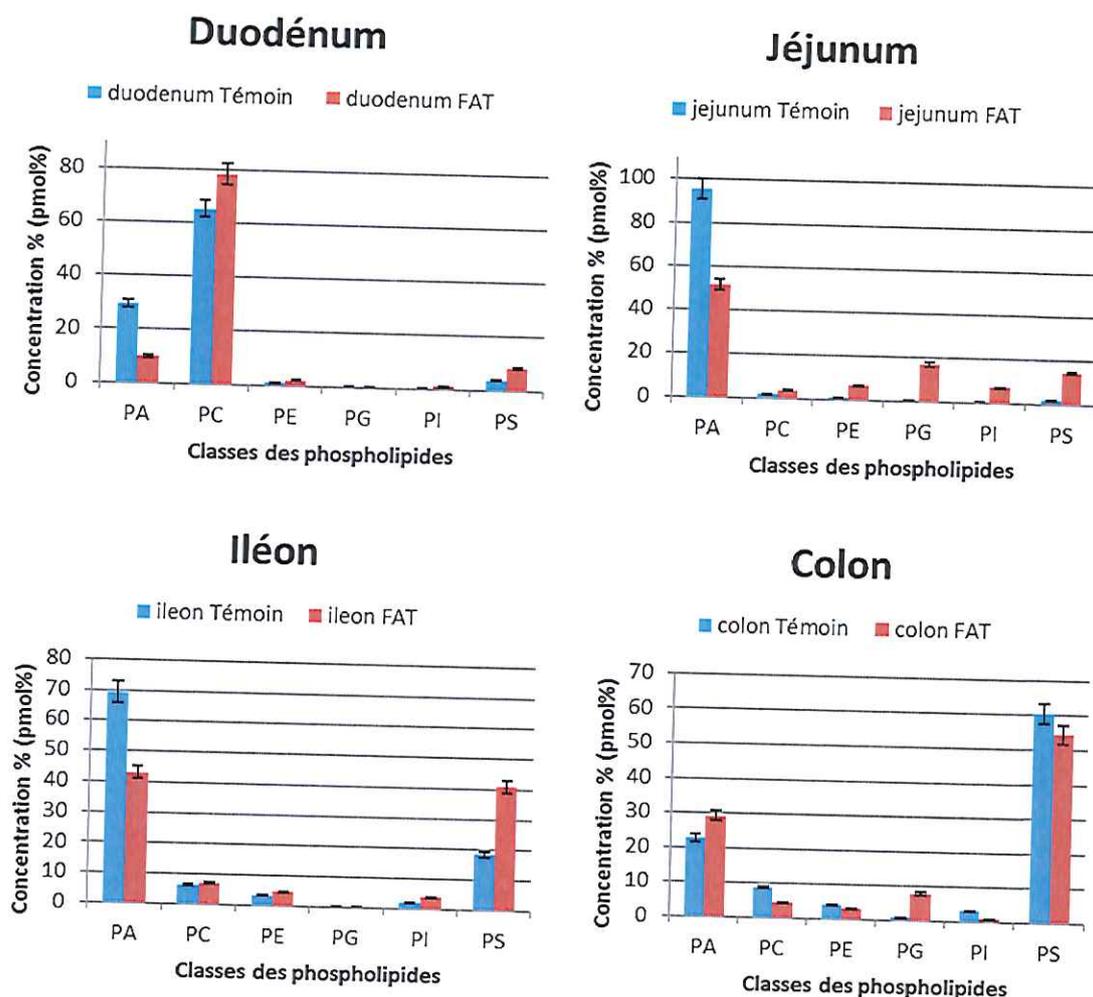


Figure 50 : Etude comparative de la quantité de phospholipide par classe dans l'intestin après huit semaines de régime enrichi en graisse

III.4.3.3 Comparaison des deux méthodes d'identification des lipides

Les analyses ont été réalisées sur une gamme de masse de 300 à 1000 Da en MALDI-IMS et de 400-900 Da en LC-MS/MS. Par conséquent, les petites molécules de masse inférieure à 400 Da (lysophospholipides) n'ont pas été détectées en MS/MS. L'identification en imagerie MALDI s'est accompagnée d'une comparaison à une banque de donnée (LipidMaps®). En LC-MS/MS, la méthode de standardisation nous a permis d'identifier

directement, grâce à la double sélectivité de la méthode, les lipides présents au sein des mêmes organes. L'ensemble des lipides d'intérêts sont retrouvés dans le tableau ci-dessous, selon la méthode utilisée.

	MALDI-IMS		LC-MS/MS
	t0	t8s	Identification
REIN	492.98 722.99 778.68 844.48	477.34 618.109 640.191 656.29 780.96	LYSOPC 722.99 → PC 30:3 Na ⁺ 780.96 → PC 36:5
CŒUR	534.319 723.24 770.48 877.114 909.92	477.34 616.73 640.65 656.29	LYSOPC 723.24 → PC 30:3 Na ⁺ 770.48 → PC 36:10
CERVEAU	722.536 748.758 772.680 798.442	722.536 734.957 748.758 760.719 772.680 798.442	734.957 → PC 32:0 748.758 → PC 34:7 760.719 → PC 34:1 772.680 → PC 36:9
DUODENUM	592.488 781.0669	592.488 781.0669	LYSOPC
JEJUNUM	495.3531 574.7368 733.2847 787.486	495.3531 574.7368 733.2847 787.486	LYSOPC
ILEON	461.1808 572.3422 630.4916	461.1808 572.3422 630.4916	LYSOPC

Tableau 15 : Comparaison des lipides identifiés en MALDI-IMS et en LC-MS/MS

Pour le rein, le cerveau, et le cœur, l'imagerie MALDI a mis en évidence certains lipides identifiés également par la méthode LC-MS/MS.

Pour l'intestin, l'identification par la méthode LC-MS/MS n'a pas pu se faire, car il s'agit de phospholipides hydrolysés nommés lysophospholipides (LYSOPC) de masse inférieure au seuil de détection choisie.

III.4.4. Conclusion

Lors de ce projet, le laboratoire venait d'acquérir le logiciel permettant de réaliser l'imagerie moléculaire par spectrométrie MALDI-TOF/TOF. Il s'agit ici, d'une prise en main de la méthode, ce qui nous a permis de comparer la répartition lipidique entre les différents



organes. Lors de ce travail, nous nous sommes rendu compte de certaines difficultés liées à la coupe des organes, notamment le cerveau et l'intestin. En effet, pour le cerveau il est important de réaliser des sections de coupe à la même profondeur de l'organe, par ailleurs, une étude plus approfondie sur les zones impliquées dans l'obésité serait intéressante afin de définir les sections à observer. Malgré ces difficultés, cette méthode a permis une ébauche de cartographie des zones d'intérêts dans lesquelles une différence au niveau de la répartition des lipides a pu être observée.

Depuis cette thèse, le laboratoire s'est équipé d'un logiciel de traitement d'images et d'analyses statistiques permettant une segmentation des zones d'intérêt au niveau de chaque organe (comme présenté ici pour le rein).

Il est à noter que mise de côté l'importance des sections et de l'application de la matrice, l'approche par imagerie moléculaire reste jusqu'à présent une approche qualitative qui aide à visualiser les modifications en surface d'organes des différentes molécules cibles. Il est donc important d'associer cette approche qualitative à une analyse quantitative plus précise comme la LC-MS/MS ce qui permet de corréliser les modifications au niveau des images à une identification et quantification des molécules.

Les premiers résultats de cette étude laissent penser la possibilité de modifications structurales des suites de l'installation de l'obésité. L'analyse par LC-MS/MS quant à elle a permis d'identifier les lipides qui montreraient une différence significative entre la souris normale et l'obèse.

Dans le cerveau, les classes de phospholipides impliquées semblent être les phosphatidylsérines et les phosphatidylcholines. Il faudrait néanmoins reprendre les images pour avoir une meilleure visibilité des zones concernées du cerveau (ce travail est par ailleurs actuellement repris par un étudiant en thèse). Comme expliqué précédemment, la section des coupes est ici très importante pour pouvoir effectuer une comparaison entre deux cerveaux.

Dans le cœur, les résultats sont en faveur d'une augmentation des PS et une diminution des PC. Cependant, nous avons constaté au cours des analyses en imagerie MALDI un biais potentielle dû à la préparation des analyses. En effet, le cœur agissant comme une pompe, il peut se trouver gorgé de sang au moment du sacrifice. Aussi, l'analyse pourrait être compromise par la plus grande présence de lipide circulant chez les souris obèses. Il serait donc intéressant de réaliser une circulation extra-corporelle avant le sacrifice des animaux afin de s'affranchir de ce biais potentiel (par ailleurs, l'analyse sur le cœur a été reprise dans



le cadre d'une autre étude et où ils sont perfusés avant sacrifice pour s'affranchir de ce biais).

