Caractérisation de métabolites oxygénés dérivés des acides arachidonique et docosahexaénoïque dans le cerveau de rat

Charlotte Jouvène

▶ **To cite this version:**

Charlotte Jouvène. Caractérisation de métabolites oxygénés dérivés des acides arachidonique et docosahexaénoïque dans le cerveau de rat. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1293 . tel-01589253

HAL Id: tel-01589253
https://theses.hal.science/tel-01589253

Submitted on 18 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°d'ordre NNT : **2016LYSE1293**

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biochimie

Soutenue publiquement le 15/12/2016, par :
Charlotte Jouvène

Caractérisation de métabolites oxygénés dérivés des acides arachidonique et docosahexaénoïque dans le cerveau de rat

---

Devant le jury composé de :

Blondeau Nicolas	CR	CNRS, Valbonne	Rapporteur
Denis Isabelle	CR	INRA, Jouy-en-Josas	Rapporteure
Nadjar Agnès	MC	Université Bordeaux 2	Rapporteure
Abousalham Abdelkarim	PR	Université Claude Bernard Lyon 1	Examinateur
Berti Liliane	PR	Université de Corse Pascal Paoli	Examinatrice
Lagarde Michel	PR	INSA de Lyon	Examinateur
Létisse Marion	MC	INSA de Lyon	Co-directrice de thèse
Guichardant Michel	PR	INSA de Lyon	Directeur de thèse

Thèse réalisée au sein du laboratoire CarMeN (Lyon)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Dr. **Nicolas Blondeau**, le Dr. **Isabelle Denis** et le Dr. **Agnès Nadjar** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Pr. **Abdelkarim Abousalham**, le Pr. **Liliane Berti** et le Pr. **Michel Lagarde** d'avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je tiens également à remercier le directeur du laboratoire CarMeN, le Dr. **Hubert Vidal**, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire durant ces quatre années.
Un grand merci aux directeurs de l'équipe 4, le Pr. **Michel Lagarde**, le Pr. **Philippe Moulin** et le Dr. **Marie-Caroline Michalski**, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe et pour leurs conseils très intéressants tout au long de ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Pr. **Michel Guichardant** et au Dr. **Marion Létisse** pour m'avoir dans un premier temps accueillie en tant que stagiaire et d'avoir permis mon épanouissement dans ce monde de la recherche. Michel, merci de m'avoir initiée à la lipidomique et de m'avoir transmis une partie de vos connaissances et de votre grande expérience. Je ne connaissais pas le monde des lipides avant d'arriver au laboratoire et aujourd'hui j'espère continuer longtemps dans ce domaine. Je vous remercie tout particulièrement de m'avoir transmis votre passion pour la science, mais également pour votre disponibilité, votre patience, vos encouragements ainsi que pour votre aide précieuse pour la rédaction de ce manuscrit. Marion, merci de m'avoir encadrée et conseillée durant ces quatre années. Merci pour tes conseils et ton aide aussi bien scientifiques que techniques ainsi que pour ton soutien, tes encouragements et nos discussions (pas toujours scientifiques !) qui ont eu une grande importance durant ces quatre ans. Je tiens également à te remercier de m'avoir accompagnée durant mes premiers pas d'enseignante. Vos deux personnalités sont assez éloignées mais vous vous êtes très bien complétés dans cet encadrement. Je vous exprime mes sincères remerciements et mon profond respect.

Je voudrais également remercier très profondément le Pr. **Michel Lagarde** pour sa grande implication dans mon travail. Je tiens à vous remercier pour le temps que vous m'avez accordé, pour tous vos conseils toujours très pertinents et pour m'avoir aidée à valoriser ce travail. Vos très grandes connaissances, votre rigueur scientifique et votre esprit critique ont permis d'améliorer la qualité de ce travail. Et ne vous inquiétez pas, je resterais une biochimiste dans l'âme et je ne mettrais jamais de côté les structures des molécules ! Je vous exprime mon profond respect ainsi que mes plus grands remerciements.

Je remercie grandement le Dr. **Alain Géloën** pour son implication dans mes travaux. Merci d'avoir réalisé la partie expérimentation animale et de nous avoir conseillés. Grâce à votre humour, vous avez su rendre ce moment pas toujours heureux plus léger.

Un grand merci à la plateforme de lipidomique du laboratoire sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci au Pr. **Nathalie Bernoud-Hubac** pour ses conseils et sa gentillesse. Une mention spéciale est décernée à **Patricia Daira**, **Patrick Molière** et **Baptiste Fourmaux**. Merci à tous les trois pour vos précieux conseils et votre aide ainsi que pour votre bonne humeur. Et surtout merci de m'avoir écoutée me plaindre, encouragée et aidée. Enfin tout simplement merci de m'avoir supportée durant ces quatre ans !

Je voudrais également remercier le Dr. **Thierry Durand** et le Dr. **Laurence Balas** de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron pour nous avoir aidés dans ce travail.

Je remercie le Dr. **Sandrine Parrot** du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon pour nous avoir aidés dans l'expérimentation animale. Merci pour vos conseils et votre expérience.
Je remercie également le Dr. **Marlène Wiart** et **Violaine Hubert** pour le modèle d'inflammation.

Je souhaite également remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire qui ont participé à mon intégration et qui m'ont aidé au cours de cette thèse.

Je tiens à remercier le Dr. **Evelyne Véricel** et le Dr. **Catherine Calzada**. Merci pour votre aide et vos précieux conseils délivrés au cours de mon stage et de ma thèse.

Un grand merci au Dr. **Françoise Hullin-Matsuda** pour ses supers conseils et nos discussions ! Même si on n'a plus trop de motivation, ta bonne humeur et ta passion pour la science nous redonnent de l'énergie.

Merci aux autres membres du « 2ème étage ». Merci au Dr. **Madeleine Picq** pour m'avoir aidée dans mes expériences, pour vos conseils très précieux et surtout pour votre gentillesse. Merci à **Amanda Lo Van** d'avoir partagé cette petite hotte avec moi !

Un grand merci à **Véronique Pierre** pour ton aide, ta bonne humeur et les covoiturages Lyon-Gap ! Vive les Hautes-Alpes !

Merci aux gestionnaires, **Samia Sbaa** et **Marina Verges**, qui ont toujours su répondre à mes demandes, même aux derniers moments !

Merci également à **Monique Estienne**, ou Madame Qualité ! Même si des fois ce n'est l'activité la plus attractive, merci de m'avoir initiée à la qualité et de m'y avoir donné goût.

Merci au Pr. **Isabelle Delton** et au **Dr. Céline Costaz** pour vos conseils et votre bonne humeur.

Merci à tous les stagiaires et les doctorants qui m'ont aidée durant ma thèse et avec qui j'ai partagé de bons moments. Merci notamment à vous les garçons : **Jérémie Bruno**, **Pierre Poinsot**, **Joris Dal Santo**, pour votre bonne humeur et nos délires. Merci à tous les co-organisateurs de la journée de l'EDISS, et notamment à **Gabriel Kocevar**, ce fut une très belle expérience !
Je finis par les meilleures, les filles ! Durant cette thèse, j'ai fait de très belles rencontres : **Marine Milard** et **Charline Buisson** (oui tu fais partie des étudiants !). Merci à vous deux pour votre aide, nos délires, nos moments hors labo et nos discussions très « scientifiques » durant les pauses cafés ! Et surtout merci pour avoir participer à la relecture de ma thèse ! Enfin, deux personnes très spéciales qui sont devenues de véritables amies au cours de ces quatre années : les Drs. **Maud Arnal-Levron** et **Manon Lecomte**. Un très grand merci à vous deux qui ont été là tout au long de cette thèse dans les bons comme dans les mauvais moments et sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. J'ai adoré partagé ce bureau, cette machine à café, nos sorties et tout plein d'autres choses avec vous ! Merci à toutes les quatre d'avoir été là et de m'avoir supportée durant ces quelques années!

Je remercie tous les autres membres du laboratoire qui ont, de prêt ou de loin, contribué à la réussite de cette thèse et qui m'ont aidé.

Parce que la vie ne se résume pas qu'au laboratoire (même si on y passe beaucoup de temps !) :

Je voudrais remercier tout d'abord mes amis qui ont été là pour m'épauler et pour me permettre de décompresser : Vanessa, Halima, Manu, Alice, Natacha, Aude, Alexia, Debby… Merci à tous d'avoir été là ! Un grand merci plus particulièrement à Steve et à Taki qui ont subi le plus durant ces dernières années. Merci à vous deux de m'avoir supportée (surtout durant ces derniers mois), épaulée et soutenue.

Enfin, je voudrais remercier mes plus grands soutiens, ma famille. Merci à mes grands-parents de toujours s'être inquiétés pour moi et de me faire des bons petits plats. Merci à mon frère pour son soutien et surtout pour nos moments passés ensemble ! Enfin, le plus grand des merci à mes parents. Merci d'avoir toujours été là, de m'avoir écoutée parler de ma thèse sans ne jamais rien comprendre et d'avoir supporté mes humeurs ! Merci à tous les deux pour votre soutien tout au long de mes études, c'est grâce à vous que j'en suis là ! Et merci maman pour avoir lu toute ma thèse et corrigé mes fautes d'orthographe !

Un grand merci à tous pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions !

Résumé

Les acides docosahexaénoïque (DHA) et arachidonique (ArA), qui appartiennent respectivement aux familles n-3 et n-6, sont présents en grande quantité dans les tissus cérébraux, en particulier dans les phospholipides membranaires. Ces deux acides gras polyinsaturés (AGPI) jouent des rôles essentiels dans le fonctionnement cérébral, notamment dans le neurodéveloppement et la neuroinflammation. De plus, ces AGPI sont des précurseurs de plusieurs médiateurs lipidiques oxygénés impliqués dans divers processus physiologiques et pathologiques.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de caractériser les métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA dans le cerveau, étape cruciale pour une meilleure compréhension de leurs rôles biologiques dans cet organe. Pour cela, une technique d'analyse à haute performance a été optimisée, la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS), pour identifier les différents métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA présents dans les cerveaux de rats exsanguinés et non exsanguinés, que ce soit en conditions basales ou inflammatoires.

Ainsi, plusieurs produits oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA ont été identifiés et quantifiés dans les cerveaux exsanguinés et non-exsanguinés, à la fois sous forme libre dans le cerveau mais aussi estérifiés dans les phospholipides. Les métabolites monohydroxylés sont les principaux dérivés oxygénés du DHA et de l'ArA, cependant, des quantités mesurables de produits dihydroxylés, tels que le 8,15-diHETE et la protectine DX, ont également été détectées. L'exsanguination permet de différencier les métabolites oxygénés du tissu cérébral de ceux présents dans le sang. De plus, le métabolisme oxygéné du DHA et de l'ArA est impacté lors d'une inflammation cérébrale. En effet, dans ces conditions, la synthèse de certains métabolites est augmentée, notamment celle de la protectine D1, molécule connue pour ces fortes propriétés anti-inflammatoires. Ces résultats méritent de plus amples recherches dans des conditions physiopathologiques, notamment lors de maladies neurodégénératives, afin d'observer leur impact sur le métabolisme oxygéné de ces AGPI.

Mots clés : Acides gras polyinsaturés, eicosanoïdes, docosanoïdes, cerveau, lipoxygénases, inflammation, UHPLC-MS/MS.

Abstract

Docosahexaenoic (DHA) and arachidonic (ArA) acids, two PUFA which belong to n-3 and n-6 families respectively, are both present at high amount in brain tissues, and especially in membrane phospholipids. These two polyunsaturated fatty acids (PUFA) play important roles in brain functioning, notably in neurodevelopment and neuroinflammation. Moreover, these PUFA are precursors of various oxygenated lipid mediators involved in diverse physiological and pathological processes.

In this context, the aim of this work was to characterize oxygenated metabolites derived from DHA and ArA in brain, crucial step for better understanding their biological roles in this organ. For this purpose, a high performance analytical approach was optimized, the liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), in order to identify the different oxygenated metabolites derived from DHA and ArA in exsanguinated and non-exsanguinated brains, both in basal and inflammatory conditions.

Several oxygenated products from DHA and ArA were identified and measured in exsanguinated and non-exsanguinated brain, both in the free form and esterified in phospholipids. Mono-hydroxylated metabolites were the main oxygenated derivatives from DHA and ArA, however, measurable amounts of di-hydroxylated products such as 8,15-diHETE and protectin DX, were also detected. Exsanguination allowed discriminating oxygenated metabolites from brain tissue against those in blood brain. Moreover, DHA and ArA oxygenated metabolism was impacted during brain inflammation. Indeed, in these conditions, the synthesis of some metabolites was increased, including that of protectin D1, molecule known for its strong anti-inflammatory properties. These results deserve further research in pathophysiological conditions, especially in neurodegenerative diseases, in order to observe their impact on the oxygenated metabolism of these PUFA.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids, eicosanoids, docosanoids, brain, lipoxygenases, inflammation, UHPLC-MS/MS.

Productions scientifiques

❖ PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THESE

Jouvène, C., Fourmaux, B., Géloën, A., Balas, L., Durand, T., Lagarde, M., Létisse, M., Guichardant, M. *Oxygenase end-products of arachidonic and docosahexaenoic acids in rat brain.* (En cours de soumission).

❖ AUTRES PUBLICATIONS

Lagarde, M., Calzada, C., **Jouvène, C.,** Bernoud-Hubac, N., Létisse, M., Guichardant, M., Véricel, E. *Functional fluxolipidomics of polyunsaturated fatty acids and oxygenated metabolites in the blood vessel compartment.* Progress in Lipid Research. 2015 Oct,60:41-49.

❖ COMMUNICATIONS AFFICHEES

Jouvène, C., Fourmaux, B., Lagarde, M. Guichardant, M. and Létisse, M. *Etude du métabolisme oxygéné de l'acide docosahexaénoïque dans le cerveau de rongeurs.* Journée de l'école doctorale EDISS 2014 (Villeurbanne).

Jouvène, C., Géloën, A., Fourmaux, B., Lagarde, M., Létisse, M. and Guichardant, M. *Profiling of oxygenated metabolites of arachidonic and docosahexaenoic acids in rat brains.* Journées Chevreul Lipids & Brain III 2015 (Paris). *Prix du meilleur poster.*

Jouvène, C., Géloën, A., Fourmaux, B., Lagarde, M., Létisse, M. and Guichardant, M. *Profiling of oxygenated metabolites of arachidonic and docosahexaenoic acids in rat brains.* Journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides 2015 (Marseille).

Jouvène, C., Fourmaux, B., Géloën, A., Balas, L., Durand, T., Bernoud-Hubac, N., Lagarde, M., Létisse, M. and Guichardant, M. *LC-MS/MS profile of lipid mediators in rat brain homogenate.* Bioactive Lipids Conference 2015 (Budapest).

❖ COMMUNICATIONS ORALES

Guichardant, M., **Jouvène, C.,** Fourmaux, B., Géloën, A., Létisse, M., Bernoud-Hubac, N. and Lagarde, M. *LC-MS/MS lipid mediator analysis. Application to rat brain.* EuroAnalysis 2015 (Bordeaux).

Jouvène, C., Géloën, A., Fourmaux, B., Lagarde, M., Létisse, M. and Guichardant, M. *Caractérisation des métabolites oxygénés dérivés des acides arachidonique et docosahexaénoïque dans le cerveau de rat.* Journée de l'école doctorale EDISS 2015 (Villeurbanne).

Jouvène, C., Fourmaux, B., Géloën, A., Balas, L., Durand, T., Lagarde, M., Létisse, M. and Guichardant, M. *Métabolisme oxygéné des acides arachidonique et docosahexaénoïque dans le cerveau de rat.* Journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides 2016 (Lyon).

Jouvène, C., Fourmaux, B., Géloën, A., Balas, L., Durand, T., Lagarde, M., Létisse, M. and Guichardant, M. *Oxygenated metabolites derived from arachidonic and docosahexaenoic acids in rat brain.* International Conference on the Bioscience of Lipids 2016 (Chamonix).

Orateur

Abréviations

A

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGPI-LC : Acide gras polyinsaturé à longue chaine

ALA : Acide α-linolénique

ApoE : Apolipoprotéine E

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde

ArA : Acide arachidonique

B

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BNDF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

C

CCM : Chromatographie sur couche mince

COX : Cyclooxygénase

$cPLA_2$: PLA_2 cytosolique

CYP450 : Cytochrome P_{450}

D

DHA : Acide docosahexaénoïque

DPA : Acide docosapentaénoïque

E

E : Exsanguiné

EDP : Acide époxydocosapentaénoïque

EET : Acide époxyeicosatriénoïque

EP : Récepteur aux prostaglandines

EPA : Acide eicosapentaénoïque

F

FLAP : Protéine activant la 5-lipoxygénase

G

GPx-1 : Glutathion peroxydase 1

H

HDoHE : Acide hydroxydocosahexaénoïque

HETE : Acide hydroxyeicosatétraénoïque

HpDoHE : Acide hydroperoxydocosahexaénoïque

HpETE : Acide hydroperoxyeicosatétraénoïque

I

$iPLA_2$: PLA_2 indépendante du calcium

L

LA : Acide linoléique

LDL : Lipoprotéines de basse densité

LOX : Lipoxygénase

LPC : Lysophosphatidylcholine

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Leucotriène

LX : Lipoxine

LXRα : Récepteur X du foie

M

MaR : Marésine

N

NE : Non exsanguiné

NGF : Facteur de croissance des nerfs

NPD1 : Neuroprotectine D1

P

PA : Acide phosphatidique

PC : Phosphatidylcholine

PD1 : Protectine D1

PDX : Protectine DX

PE : Phosphatidyléthanolamine

PG : Prostaglandine

PGI_2 : Prostacycline

PI : Phosphatidylinositol

PL : Phospholipides

PMN : Leucocyte polymorphonucléaire

PLA_2 : Phospholipase A_2

PLC : Phospholipase C

PPAR : Récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes

PS : Phosphatidylsérine

R

RvD : Résolvine de la série D

RXRα : Récepteur X aux rétinoïdes

S

SREBP-1 : Protéine 1 liant les éléments régulateurs des stérols

T

TG : Triglycérides

THA : Acide tétracosahexaénoïque

TPA : Acide tétracosapentaénoïque

Tx : Thromboxane

U

UHPLC-MS/MS : Chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem

Table des matières

RESUME 9

ABSTRACT 10

ABREVIATIONS 13

LISTE DES FIGURES 19

LISTE DES TABLEAUX 21

INTRODUCTION GENERALE 23

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 27

I Les acides gras polyinsaturés 29
I.1 Présentation des acides gras polyinsaturés 29
I.2 Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longues chaînes 31
I.3 Distribution des acides gras polyinsaturés dans l'organisme 35
I.4 Rôles physiologiques des acides gras polyinsaturés 39
I.4.1 Rôle structural des acides gras polyinsaturés 39
I.4.2 Précurseurs de métabolites actifs 40
I.4.3 Médiateurs de l'expression génique 41

II Métabolisme oxygéné des acides gras polyinsaturés n-3 et n-6 45
II.1 Principales enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés 45
II.1.1 Les phospholipases 45
II.1.2 Les lipoxygénases 47
II.1.3 Les cyclooxygénases 51
II.1.4 Autres oxygénases agissant sur les acides gras polyinsaturés 54
II.2 Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique 55
II.2.1 Les acides gras monohydroxylés dérivés de l'acide arachidonique 55
II.2.2 Les leucotriènes 57
II.2.3 Les lipoxines 61
II.2.4 Les prostanoïdes 63
II.2.4.1 Les prostaglandines 63
II.2.4.2 Les thromboxanes 65
II.2.5 Autres métabolites 67
II.3 Métabolisme oxygéné de l'acide docosahexaénoïque 68
II.3.1 Les acides gras monohydroxylés dérivés de l'acide docosahexaénoïque 69
II.3.2 Les docosatriènes 72
II.3.2.1 Les protectines 72
II.3.2.2 Les marésines 77
II.3.3 Les résolvines 79
II.3.4 Autres métabolites 82
II.4 Les métabolites oxygénés estérifiés dans les phospholipides 83