Dans le rein, la répartition lipidique entre les deux échantillons est modifiée au cours de l'obésité. On constate également une proportion de PS augmentée, et une diminution des PE et des PC. Cette différence de proportion entre les organes sains et obèses affecte donc l'intégrité des membranes plasmiques.

Au niveau intestinal, le profil lipidique observé correspond à la famille des phosphatidylcholines. Ces observations ont par ailleurs été confirmées par d'autres investigations réalisées par la suite. Une quantité moindre de ces lipides est observée sur la paroi intestinale des souris ayant subi un régime gras. Les phosphatidylcholines apparaissent alors comme un biomarqueur potentiel de l'obésité au niveau de l'intestin.



Conclusion générale et perspectives

L'imagerie moléculaire par spectrométrie de masse (MALDI-IMS) est une nouvelle approche prometteuse pour détecter les biomolécules. Elle offre la possibilité de visualiser les lésions et les modifications structurales au niveau moléculaire dans différents organes. Cette technique est en plein essor, notamment dans l'étude des protéines et des peptides avec le développement de l'imagerie utilisant des sources d'ionisation à pression atmosphérique tel le DESI qui permettrait dans le futur une analyse in vivo de certaines pathologies.

L'étude lipidomique que nous avons menée, était la première étape permettant d'observer des différences entre des organes. Celle-ci a permis de mettre en évidence les lipides susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes de l'obésité. Ainsi, des profils lipidiques au sein de différents tissus ont été obtenus avec une matrice standard (HCCA). La répétition des résultats pré-confirme cette méthode, et représente donc la première étape d'un processus qui devrait valider l'utilisation de cette technique pour un diagnostic précoce de certaines pathologies.

Au cours de ces travaux, de nombreuses difficultés se sont présentées fonction de l'organe étudié. L'étude sur le cerveau a montré la nécessité de réaliser des coupes strictement identiques entre deux cerveaux afin de pouvoir comparer les images. Les analyses MALDI du cœur ont mis en évidence un biais non négligeable de par sa fonction de pompe. Les intestins ont mis en avant la difficulté de réaliser des coupes et l'importance de délimiter la zone à observer.

Bien que prometteuse, cette méthode analytique nécessite donc une bonne préparation des échantillons du prélèvement jusqu'à la coupe. Par ailleurs, le choix de la matrice et son mode de dépôt conditionnent également les résultats. Il serait donc intéressant de refaire les analyses en utilisant une autre matrice, en observant les mêmes classes de molécule, afin de vérifier si une tendance se dégage, validant les résultats obtenus. Par ailleurs, il est important de préciser qu'une absence de détection d'une molécule ne signifie pas son absence au sein de l'échantillon. En effet, des phénomènes de compétition à la désorption et à l'ionisation existent. Ainsi, la capacité d'ionisation de la molécule va dépendre de ces caractéristiques mais également de son abondance et de son environnement. C'est pourquoi en imagerie MALDI on ne peut pas comparer deux zones différentes. La comparaison doit en effet se faire sur deux coupes très similaires, dans une même zone.



En outre, une identification et une quantification sont nécessaires pour déterminer l'impact des phospholipides comme biomarqueurs. Dans ces circonstances, la méthode LC-MS/MS apporte une contribution non négligeable. En effet, la double sélectivité de cette technique fait de cette analyse une méthode complémentaire de choix. Cependant, cette technique nécessite un broyat préalable de l'échantillon et donc une perte de la localisation des analytes d'intérêts. Dans ce contexte, l'imagerie MALDI apporte donc un support d'identification permettant de déterminer les zones d'intérêts ou de cible thérapeutique.



Références bibliographiques

1. Food and Drug Administration. Endocrinologic and metabolic drugs advisory committee [Internet]. [cité 21 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/95/3107t1a.pdf>
2. OMS. Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale : rapport d'une consultation de l'OMS, Genève 2003 [Internet]. [cité 6 nov 2016]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42734/1/WHO_TRS_894_fre.pdf
3. E. Barbazan, Fabliaux et Contes, op. cit. t. III p37.
4. A. Brachet. Pathologie mentale des rois de France : Louis XI et ses ascendants : une vie humaine étudiée à travers six siècles d'hérédité, 852-1438 [Internet]. [cité 25 mars 2017]. Disponible sur: <https://archive.org/stream/pathologiemental00brac#page/217/mode/1up>
5. Hippocrates. Oeuvres complètes d'Hippocrate. (1er éd 1620). Bailliere; 1844. 704 p.
6. D. Jacquart et M Nicoud, « les régimes de santé au XIIIè siècles » in P. Guichard et D. Alexandre Bidon (Dir), Comprendre le XIIIè siècles études offertes à M. T. Lercin, Lyon, PUL, 1995.
7. Guy de Chauliac. La grande chirurgie de M. Guy de Chauliac [Internet]. Tournon: par Claude Michel; 1598 [cité 25 mai 2017]. Disponible sur: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k53884s>
8. A. Paré. A. Paré, Les œuvres divisées en 28 livres, Paris, 1585 p.1005.
9. G. L. Buffon. De l'homme, Œuvres complètes, Paris, 1836 (1er éd 1749-1767, addition de 1777) t. IV, p102.
10. Furetière A (1619-1688). Dictionnaire universel, contenant généralement tous les mots françois tant vieux que modernes, et les termes de toutes les sciences et des arts... ([Reprod.]) / par feu Messire Antoine Furetière,... [Internet]. La Haye: A. et R. Leers; 1690 [cité 25 mai 2017]. Disponible sur: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k50614b>
11. Bulletins de l'Académie royale des sciences et belles-lettres de Bruxelles. M. Hayez.; 1836. 226 p.
12. J.-A Chaptal. Eléments de chimie, paris 1776 (1er éd. 1790), t. III, p.346.
13. Liebig J -von. Chimie organique appliquée à la physiologie animale et à la pathologie: Traduction faite sur les manuscrits de l'Auteur par Charles Gerhardt. Fortin; 1842. 420 p.
14. M. Levy. Traité d'hygiène publique et privée [Internet]. [cité 25 mai 2017]. Disponible sur: <https://archive.org/stream/b24400488#page/700/mode/2up>
15. A. Quételet. Le poids de l'homme aux différents âges, Annales d'hygiène publique et de médecine légale, 1833, p.24. [Internet]. [cité 25 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.biusante.parisdescartes.fr/histoire/medica/resultats/?p=24&cote=90141x1833x10&do=page>



16. L. A. de Saint-Germain. L'obésité et son traitement. Extrait des leçons cliniques d'orthopédie, par le Dr de Saint Germain, recueillies et publiées par le Dr. Pierre-J. Mercier, Paris, 1891.
17. Guen J-ML. Obésité, le nouveau mal français: Pour une réponse politique à un fléau social. Armand Colin; 2005. 135 p.
18. Des ados new-yorkaises vont poursuivre McDo - 30 janvier 2005 - L'Obs [Internet]. [cité 21 mai 2017]. Disponible sur: <http://tempsreel.nouvelobs.com/monde/20050126.OBS7219/des-ados-new-yorkaises-vont-poursuivre-mcdo.html>
19. Nouvelobs.com. Des messages sanitaires bientôt insérés dans les publicités - 27 février 2007 - L'Obs [Internet]. [cité 25 mai 2017]. Disponible sur: <http://tempsreel.nouvelobs.com/societe/20070227.OBS4447/des-messages-sanitaires-bientot-inseres-dans-les-publicites.html>
20. Proposition de loi prévention et lutte contre l'obésité [Internet]. [cité 25 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.senat.fr/leg/pp107-312.html>
21. OMS | Obésité et surpoids [Internet]. WHO. [cité 14 janv 2016]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/>
22. Rasmussen BA, Breen DM, Lam TKT. Lipid sensing in the gut, brain and liver. Trends Endocrinol Metab TEM. févr 2012;23(2):49- 55.
23. Northern Ireland Assembly. Obesity inquiry research paper, 97/09 [Internet]. [cité 14 janv 2016]. Disponible sur: <http://archive.niassembly.gov.uk/researchandlibrary/2009/9709.pdf>
24. C. Rivera, N. Pecuchet, D. Wermert, C. Pricopi, F. Le Pimpec-Barthes, M. Riquet, E. Fabre. Obésité et cancer bronchique : incidences épidémiologiques, pathologiques et thérapeutiques, Revue de pneumologie clinique, Volume 71, issue 1, February 2015 [Internet]. [cité 14 janv 2016]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S076184171400159X>
25. A. Keys, F. Fidanza, M. J. Karnoven, N. Kimura, H. L. Taylor. Indices of relative weight and obesity, Journal of chronic diseases, Volume 2(, Issues 6-7, July 1972 [Internet]. [cité 14 janv 2016]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021968172900276>
26. Han TS, Seidell JC, Currall JE, Morrison CE, Deurenberg P, Lean ME. The influences of height and age on waist circumference as an index of adiposity in adults. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes. janv 1997;21(1):83- 9.
27. OMS. Surveillance STEPS : Guides pour la formation et fiches pratiques, guide pour les mesures physiques [Internet]. [cité 18 déc 2016]. Disponible sur: http://www.who.int/chp/steps/Partie3_Section4.pdf
28. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. BMJ. 15 juill 1995;311(6998):158- 61.
29. Roche AF, Sievogel RM, Chumlea WC, Webb P. Grading body fatness from limited anthropometric data. Am J Clin Nutr. déc 1981;34(12):2831- 8.



30. Thibault H, Rolland-Cachera MF. Stratégies de prévention de l'obésité chez l'enfant. Arch Pédiatrie. déc 2003;10(12):1100- 8.
31. INPES. Evaluer et suivre la corpulence des enfants, PNNS. [Internet]. [cité 24 nov 2016]. Disponible sur: <http://inpes.santepubliquefrance.fr/cfesbases/catalogue/pdf/imc/docimcenf.pdf>
32. Centers for Disease Control and Prevention. Overweight Prevalence Among Children and Adolescents 2011-2012 [Internet]. [cité 26 mars 2017]. Disponible sur: https://www.cdc.gov/nchs/data/hestat/obesity_child_11_12/obesity_child_11_12.htm
33. INSERM. Obésité [Internet]. [cité 14 janv 2016]. Disponible sur: <http://www.inserm.fr/thematiques/physiopathologie-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/obesite>
34. INSERM, KANTAR HEALTH, ROCHE. Obepi2012, Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité [Internet]. [cité 12 mars 2017]. Disponible sur: http://www.roche.fr/content/dam/roche_france/fr_FR/doc/obepi_2012.pdf
35. INSERM. Développement du tissu adipeux blanc et différenciation adipocytaire [Internet]. [cité 15 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/187/?sequence=18>
36. Poskitt, E.M.E. Assessment of body composition in the obese. In Davies, P.S.W., Cole, T.J. Body composition techniques in health and disease. Illustrated. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p. 146-69.
37. Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Bellisle F, Sempé M, Guillaud-Bataille M, Patois E. Adiposity rebound in children: a simple indicator for predicting obesity. Am J Clin Nutr. janv 1984;39(1):129- 35.
38. Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne J-Y, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. J Exp Med. 2 mai 2005;201(9):1397- 405.
39. Björntorp P, Gustafson A, Persson B. Adipose tissue fat cell size and number in relation to metabolism in endogenous hypertriglyceridemia. Acta Med Scand. nov 1971;190(5):363- 7.
40. Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. Circ Res. 16 nov 1998;83(10):1059- 66.
41. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. J Clin Invest. nov 1989;84(5):1663- 70.
42. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature. 5 juin 2008;453(7196):783- 7.
43. Tobin L, Simonsen L, Bülow J. Real-time contrast-enhanced ultrasound determination of microvascular blood volume in abdominal subcutaneous adipose tissue in man. Evidence for adipose tissue capillary recruitment. Clin Physiol Funct Imaging. nov 2010;30(6):447- 52.



44. P. Faucher, C. Poitou. Physiopathologie de l'obésité, Revue du Rhumatisme Monographies, Volume 83, issue 1 [Internet]. [cité 6 mars 2017]. Disponible sur: http://ac.els-cdn.com/S1878622715000995/1-s2.0-S1878622715000995-main.pdf?_tid=7ab3dba8-0285-11e7-9d5d-00000aab0f26&acdnat=1488815977_a0cf5707448a18b612676d6c357cc0b1
45. HAS. Complications et comorbidités du surpoids et de l'obésité de l'enfant et de l'adolescent [Internet]. [cité 12 mars 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-03/10irp02_memo_obesite_enfant_adolescent_recapitulatif_des_complications_comorbidites_du_surpoids_et_obesite.pdf
46. HAS. Surpoids et obésité de l'adulte : prise en charge médicale de premier recours [Internet]. [cité 26 mai 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-09/2011_09_30_obesite_adulte_argumentaire.pdf
47. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. *Pediatrics*. mai 2005;115(5):1367- 77.
48. ELFE. Présentation générale de l'Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance [Internet]. [cité 26 mai 2017]. Disponible sur: https://pandora.vjf.inserm.fr/doc/presentation_generale_elfe.pdf
49. Williams, S., Davie, G., Lam, F. Predicting BMI in young adults from childhood data using two approaches to modelling adiposity rebound. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 26 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10340811>
50. He Q, Karlberg J. Probability of Adult Overweight and Risk Change during the BMI Rebound Period. *Obes Res*. 1 mars 2002;10(3):135- 40.
51. Dorosty AR, Emmett PM, Cowin S d, Reilly JJ. Factors associated with early adiposity rebound. ALSPAC Study Team. *Pediatrics*. mai 2000;105(5):1115- 8.
52. Kannel WB, Brand N, Skinner JJ, Dawber TR, McNamara PM. The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. *Ann Intern Med*. juill 1967;67(1):48- 59.
53. OMS | Questions-réponses l'hypertension artérielle [Internet]. WHO. [cité 12 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/features/qa/82/fr/index.html>
54. UMFT. Physiopathologie de l'hypertension artérielle [Internet]. [cité 12 mars 2017]. Disponible sur: http://pathophysiology.umft.ro/lib/exe/fetch.php?media=fr:program:mg:cours-9_physiopathologie-de-l-ht-arterielle.pdf
55. Alpert MA. Management of obesity cardiomyopathy. *Am J Med Sci*. avr 2001;321(4):237- 41.
56. Wang TJ, Parise H, Levy D, D'Agostino RB, Wolf PA, Vasan RS, et al. Obesity and the Risk of New-Onset Atrial Fibrillation. *JAMA*. 24 nov 2004;292(20):2471- 7.
57. E. Gallissot-Pierrot. Pratique d'une activité physique et ses facteurs limitants dans une population d'adultes obèses : diminution des affects dépressifs et possibilités d'action



- par le médecin généraliste, Université de Lorraine, 2013 [Internet]. [cité 6 mars 2017]. Disponible sur: http://docnum.univ-lorraine.fr/public/BUMED_T_2013_GALLISSOT_PIERROT_ELISE.pdf
58. N. Eikelis, M. Schlaich, A. Aggarwal, D. Kaye, M. Esler. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. [Internet]. [cité 12 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668587>
 59. D. Junquero, Y. Rival. Syndrome métabolique: quelle définition pour quel(s) traitement(s) [Internet]. [cité 27 mai 2017]. Disponible sur: file:///C:/Users/LUDIET~1/AppData/Local/Temp/syndrome_metabolique.pdf
 60. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* mai 2006;23(5):469- 80.
 61. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome [Internet]. [cité 27 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.idf.org/component/attachments/attachments.html?id=705&task=download>
 62. Haute Autorité de Santé - Apnées du sommeil: de nouvelles recommandations de prise en charge des patients [Internet]. [cité 12 mars 2017]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1761160/fr/apnees-du-sommeil-de-nouvelles-recommandations-de-prise-en-charge-des-patients
 63. J. Burisch, T. Jess, M. Martinato, P.L. Lakatos. The burden of inflammatory bowel disease in Europe, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 7, issue 4 [Internet]. [cité 15 janv 2016]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873994613000305>
 64. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Animal models of IBD: linkage to human disease. *Curr Opin Pharmacol.* oct 2010;10(5):578- 87.
 65. Paik J, Fierce Y, Treuting PM, Brabb T, Maggio-Price L. High-fat diet-induced obesity exacerbates inflammatory bowel disease in genetically susceptible *Mdr1a*^{-/-} male mice. *J Nutr.* août 2013;143(8):1240- 7.
 66. Basdevant A. Médecine et chirurgie de l'obésité. Lavoisier; 2011. 833 p. (Lavoisier 2011).
 67. Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J Hepatol.* mars 2012;56(3):704- 13.
 68. Laville M. Conséquences rénales de l'obésité. *Néphrologie Thérapeutique.* avril 2011;7(2):80- 5.
 69. Legendre G, Fritel X, Capmas P, Pourcelot A-G, Fernandez H. Incontinence urinaire et obésité. [Httpwwwem-Premiumcomdatarevues03682315v41i4S0368231512000439](http://www.em-premium.com/data/revues/03682315v41i4S0368231512000439) [Internet]. 6 janv 2012 [cité 26 mai 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com.rproxy.sc.univ-paris-diderot.fr/article/724357/alertePM>
 70. Deruelle P. Obésité et grossesse. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* février 2011;39(2):100- 5.