III Le cerveau, organe riche en acides gras polyinsaturés 87
III.1 Composition en acides gras polyinsaturés du cerveau 88
III.2 Accrétion des acides gras polyinsaturés dans le cerveau 91
III.2.1 Synthèse intracérébrale d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes 91
III.2.2 Apport des acides gras polyinsaturés au cerveau *via* la circulation sanguine 92
III.3 Rôle des acides gras polyinsaturés dans le cerveau 95
III.3.1 Neurodéveloppement et neurogenèse 96
III.3.2 Régulation synaptique 98
III.3.3 Neuroinflammation 100
III.3.4 Les acides gras polyinsaturés dans le vieillissement cérébral 104
III.3.4.1 Altération du contenu cérébral en acides gras polyinsaturés durant le vieillissement 104
III.3.4.2 Impact des acides gras polyinsaturés n-3 au cours du vieillissement cérébral normal 106
III.3.4.3 Vieillissement cérébral altéré et AGPI 107

HYPOTHESES ET OBJECTIFS 111

MATERIELS ET METHODES 115

MATERIELS 117

I Produits 117

II Appareils 118

METHODES 119

I Préparation des échantillons biologiques 123
I.1 Prélèvement des cerveaux exsanguinés ou non exsanguinés de rats 123
I.2 Traitement des rats par des lipopolysaccharides 124
I.3 Microdissection des cerveaux 124
I.4 Broyage des cerveaux et incubation des homogénats 125

II Extraction des lipides 126
II.1 Extraction liquide/liquide des lipides 126
II.2 Extraction en phase solide des métabolites oxygénés libres 126
II.3 Isolement des métabolites oxygénés estérifiés dans les phospholipides 127

III Analyse des métabolites oxygénés en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) 127
III.1 Méthode d'analyse en UHPLC-MS/MS 127
III.2 Séparation des deux isomères de protectine par UHPLC-MS/MS 130
III.3 Détermination de la chiralité des métabolites oxygénés par LC-MS/MS 130

IV Analyses statistiques 131

RESULTATS ET DISCUSSION 133

I Caractérisation des métabolites oxygénés en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem 137

II Métabolites oxygénés non estérifiés dérivés de l'ArA et du DHA 141

II.1 Caractérisation des métabolites oxygénés libres dans les cerveaux exsanguinés et non exsanguinés. 141

II.2 Effet de l'addition de DHA sur le métabolisme oxygéné du DHA et de l'ArA 144

II.3 Intérêt de l'exsanguination sur la mesure des métabolites oxygénés libres 145

II.4 Identification des deux isomères de protectine par UHPLC-MS/MS 146

II.5 Mécanismes impliqués dans la synthèse des métabolites oxygénés 150

III Recherche des métabolites oxygénés dérivés de l'ArA et du DHA estérifiés dans les phospholipides 155

IV Impact d'une inflammation cérébrale sur les métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA 159

V Répartition des dérivés oxygénés sous forme libre du DHA et de l'ArA dans les différentes régions du cerveau de rat 163

DISCUSSION GENERALE 167

CONCLUSION 179

PERSPECTIVES 183

REFERENCES 187

Liste des figures

Figure 1. Structure et nomenclature des différentes familles d'acides gras. 30

Figure 2. Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 et n-3 à longue chaîne à partir des AGPI indispensables. 33

Figure 3. Conséquences d'un apport alimentaire déséquilibré en AGPI n-6/n-3. 34

Figure 4. Proportion des différentes espèces d'acides gras dans le corps entier de rat. 36

Figure 5. Pourcentage de chaque AGPI (wt%) dans chaque compartiment.. 37

Figure 6. Les principales classes de phospholipides formées par la liaison d'un groupement polaire à l'acide phosphatidique. 38

Figure 7. Voies de biosynthèse de certains métabolites oxygénés dérivés de l'ArA (en bleu) et du DHA (en vert). 41

Figure 8. Mécanisme nucléaire de régulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique par les AGPI. 43

Figure 9. Principales voies d'hydrolyse des phospholipides permettant la libération d'AGPI. 46

Figure 10. Mécanisme d'oxygénation des acides gras polyinsaturés par les lipoxygénases. 48

Figure 11. Mécanisme d'oxygénation des acides gras polyinsaturés qui implique deux sites catalytiques distincts des cyclooxygénases. 52

Figure 12. Métabolites monohydroxylés formés par les différentes lipoxygénases humaines à partir de l'acide arachidonique. 56

Figure 13. Voies de synthèse des leucotriènes à partir de l'ArA 60

Figure 14. Voies de synthèse des lipoxines 62

Figure 15. Voies de synthèse des prostaglandines 65

Figure 16. Voie de synthèse des thromboxanes. 67

Figure 17. Métabolisme de l'acide docosahexaénoïque par les lipoxygénases humaines 71

Figure 18. Synthèse des protectines *via* la voie de la 15-lipoxygénase 75

Figure 19. Biosynthèse de l'AT-PD1 en présence d'aspirine. 76

Figure 20. Voies de synthèse des marésines. 78

Figure 21. Voies de synthèse des résolvines de la série D. 81

Figure 22. Biosynthèse des résolvines de la série D en présence d'aspirine. 82

Figure 23. Schéma montrant les mécanismes de formation des phospholipides contenant des dérivés monohydroxylés de l'ArA. 85

Figure 24. Présentation d'un hémisphère du cerveau divisé en quatre lobes. L'ensemble cerveau, tronc cérébral et cervelet compose l'encéphale. 87

Figure 25. Composition en acides gras des cortex frontaux et préfrontaux humains de sujets males (n=15) et femelles (n=15) âgés de 29 à 45 ans (en % d'acides gras totaux).. 89

Figure 26. Proportion des différentes espèces d'acides gras dans le cerveau de rats (en % des acides gras totaux)..... 89

Figure 27. Constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique. 93

Figure 28. Les différentes voies d'accrétion des acides gras dans le cerveau à partir du plasma. 95

Figure 29. Différentes activités du complexe synaptique.. 99

Figure 30. Rôle des différents médiateurs lipidiques dans la réponse inflammatoire aigüe. 102

Figure 31. Action de la NPD1 sur la formation des plaques amyloïdiennes. 110

Figure 32. Présentation des différentes études réalisées. 121

Figure 33. Spectre de masse de la PDX obtenu par analyse en UHPLC-MS/MS. 138

Figure 34. Chromatogramme reconstitué obtenu par analyse en UHPLC-MS/MS d'un mélange de standards de métabolites oxygénés. 142

Figure 36. Métabolites oxygénés non estérifiés dans les homogénats de cerveau de rat. 143

Figure 37. Synthèse des protectines DX et D1 *via* la voie de la 15-LOX.. 147

Figure 38. Identification des deux isomères de protectines : PDX et PD1.. 149

Figure 39. Comparaison des spectres UV de la PDX (A) et de la PD1 (B) 150

Figure 40. Exemples de séparation d'énantiomères sur colonne chirale. 152

Figure 41. Métabolites monohydroxylés estérifiés dans les phospholipides des homogénats de cerveaux de rats. 157

Figure 42. Impact de l'inflammation cérébrale sur les métabolites lipidiques oxygénés libres dérivés du DHA et de l'ArA. 161

Figure 43. Impact de l'inflammation cérébrale sur les prostanoïdes dérivés de l'ArA. 162

Figure 44. Répartitions des métabolites lipidiques oxygénés libres dans les structures cérébrales de rat. 164

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principales isoformes de lipoxygénases présentes chez l'Homme. 51

Tableau 2. Paramètres utilisés en UHPLC-MS/MS pour analyser les métabolites oxygénés du DHA et de l'ArA. 129

Tableau 3. Pourcentage de métabolites de stéréochimie S comparés à ceux de stéréochimie R..... 153

INTRODUCTION GENERALE

Depuis plusieurs années, une attention particulière est portée sur l'alimentation de la population, facteur environnemental sur lequel il est possible d'agir afin de prévenir certaines maladies. Ainsi plusieurs études épidémiologiques et cliniques suggèrent que la consommation alimentaire régulière d'acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 pourrait être associée chez l'Homme à des effets bénéfiques sur la santé dans plusieurs domaines tels que les maladies neurologiques (Salem, N., Jr. *et al.* 2001 ; Cunnane, S.C. *et al.* 2009 ; Joffre, C. *et al.* 2014), cardiovasculaires (Kris-Etherton, P.M. *et al.* 2002 ; Mozaffarian, D. and Wu, J.H. 2011), inflammatoires (Yates, C.M. *et al.* 2014) ou cancéreuses (Huang, C. and Freter, C. 2015). Cependant, depuis plusieurs années, l'alimentation occidentale connaît un déséquilibre des apports entre les deux grandes familles d'AGPI : les AGPI n-3 et les AGPI n-6, ces derniers étant présents en plus grande quantité (Guesnet, P. *et al.* 2005). De plus, ce déséquilibre associé au fait que le précurseur des AGPI n-3, l'acide α-linolénique (ALA, 18:3 n-3), est faiblement converti en acides gras à longue chaîne, provoque une diminution de la disponibilité tissulaire d'AGPI n-3, en particulier celle de l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3). Cet apport plus important d'AGPI n-6, et notamment d'acide arachidonique (ArA, 20:4 n-6), et la diminution des AGPI n-3 peuvent favoriser l'apparition de certaines pathologies. En effet, les AGPI n-6 sont connus pour avoir des effets délétères sur l'organisme, tel que l'induction de l'inflammation alors que les AGPI n-3 ont tendance à être protecteurs pour l'organisme, notamment en la diminuant.

Durant ces dernières années, des études métabolomiques ont montré que les effets associés aux AGPI pouvaient s'exercer *via* leurs dérivés oxygénés. Ainsi, les enzymes lipoxygénases et cyclooxygénases convertissent l'ArA en plusieurs médiateurs lipidiques, tels que les prostaglandines, le thromboxane ou les leucotriènes, connus pour leurs propriétés pro-inflammatoires et pro-agrégantes. De la même façon, le DHA est le précurseur de métabolites, tels que les protectines, les marésines et les résolvines, présentant des propriétés opposées à celles des dérivés de l'ArA (propriétés anti-inflammatoires et anti-agrégantes) (Lagarde, M. *et al.* 2015 ; Marion-Letellier, R. *et al.* 2015). Au vu des effets très importants de ces différents métabolites sur certains processus de l'organisme, une attention très particulière s'est portée sur eux depuis plusieurs années. De plus, depuis peu, des travaux mettent en évidence l'importance de quelques métabolites dans le cerveau, du développement à la sénescence.

En effet, le cerveau est, après le tissu adipeux, l'organe le plus riche en lipides (50 % de son poids sec). Les phospholipides des membranes cérébrales sont constitués à environ 30 % d'AGPI, et notamment de DHA et d'ArA. Ces derniers représentent la quasi-totalité des AGPI cérébraux avec environ 45 % de DHA et 30 % d'ArA (McNamara, R.K. and Carlson, S.E. 2006 ; Salem, N.M. *et al.* 2015). Les AGPI et leurs dérivés sont impliqués dans différents processus physiologiques tels que le neurodéveloppement, la neurogenèse, la régulation synaptique et la réponse inflammatoire. Cependant, lors du vieillissement, processus multifactoriel aboutissant à l'affaiblissement des facultés physiques et/ou psychiques, le cerveau est un organe particulièrement touché. Ainsi le vieillissement cérébral est à l'origine de l'affaiblissement de certaines fonctions cérébrales telles que les fonctions cognitives mais également de l'altération du contenu en lipides des membranes cérébrales. Plusieurs études ont notamment démontré une association entre vieillissement et diminution cérébrale de certains AGPI, tels que le DHA et l'ArA, chez des personnes âgées saines ou atteintes de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Soderberg, M. *et al.* 1991 ; Prasad, M.R. *et al.* 1998 ; Carver, J.D. *et al.* 2001 ; McNamara, R.K. *et al.* 2008). Afin de contrer les effets de ces altérations du contenu lipidique, plusieurs études ont mis en évidence qu'une consommation régulière d'AGPI n-3 permettait entre autres de diminuer le déclin cognitif de personnes âgées saines (Kotani, S. *et al.* 2006 ; Yurko-Mauro, K. *et al.* 2010) et de réduire le risque de développer une démence, en particulier celle de type Alzheimer (Kalmijn, S. *et al.* 1997 ; Barberger-Gateau, P. *et al.* 2007). Ces effets bénéfiques des AGPI n-3 sont médiés par les acides gras eux-mêmes mais également par leurs dérivés oxygénés, tous étant capables de contrer l'inflammation associée à ces maladies neurodégénératives.

Dans ce contexte bibliographique, l'objectif de notre travail a consisté à caractériser les différents métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA présents dans le cerveau par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem. Afin d'obtenir une quantification de ces métabolites libres mais également estérifiés dans les phospholipides, les cerveaux ont été exsanguinés ou non. De plus, l'impact d'une inflammation cérébrale sur le métabolisme oxygéné du DHA et de l'ArA a été étudié. Enfin, ces métabolites oxygénés ont aussi été identifiés dans certaines structures cérébrales impliquées dans des maladies neurodégénératives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I Les acides gras polyinsaturés

Les lipides apportés par l'alimentation couvrent 35 à 40% des besoins énergétiques journaliers pour un homme. Ils se composent essentiellement de triglycérides (ou triacylglycérols, TG) et d'une petite quantité de phospholipides (PL). Les TG sont principalement stockés dans le tissu adipeux et constituent la forme majoritaire de réserves énergétiques. Les PL sont des lipides de structure que l'on retrouve dans quasiment toutes les membranes cellulaires. Les acides gras, constituants majoritaires de ces lipides, présentent plusieurs rôles dans l'organisme. Ils permettent notamment de satisfaire une partie de nos dépenses énergétiques et sont à l'origine de puissants médiateurs lipidiques.

I.1 Présentation des acides gras polyinsaturés

Les acides gras, estérifiés dans les TG et les PL, sont des acides carboxyliques composés d'une chaîne hydrocarbonée hydrophobe comprenant généralement de 8 à 24 carbones. Cette chaîne aliphatique comporte un groupement carboxyle (COOH) (carbone 1) et se termine par un groupement méthyle (CH_3) (carbone n terminal) (Guesnet, P. *et al.* 2005). Ils sont classés en 3 grandes catégories selon le degré d'insaturation de la chaîne carbonée (Figure 1) :

- Les acides gras saturés avec aucune double liaison (ou insaturation)
- Les acides gras monoinsaturés avec une seule double liaison,
- Les acides gras polyinsaturés (AGPI) qui possèdent au moins deux doubles liaisons.

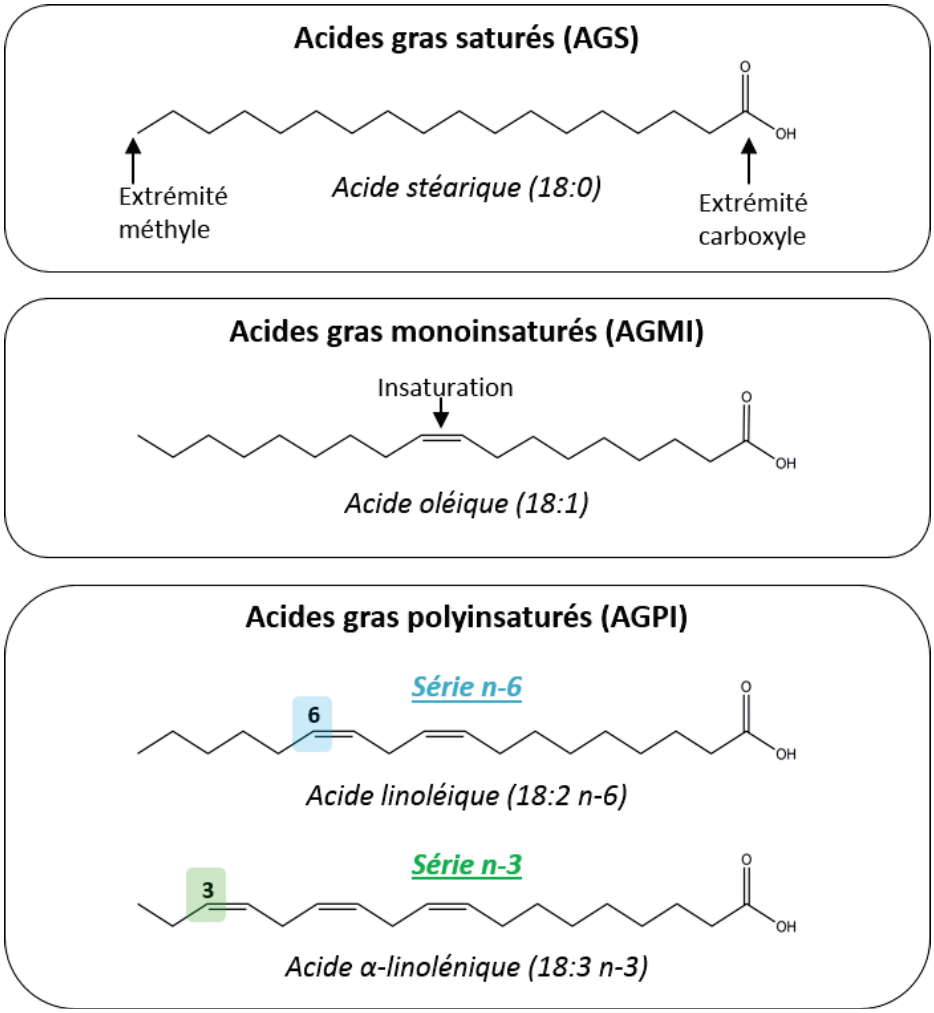


Figure 1. Structure et nomenclature des différentes familles d'acides gras. Adaptée de (Guesnet et al. 2005).

La nomenclature biochimique des AGPI repose sur le nombre d'atomes de carbones et sur le nombre et l'emplacement des doubles liaisons. Par convention, la notation suivante est utilisée : Cx:y n-z où x correspond au nombre d'atomes de carbone, y au nombre de doubles liaisons et z à l'emplacement de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle terminale. Ainsi l'acide linoléique est désigné par C18:2 n-6. Une nomenclature similaire désigne le méthyle terminal par oméga au lieu de n. La nomenclature de l'acide linoléique est alors C18:2 ω6. La configuration des doubles liaisons est majoritairement *cis* pour les acides gras naturels. Elle peut cependant parfois être *trans*, c'est notamment le cas des acides gras partiellement hydrogénés industriellement.

On distingue deux familles ou séries principales d'AGPI en fonction de leur structure : la série n-3 ou oméga-3 et la série n-6 ou oméga-6. Cette distinction est basée sur la position du carbone qui porte la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle terminale : le 3ème carbone pour la famille des AGPI n-3, et le 6ème pour les AGPI n-6.

Tous les AG saturés, monoinsaturés et une partie des polyinsaturés peuvent être synthétisés dans l'organisme des vertébrés, à l'exception des deux précurseurs des familles n-3 et n-6 : les acides α-linolénique (18:3 n-3, ALA) et linoléique (18:2 n-6, LA) qui sont exclusivement d'origine végétale. En effet, les cellules animales ne possèdent pas les enzymes Δ12- et Δ15-désaturases qui permettent d'introduire des doubles liaisons en position n-3 et n-6 de l'acide oléique (18:1 n-9), conduisant respectivement à la synthèse de l'ALA et du LA (Wallis, J.G. *et al.* 2002). Ces AGPI doivent obligatoirement être apportés par l'alimentation. Ils sont donc qualifiés d'acides gras indispensables (ou essentiels). Ces deux AGPI peuvent ensuite être convertis en AGPI à longues chaînes (AGPI-LC) possédant de multiples fonctions dans l'organisme.