71. Jensen DM, Damm P, Sørensen B, Mølsted-Pedersen L, Westergaard JG, Ovesen P, et al. Pregnancy outcome and prepregnancy body mass index in 2459 glucose-tolerant Danish women. *Am J Obstet Gynecol.* juillet 2003;189(1):239- 44.
72. Yu C, Teoh T, Robinson S. Review article: Obesity in pregnancy. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 1 oct 2006;113(10):1117- 25.
73. Fullston T, Wu L, Teede HJ, Moran LJ. Chapter 11 - Obesity and Reproductive Dysfunction in Men and Women. In: Watson RR, éditeur. *Handbook of Fertility* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 26 mai 2017]. p. 119- 32. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128008720000111>
74. Institut National Du Cancer | Surpoids et obésité - Réduire les risques de cancer [Internet]. [cité 26 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Reduire-les-risques-de-cancer/Surpoids-et-obesite>
75. André C, Dinel A-L, Ferreira G, Layé S, Castanon N. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain Behav Immun.* oct 2014;41:10- 21.
76. Stranahan AM. Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience.* 19 nov 2015;309:125- 39.
77. Mishra AK, Dubey V, Ghosh AR. Obesity: An overview of possible role(s) of gut hormones, lipid sensing and gut microbiota. *Metabolism.* janv 2016;65(1):48- 65.
78. Liou LS, Kheterpal E, Babayan RK. Obesity and Kidney Cancer. In: MD,PhD JJMCH de la R, MD,FACP CNS, MD,PhD HPA van P, éditeurs. *Renal Cell Cancer* [Internet]. Springer London; 2008 [cité 14 janv 2016]. p. 367- 72. Disponible sur: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-84628-763-3_38
79. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer J Int Cancer.* 15 mars 1999;80(6):827- 41.
80. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut.* juin 2013;62(6):933- 47.
81. Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut.* févr 2006;55(2):285- 91.
82. J.F. Le Men et all. Spectrométrie de masse, Université de Rennes [Internet]. [cité 21 mai 2017]. Disponible sur: <http://jflemen.iutlan.univ-rennes1.fr/CHIMIE/SPECMAS/specmas2.htm>
83. Cech NB, Enke CG. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev.* déc 2001;20(6):362- 87.
84. A. Droit. De l'identification à la caractérisation des complexes protéiques : développement d'une plateforme bioinformatique d'analyse, sous la direction de G. Poirier, Université Laval, 2007 [Internet]. [cité 21 mai 2017]. Disponible sur: <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/24220/ch02.html>
85. Waldron JD. *Advances in Mass Spectrometry: Proceedings of a Joint Conference Organised by the Hydrocarbon Research Group, Institute of Petroleum, and A.S.T.M.*



Committee E.14 and Held in the University of London, 24th–26th September, 1958. Elsevier; 2017. 721 p.

86. X. CZESZAK. Nouvelle stratégie de positionnement des structures O-Glycanniques : beta-élimination et dérivation à charge fixe, sous la direction de J. Lemoine, Université de Lille 1, Avril 2003 [Internet]. [cité 9 avr 2017]. Disponible sur: <https://ori-nuxeo.univ-lille1.fr/nuxeo/site/esupversions/4193a57f-a1a1-46c4-af17-e3feaeada7c3>
87. R.E. March. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, April 1997 [Internet]. [cité 5 mai 2017]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/profile/Raymond_March/publication/264754272_An_Introduction_to_Quadrupole_Ion_Trap_Mass_Spectrometry/links/02e7e5280e457acdfd000000/An-Introduction-to-Quadrupole-Ion-Trap-Mass-Spectrometry.pdf
88. Magniez M. Spectrométrie de masse, biotechnologies [Internet]. biotechnologie. [cité 21 mai 2017]. Disponible sur: <http://www.technobio.fr/search/ion%20trap/>
89. Cotter RJ. High energy collisions on tandem time-of-flight mass spectrometers. *J Am Soc Mass Spectrom.* mai 2013;24(5):657- 74.
90. MS/MS. Spectromètre de masse à temps de vol (TOF) [Internet]. Spectrométrie de masse. 2016 [cité 21 mai 2017]. Disponible sur: <http://masse-spec.fr/analyseur-temps-de-vol>
91. B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, and V. A. Zagulin. The mass-reflecton, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution, January 1973 [Internet]. [cité 5 mai 2017]. Disponible sur: http://jetp.ac.ru/cgi-bin/dn/e_037_01_0045.pdf
92. E. Jaspard. Proteomique proteomics gel bidimensionnel spectrometrie masse Module master genomique fonctionnelle vegetale Enseignement et recherche Biochimie, Université Angers [Internet]. [cité 21 mai 2017]. Disponible sur: <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/9ModulGenFoncVeg/6Proteomique/1Proteomiq.htm>
93. MS/MS. Cyclotron ou Résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FT-ICR) [Internet]. [cité 6 mai 2017]. Disponible sur: <http://masse-spec.fr/wp-content/uploads/2016/02/FTICR.pdf>
94. Balluff B, Rauser S, Ebert MP, Siveke JT, Höfler H, Walch A. Direct Molecular Tissue Analysis by MALDI Imaging Mass Spectrometry in the Field of Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology.* 1 sept 2012;143(3):544- 549.e2.
95. Lemaire R, Wisztorski M, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, et al. MALDI-MS Direct Tissue Analysis of Proteins: Improving Signal Sensitivity Using Organic Treatments. *Anal Chem.* 1 oct 2006;78(20):7145- 53.
96. Gagnon H, Franck J, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M. TARGETED MASS spectrometry Imaging: Specific Targeting Mass Spectrometry imaging technologies from history to perspective. *Prog Histochem Cytochem.* oct 2012;47(3):133- 74.
97. Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J Mass Spectrom.* juillet 2003;38(7):699- 708.



98. Lemaire R, Tabet JC, Ducoroy P, Hendra JB, Salzet M, Fournier I. Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem.* 1 févr 2006;78(3):809- 19.
99. H. N. Abdelhamid, J. Gopal, H-F. Wu. Synthesis and application of ionic liquid matrices (ILMs) for effective pathogenic bacteria analysis in matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI-MS), *Analytica chimica acta*, March 2013 [Internet]. ResearchGate. [cité 5 mai 2017]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/235773897_Synthesis_and_application_of_ionic_liquid_matrices_ILMs_for_effective_pathogenic_bacteria_analysis_in_matrix_assisted_laser_desorptionionization_MALDI-MS
100. Bonnel D, Franck J, Mériaux C, Salzet M, Fournier I. Ionic matrices pre-spotted matrix-assisted laser desorption/ionization plates for patient maker following in course of treatment, drug titration, and MALDI mass spectrometry imaging. *Anal Biochem.* 1 mars 2013;434(1):187- 98.
101. Hankin JA, Barkley RM, Murphy RC. Sublimation as a Method of Matrix Application for Mass Spectrometric Imaging. *J Am Soc Mass Spectrom.* sept 2007;18(9):1646- 52.
102. Dekker LJM, van Kampen JJA, Reedijk ML, Burgers PC, Gruters RA, Osterhaus ADME, et al. A mass spectrometry based imaging method developed for the intracellular detection of HIV protease inhibitors. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* avr 2009;23(8):1183- 8.
103. Caughlin S, Park DH, Yeung KK-C, Cechetto DF, Whitehead SN. Sublimation of DAN Matrix for the Detection and Visualization of Gangliosides in Rat Brain Tissue for MALDI Imaging Mass Spectrometry. *J Vis Exp JoVE.* 23 mars 2017;(121).
104. K. Arafah. Etude lipidomique et développements en imagerie MALDI des lipides : Application à la régénération du système nerveux central d'*Hirudo medicinalis*, sous la direction du Dr I. Fournier et D. Croix, Université de Lille 1, 2009 [Internet]. [cité 6 mai 2017]. Disponible sur: <https://ori-nuxeo.univ-lille1.fr/nuxeo/site/esupversions/b54426cb-0e4d-48eb-b27e-137c225d37c5>
105. Feng L, Prestwich GD. *Functional Lipidomics.* CRC Press; 2005. 350 p.
106. Fuchs B, Süß R, Teuber K, Eibisch M, Schiller J. Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state. *J Chromatogr A.* 13 mai 2011;1218(19):2754- 74.
107. P. Volin. Analysis of Steroidal Lipids by Gas and Liquid Chromatography, *J Chromatogr A* 935 (1-2), 125-140. 2001 Nov 23 [Internet]. PubMed Journals. [cité 2 juin 2017]. Disponible sur: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/11762771/>
108. Buré C, Ayciriex S, Testet E, Schmitter J-M. A single run LC-MS/MS method for phospholipidomics. *Anal Bioanal Chem.* janv 2013;405(1):203- 13.
109. Ogiso H, Suzuki T, Taguchi R. Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection of phosphatidic acid and phosphatidylserine. *Anal Biochem.* 1 avr 2008;375(1):124- 31.
110. L. Li, J. Han, Z. Wang, J. Liu, J. Wei, S. Xiong and Z. Zhao. Mass spectrometry methodology in lipid analysis, *International Journal of Molecular Sciences*, 2014



- [Internet]. [cité 2 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/6/10492/pdf>
111. Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail | Les lipides [Internet]. [cité 1 juin 2017]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/les-lipides>
 112. O. Jardin-Mathe. Développement d'un logiciel universel d'imagerie par spectrométrie de masse et application au modèle sanguin et aux maladies neurodégénératives, sous la direction de M. Salzet et I. Fournier, Université de biologie de Lille, Juin 2008 [Internet]. [cité 1 juin 2017]. Disponible sur: <https://ori-nuxeo.univ-lille1.fr/nuxeo/site/esupversions/65c2bc55-3d4f-481d-8479-8c011e13167e>
 113. Smedsgaard J, Frisvad JC. Terverticillate penicillia studied by direct electrospray mass spectrometric profiling of crude extracts. I. Chemosystematics. *Biochem Syst Ecol* [Internet]. 1997 [cité 3 juin 2017]; Disponible sur: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302883749>
 114. MS/MS. La métabolomique et spectrométrie de masse, Juin 2016 [Internet]. Spectrométrie de masse. 2016 [cité 2 juin 2017]. Disponible sur: <http://masse-spec.fr/metabolomique>
 115. Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, Duchoslav E, Ekroos K, Klemm RW, et al. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 févr 2009;106(7):2136- 41.
 116. Quetelet L-A-J. A Treatise on Man and the Development of His Faculties. *Obes Res*. 1 janv 1994;2(1):72- 85.



Annexes

Annexe 1. Table de Quételet (116)	106
Annexe 2. Tour de taille en fonction des ethnies d'après l'International Diabetes Federation (IDF) 2006	107
Annexe 3. Courbe de corpulence chez les filles de 0 à 18 ans	108
Annexe 4. Identification des Phosphatidylcholines	109
Annexe 5. Identification des Phosphatidylsérines	110
Annexe 6. Identification des Acides Phosphatidiques	111
Annexe 7. Identification des Phosphatidyléthanolamines	112
Annexe 8. Identification des Phosphatidylglycérols	113



Annexe 1. Table de Quételet (116)

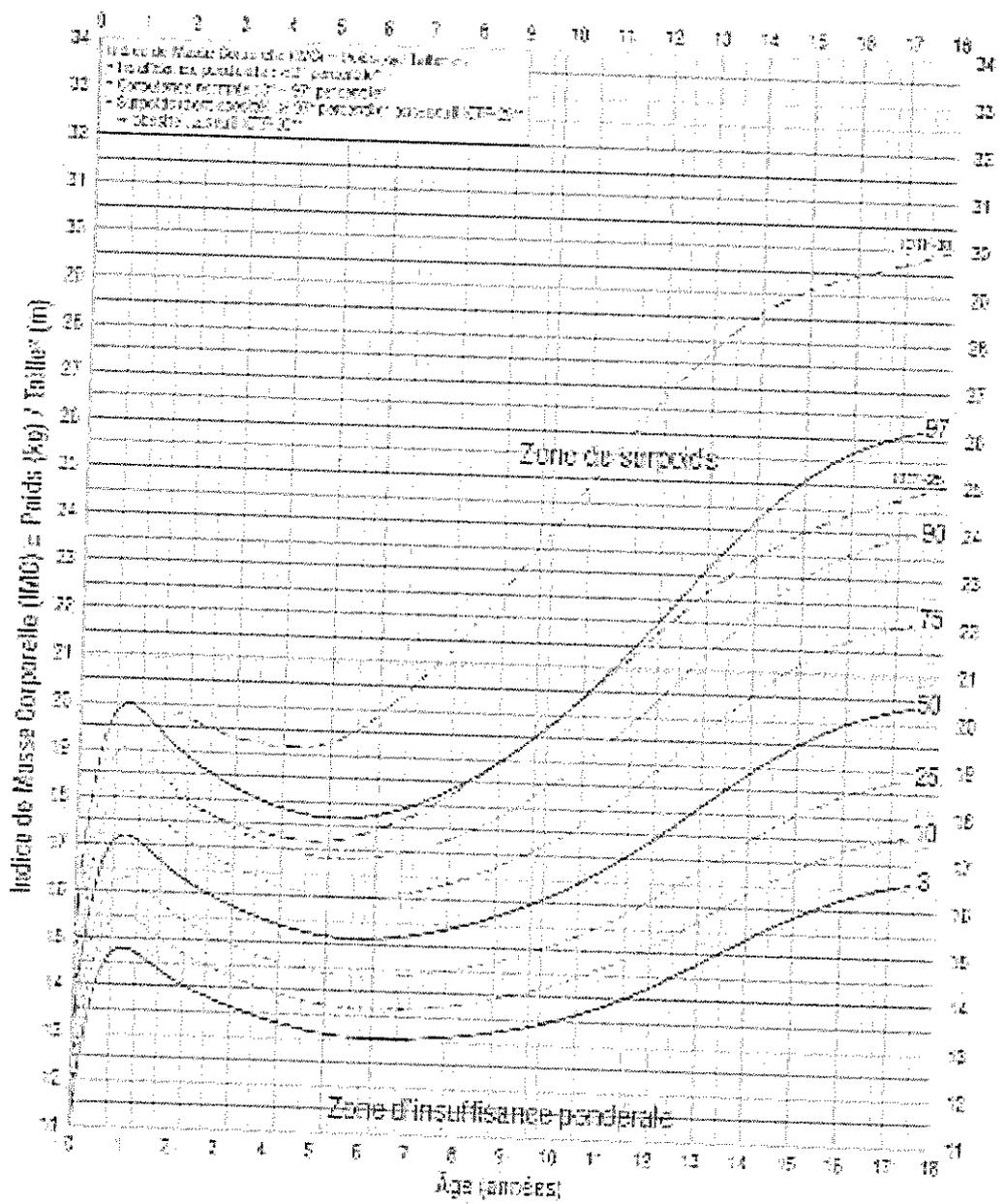
Table of the Size and Weight of Man at Different Ages.								Table of the Size and Weight of Woman at Different Ages.							
Ages.	Size.	Weight.	Ratio of Weight to Size.	Size Observed.		Weight Observed.		Ages.	Size.	Weight.	Ratio of Weight to Size.	Size Observed.		Weight Observed.	
				Max.	Min.	Max.	Min.					Max.	Min.		
Birth	met.	kilog.		met.	met.	kilog.	kilog.	Birth	met.	kilog.		met.	met.	kilog.	kilog.
1 year	0-496	3-20	6-19	0-532	0-438	4-30	2-34	1 year	0-483	2-91	6-15	0-555	0-438	4-25	1-12
2 "	0-696	10-00	14-20	0-750	0-682	11-00	9-00	2 "	0-690	9-30	13-50	0-704	0-660	10-5	8-3
3 "	0-797	12-00	15-00	0-824	0-730	13-50	10-50	3 "	0-780	11-40	14-50	0-798	0-720	12-0	8-3
4 "	0-860	13-21	15-36	0-875	0-840	13-60	12-10	4 "	0-850	12-45	14-70	0-895	0-795	15-8	10-5
5 "	0-932	15-07	16-32	0-963	0-840	18-20	12-50	5 "	0-910	14-18	15-10	0-950	0-810	15-8	11-5
6 "	0-990	16-70	16-98	1-080	0-915	28-50	14-00	6 "	0-974	15-50	15-70	1-085	0-876	17-5	13-3
7 "	1-046	18-04	17-44	1-115	0-960	30-40	15-80	7 "	1-032	16-74	16-24	1-085	0-956	20-3	13-3
8 "	1-112	20-16	18-31	1-162	1-109	24-50	17-20	8 "	1-096	18-45	16-85	1-177	1-050	23-4	16-0
9 "	1-170	22-26	18-92	1-260	1-120	28-50	19-00	9 "	1-139	19-82	17-45	1-380	1-050	23-4	16-0
10 "	1-227	24-09	19-68	1-325	1-150	29-00	22-20	10 "	1-200	22-44	18-65	1-380	1-110	25-7	18-3
11 "	1-282	26-12	20-37	1-325*	1-163	32-00	22-70	11 "	1-248	24-24	19-45	1-380	1-160	28-3	20-3
12 "	1-327	27-85	21-58	1-405	1-215	33-80	25-00	12 "	1-275	26-25	20-60	1-385	1-160	39-8	21-6
13 "	1-359	31-00	22-80	1-450	1-270	36-30	25-00	13 "	1-327	30-54	23-00	1-476	1-160	42-8	21-6
14 "	1-403	35-32	25-30	1-490	1-300	39-50	34-60	14 "	1-386	34-65	24-50	1-580	1-160	42-8	21-6
15 "	1-487	40-50	27-49	1-630	1-330	45-00	37-00	15 "	1-447	38-10	25-35	1-580	1-160	51-0	32-0
16 "	1-559	46-41	29-88	1-658	1-380	61-50	37-00	16 "	1-475	41-30	28-10	1-638	1-160	55-2	32-0
17 "	1-610	53-39	33-00	1-730	1-430	61-50	40-00	17 "	1-500	44-44	29-62	1-638	1-160	57-6	32-0
18 "	1-670	57-40	34-25	1-790	1-467	65-50	45-00	18 "	1-544	49-08	31-75	1-688	1-284	61-6	..
19 "	1-700	61-26	35-67	1-790	..	67-00	45-00	19 "	1-562	53-10	34-05	1-740	..	79-9	..
20 "	1-706	63-32	37-00	1-800	..	70-00	48-20	20 "	1-570	54-46	34-70
25 "	1-711	65-00	37-99	1-838	..	72-70	..	25 "	1-577	55-08	35-26
30 "	1-722	68-29	39-66	1-890	..	98-50	..	30 "	1-579	55-14	35-90
40 "	1-722	68-90	40-02	40 "	1-555	56-65	36-50
50 "	1-713	68-81	40-03	50 "	1-536	58-45	38-15	..	1-444	90-5	39-8
60 "	1-674	67-45	40-14	60 "	1-516	56-73	37-28	..	1-436
70 "	1-639	65-50	40-01	70 "	1-514	53-72	35-49	..	1-431	93-8	..
80 "	1-623	63-03	38-83	49-1	80 "	1-506	51-52	34-21	1-701	1-408	72-5	33-0
80 "	1-613	61-22	37-96	1-820	1-467	83-00	49-7								