I.2 Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longues chaînes

Après leur absorption, les précurseurs des deux principales familles d'AGPI, l'ALA et le LA, sont métabolisés en AGPI-LC (> 18 carbones) (Figure 2).

Dans le réticulum endoplasmique, l'ALA et le LA subissent une série de désaturations (ajout de doubles liaisons) par les enzymes Δ5- et Δ6-désaturases et d'élongations (ajout d'atomes de carbone) par les élongases (Nakamura, M.T. and Nara, T.Y. 2004 ; Guillou, H. *et al.* 2010). L'élongation à partir de l'extrémité carboxyle permet de conserver la conformation initiale n-6 ou n-3 de leurs précurseurs. Ces étapes enzymatiques permettent la synthèse des différents AGPI et notamment des acides arachidonique (20:4 n-6, ArA) et eicosapentaénoïque (20:5 n-3 ; EPA) à partir du LA et de l'ALA, respectivement. Dans ce compartiment, ces voies aboutissent au final à la synthèse de deux AGPI à 24 carbones :

l'acide tétracosapentaénoïque (24:5 n-6, TPA n-6) pour la série n-6 et l'acide tétracosahexaénoïque (24:6 n-3, THA) pour la série n-3. La synthèse finale des acides docosapentaénoïque (22:5 n-6, DPA n-6) et docosahexaénoïque (22:6 n-3, DHA) nécessite une étape de rétroconversion par β-oxydation respectivement du TPA n-6 et du THA, après leur transfert du réticulum endoplasmique aux peroxysomes (Moore, S.A. *et al.* 1995 ; Sprecher, H. 2000).

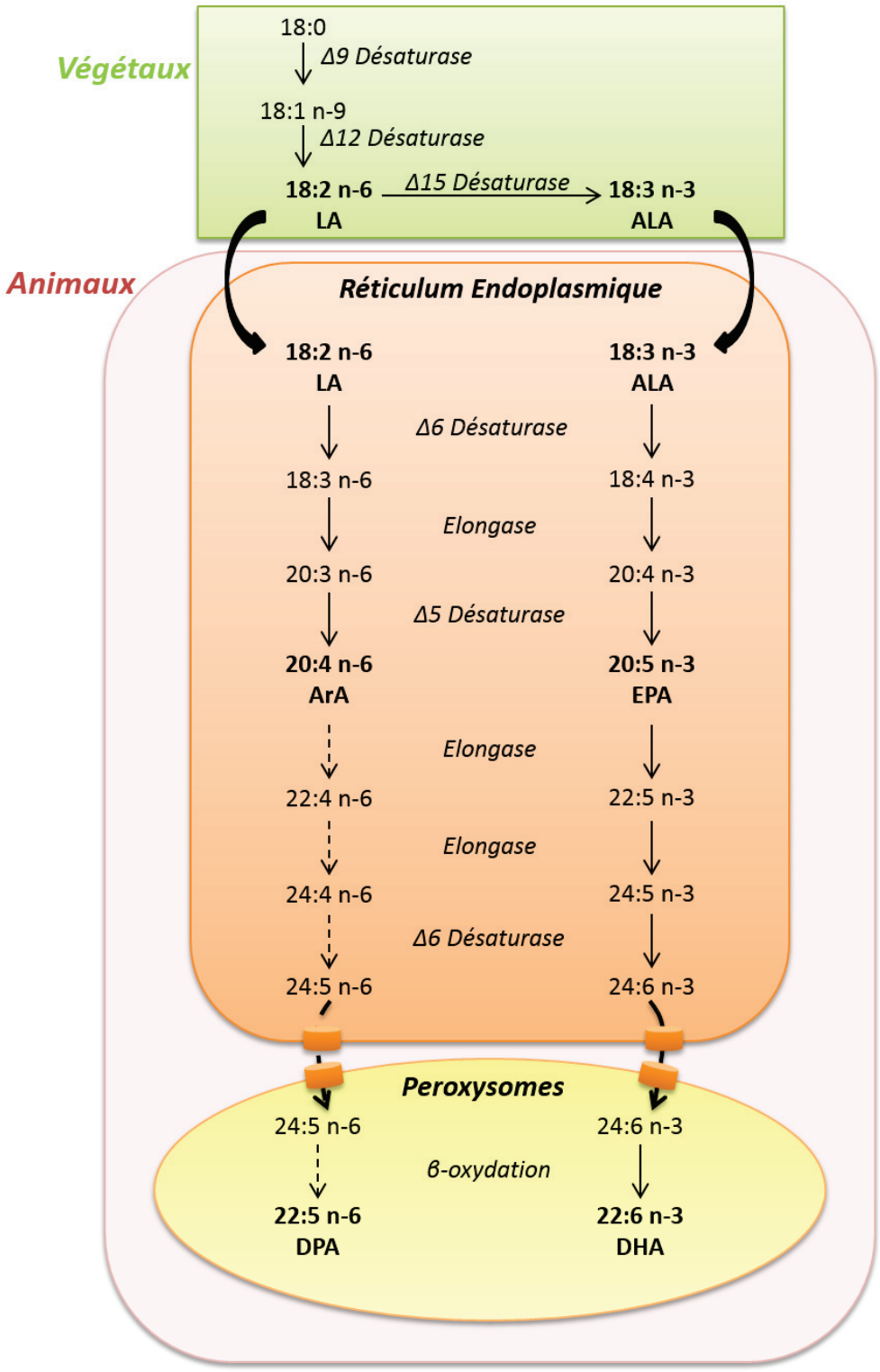


Figure 2. Voies de biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6 et n-3 à longue chaîne à partir des AGPI indispensables. Lors d'un apport alimentaire équilibré, la voie de synthèse de la série n-6 s'arrête à l'ArA. Cependant, en cas de déséquilibre alimentaire, cette voie continue jusqu'à la synthèse du DPA n-6, pour compenser la synthèse déficiente du DHA.

La biosynthèse de ces AGPI est principalement régulée par l'apport alimentaire en AGPI n-6 et n-3. En effet, ces deux voies de synthèse partagent les mêmes enzymes d'élongation et de désaturation créant ainsi une compétition entre ces voies. Un équilibre métabolique doit donc être maintenu entre ces deux familles (Nakamura, M.T. and Nara, T.Y. 2004 ; Blanchard, H. *et al.* 2013). Cette compétition est présente à deux niveaux. D'une part, la Δ6-désaturase, qui a une forte affinité pour les acides gras très insaturés, privilégie la conversion de l'ALA plutôt que celle du LA (Brenner, R.R. and Peluffo, R.O. 1966). D'autre part, l'apport journalier insuffisant d'AGPI de la famille n-3 limite la synthèse de l'EPA et du DHA et favorise de ce fait la voie de synthèse des AGPI n-6 (Figure 3). Cette voie, qui s'arrête normalement à l'ArA lors d'un apport alimentaire équilibrée en AGPI, se poursuit jusqu'à la synthèse du DPA n-6 lors de carence en acides gras n-3 (Kurvinen, J.P. *et al.* 2000 ; Moriguchi, T. *et al.* 2004). Ce DPA n-6 est considéré comme un marqueur d'une carence en AGPI n-3. Du fait de ces mécanismes de compétition, un rapport LA/ALA inférieur à 5 dans l'alimentation est recommandé.

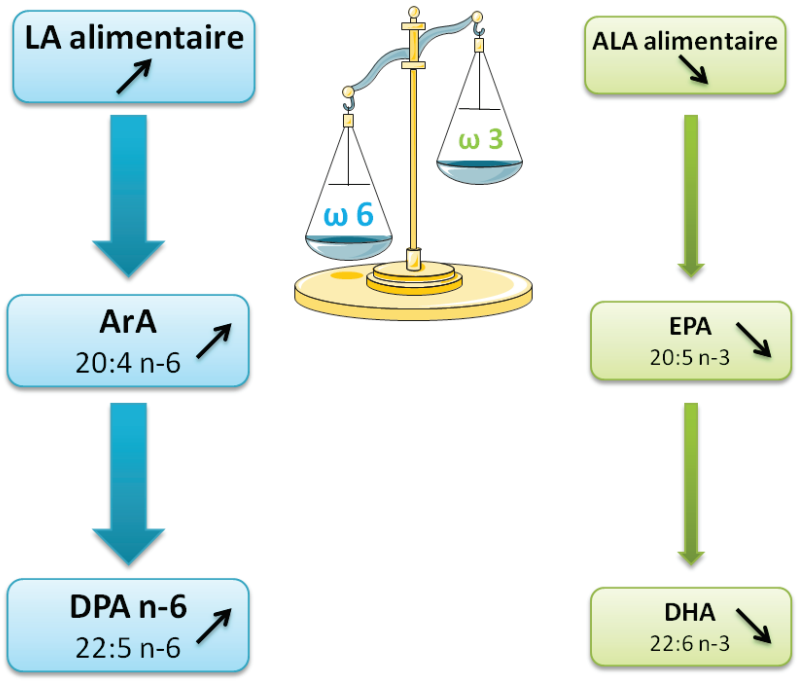


Figure 3. Conséquences d'un apport alimentaire déséquilibré en AGPI n-6/n-3. Adaptée de (Guesnet, P. et al. 2005).

La synthèse de ces AGPI-LC, bien que primordiale sur le plan physiologique, est très faible sur le plan quantitatif comme le montrent des études métaboliques réalisées chez le rat en croissance où seulement 3% du LA est converti en AGPI-LC n-6. Ce taux de conversion est encore plus faible pour la série n-3, ainsi seulement 1,4% de l'ALA est converti en DHA (Cunnane, S.C. and Anderson, M.J. 1997). Chez l'homme adulte, le taux de conversion de l'ALA en DHA est inférieur à 1% (Burdge, G. 2004 ; Plourde, M. and Cunnane, S.C. 2007). Ces différentes études suggèrent que ces précurseurs apportés par l'alimentation sont une source trop limitée pour satisfaire les besoins en ces AGPI (Arterburn, L.M. *et al.* 2006). Des apports alimentaires en DHA préformés sont donc nécessaires pour satisfaire les besoins du système nerveux central durant la période périnatale (Burdge, G. 2004). Cependant, un apport du précurseur des AGPI n-3, l'ALA, reste important durant la période périnatale. En effet, il a été montré que le taux de conversion de l'ALA en DHA était plus élevé chez la femme en âge de procréer, et permettait de mieux répondre aux besoins spécifiques en DHA du fœtus et du nouveau-né (Burdge, G. 2004 ; Alessandri, J.M. *et al.* 2008).

L'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse de ces AGPI-LC est présent dans la plupart des tissus de l'organisme. Cependant, le foie joue un rôle majeur dans la synthèse des AGPI. Quand la nourriture n'arrive pas à satisfaire les besoins en DHA, le foie peut générer du DHA à partir de l'ALA qui est ensuite transféré dans le sang et transporté le plus souvent sous forme d'un complexe avec des protéines (comme l'albumine). Il est ensuite rapidement distribué dans l'organisme, principalement au niveau du cerveau et de la rétine (Scott, B.L. and Bazan, N.G. 1989) (*Cf. §.III.2*).

I.3 Distribution des acides gras polyinsaturés dans l'organisme

Les acides gras synthétisés par l'organisme ou apportés par l'alimentation sont retrouvés dans des proportions différentes dans l'organisme. Ainsi une étude récente de Salem N.M. et ses collaborateurs sur des rats montre que les AGPI représentent 14,1 % des acides gras totaux de l'organisme, 12 % sont des AGPI de la série n-6 et 2,1 % des AGPI de la série n-3. Dans la série n-6, le LA est majoritaire, suivi par l'ArA. Ils représentent respectivement 84,1 % et 12 % des AGPI n-6 totaux (Figure 4). L'alimentation équilibrée de

ces animaux se traduit par le fait que le DPA n-6 est présent en faible quantité (0,77 % des AGPI n-6 totaux). Dans la famille des AGPI n-3, l'ALA est majoritaire (59,3 % des AGPI n-3 totaux). Le DHA représente 31,9 % des AGPI n-3 totaux (Salem, N.M. *et al.* 2015).

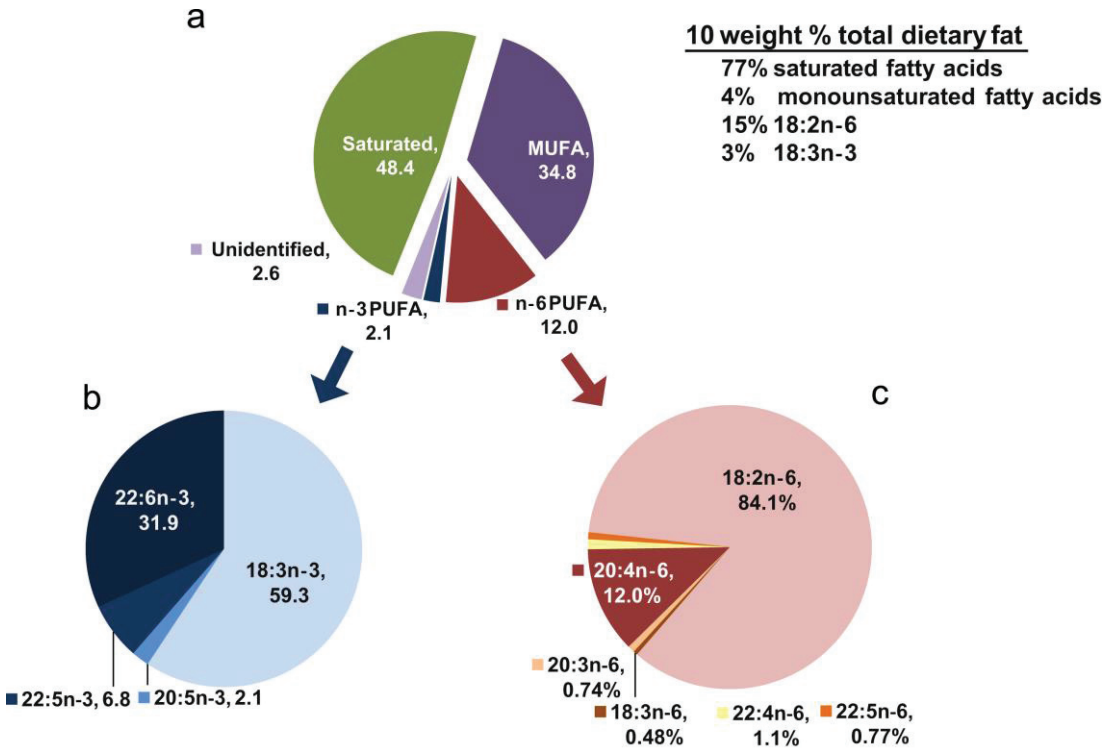


Figure 4. Proportion des différentes espèces d'acides gras dans le corps entier de rat. a) Les différentes catégories d'acides gras ; b) les principaux AGPI de la série n-3, exprimés en % des AGPI n-3 totaux ; c) les principaux AGPI de la série n-6 en %, exprimés des AGPI n-6 totaux (Salem, N.M. *et al.* 2015).

Il existe une grande spécificité de l'accrétion de ces AGPI dans les tissus (Figure 5). En effet, les deux précurseurs LA et ALA, sont principalement retrouvés au niveau du tissu adipeux blanc où ils représentent respectivement 83,5 % et 11,3 % des acides gras totaux et au niveau de la peau avec respectivement 78 % de LA et 8,9 % de LA. La distribution de l'ArA est moins ciblée. En effet, il représente plus de 50 % des acides gras totaux dans plusieurs compartiments tels que les reins, le plasma et le pancréas. Son homologue de la série n-3, l'EPA, est plus abondant dans le pancréas (4,5 % des acides gras totaux). Enfin, le DHA est trouvé en plus grande quantité dans le cerveau et dans la moelle épinière (48,2 % et 36,1 % des acides gras totaux). Chez le rat, la répartition des acides gras présente deux

particularités : le DPA n-6 prédomine dans les testicules (36,7 %), et le LA et l'EPA sont en très faibles quantités dans le cerveau (< 0,1 %) (Salem, N.M. *et al.* 2015).

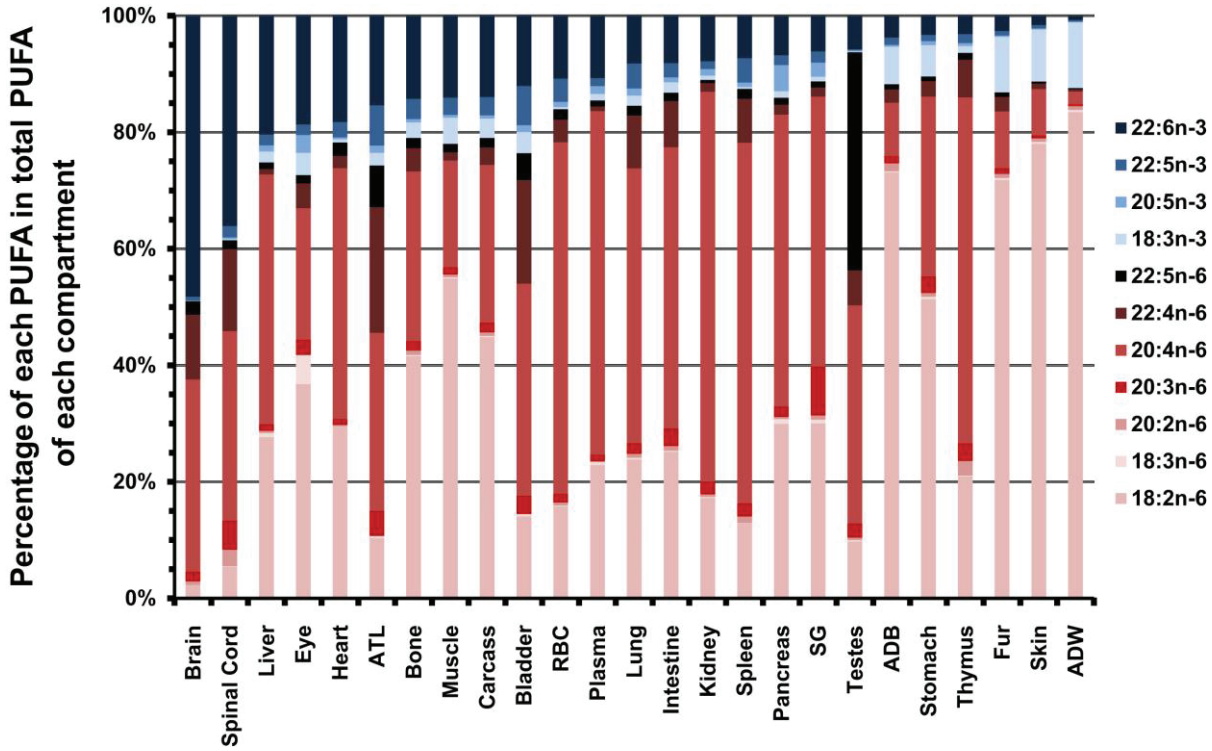


Figure 5. Pourcentage de chaque AGPI (wt%) dans chaque compartiment. AGPI n-3 sont représentés en nuances de bleu, alors que les AGPI n-6 sont en rouge/noir. ATL, glande surrénale, glande thyroïde et ganglions lymphatiques mandibulaires ; RBC, cellules rouges sanguines ; SG, glandes salivaires ; ADB, tissu adipeux brun ; ADW, tissu adipeux blanc (Salem, N.M. *et al.* 2015).

Les AGPI peuvent circuler sous différentes formes dans l'organisme : non estérifiés, liés à l'albumine ou estérifiés dans les PL. Ces derniers sont constitués d'un glycérol estérifié en général en position *sn-1* par un acide gras saturé ou monoinsaturé, en position *sn-2* par un AGPI et en *sn-3* par un phosphate pour former l'acide phosphatidique (PA), qui peut également être estérifié par un groupement polaire. Selon sa nature, on distingue plusieurs classes de PL (Figure 6) :

- **L**es phosphatidylcholines (PC), (choline estérifiée à PA). C'est le PL le plus abondant chez les animaux, où il représente environ 50 % des PL.