Annexe 2. Tour de taille en fonction des ethnies d'après l'International Diabetes Federation (IDF) 2006

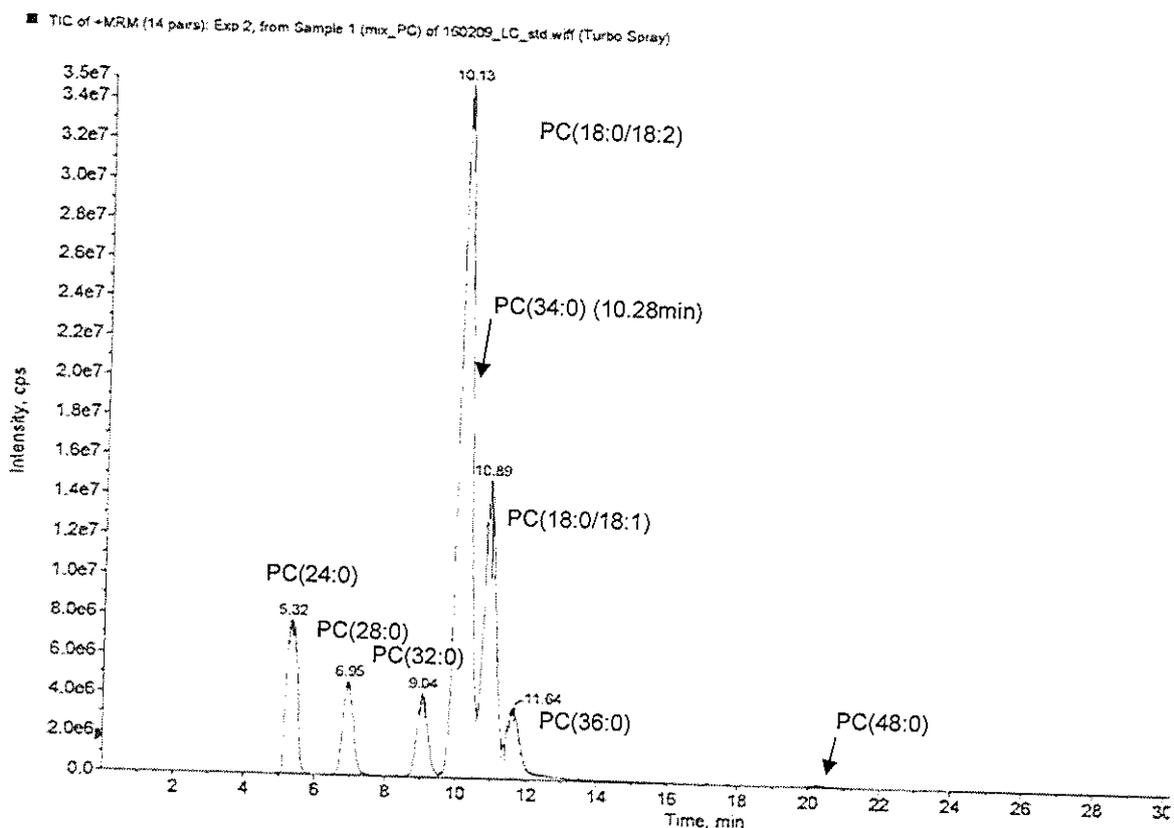
Pays/Ethnie	Tour de taille	
	Hommes	Femmes
Caucasiens	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Asiatiques du Sud (population chinoise, malaisienne et indonésienne)	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Population chinoise	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Population japonaise	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Ethnies d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale	Utiliser les recommandations sud-asiatiques jusqu'à ce que des données plus spécifiques soient disponibles	
Origine ethnique africaine subsaharienne	Utiliser les données européennes jusqu'à ce que des données plus spécifiques soient disponibles	
Utiliser les recommandations sud-asiatiques jusqu'à ce que des données plus spécifiques soient disponibles	Utiliser les données européennes jusqu'à ce que des données plus spécifiques soient disponibles	



Annexe 3. Courbe de corpulence chez les filles de 0 à 18 ans



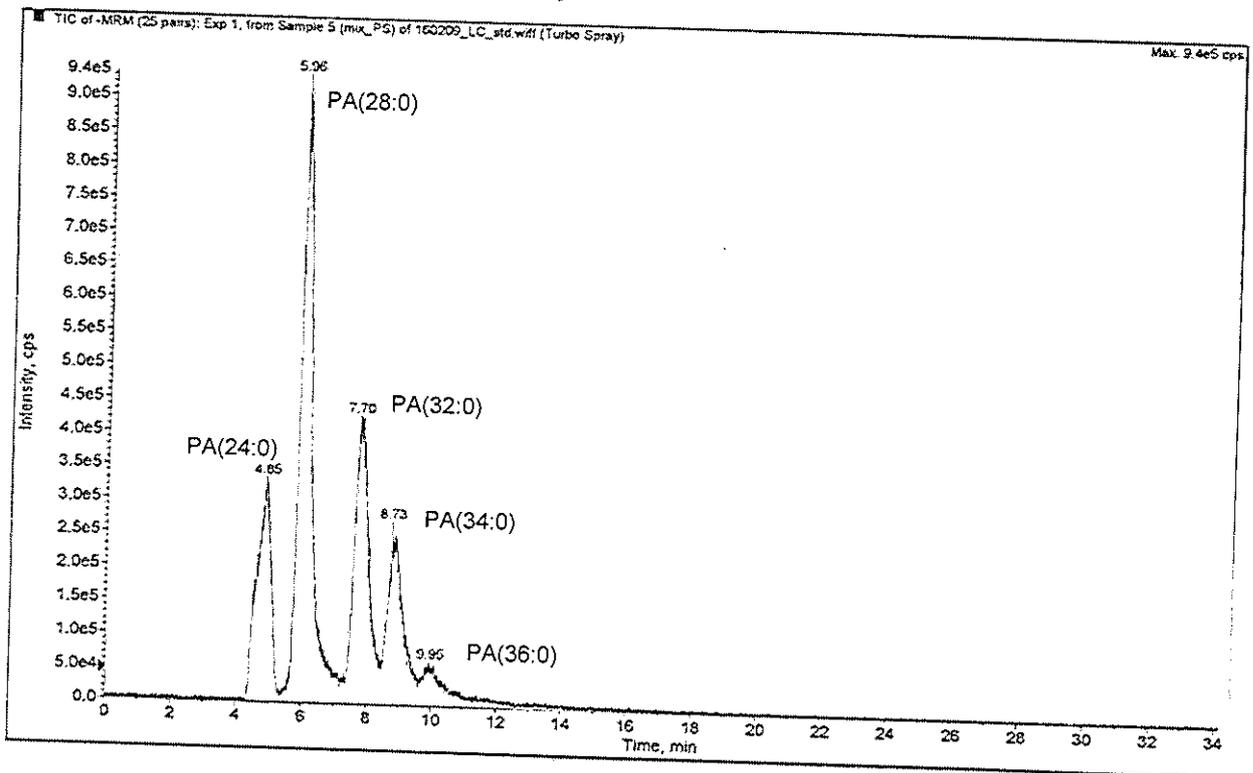
Annexe 4. Identification des Phosphatidylcholines



ID échantillon (m/z)	PIS (m/z)	Temps de rétention (min)	Nom du lipide	ID échantillon (m/z)	PIS (m/z)	Temps de rétention (min)	Nom du lipide
706.5	184.1	7.94	PC 30:0	784.6	184.1	9.88	PC 36:3
704.5	184.1	8.01	PC 30:1	782.6	184.1	8.00	PC 36:4
720.5	184.1	8.48	PC 32:7	780.5	184.1	8.09	PC 36:5
718.5	184.1	8.48	PC 32:8	774.5	184.1	8.03	PC 36:8
760.5	184.1	7.96	PC 34:1	772.5	184.1	7.98	PC 36:9
758.5	184.1	7.92	PC 34:2	818.5	184.1	7.96	PC 38:0
756.5	184.1	7.95	PC 34:3	814.5	184.1	8.12	PC 38:2
748.5	184.1	7.85	PC 34:7	813	184.1	7.89	PC 38:3
746.5	184.1	7.91	PC 34:8	805	184.1	7.90	PC 38:7
744.5	184.1	7.84	PC 34:9	838.8	184.1	7.82	PC 40:4
770.5	184.1	7.80	PC 36:1	836.6	184.1	7.75	PC 40:5
788.7	184.1	7.77	PC 36:1	834.6	184.1	7.86	PC 40:6
786.8	184.1	7.83	PC 36:2	832.5	184.1	7.29	PC 40:7



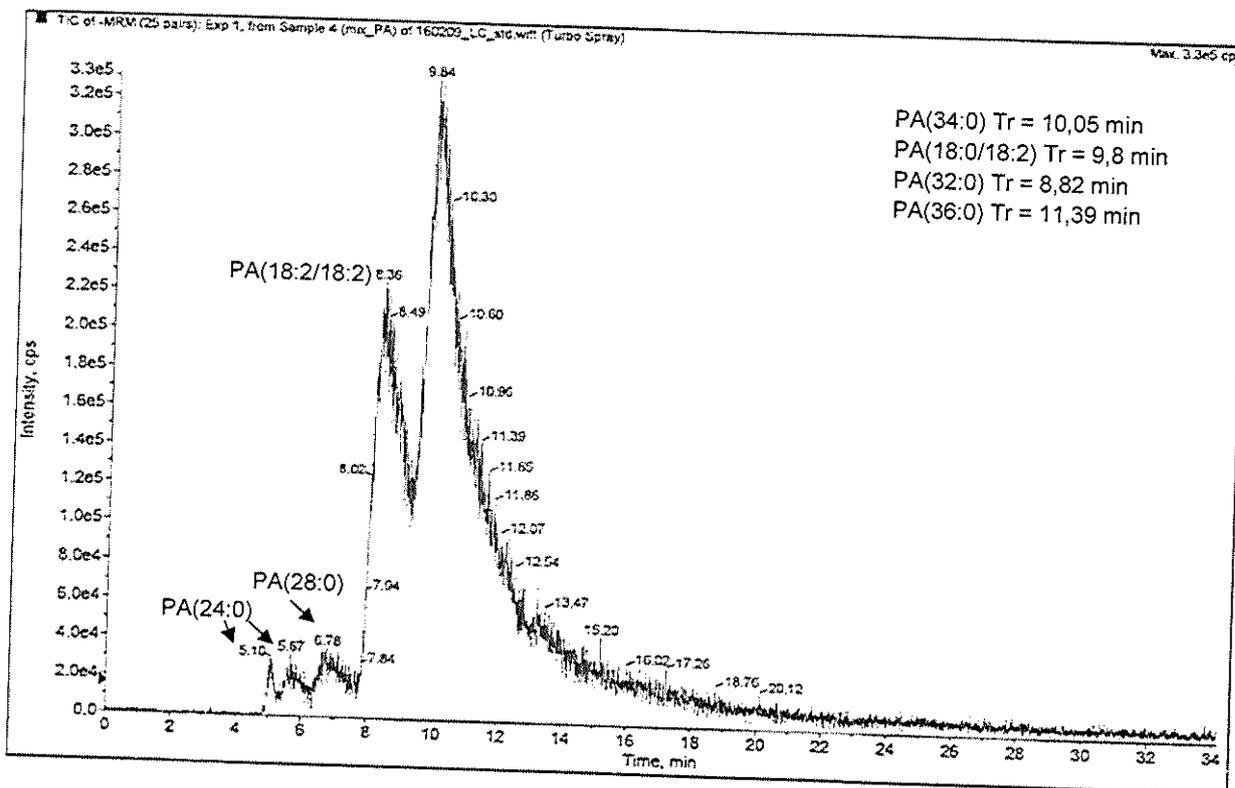
Annexe 5. Identification des Phosphatidylsérines



ID échantillon (m/z)	PIS (m/z)	Temps de rétention (min)	Nom du lipide
760.5	255.2	8.16	PS 34:1
760.5	281.3	8.16	PS 34:1
788.5	281.3	9.31	PS 36:1
788.5	283.3	9.31	PS 36:1
786.5	281.3	8.54	PS 36:2
784.5	279.2	8.13	PS 36:3
784.5	281.3	8.13	PS 36:3
810.5	283.3	5.25	PS 38:4
810.5	303.2	5.25	PS 38:4
834.5	283.3	8.64	PS 40:6
834.5	327.2	8.74	PS 40:6



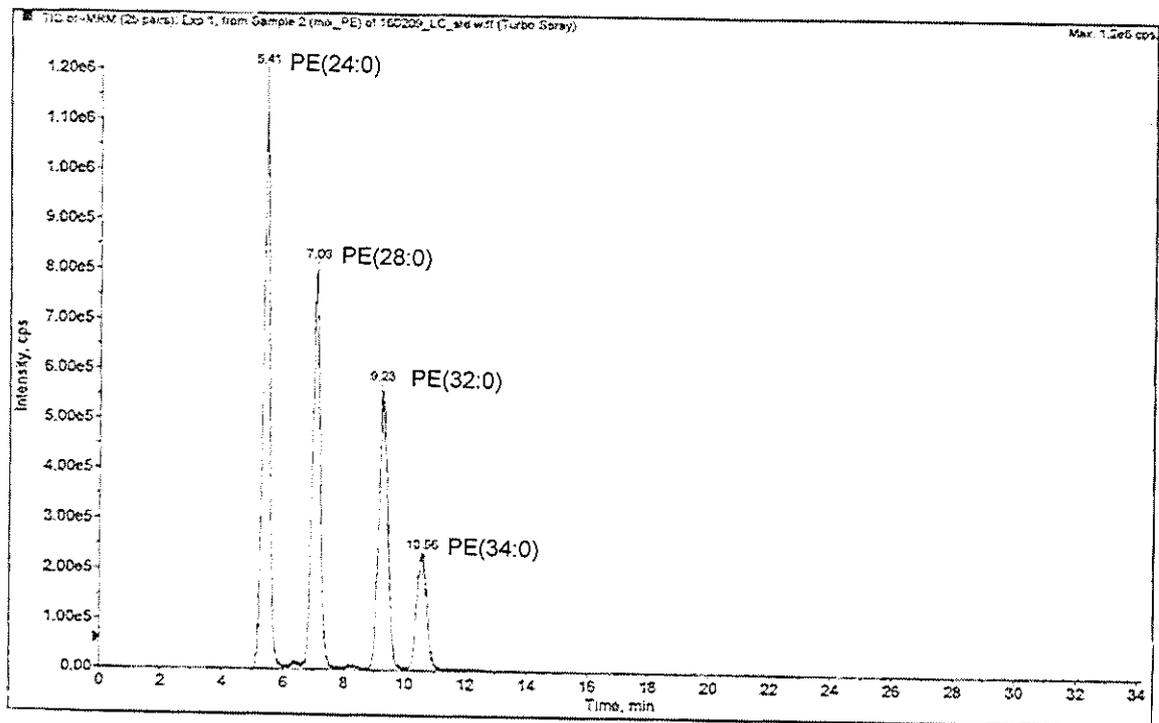
Annexe 6. Identification des Acides Phosphatidiques