- Les phosphatidyléthanolamines (PE), (éthanolamine estérifiée à PA). Deuxième PL le plus abondant chez les animaux, ils représentent environ 20 % des PL du foie et jusqu'à 45 % des PL du cerveau.

- Les phosphatidylsérines (PS), (sérine estérifiée à PA). Les PS représentent moins de 10 % des PL totaux.

- Les phosphatidylinositols (PI), (myoinositol estérifié à PA). Les PI sont peu abondants dans l'organisme à l'exception des tissus cérébraux.

- Les phosphatidylglycérols (PG), (glycérol estérifié à PA).

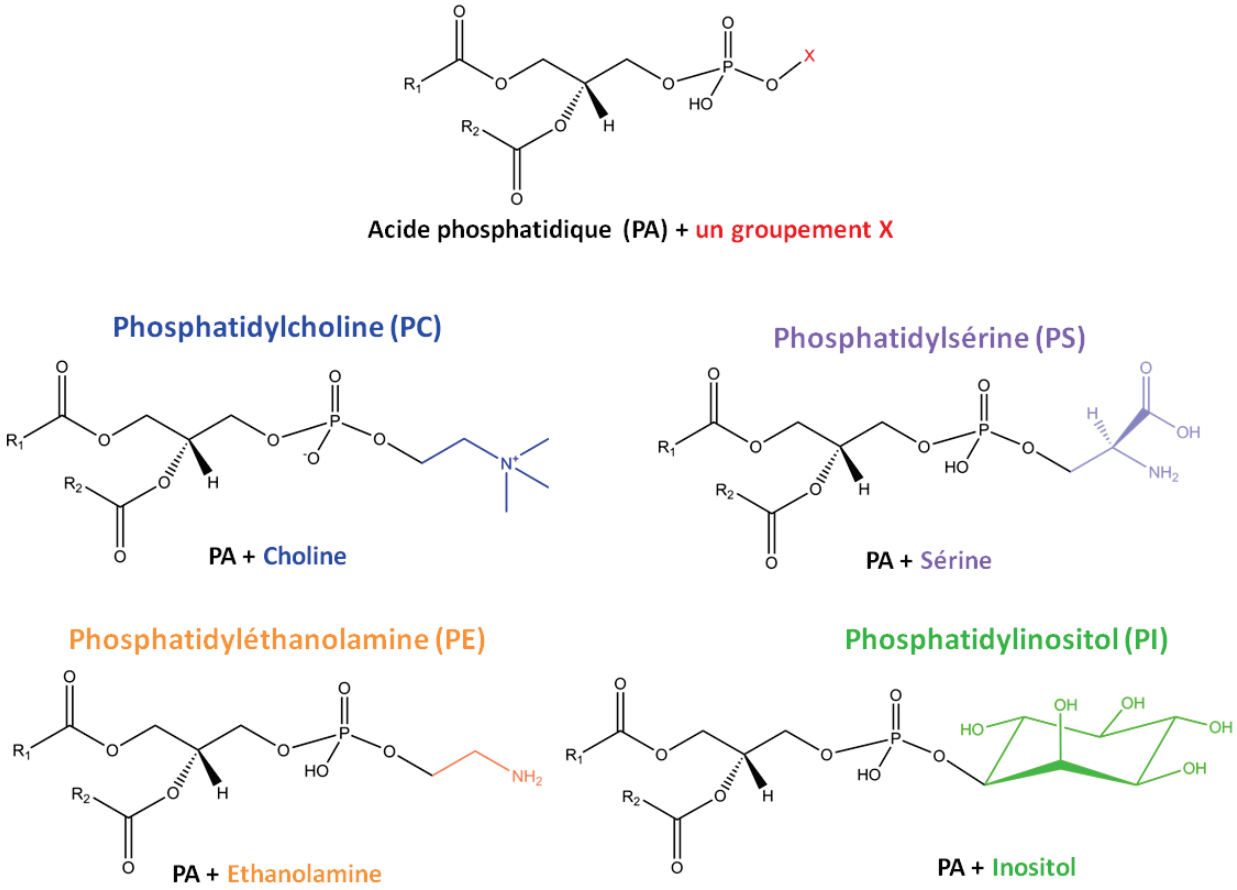


Figure 6. Les principales classes de phospholipides formées par la liaison d'un groupement polaire à l'acide phosphatidique.

Selon le tissu, la répartition et la composition en acide gras de ces différentes classes de PL sont différentes. Les PI et les PE du foie sont composés d'une majorité d'ArA en position *sn-2* associé à de l'acide stéarique (C18:0) en position *sn-1* (Wood, R. and Harlow, R.D. 1969a ; Wood, R. and Harlow, R.D. 1969b). De plus, le DHA est l'AGPI majoritairement estérifié en position *sn-2* des PS et des PE cérébraux (Yabuuchi, H. and O'Brien, J.S. 1968).

Ainsi, les AGPI présentent une véritable spécificité pour certains tissus de l'organisme qu'ils soient sous forme non-estérifiée ou estérifiée dans les PL. Selon leur localisation et leur estérification ou non dans certains PL, ces différents AGPI exercent divers rôles dans des processus physiologiques mais également physiopathologiques.

I.4 Rôles physiologiques des acides gras polyinsaturés

Les AGPI, de par leur diversité et leur localisation dans l'organisme, présentent diverses fonctions physiologiques.

I.4.1 Rôle structural des acides gras polyinsaturés

L'ArA et le DHA, constituants majeurs des PL des membranes cellulaires, peuvent moduler les propriétés physiques (fluidité, dynamique et perméabilité membranaire) et chimiques (influence dans la composition des membranes et implication dans des voies de signalisation) de ces membranes.

L'insertion d'AGPI-LC dans les PL membranaires favorise une plus grande fluidité et perméabilité de la membrane (Stillwell, W. and Wassall, S.R. 2003 ; Pinot, M. *et al.* 2014). En effet, les chaînes polyinsaturées estérifiées dans les PL membranaires peuvent adopter différentes conformations d'énergies équivalentes et ainsi adapter leur conformation à la courbure de la membrane. Grâce à ces propriétés, les AGPI facilitent l'endocytose de vésicule en réduisant l'énergie nécessaire à la flexion de la membrane (Pinot, M. *et al.* 2014).

De plus, du fait de leur structure, l'insertion d'AGPI dans la membrane peut entraîner la ségrégation de domaines membranaires plus ordonnés enrichis en acide gras saturés, glycosphingolipides et cholestérol, appelés radeaux lipidiques. (Shaikh, S.R. *et al.* 2003 ; Wassall, S.R. *et al.* 2004 ; Chapkin, R.S. *et al.* 2008). Ces radeaux lipidiques constituent des domaines stables pour l'ancrage des protéines et des récepteurs impliqués dans la signalisation cellulaire. Ils sont donc assimilés à des plateformes de signalisation favorisant

l'association de molécules de signalisation et les interactions entre les différents types cellulaires (Simons, K. and Toomre, D. 2000 ; Katagiri, Y.U. *et al.* 2001 ; Yaqoob, P. 2009).

Des travaux de Kim, H.Y. et de son équipe illustrent bien un des rôles des AGPI au niveau des membranes. Il a ainsi été montré que l'enrichissement en DHA favorise l'accumulation de PS dans les membranes neuronales. Cette forte concentration de PS dans les membranes facilite la translocation membranaire et l'activation de trois kinases, aboutissant à une inhibition de la caspase 3. Ainsi, le DHA présent dans les PL exerce un effet neuroprotecteur en inhibant une mort inappropriée des neurones (Kim, H.Y. *et al.* 2010).

I.4.2 Précurseurs de métabolites actifs

Une fois libérés des membranes *via* les phospholipases, les AGPI sont les précurseurs de divers métabolites oxygénés actifs tels que les eicosanoïdes et les docosanoïdes, synthétisés respectivement à partir de l'EPA, de l'ARA et du DHA. Deux voies enzymatiques principales catalysent l'oxygénation des AGPI (Figure 7) : celle des lipoxygénases (5,12, et 15-lipoxygénases) et celle des cyclooxygénases (Lagarde, M. *et al.* 2015) (*Cf. §.II*). Ces dérivés régulent diverses fonctions dans l'organisme : la vasoconstriction/vasodilatation, la coagulation sanguine, l'inflammation, la neuroprotection… D'une manière générale, les médiateurs oxygénés générés à partir des AGPI de la série n-6 ont des propriétés opposées à ceux générés à partir des AGPI de la série n-3. Ces différences d'actions sont notamment observables au niveau de l'inflammation, où les dérivés de la série n-6 sont plutôt pro-inflammatoires tandis que ceux issus de la série n-3 sont anti-inflammatoires (Serhan, C.N. *et al.* 2015a).

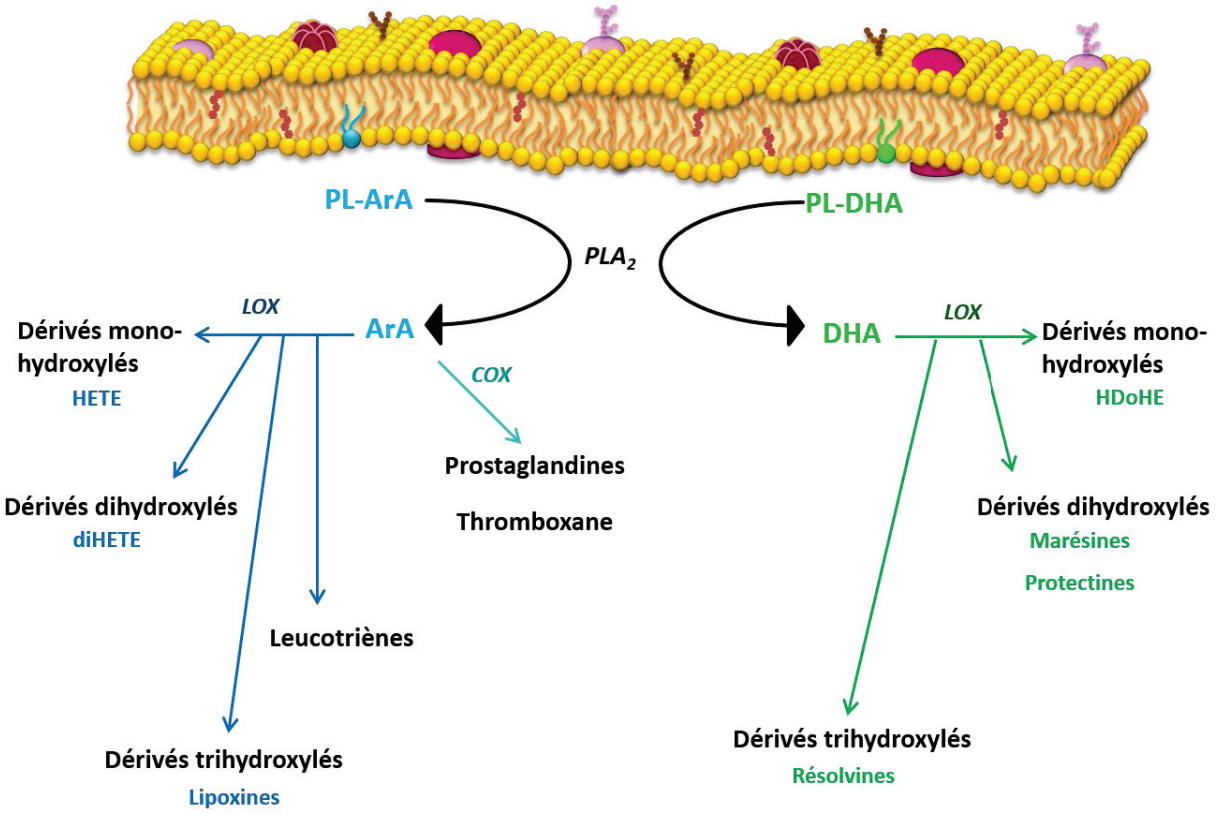


Figure 7. Voies de biosynthèse de certains métabolites oxygénés dérivés de l'ArA (en bleu) et du DHA (en vert).

I.4.3 Médiateurs de l'expression génique

Les acides gras, et notamment les AGPI, et leurs dérivés oxygénés (prostacyclines, 15-dPGJ$_2$ par exemple) peuvent influencer l'expression de certains gènes par l'intermédiaire de multiples facteurs de transcription au niveau du foie et du tissu adipeux principalement. Ils régulent notamment l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique. Plusieurs facteurs de transcription sont sensibles à l'action des AGPI : les « Peroxysome Proliferator-Activated Receptors » (PPAR), les « Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 » (SREBP-1), les « Retinoid X Receptor » (RXRα) ou encore les « Liver X Receptor » (LXRα) (Guesnet, P. *et al.* 2005). Les AGPI contrôlent aussi certaines voies métaboliques en modulant l'activité de liaison à l'ADN et l'abondance nucléaire de facteurs de transcription soit directement par liaisons avec ces facteurs de transcription (PPAR, RXRα, LXRα), soit indirectement en inhibant la transcription du

récepteur lui-même ou sa fixation au gène d'intérêt (SREBP-1) (Sampath, H. and Ntambi, J.M. 2004) (Figure 8).

Les AGPIs exercent leurs effets bénéfiques en activant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras. En effet, les AGPI peuvent activer directement PPARα ce qui entraîne son association avec le récepteur aux rétinoïdes (RXR). Ce complexe peut alors se fixer sur l'ADN sur une séquence spécifique (PPRE) du promoteur des gènes d'oxydation des acides gras, entraînant une augmentation de la β-oxydation mitochondriale et peroxysomale. De plus, les AGPI réduisent l'activité lipogénique du tissu hépatique en réprimant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse lipidique. Pour cela, deux voies sont possibles. Les AGPI ont la capacité d'inhiber la libération protéolytique de SREBP-1c mature du réticulum endoplasmique. Ce phénomène limite l'abondance nucléaire de SREBP-1 c et sa liaison aux gènes lipogéniques. D'autre part, les AGPI peuvent également inhiber la liaison de l'hétérodimère LXRα/RXR à la séquence spécifique LXRE et diminuer l'expression des gènes lipogéniques cibles. Ainsi, l'inhibition de ces deux voies par les AGPI réduit la synthèse d'acides gras et de triglycérides dans la cellule hépatique (Clarke, S.D. 2001 ; Sampath, H. and Ntambi, J.M. 2004 ; Guesnet, P. *et al.* 2005). De plus, au niveau hépatique, cette inactivation de SREBP-1 c inhibe notamment plusieurs enzymes contrôlant la lipogenèse *de novo* des acides gras (acétylCoA synthase, acide gras synthase…), la bioconversion des AGPI (Δ9-, Δ6- et Δ5-désaturases et élongases), mais également la transcription de lipoprotéine lipase des lipoprotéines VLDL (Guesnet, P. *et al.* 2005).

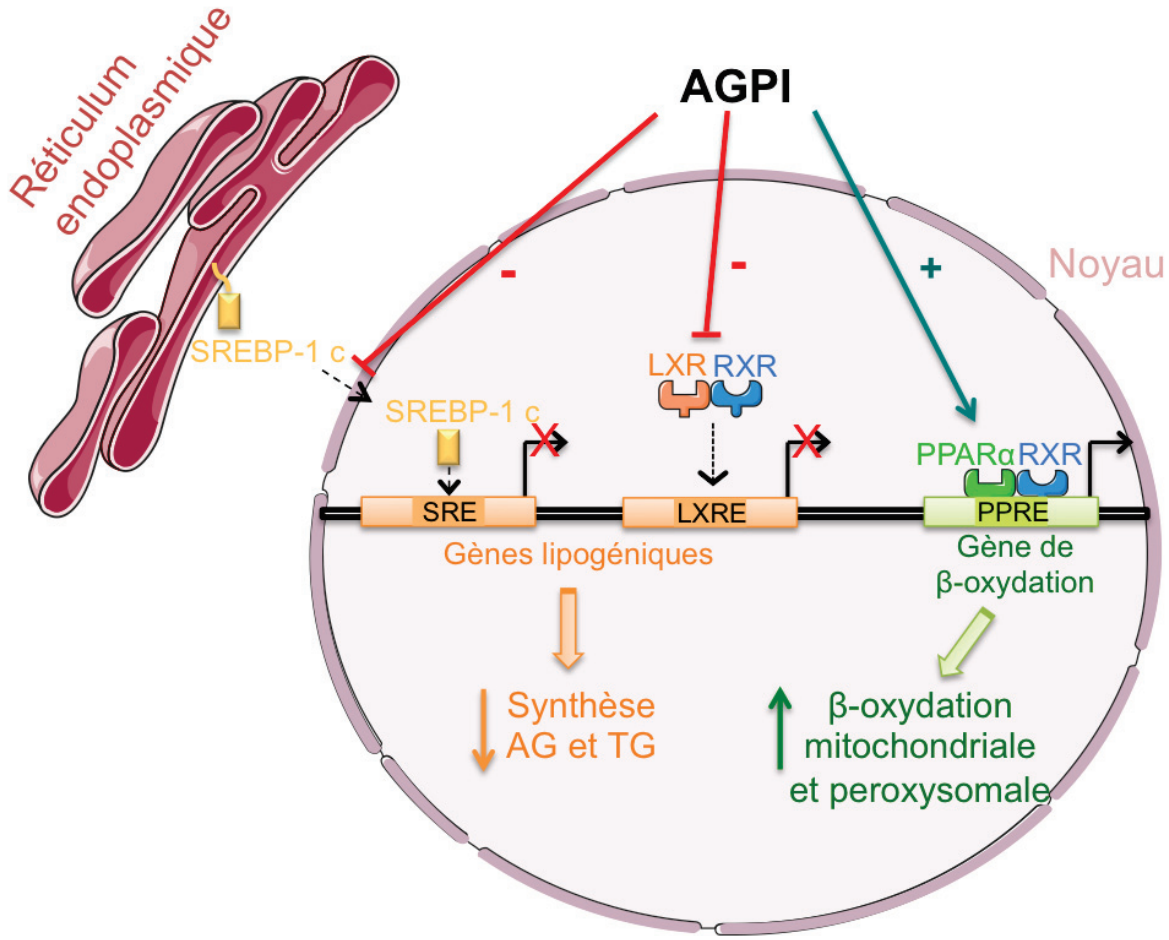


Figure 8. Mécanisme nucléaire de régulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique par les AGPI. Adaptée de (Clarke, S. D. 2001 ; Sampath, H. & Ntambi, J. M. 2004).

Compte tenu des rôles physiologiques majeurs exercés par les AGPI n-3 et n-6, de nombreuses études ont montré qu'un déséquilibre d'apport alimentaire de ces AGPI pouvait favoriser l'incidence de nombreuses maladies. Des AGPI n-6 présents en excès sont connus pour avoir des effets délétères sur l'organisme, tels que l'induction de l'inflammation. Au contraire, les AGPI n-3 ont tendance à avoir un effet plutôt bénéfique pour l'organisme, notamment sur les maladies cardiovasculaires (Leaf, A. *et al.* 2003).

Différents rôles physiologiques et pathologiques sont donc exercés par les AGPI dans l'organisme mais également par les nombreux métabolites oxygénés dérivés de ces AGPI *(Cf. §.II).*

II Métabolisme oxygéné des acides gras polyinsaturés n-3 et n-6

Plusieurs voies de signalisation sont activées par l'action de métabolites oxygénés dérivés des AGPI. Deux grandes étapes sont nécessaires à la synthèse de ces molécules : la libération des AGPI précurseurs des PL et leur transformation par différentes enzymes en dérivés oxygénés.

II.1 Principales enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés

Après leur libération des PL membranaires par des phospholipases, les AGPI, et plus particulièrement le DHA et l'ArA, peuvent être métabolisés par différentes voies :

- La voie des lipoxygénases (LOX) impliquée dans la synthèse de dérivés bioactifs tels que les protectines, marésines et résolvines à partir du DHA et les leucotriènes à partir de l'ArA ;
- La voie des cyclooxygénases (COX) qui conduit à la formation des prostanoïdes (prostaglandines et thromboxanes) ;
- D'autres voies mineures impliquant notamment les époxygénases et les cytochromes P_{450} ω-oxygénases.

II.1.1 Les phospholipases

Afin d'être métabolisés par les LOX et les COX, les AGPI doivent dans un premier temps être libérés des PL par l'activation de phospholipases (PLA) spécifiques.

Il existe quatre familles de phospholipases classées selon leur site de clivage sur les PL, appelées phospholipase A, B, C ou D. Chaque phospholipase possède une spécificité de

substrat selon le type de lipides (PL, TG…), la classe de PL (PC, PE, PI, PS…) et le type d'AGPI estérifiés dans les PL (ArA, DHA …). Ainsi deux familles de phospholipases sont impliquées dans la libération d'AGPI à partir des PL (Figure 9). La première famille rassemble les phospholipases A_2 (PLA_2) qui clivent directement en position *sn-2* la liaison ester pour donner un AGPI libre et un lysophospholipide (Dennis, E.A. *et al.* 2011). L'ArA est préférentiellement libéré des PL par la $cPLA_2$ (PLA_2 cytosolique de grande taille dépendante du calcium) (Kudo, I. and Murakami, M. 2002) alors que le DHA est principalement hydrolysé par l'$iPLA_2$ (PLA_2 indépendante du calcium) (Strokin, M. *et al.* 2003). Les AGPI peuvent aussi être hydrolysés par des phospholipases C (PLC) en association avec les diglycérides et monoglycérides lipases. Les PLC sont spécifiques des phosphoinositides. Elles catalysent notamment l'hydrolyse des phosphatidylinositols pour générer un diacylglycérol et un inositol phosphorylé. La diglycéride lipase catalyse ensuite la perte d'un acide gras pour former un monoacylglycérol qui est ensuite hydrolysé par la monoglycéride lipase en glycérol et acide gras (Authi, K.S. *et al.* 1985).

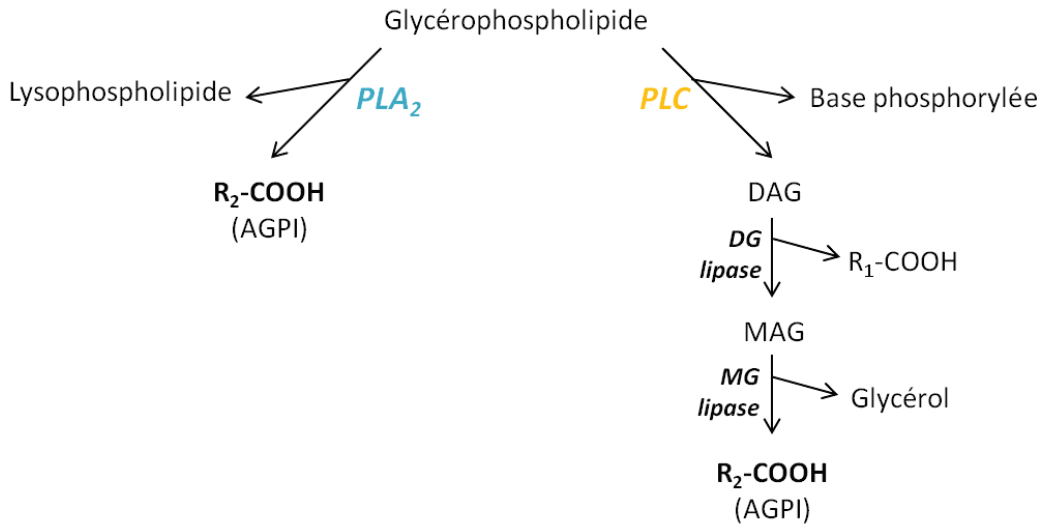


Figure 9. Principales voies d'hydrolyse des phospholipides permettant la libération d'AGPI.

II.1.2 Les lipoxygénases

Les AGPI libres peuvent alors être des substrats pour les lipoxygénases (LOX).

Ces enzymes qui contiennent du fer non-héminique catalysent la dioxygénation des AGPI contenant au moins deux doubles liaisons *cis* formant un motif 1,4-cis-cis-pentadiène (Ivanov, I. *et al.* 2010 ; Kuhn, H. *et al.* 2015b). Cette oxygénation par les LOX s'effectue en quatre réactions successives pour former un hydroperoxyde d'acide gras (Ivanov, I. *et al.* 2010) (Figure 10) :

- La réaction démarre par une abstraction stéréosélective d'un atome d'hydrogène d'un groupe méthylène bis allylique appartenant à une structure 1,4-cis-cis-pentadiène. Le fer, sous forme ferrique (Fe^{3+}), du site actif de la LOX est alors réduit sous forme ferreux (Fe^{2+}). La stéréospécificité (R ou S) de l'abstraction de l'hydrogène dépend du type de LOX impliqué, les LOX animales ont par exemple une stéréospécificité S. Un radical alkyle est ainsi formé.

- Un réarrangement du radical s'opère. L'électron radical est ensuite délocalisé sur la chaîne soit en direction de l'extrémité méthyle soit en direction de l'extrémité carboxylique.

- Après réarrangement, une molécule d'oxygène s'insère au niveau du radical alkyle libre pour former un radical hydroperoxyle qui présente alors un diène conjugué *cis-trans* sur sa chaîne absorbant à une longueur d'onde maximum de 235 nm.

- Ce radical est dans un premier temps réduit par un électron du fer ferreux en anion qui est ensuite protoné pour former un hydroperoxyde. L'oxydation du fer ferreux en fer ferrique permet de régénérer l'enzyme sous sa forme active.

L'hydroperoxyde est ensuite réduit par la glutathion peroxydase, en présence de ses deux cofacteurs (sélénium et glutathion) en acide gras monohydroxylé.

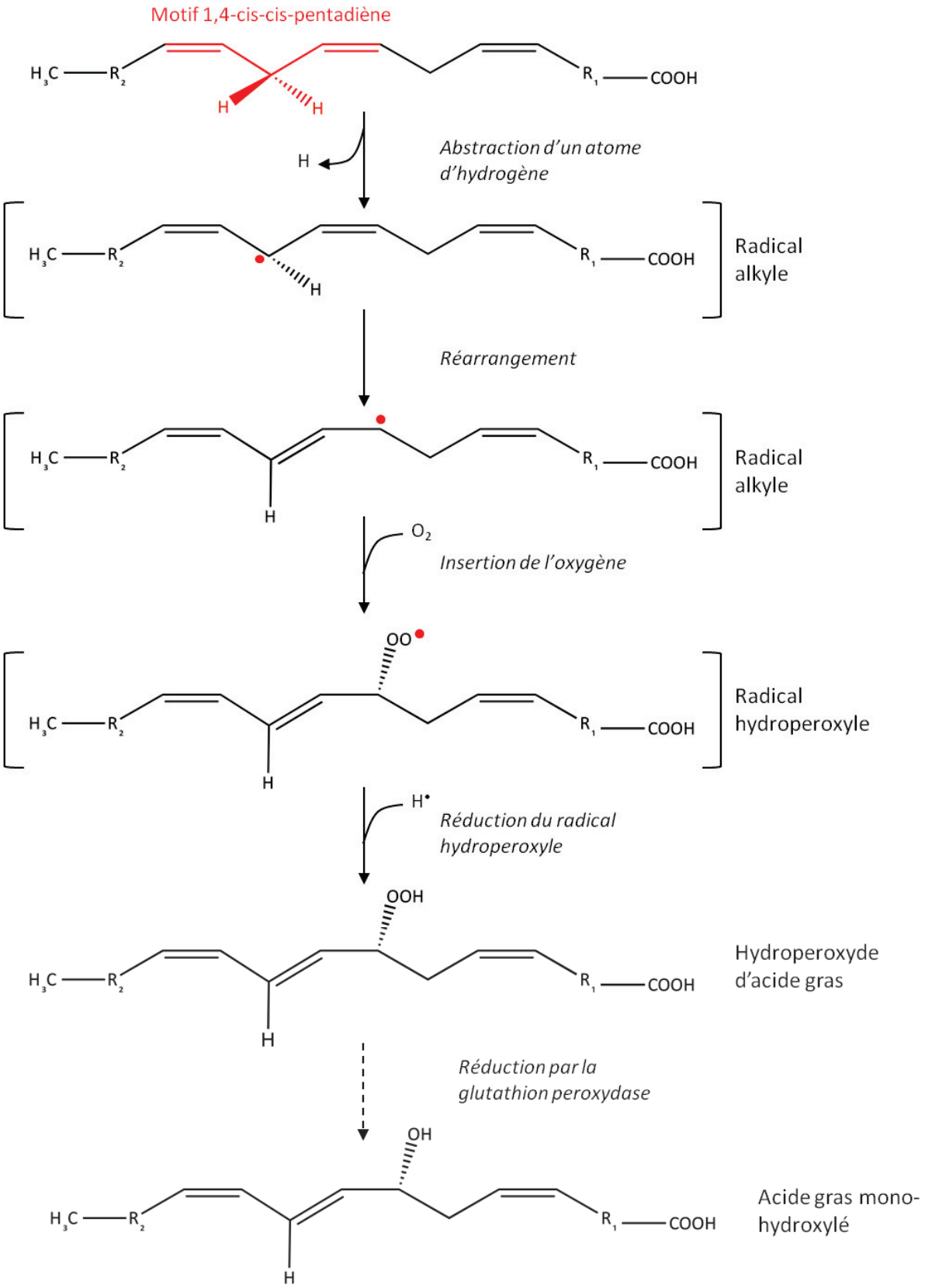


Figure 10. Mécanisme d'oxygénation des acides gras polyinsaturés par les lipoxygénases.

Les LOX possèdent différentes fonctions biologiques. Elles sont impliquées dans la synthèse de plusieurs médiateurs lipidiques bioactifs tels que les leucotriènes (Samuelsson, B. 1981), les lipoxines (Serhan, C.N. *et al.* 1984), les résolvines (Hong, S. *et al.* 2003) et les protectines (Serhan, C.N. *et al.* 2006). Les LOX sont capables de modifier les complexes lipides-protéines dans les membranes en convertissant les acides gras estérifiés dans les PL en métabolites oxygénés actifs (Hammond, V.J. and O'Donnell, V.B. 2012) (*Cf. §II.4)*. La présence de tels lipides oxydés polaires dans la membrane lipidique peut changer ses propriétés physico-chimiques et créer par exemple des pores hydrophiles dans la membrane (Kuhn, H. *et al.* 2015b). De plus, en générant des composés pro-oxydatifs tels que les hydroperoxydes, les LOX sont impliquées dans le déséquilibre de l'homéostasie redox intracellulaire.

Six gènes LOX fonctionnels sont présents dans le génome humain : ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5, qui codent pour six isoformes différentes (Funk, C.D. *et al.* 2002) (Tableau 1). Trois LOX agissent principalement sur les AGPI : 15-LOX, 12-LOX et 5-LOX (Yamamoto, S. 1992).

La nomenclature conventionnelle classe les LOX animales en fonction du site de fixation de l'oxygène sur l'ArA (par exemple la 5-LOX permet l'addition de l'oxygène sur le carbone 5 de l'ArA). Cette nomenclature peut cependant être discutable car elle est spécifique des positions d'oxygénation sur l'ArA et n'est pas adaptée aux autres AGPI (la 15-LOX oxygène par exemple le DHA sur son 17ème carbone).

La famille des 15-LOX regroupe 2 isoformes : la 15-LOX1 et la 15-LOX2. La 15-LOX1, qui est codée par le gène ALOX15, est principalement exprimée dans les éosinophiles, dans les réticulocytes (Sigal, E. *et al.* 1988) et dans les cellules de l'épithélium broncho-alvéolaire (Sigal, E. *et al.* 1992). La 15-LOX2, enzyme codée par le gène ALOX15B, est hautement exprimée dans les cellules épithéliales (Brash, A.R. *et al.* 1997). Ces 15-LOX sont impliquées dans plusieurs processus biologiques tels que la régulation de la pression sanguine et de l'hypertension (Nasjletti, A. 1998 ; Chawengsub, Y. *et al.* 2009) et dans la régulation de la carcinogenèse (Kelavkar, U. *et al.* 2002).

Deux isoformes des 12-LOX sont présentes chez l'Homme. La 12-LOX plaquettaire, qui est codée par le gène ALOX12, n'est pas seulement présente dans les plaquettes (Funk, C.D. *et al.* 1990) comme son nom l'indique mais également dans la peau (Virmani, J. *et al.* 2001). Cette isoenzyme est notamment impliquée dans la régulation du cancer de la prostate (Nie, D. *et al.* 1998) et dans l'athérothrombose (Katoh, A. *et al.* 1998). La deuxième 12-LOX présente chez l'homme est la seule LOX ayant une stéréospécificité R, d'où son nom de 12(R)-LOX. Elle est codée par le gène ALOX12B et est retrouvée dans l'épiderme (Boeglin, W.E. *et al.* 1998). Elle est faiblement représentée chez l'Homme mais très active dans certaines pathologies de la peau comme le psoriasis (Baer, A.N. *et al.* 1995 ; Boeglin, W.E. *et al.* 1998). D'autres isoformes de 12-LOX existent chez les rongeurs : une 12-LOX leucocytaire qui présente des propriétés enzymatiques similaires à celles de la 15-LOX1 et la 12-LOX de l'épiderme qui joue un rôle dans la protection de la peau des rongeurs (Yoshimoto, T. and Takahashi, Y. 2002).

Enfin, la 5-LOX est la dernière LOX agissant sur les AGPI. Cette enzyme, codée par le gène ALOX5, est majoritairement retrouvée dans les leucocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Radmark, O. and Samuelsson, B. 2010). La 5-LOX nécessite plusieurs facteurs pour être active, dont la protéine qui active la 5-LOX (5-lipoxygenase-activating protein ou FLAP) *via* un mécanisme qui est encore sujet à discussion. La FLAP activerait la 5-LOX en liant spécifiquement l'ArA pour faciliter son transfert au niveau de l'enzyme (Mancini, J.A. *et al.* 1993 ; Radmark, O. and Samuelsson, B. 2010). La 5-LOX est associée à plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose (Zhao, L. and Funk, C.D. 2004) et la maladie d'Alzheimer (Manev, H. *et al.* 2011).

Tableau 1. Les principales isoformes de lipoxygénases présentes chez l'Homme. Adapté de (Kuhn, H. *et al.* 2015b).

Gène	Protéine	Expression majeure	Références
ALOX15	15(S)-LOX1	Eosinophiles, réticulocytes, cellules épithéliales broncho-alvéolaire	(Sigal, E. *et al.* 1988 ; Sigal, E. *et al.* 1992)
ALOX15B	15(S)-LOX2	Cellules épithéliales	(Brash, A.R. *et al.* 1997)
ALOX12	12(S)-LOX plaquettaire	Plaquettes, peau	(Funk, C.D. *et al.* 1990 ; Virmani, J. *et al.* 2001)
ALOX12B	12(R)-LOX	Epiderme	(Boeglin, W.E. *et al.* 1998)
ALOX5	5(S)-LOX	Leucocytes, macrophages, cellules dendritiques	(Radmark, O. and Samuelsson, B. 2010)

II.1.3 Les cyclooxygénases

Une autre grande voie d'oxygénation des AGPI est celle des cyclooxygénases.

Les cyclooxygénases (COX) sont des enzymes bi-fonctionnelles contenant un hème comprenant deux centres catalytiques (Figure 11). Un premier centre possède une activité cyclooxygénase. Il ajoute deux molécules d'oxygène sur l'ArA pour former un endoperoxyde appelé prostaglandine G_2 (PGG_2). Le deuxième centre actif a une activité peroxydase pour réduire la PGG_2 en PGH_2. L'activité cyclooxygénase a besoin d'être activée, phénomène dépendant de l'activité peroxydase. En effet, l'hème contenu dans le site peroxydase permet d'activer la tyrosine 385 pour la COX-1 ou la tyrosine 671 pour la COX-2 afin de produire un radical tyrosyle (1). Ce radical est alors parfaitement positionné pour capturer l'hydrogène pro-(S) porté par le carbone 13 de l'ArA et former un radical arachidonyle (2). Ce dernier réagit ensuite avec deux molécules d'oxygène pour produire la PGG_2 (3). Cette dernière diffuse vers le site peroxydase (4) et est réduite en PGH_2 (5). L'étape finale est la régénération du radical tyrosyle dans chaque site catalytique. Ainsi, il n'est pas nécessaire que l'étape d'activation de l'enzyme se répète à chaque tour (Chandrasekharan, N.V. and Simmons, D.L. 2004 ; Rouzer, C.A. and Marnett, L.J. 2009).

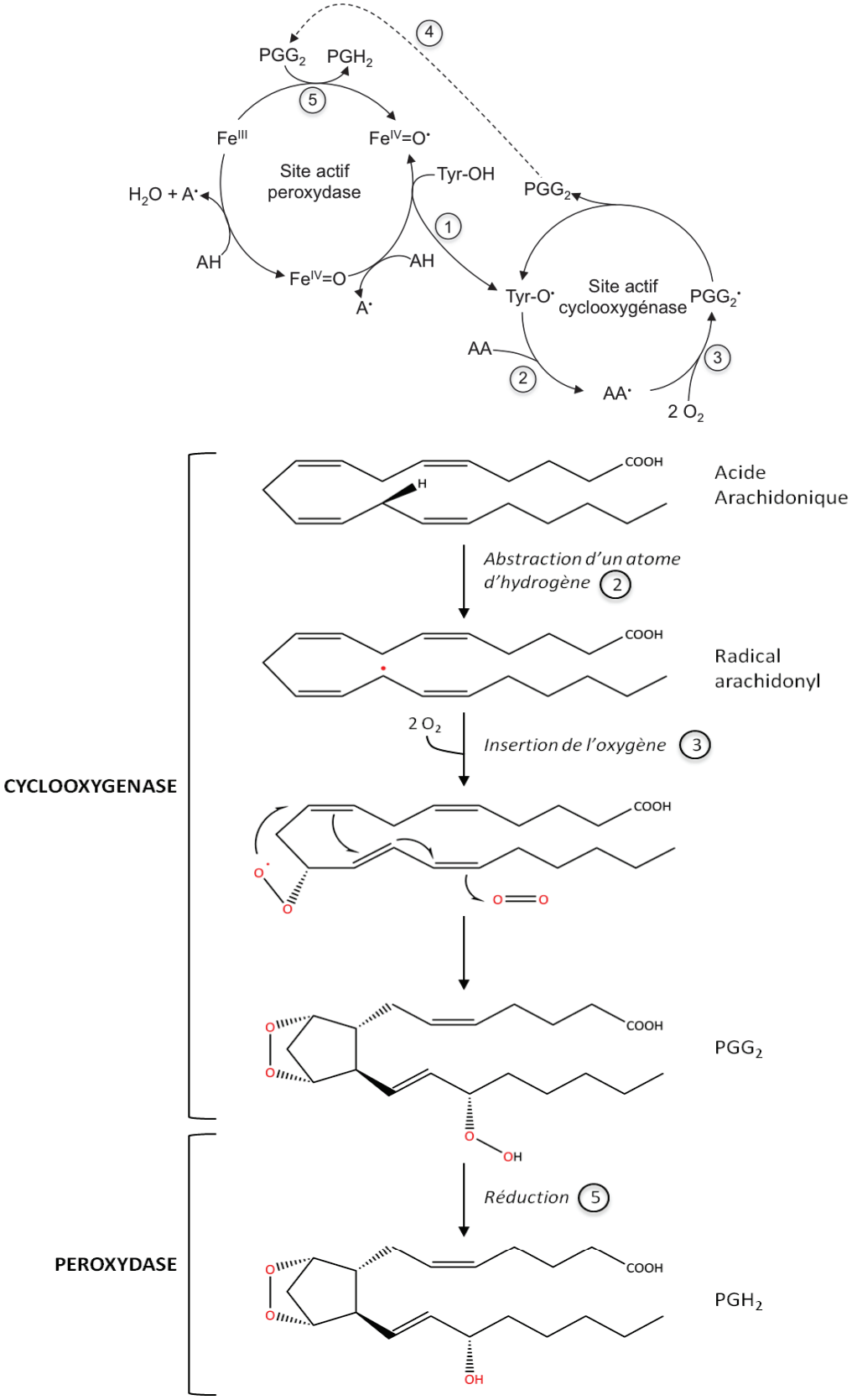


Figure 11. Mécanisme d'oxygénation des acides gras polyinsaturés qui implique deux sites catalytiques distincts des cyclooxygénases. Adaptée de (Smith, W.L. and Song, I. 2002 ; Chandrasekharan, N.V. and Simmons, D.L. 2004 ; Rouzer, C.A. and Marnett, L.J. 2009).