ID échantillon (m/z)	PIS (m/z)	Temps de rétention (min)	Nom du lipide
673.5	255.2	9.22	PA 34:1
673.5	281.3	9.32	PA 34:1
701.5	281.3	9.28	PA 36:1
701.5	283.3	9.26	PA 36:1
699.5	281.3	8.57	PA 36:2
723.5	283.3	4.76	PA 38:4
723.5	303.2	4.76	PA 38:4
755.5	309.2	12.53	PA 40:2
751.5	283.3	6.87	PA 40:4
751.5	331.2	6.87	PA 40:4



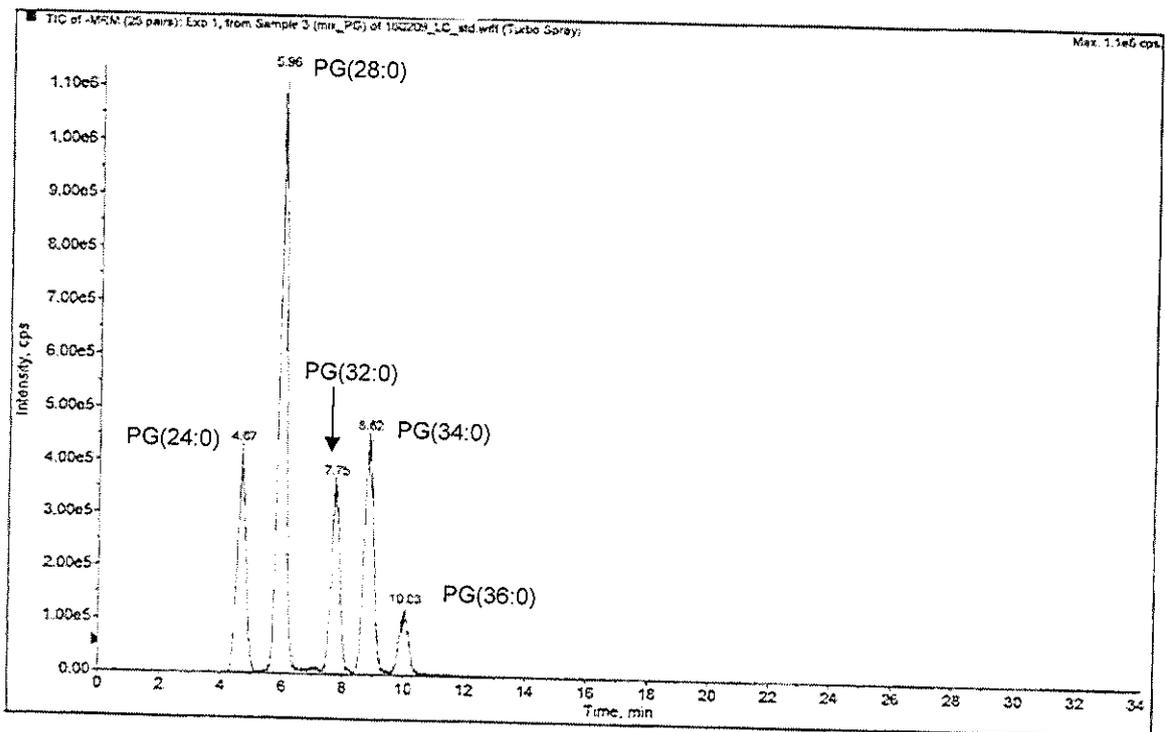
Annexe 7. Identification des Phosphatidyléthanamines



ID échantillon (m/z)	PIS (m/z)	Temps de rétention (min)	Nom du lipide
716.5	255.2	9.83	PE 34:1
716.5	281.3	9.88	PE 34:1
746.5	283.3	9.99	PE 36:0
744.5	281.3	11.15	PE 36:1
744.5	283.3	11.18	PE 36:1
738.5	255.2	9.3	PE 36:4
738.5	303.2	9.31	PE 36:4
770.5	281.3	9.20	PE 38:2
770.5	309.2	11.5	PE 38:2
766.5	283.3	11.45	PE 38:4
766.5	303.2	10.60	PE 38:4
764.5	281.3	10.68	PE 38:5
764.5	303.2	9.67	PE 38:5
762.5	255.2	9.76	PE 38:6
762.5	327.2	9.15	PE 38:6
790.5	283.3	9.14	PE 40:6
790.5	327.2	10.4	PE 40:6



Annexe 8. Identification des Phosphatidylglycérols



ID échantillon (m/z)	PIS (m/z)	Temps de rétention (min)	Nom du lipide
747.5	253.2	8.28	PG 34:1
747.5	255.2	8.15	PG 34:1
747.5	281.3	8.13	PG 34:1
747.5	283.3	8.15	PG 34:1
745.5	255.2	9.44	PG 34:2
745.5	270.2	0.06	PG 34:2



Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



Contribution of mass spectrometry and MALDI-TOF imaging in the study of the impact of obesity on the organism

L'obésité est l'un des plus graves problèmes de santé publique dans le monde, qui affecte aujourd'hui 13% de la population mondiale. Cette pathologie chronique crée des complications telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'arthrose et le cancer, entraînant la mort d'au moins 2.8 millions de personnes chaque années.

L'imagerie MALDI offre la possibilité de visualiser les modifications structurelles et spatiales des molécules à la surface de différents organes. Aucune préparation d'échantillon n'est nécessaire pour réaliser cette analyse, une simple microsection à l'aide d'un cryostat et l'application d'une matrice sont à réaliser avant l'analyse. L'étude en imagerie MALDI-TOF a permis d'obtenir des images de profils lipidique de quatre organes différents, potentiellement impactés par l'obésité : le cerveau, le cœur, le rein et l'intestin. Ces profils correspondent à la famille des phospholipides et mettent en évidence la différence moléculaire entre les tissus sains et obèses. Cette évaluation analytique représente la première étape d'un processus qui devrait être validé par la suite en optimisant les différents paramètres et rendre ainsi l'utilisation de l'imagerie moléculaire une méthode de routine dans la pratique clinique. Il est à noter qu'une identification et une quantification sont nécessaires par LC-MS/MS pour déterminer le rôle des phospholipides identifiés comme biomarqueurs.

Mots-clés : Obésité, Imagerie par spectrométrie de masse, MALDI-TOF, matrice HCCA, Phospholipides, LC-MS/MS

Contribution of mass spectrometry and MALDI-TOF imaging in the study of the impact of obesity on the organism

Obesity is one of the most serious public health problems in the world, which today affects 13% of the world's population. This chronic pathology creates complications such as cardiovascular disease, diabetes, osteoarthritis and cancer, resulting in the death of at least 2.8 million people each year.

MALDI Imaging offers the possibility to visualize structural and spatial changes of molecules on the surface of different organs. No sample preparation is necessary to carry out this analysis, a simple microsection using a cryostat and the application of a matrix are to be carried out before the analysis. The MALDI-TOF imaging study resulted in images of lipid profiles from four different organs, potentially affected by obesity : the brain, heart, kidney, and intestine. These profiles correspond to the Phospholipid family and highlight the molecular difference between healthy and obese tissues. This analytical evaluation represents the first step in a process that should be validated later by optimizing the different parameters and thus making the use of molecular imaging a routine method in clinical practice. Note that identification and quantification are required by LC-MS/MS to determine the role of phospholipids identified as biomarkers.

Keywords : Obesity, Mass spectrometry imaging, MALDI-TOF, HCCA matrix, Phospholipids, LC-MS/MS