Trois isoformes de COX ont été trouvées dans les tissus de mammifères : COX-1, COX-2 et COX-3.

La COX-1 est ubiquitaire et constitutive. Elle est exprimée dans la plupart des cellules et tissus de mammifères. Son expression est relativement uniforme dans l'organisme, sauf dans les vaisseaux sanguins, les cellules du muscle lisse et les plaquettes où son niveau d'expression est plus important. Du fait de cette expression dans la plupart des tissus, la COX-1 permet de synthétiser des prostaglandines (PG) qui sont nécessaires au maintien de l'homéostasie (Chandrasekharan, N.V. and Simmons, D.L. 2004 ; Rouzer, C.A. and Marnett, L.J. 2009).

Contrairement à la COX-1, la COX-2 est inductible et sa synthèse est déclenchée par de nombreux stimuli inflammatoires et proliférateurs tels que les cytokines et les facteurs de croissance. Elle est généralement présente dans les tissus de mammifères à des niveaux très bas, ce qui la rend souvent indétectable dans les tissus sains. Elle joue un rôle important dans les processus physiopathologiques comme l'inflammation (Chandrasekharan, N.V. and Simmons, D.L. 2004 ; Rouzer, C.A. and Marnett, L.J. 2009). Cependant, la COX-2 est également constitutivement exprimée dans les reins, l'estomac et le cerveau (Hoffmann, C. 2000a).

Ces deux isoformes présentent une grande homologie de structure, 60% de leur ADN et des acides aminés sont identiques, en particulier au niveau de leurs régions catalytiques. Les conformations des sites catalytiques et de liaison du substrat sont similaires mais pas identiques, quelques acides aminés diffèrent entre ces deux enzymes (Kurumbail, R.G. *et al.* 1996). Ainsi, cette différence dans les séquences d'acides aminés est à l'origine d'un plus grand et plus flexible site actif pour la COX-2 que pour la COX-1. Cette différence de taille est utilisée lors du développement d'inhibiteurs spécifiques des COX-2 (les anti-inflammatoires non-stéroïdiens). De plus, une légère différence est également observée au niveau des propriétés cinétiques de ces deux enzymes. A faibles concentrations d'ArA, la COX-1 présente une allostérie négative qui favorise dans ces conditions une plus grande production de prostanoïdes par la COX-2 (Smith, W.L. *et al.* 2000).

La COX-1 et la COX-2 agissent principalement sur l'ArA pour former des dérivés oxygénés appelés prostanoïdes, mais elles peuvent également métaboliser d'autres AGPI comme l'ALA et l'EPA et également le DHA en présence d'aspirine (Smith, W.L. and Song, I. 2002 ; Serhan, C.N. *et al.* 2004).

Enfin, une COX-3 constitutive a été trouvée au niveau du cerveau. Il s'agit d'un variant d'épissage de la COX-1. En effet, la COX-3 est un produit du gène de la COX-1, avec la différence que la COX-3 conserve un intron dans son ARNm, ce qui n'est pas le cas pour la COX-1 (Chandrasekharan, N.V. *et al.* 2002). La COX-3 semble être impliquée dans les processus inflammatoires car elle peut être inhibée par des médicaments analgésiques/antipyrétiques tels que l'acétaminophène. Cependant, ce rôle reste encore discuté car pour le moment seule la COX-3 canine semble posséder une activité cyclooxygénase (Chandrasekharan, N.V. *et al.* 2002).

II.1.4 Autres oxygénases agissant sur les acides gras polyinsaturés

D'autres voies métaboliques d'oxygénation ont également été décrites pour les AGPI, et notamment celles impliquant les cytochromes P_{450} (CYP450) monooxygénases. Ces protéines ubiquitaires sont largement distribuées dans les tissus animaux et exprimées dans tous les types cellulaires des mammifères (Capdevila, J.H. *et al.* 2000).

Les CYP450 microsomales appartiennent à la famille des hémoprotéines liées à la membrane. Ces enzymes catalysent l'activation d'une molécule d'oxygène. L'atome d'oxygène ainsi activé peut alors s'insérer sur un carbone accepteur de l'acide gras. Ces CYP450 sont des monooxygénases du fait que le clivage enzymatique de l'oxygène moléculaire est suivi par l'insertion d'un seul atome d'oxygène sur l'acide gras, alors que l'autre oxygène est relâché sous forme d'eau. Les CYP450 métabolisent certains AGPI en divers métabolites *via* des réactions d'hydroxylation, d'époxydation ou d'oxydation allylique (réaction similaire à celle catalysée par les LOX) (Capdevila, J.H. *et al.* 2000).

Ainsi ces différentes enzymes sont capables de convertir rapidement certains AGPI en médiateurs lipidiques très puissants. Parmi ces dérivés, des eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines) sont synthétisés à partir d'AGPI à 20 carbones (EPA ou ArA) et des docosanoïdes (protectines, marésines et résolvines) résultent du métabolisme des AGPI à 22 carbones (DHA) (Rao, G.H. *et al.* 1983 ; Lagarde, M. *et al.* 2015).

II.2 Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique

L'ArA est l'AGPI majeur des tissus périphériques chez les mammifères (*Cf. §.I.3)*. Sa conversion en métabolites oxygénés impacte fortement les fonctions cellulaires.

Après sa libération des PL membranaires par la $cPLA_2$ (Kudo, I. and Murakami, M. 2002), l'ArA peut être oxygéné par différentes oxygénases selon l'équipement enzymatique du tissu.

Du fait du très grand nombre de dérivés oxygénés de l'ArA, seuls les métabolites d'importance physiologique seront abordés dans la suite de cette introduction.

II.2.1 Les acides gras monohydroxylés dérivés de l'acide arachidonique

Les trois principales isoformes de LOX présentes chez l'homme, la 5-LOX, la 12-LOX et la 15-LOX, convertissent l'ArA respectivement en dérivés hydroperoxydes appelés acide 5(S)-hydroperoxyeicosatétraénoïque (5(S)-HpETE), 12(S)-HpETE et 15(S)-HpETE (*Cf. §.II.1.2*). Ces intermédiaires hydroperoxydes peuvent également être formés de manière non enzymatique par la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes sont ensuite réduits par la glutathion peroxydase 1 (GPx-1) en leurs acides gras hydroxylés correspondants : acide 5(S)-hydroxyeicosatétraénoïque (5(S)-HETE), 12(S)-HETE et 15(S)-HETE (Yamamoto, S. 1992) (Figure 12).

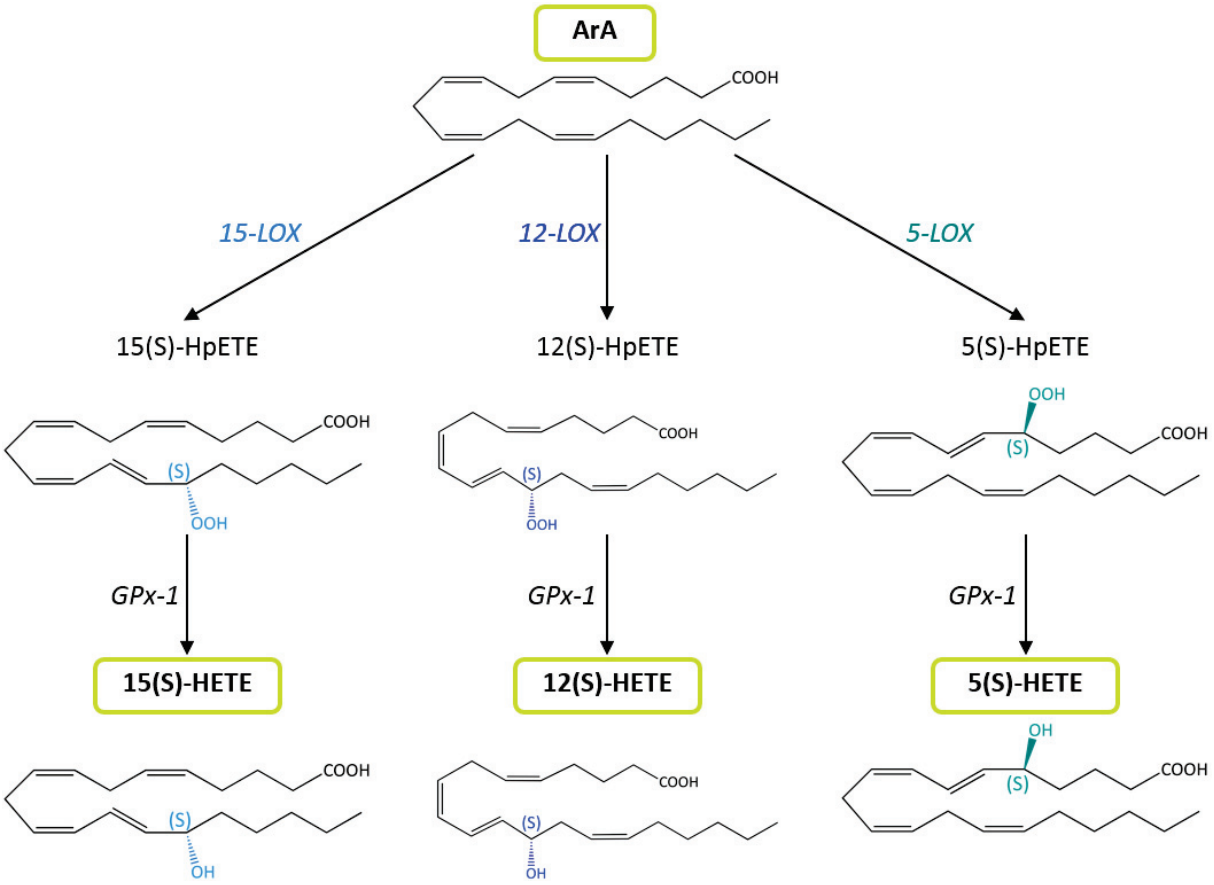


Figure 12. Métabolites monohydroxylés formés par les différentes lipoxygénases humaines à partir de l'acide arachidonique.

Ces dérivés hydroperoxydés et monohydroxylés sont non seulement les précurseurs de médiateurs lipidiques puissants mais ils exercent eux-mêmes des fonctions importantes dans l'organisme.

Le 12-HpETE et le 12-HETE sont notamment capables de moduler l'agrégation plaquettaire. En effet, le 12-HpETE peut activer sa propre synthèse en augmentant l'activité de la 12-LOX plaquettaire humaine (Croset, M. and Lagarde, M. 1985). Il peut également activer la libération d'ArA par la $cPLA_2$ et la formation de prostanoïdes en stimulant l'activité de la COX (Calzada, C. *et al.* 2001). Au contraire, le 12-HETE est considéré comme un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire induite par le thromboxane A_2. En effet, il peut inhiber la réactivité du thromboxane A_2 (Croset, M. *et al.* 1988), et ce en agissant au niveau de son récepteur (Fonlupt, P. *et al.* 1991).

Selon la voie de synthèse impliquée, les métabolites monohydroxylés dérivés de l'ArA ont des fonctions opposées dans l'inflammation. Des dérivés pro-inflammatoires, les leucotriènes, sont par exemple formés *via* la voie de la 5-LOX sur l'ArA. Au contraire, certains dérivés monohydroxylés de cet AGPI ont des propriétés anti-inflammatoires. Ainsi le 15(S)-HpETE présente notamment des propriétés anti-inflammatoires dans plusieurs modèles d'inflammation (Kuhn, H. 1996). Le 12-HETE et le 15-HETE peuvent aussi activer la voie de signalisation PPARγ (Limor, R. *et al.* 2008) et renforcer son effet anti-inflammatoire dans l'organisme (Martin, H. 2010).

Les métabolites monohydroxylés dérivés de l'ArA sont également fortement impliqués dans différents cancers. Alors que le 15-HETE sert d'indicateur de la sévérité du cancer de la prostate par son absence (Jack, G.S. *et al.* 2000), le 5-HETE et le 12-HETE présentent des activités pro-carcinogéniques en stimulant respectivement la prolifération cellulaire (DuBois, R.N. 2003) et l'adhésion cellulaire, le développement de métastases et la néo-angiogenèse (Nie, D. *et al.* 1998).

Seule une liste non exhaustive des différentes fonctions de ces dérivés est présentée ici et dans les paragraphes suivants. Ces composés issus de l'action des LOX présentent bien d'autres fonctions dans l'organisme et notamment au niveau du cerveau (*Cf. §.III).*

II.2.2 Les leucotriènes

La 5-LOX catalyse les deux premières étapes qui conduisent à la biosynthèse des leucotriènes (LT) connus pour être de puissants médiateurs de l'inflammation et des réactions allergiques (Ford-Hutchinson, A.W. *et al.* 1980 ; Samuelsson, B. 1981 ; Murphy, R.C. and Gijon, M.A. 2007) .

Après action de la 5-LOX sur l'ArA, le 5(S)-HpETE peut soit être converti en dérivé monohydroxylé (*Cf. §.II.2.1*) soit être converti par l'enzyme LTA_4 hydrolase en acide 5(S),6(S)-époxy-7*E*,9*E*,11*Z*,14*Z*-eicosatétraénoïque, appelé également leucotriène A_4 (LTA_4) (Radmark, O. *et al.* 1980b) (Figure 13). Le LTA_4 étant très instable à cause de l'époxyde présent à côté

du triène conjugué (demi-vie de 10 secondes) est rapidement transformé selon deux voies enzymatiques.

Différents types de leucocytes et de cellules immunocompétentes (cellules où la 5-LOX est la plus exprimée), dont les leucocytes polymorphonucléaires (PMN), possèdent la LTA_4 hydrolase qui ajoute une molécule d'eau sur le LTA_4. Ainsi, un groupement hydroxyle se fixe sur le carbone 12 alors que l'hydrogène restant permet l'ouverture de l'époxyde et la formation d'un groupement hydroxyle sur le carbone 5. Cette hydrolyse stéréospécifique permet la formation de l'acide 5(S),12(R)-dihydroxy-6*Z*,8*E*,10*E*,14*Z*-eicosatétraénoïque ou leucotriène B_4 (LTB_4) (Radmark, O. *et al.* 1980b). Le LTB_4 joue des rôles très importants dans la réponse inflammatoire en stimulant le chimiotactisme et l'adhérence des neutrophiles à la paroi vasculaire (Palmblad, J. *et al.* 1981). De plus, lorsque le LTB_4 est en excès, il peut être impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques et aigües (Peters-Golden, M. and Henderson, W.R., Jr. 2007). Il a également été démontré que la 5-LOX et le LTB_4 stimulent la croissance de différentes lignées cellulaires cancéreuses et qu'un des antagonistes du LTB_4 pourrait inhiber la prolifération et induire l'apoptose (Tong, W.G. *et al.* 2002 ; Ihara, A. *et al.* 2007).

Le LTA_4 peut également être converti en différents peptido-leucotriènes (métabolites liés de façon covalente à un résidu d'acides aminés). En effet, le LTA_4 peut se conjuguer avec un glutathion réduit par l'action de la glutathion S-transférase (ou LTC_4-synthase). Cette enzyme ouvre l'époxyde du LTA_4 pour former l'acide 5-hydroxy-6-glutathionyl-7*E*,9*E*,11*Z*,14*Z*-eicosatetraénoïque ou leucotriène C_4 (LTC_4) (Radmark, O. *et al.* 1980a). L'enlèvement du résidu gamma-glutamyl du LTC_4 par la gamma-glutamyl transpeptidase permet la synthèse du leucotriène D_4 (LTD_4, acide 5(S)-hydroxy-6(R)-(S-cysteinylglycinyl)-7*Z*,9*E*,11*E*,14*Z*-eicosatétraénoïque). Le LTD_4 est ensuite converti en leucotriène E_4 (LTE_4, acide 5(S),hydroxy,6(R)-(S-cysteinyl),7*E*,9*E*,11*Z*,14*Z*-eicosatétraénoïque) par une abstraction du résidu glycine grâce à une dipeptidase (Hammarstrom, S. 1983). Le LTC_4 et le LTD_4 sont tous les deux des composés vaso- et broncho-constricteurs (Smedegard, G. *et al.* 1982 ; Allen, S. *et al.* 1998). De plus, ces trois peptido-leucotriènes sont des constituants de la substance d'anaphylaxie à réaction lente (SRS-A pour « slow-reacting substance of analphylaxis ») (Samuelsson, B. *et al.* 1987). Ces médiateurs exercent divers effets pro-

inflammatoires, et jouent un rôle important dans les maladies allergiques telles que l'asthme (Singh, R.K. *et al.* 2013) ou les rhinites (Cobanoglu, B. *et al.* 2013).

Il existe une deuxième voie alternative à celle des leucotriènes formant des molécules dihydroxylés similaires au LTB_4 *via* l'action de la 15-LOX. Ainsi, une molécule dihydroxylé, le 8(S)-15(S)-diHETE, peut notamment être synthétisée à partir de l'ArA par un mécanisme de double oxygénation (Maas, R.L. *et al.* 1981). Ce 8(S)-15(S)-diHETE agit comme le LTB_4 en tant que facteur chimiotactique de l'anaphylaxie (Sehmi, R. *et al.* 1991) et de l'inflammation (Kirsch, C.M. *et al.* 1988), bien que ses effets soient beaucoup plus faibles que ceux du LTB_4.

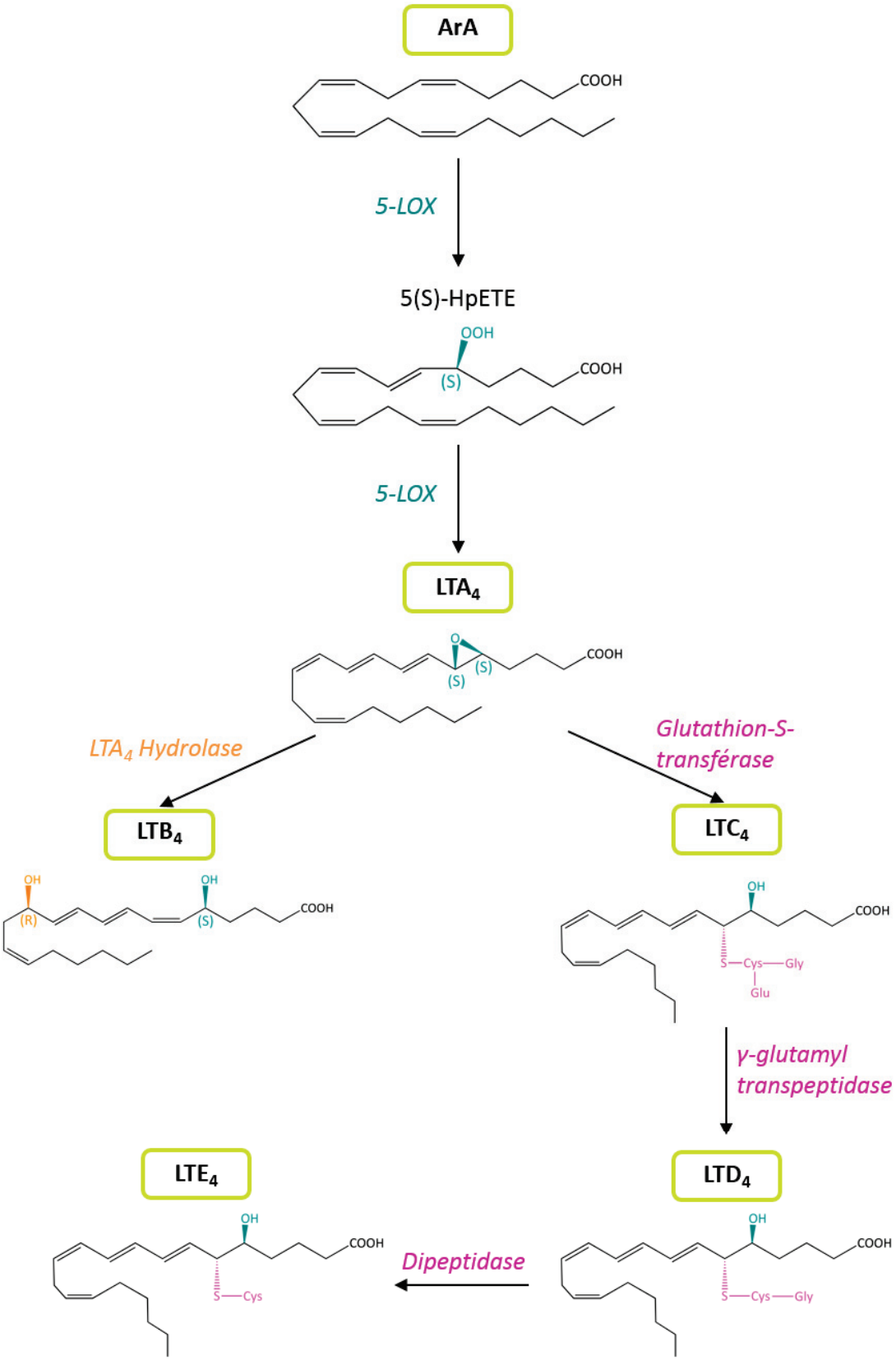


Figure 13. Voies de synthèse des leucotriènes à partir de l'ArA

II.2.3 Les lipoxines

L'oxygénation de l'ArA produit principalement des métabolites impliqués dans l'initiation et la progression de l'inflammation. Cependant, l'ArA est également impliqué dans la biosynthèse de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires et pro-résolvants : les lipoxines (Ryan, A. and Godson, C. 2010 ; Romano, M. *et al.* 2015).

Les lipoxines (LX) sont des acides gras trihydroxylés dérivés de l'ArA qui possèdent quatre doubles liaisons conjuguées (Serhan, C.N. *et al.* 1984). Leur biosynthèse transcellulaire lors d'une interaction entre des neutrophiles stimulés et d'autres types cellulaires peut se réaliser par deux voies distinctes impliquant des enzymes différentes (Figure 14). La première voie de synthèse possible implique la 15-LOX qui convertit dans un premier temps l'ArA en 15(S)-HpETE, lui-même réduit en 15(S)-HETE. L'ajout d'une molécule d'oxygène sur le carbone 5 du 15(S)-HETE par la 5-LOX, suivi par une déshydratation stéréospécifique, permet la formation d'un intermédiaire 5(S),6(S),15(S)-epoxytétraène. Finalement, son hydrolyse enzymatique par les LX synthases conduit aux lipoxines A_4 (LXA_4) et B_4 (LXB_4). La seconde voie de biosynthèse des lipoxines emprunte celle des leucotriènes. Après action de la 5-LOX sur l'ArA, le 5(S)-HpETE est transformé en LTA_4 (*Cf. §.II.2.2)*. Ce composé subit ensuite une deuxième oxygénation sur le carbone 15 *via* une 15-LOX ou une 12-LOX pour former l'intermédiaire 5(S),6(S),15(S)-epoxytétraène (Serhan, C.N. 1989 ; Petasis, N.A. *et al.* 2005). Cette voie d'oxygénation permet non seulement de générer des métabolites anti-inflammatoires mais aussi de supprimer le statut pro-inflammatoire lié aux leucotriènes. En effet, un blocage ou une diminution de l'activité de la LTA_4 hydrolase (permettant la conversion du LTA_4 en LTB_4) augmente la biosynthèse endogène de LXA_4 et la réponse anti-inflammatoire (Tobin, D.M. *et al.* 2010).

Les lipoxines, et principalement la LXA_4, présentent plusieurs fonctions dans la réponse anti-inflammatoire. Elles inhibent notamment le chimiotactisme des PMN et des éosinophiles, l'adhésion vasculaire des PMN et la génération d'anion superoxyde. D'un autre côté, ces molécules peuvent également stimuler le chimiotactisme des monocytes et la phagocytose bactérienne et réduire la libération des cytokines inflammatoires. Elles contrôlent la résolution de l'inflammation dans plusieurs pathologies comme les maladies cardiovasculaires, l'asthme, certaines fibroses et les péritonites (Romano, M. *et al.* 2015).

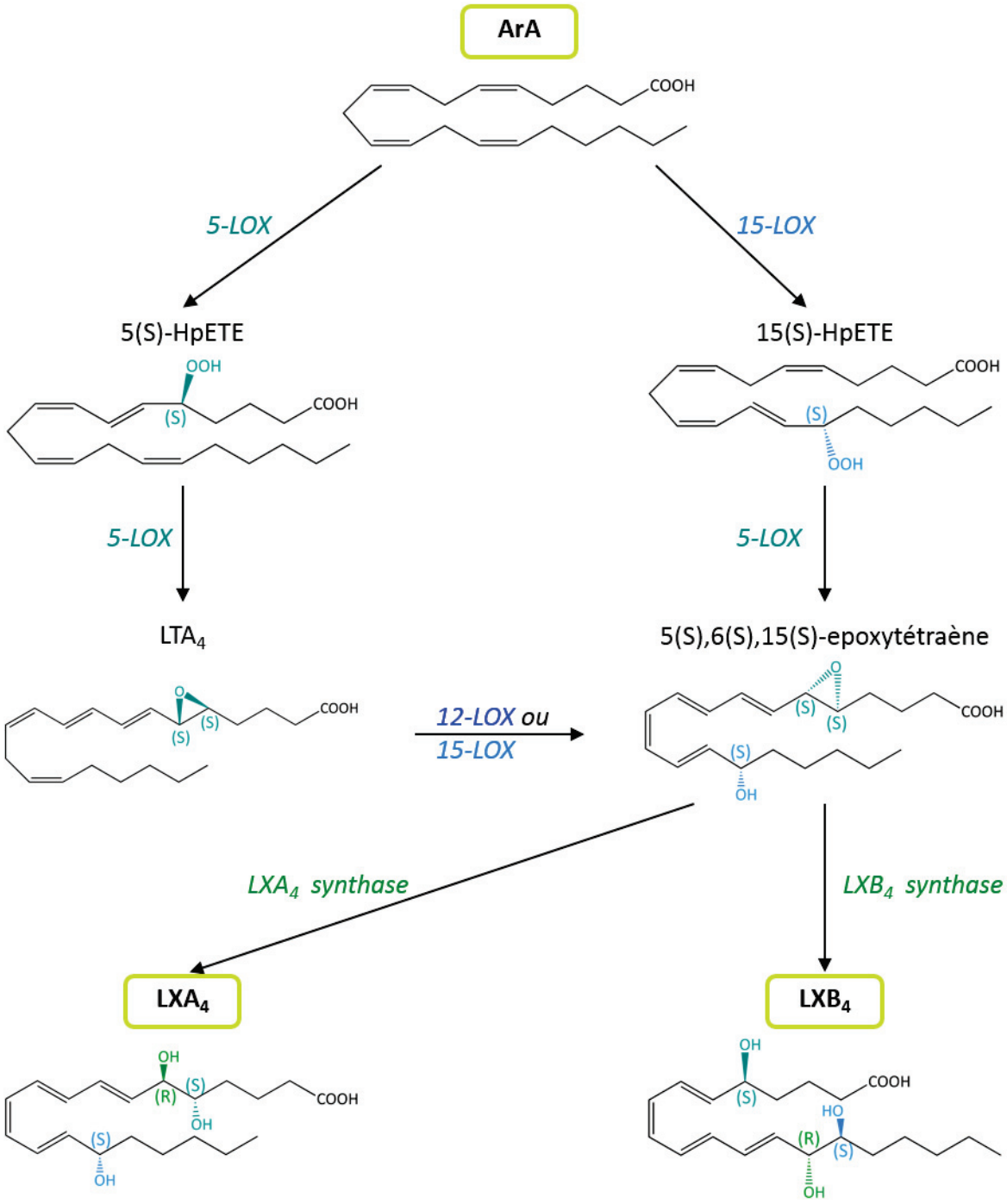


Figure 14. Voies de synthèse des lipoxines

II.2.4 Les prostanoïdes

La voie des COX est la voie de formation de prostanoïdes à partir de l'ArA. Sa cinétique est très rapide comparée à celle des LOX. La COX permet de convertir l'ArA en PGG_2, qui est ensuite transformée en PGH_2 par son activité peroxydase (*Cf. §.II.1.3).* La PGH_2 est ensuite métabolisée en prostaglandines (PG) et thromboxane (Tx).

II.2.4.1 Les prostaglandines

Quatre principales PG bioactives peuvent être générées *in vivo* à partir de la PGH_2 : les prostaglandines D_2 (PGD_2), E_2 (PGE_2), $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) et I_2 (PGI_2 ou prostacycline) *via* l'action d'isomérases et de prostaglandines synthases spécifiques (Helliwell, R.J. *et al.* 2004) (Figure 15). L'isomérisation de la PGD_2 et de la PGE_2 peut être en partie spontanée alors que la formation de la $PGF_{2\alpha}$ et de la PGI_2 nécessite l'action d'une enzyme. Contrairement aux PG primaires (PGE_2, PGD_2 et $PGF_{2\alpha}$) dont la synthèse est assez ubiquiste, la conversion de la PGH_2 en PGI_2 par la prostacycline synthase est principalement localisée au niveau de l'endothélium vasculaire, dans les cellules musculaires lisses (Smith, W.L. 1986) et dans les lymphocytes (Wu, K.K. *et al.* 1987). La synthèse des PG dépend également de l'expression des différentes enzymes impliquées dans leur biosynthèse. Par exemple, lors d'une inflammation, la PGD_2 est principalement générée dans les mastocytes alors que les macrophages produisent plutôt de la PGE_2 (Tilley, S.L. *et al.* 2001).

Certaines de ces PG, instables, sont finalement métabolisées en produits inactifs : la PGE_2 est déshydratée en PGA_2 dans des conditions acides ou en PGB2 dans des conditions basiques (Amin, M. 1989) et la PGI_2 est transformée en 6-céto-$PGF_{1\alpha}$. Seule la PGD_2 est métabolisée en produits actifs. En effet, elle est convertie en PGJ_2, un métabolite mitogénique (Fukushima, M. 1992) puis en 15-déoxy-PGJ_2, un ligand des récepteurs PPARγ, doté de propriétés anti-inflammatoires (Ide, T. *et al.* 2003). Ils jouent un rôle très important dans l'adipogenèse.

Ces PG exercent des rôles très divers dans l'organisme et certaines d'entre elles possèdent des rôles totalement opposés, notamment dans l'inflammation. Les PGE_2 et PGI_2

sont pro-inflammatoires en favorisant la formation d'œdème et l'infiltration des leucocytes (Hata, A.N. and Breyer, R.M. 2004). Cependant, la PGE_2 peut également exhiber des propriétés anti-inflammatoires selon les récepteurs et la population cellulaire impliqués et le contexte d'activation (Moriyama, T. *et al.* 2005 ; Ricciotti, E. and FitzGerald, G.A. 2011). La PGD_2 exerce également des effets dans les phénomènes inflammatoires. L'activation des récepteurs DP1 et CRTH2/DP2 par la PGD_2 augmente le niveau intracellulaire d'AMPc et également le calcium intracellulaire favorisant ainsi la production et la migration des cytokines au niveau des surfaces endothéliales (Khanapure, S.P. *et al.* 2007). Similairement à la PGE_2, la PGD_2 peut également présenter des propriétés pro-inflammatoires et anti-inflammatoires selon sa concentration dans le milieu. A des concentrations élevées, la PGD_2 active la voie PPARγ et inhibe la prolifération des lymphocytes T, alors qu'à des concentrations plus faibles (de l'ordre du nanomolaire), elle active les lymphocytes T (Hirai, H. *et al.* 2001 ; Tanaka, K. *et al.* 2004). La $PGF_{2\alpha}$ est aussi associée à des maladies inflammatoires chroniques et aigües telles que les maladies rhumatismales (Basu, S. *et al.* 2001).

Certaines PG exercent aussi des fonctions importantes dans le système cardiovasculaire. La PGI_2, médiateur généré principalement dans les cellules endothéliales vasculaires, est un puissant vasodilatateur et anti-thrombotique (Lagarde, M. 1988 ; Kawabe, J. *et al.* 2010). Elle exerce ses effets régulateurs dans le système cardiovasculaire comme un puissant antagoniste du thromboxane A_2 (*Cf. §.II.2.4.2*) (Vane, J.R. and Botting, R.M. 1995). La $PGF_{2\alpha}$ est, au contraire, un puissant vaso- et bronchoconstricteur. Elle est également impliquée dans le système reproducteur où elle joue un rôle dans la contraction des muscles utérins lors de l'accouchement (Miller, S.B. 2006). Lors de l'agrégation plaquettaire, l'action de la PGE_2 est dépendante de sa concentration dans ces cellules. En présence de faibles concentrations de PGE_2, elle stimule l'agrégation plaquettaire. Au contraire, l'agrégation plaquettaire est inhibée par l'augmentation d'AMPc induite par de fortes concentrations de PGE_2 (Gray, S.J. and Heptinstall, S. 1991).

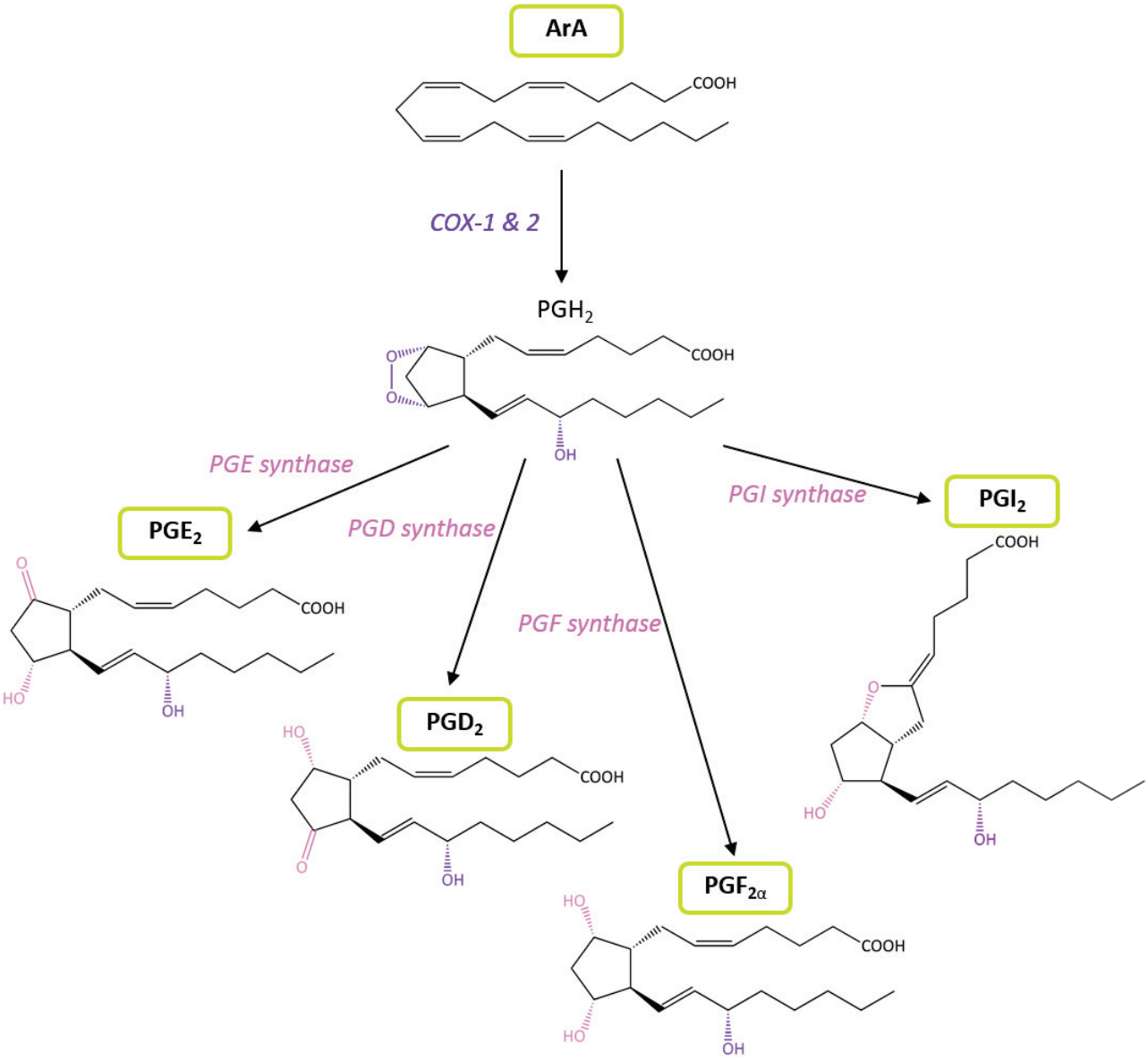


Figure 15. Voies de synthèse des prostaglandines

II.2.4.2 Les thromboxanes

Alternativement à la voie des prostaglandines, la PGH2 est convertie en thromboxane A_2 (TxA_2) *via* l'action de la thromboxane synthase (Hamberg, M. *et al.* 1975) principalement dans les plaquettes sanguines activées (Patrono, C. 1989). Le TxA_2 est très instable. En effet, ayant une demi-vie de 30 secondes, il est rapidement hydrolysé en solution aqueuse en thromboxane B_2 (TxB_2), métabolite biologiquement inactif (Hamberg, M. *et al.* 1975) (Figure 16). Cette instabilité indique que le TxA_2 est un médiateur autocrine ou paracrine, agissant

au niveau de son site de biosynthèse. Le TxA_2 exerce, malgré sa demi-vie très courte, plusieurs fonctions dans l'organisme (Nakahata, N. 2008). Un des rôles les plus importants du TxA_2 est l'activation des plaquettes sanguines. Il favorise le changement de forme, l'agrégation et la sécrétion des plaquettes impliquées lors de la formation de thrombus et lors d'une thrombose (Ally, A.I. and Horrobin, D.F. 1980 ; Dorn, G.W., 2nd and DeJesus, A. 1991). Le TxA_2 est également un puissant agent capable de contracter les muscles lisses vasculaires (Yamamoto, K. *et al.* 1995) et bronchiaux (Devillier, P. and Bessard, G. 1997). Ce métabolite est notamment impliqué dans l'asthme (Martin, C. *et al.* 2001).

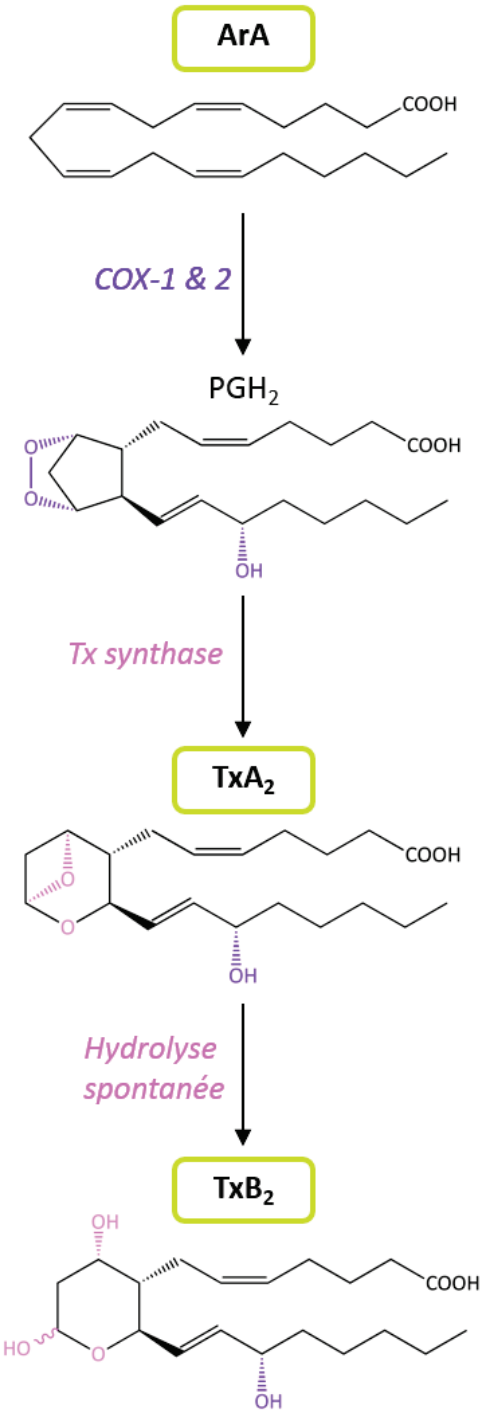


Figure 16. Voie de synthèse des thromboxanes.

II.2.5 Autres métabolites

D'autres voies enzymatiques peuvent convertir l'ArA en dérivés oxygénés. En effet, par les activités hydroxylases des CYP450, l'ArA peut être hydroxylé sur les carbones n-1 et

n-terminal pour former respectivement le 19- et le 20-HETE, ce dernier étant un produit vasorelaxant (Kaduce, T.L. *et al.* 2004). Les CYP450 peuvent également former des époxydes à partir de l'ArA. Quatre époxydes vasoactifs dérivés de l'ArA ont été décrits : l'acide 5,6-époxyeicosatriénoïque (5,6-EET), le 8,9-EET, le 11,12-EET et le 14,15-EET. Ces EET sont par la suite hydrolysés par des époxydes hydrolases en acides dihydroxy-eicosatriénoïques correspondant. Cette deuxième hydroxylation rend alors les composés inactifs (Spector, A.A. 2009).

Jusqu'à présent, seuls les métabolites oxygénés formés enzymatiquement ont été mentionnés. Cependant, les AGPI peuvent aussi être oxydés de manière non-enzymatique. Ces produits sont multiples et proportionnels au nombre de double liaison de l'AGPI. L'oxygénation non-enzymatique de l'ArA peut former deux grandes familles de molécules. Les intermédiaires hydroperoxydes formés par les lipoxygénases ou par la peroxydation lipidique, peuvent être clivés spontanément pour générer des dérivés ayant un groupe carbonyle dans leur structure. A partir de l'ArA, le 4-hydroxy-nonénal (4-HNE) et le 4-hydroxy-dodécadiénal (4-HDDE) peuvent être formés spontanément. Ces produits sont très délétères pour l'organisme car ils sont capables de se lier de façon covalente aussi bien avec des groupements amines primaires libres qu'avec des thiols pour former des adduits de Michael et/ou des bases de Schiff. Ces hydroxy-alcénals augmentent lors d'un stress oxydant qui accompagne souvent les processus inflammatoires (Guichardant, M. *et al.* 2006). De plus, les radicaux libres peuvent convertir l'ArA non enzymatiquement en isoprostanes qui sont des isomères de PG. Ces molécules sont des marqueurs de la peroxydation lipidique et elles sont souvent associées à des conditions inflammatoires sévères (Basu, S. 2004).

II.3 Métabolisme oxygéné de l'acide docosahexaénoïque

Le DHA est un AGPI majeur de la série n-3 présent en forte quantité dans les lipides d'origine marine. Chez les mammifères, c'est l'AGPI le plus abondant dans le cerveau, la moelle épinière et la rétine (*Cf. §.I.3*) (Salem, N.M. *et al.* 2015).

Le DHA doit dans un premier temps être libéré des PL membranaires préférentiellement par une iPLA2, une phospholipase indépendante du calcium (Strokin, M. *et al.* 2003) avant d'être métabolisé.

Contrairement à l'ArA, le DHA n'est pas un substrat des COX, il ne peut donc pas être transformé en dihomo-prostanoïdes. C'est de ce fait un puissant inhibiteur compétitif des COX (Corey, E.J. *et al.* 1983). En revanche, le DHA est un excellent substrat des LOX. Ainsi une grande variété de dérivés mono-, di- et trihydroxylés peut être produite à partir du DHA par réduction des hydroperoxydes formés.

II.3.1 Les acides gras monohydroxylés dérivés de l'acide docosahexaénoïque

De la même façon que pour l'ArA, le DHA peut être métabolisé par les LOX. Ainsi par les actions consécutives des LOX (formation d'un acide hydroperoxydocosahexaénoïque (HpDoHE)) et de la GPx-1 (réduction du HpDoHE en un acide hydroxydocosahexaénoïque (HDoHE)), plusieurs dérivés monohydroxylés peuvent être synthétisés (Figure 17) :

- les 4-HDoHE et 7-HDoHE catalysés 5-LOX (Lee, T.H. et al. 1984)
- les 11-HDoHE et 14-HDoHE formés par la 12-LOX (Aveldano, M.I. and Sprecher, H. 1983)
- le 17-HDoHE par l'action de la 15-LOX (Sawazaki, S. et al. 1994).

Ces différents métabolites monohydroxylés sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques.

Le 4-HDoHE et son produit de déshydrogénation, le 4-oxo-DHA, sont notamment de puissants ligands des récepteurs PPARγ (Sapieha, P. *et al.* 2011). De ce fait, ces deux molécules présentent des propriétés anti-tumorales majeures, en inhibant par exemple la prolifération cellulaire du cancer du sein (Pogash, T.J. *et al.* 2015). Un autre dérivé du DHA semble être impliqué dans le processus tumoral. En effet, le précurseur du 17-HDoHE, le 17-

HpDoHE agit directement comme un agent cytotoxique sur les cellules de neuroblastome en induisant leur apoptose et la diminution de leur prolifération (Gleissman, H. *et al.* 2010).

Le 17-HDoHE, précurseur de plusieurs médiateurs lipidiques puissants, exerce lui-même différents effets anti-inflammatoires dans l'organisme. Il peut notamment être utilisé pour traiter des conditions inflammatoires associées à diverses maladies telles que les maladies intestinales ou l'obésité (Chiu, C.Y. *et al.* 2012 ; Neuhofer, A. *et al.* 2013). Plusieurs autres effets du 17-HDoHE ont été démontrés dans la littérature. Il améliorerait la réponse immunitaire contre le virus de la grippe (Ramon, S. *et al.* 2014) et serait également impliqué dans la vasodilatation coronarienne (Li, X. *et al.* 2011).

De plus, les dérivés hydroperoxydes et monohydroxylés du DHA peuvent inhiber l'agrégation plaquettaire induite par le thromboxane. Cette inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par le thromboxane varie en fonction de la longueur de la chaîne (22 carbones > 20 carbones), de la position des doubles liaisons (AGPI n-3 > AGPI n-6), du nombre de doubles liaisons (6 > 5 > 4) et des groupes fonctionnels (OOH > OH) ainsi que de leur position sur la chaîne carbonée (14-OH > 11-OH) (Karanian, J.W. *et al.* 1996). Ces observations sont en adéquation avec les résultats obtenus précédemment par Lagarde M. et ses collaborateurs qui avaient montré que le 14-HDoHE et le 11-HDoHE inhibaient l'agrégation plaquettaire induite par le thromboxane et que le 14-HDoHE était clairement plus puissant que le 12-HETE (Croset, M. *et al.* 1988).

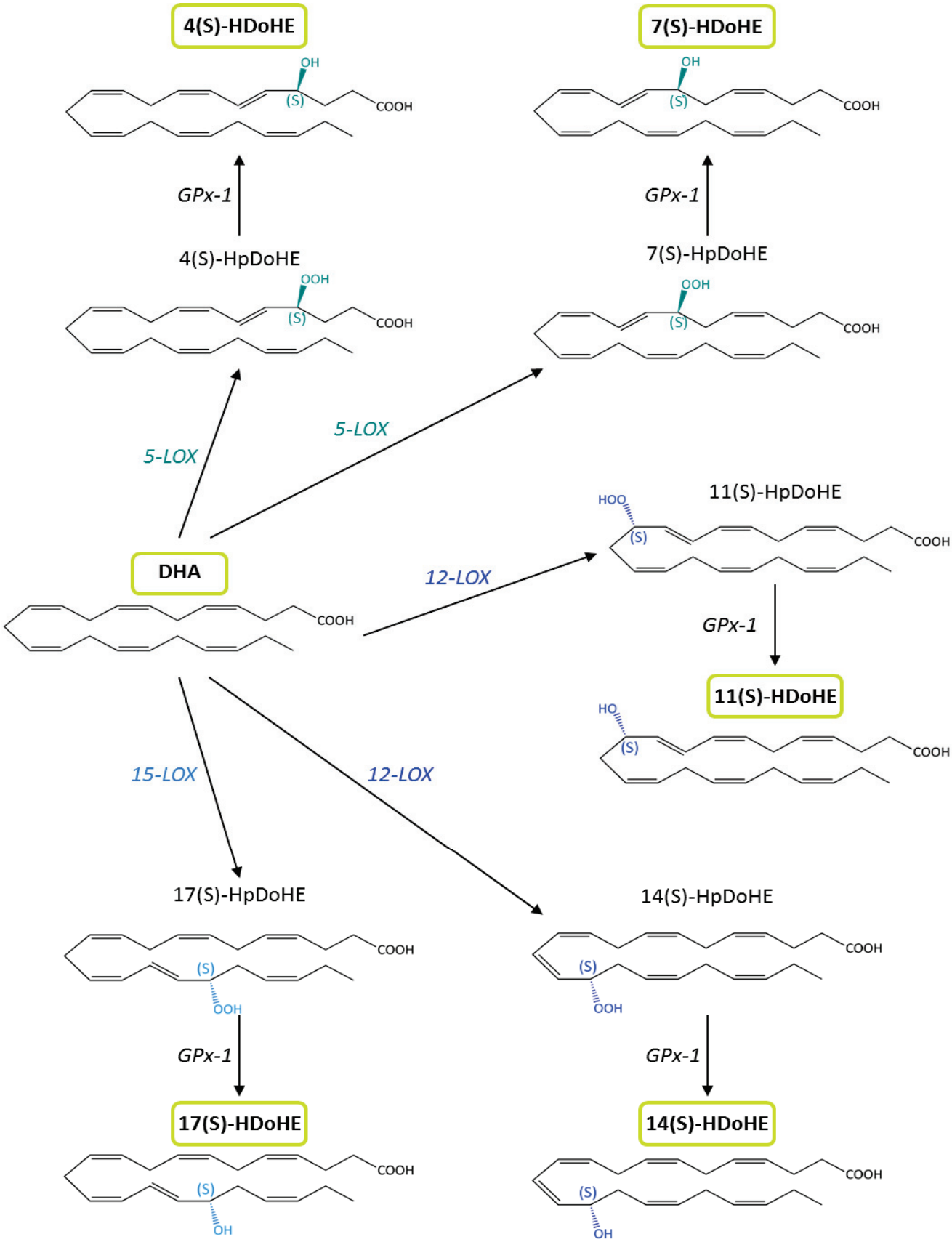


Figure 17. Métabolisme de l'acide docosahexaénoïque par les lipoxygénases humaines

Ces métabolites monohydroxylés dérivés du DHA sont les précurseurs d'une famille de médiateurs lipidiques possédant notamment de forts pouvoirs anti-inflammatoires et pro-résolvants incluant les protectines (PDX et PD1) (Serhan, C.N. *et al.* 2006 ; Liu, M. *et al.* 2014), les marésines (MaR1 et MaR2) (Serhan, C.N. *et al.* 2009 ; Deng, B. *et al.* 2014) et les résolvines de la série D (RvD1 - RvD6) (Serhan, C.N. *et al.* 2002 ; Qu, Q. *et al.* 2015), rassemblées sous le terme de « specialized pro-resolving mediators ». En effet, lors d'une inflammation aigüe, deux phases peuvent être distinguées : l'initiation durant laquelle des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires comme les leucotriènes ou certaines prostaglandines sont libérés et la résolution de l'inflammation qui se déclenche notamment par une commutation des classes de médiateurs lipidiques (Levy, B.D. *et al.* 2001) depuis les médiateurs pro-inflammatoires (leucotriènes, prostaglandines) vers les métabolites anti-inflammatoires (lipoxines, protectines, marésines et résolvines).

II.3.2 Les docosatriènes

Les métabolites monohydroxylés issus du DHA peuvent subir une deuxième oxygénation afin de former des dérivés dihydroxylés, appelés les docosatriènes. Selon la voie métabolique impliquée et donc le métabolite monohydroxylé précurseur, deux types de famille peuvent être distinguées : les protectines et les marésines.

II.3.2.1 Les protectines

Les protectines sont des molécules dihydroxylées sur les carbones 10 et 17 *via* la 15-LOX.

La première protectine a été mise en évidence par l'équipe de Serhan dans les leucocytes et le cerveau, d'où sa double dénomination : protectine D1 (PD1) ou neuroprotectine D1 (NPD1) selon sa localisation (Hong, S. *et al.* 2003 ; Marcheselli, V.L. *et al.* 2003). Cette molécule a été caractérisée comme étant l'acide 10(R)-17(S)-dihydroxy-*4Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*-docosahexaénoïque (Serhan, C.N. *et al.* 2006). Afin de former la PD1,

la 15-LOX agit dans un premier temps sur le DHA pour former le 17(S)-HpDoHE, qui est ensuite converti en un intermédiaire époxyde : le 16(S),17(S)-époxy-protectine. Ce dernier est ensuite hydrolysé afin d'ouvrir l'époxyde et permettre l'attaque nucléophile d'une deuxième molécule d'oxygène (Hong, S. *et al.* 2003) (Figure 18). La PD1 exerce différents rôles dans l'organisme (Weylandt, K.H. *et al.* 2012 ; Serhan, C.N. *et al.* 2015b). Comme son nom l'indique, la PD1 exerce des rôles protecteurs, notamment anti-inflammatoires. Elle réduit notamment l'inflammation allergique respiratoire et l'hyperréactivité associée à l'asthme en diminuant les médiateurs pro-inflammatoires et le recrutement des éosinophiles et des lymphocytes T (Levy, B.D. *et al.* 2007). Cette limitation de l'infiltration des leucocytes par la PD1 est observée dans plusieurs dysfonctionnements de l'organisme, et notamment dans les accidents vasculaires cérébraux et dans le système oculaire (*Cf. §.III.3*) (Hong, S. *et al.* 2003 ; Marcheselli, V.L. *et al.* 2003 ; Mukherjee, P.K. *et al.* 2004). La PD1 est également rénoprotective en protégeant les reins des dommages induits par la reperfusion après une ischémie (Hassan, I.R. and Gronert, K. 2009). Elle protège également les cellules souches du stress oxydatif et permet la différenciation des cellules souches cardiaques et neurales (Yanes, O. *et al.* 2010).

En 2006, Serhan et son équipe ont décrit plusieurs autres isomères de la PD1 possédant également des pouvoirs anti-inflammatoires (Serhan, C.N. *et al.* 2006). Cette propriété anti-inflammatoire ne serait pas stéréosélective, ainsi la stéréochimie du carbone 10 ne serait pas décisive pour cette activité. L'efficacité anti-inflammatoire de ces molécules dépendrait plus particulièrement de la configuration des doubles liaisons du triène conjugué. Ainsi pour une dose de 0,1 ng, la réponse anti-inflammatoire est plus importante pour le 10(S),17(S)-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*-diHDoHE > 10(R),17(S)-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*-diHDoHE (PD1) > 10(S),17(S)-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*Z*,15*E*,19*Z*-diHDoHE > 10(R),17(S)-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*E*,19*Z*-diHDoHE > 10(S),17(R)-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*-diHDoHE.

Un isomère de la PD1, l'acide 10(S),17(S)-dihydroxy-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*Z*,15*E*,19*Z*-docosahexaénoïque, a été caractérisé par notre laboratoire (Chen, P. *et al.* 2009). Cette molécule, formée par un processus de double oxygénation du DHA par la 15-LOX en association avec la GPx-1, a été nommée protectine DX (PDX) (Chen, P. *et al.* 2009). La PDX (acide 10(S),17(S)-dihydroxy-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*Z*,15*E*,19*Z*-docosahexaénoïque) diffère de la PD1

(acide 10(R)-17(S)-dihydroxy-4*Z*,7*Z*,11*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*-docosahexaénoïque) par plusieurs points (Balas, L. *et al.* 2014) : i) la configuration du carbone 10 est S pour la PDX et R pour la PD1 ; ii) la géométrie des doubles liaisons du triène conjugué est 11*E*,13*Z*,15*E* pour la PDX et 11*E*,13*E*,15*Z* pour la PD1 ; iii) leur voie de biosynthèse, la PDX étant un simple produit de double oxygénation de la 15-LOX alors que la synthèse de la PD1 plus complexe nécessite la formation d'un intermédiaire époxyde et l'action d'autres enzymes. La PDX appartient à la famille des poxytrines caractérisée par la présence d'un triène conjugué de géométrie *E,Z,E* et elle est dotée de propriétés anti-agrégantes et anti-inflammatoires, en inhibant les COX-1 et COX-2 et en diminuant la production d'espèces réactives à l'oxygène (Chen, P. *et al.* 2011 ; Liu, M. *et al.* 2014). De plus, la PDX exerce également un effet antiviral en inhibant la réplication du virus de la grippe (Morita, M. *et al.* 2013 ; Balas, L. *et al.* 2014 ; Imai, Y. 2015). La PDX présente également des rôles dans l'obésité et ses pathologies associées. Ainsi, il a été montré que la PDX restaure la sensibilité à l'insuline (White, P.J. *et al.* 2014) et stimule l'activité transcriptionnelle de PPARγ dans le tissu (régulateur clé de l'adipogenèse) (White, P.J. *et al.* 2015) chez des souris obèses. Son rôle anti-inflammatoire a été montré dans de nombreux organes tels que le péritoine (Serhan, C.N. *et al.* 2006) et l'intestin. En effet, l'administration de PDX peut réduire la sévérité des colites et l'inflammation observée après une chirurgie abdominale en atténuant l'infiltration des leucocytes et en réduisant le niveau de médiateurs post-opératoires (IL-6, IL-1β, NOS) (Masterson, J.C. *et al.* 2015 ; Stein, K. *et al.* 2016).

L'aspirine est un puissant inhibiteur des COX par l'acétylation de résidus dans leur région catalytique. Cependant, l'action de l'aspirine sur la COX-2 ne bloque que partiellement son action (abortion du processus de cyclisation). Cette dernière peut tout de même produire des composés hydroxylés mais l'insertion de l'oxygène se fait dans une position R (Kurumbail, R.G. *et al.* 1996). Ainsi la COX-2 acétylée par l'aspirine est capable de convertir le DHA en 17(R)-HpDoHE qui sera transformé par la suite en acide 10(R),17(R)-dihydroxy-4*Z*,7*Z*,10*E*,12*E*,14*Z*,19*Z*-docosahexaénoïque, appelé AT-(N)PD1 (AT pour « Aspirin-triggered ») (Figure 19). L'AT-(N)PD1 présente des actions protectrices similaires à la PD1, en réduisant notamment l'infiltration des PMN et en facilitant l'élimination des PMN apoptotiques par les macrophages (Serhan, C.N. *et al.* 2011).

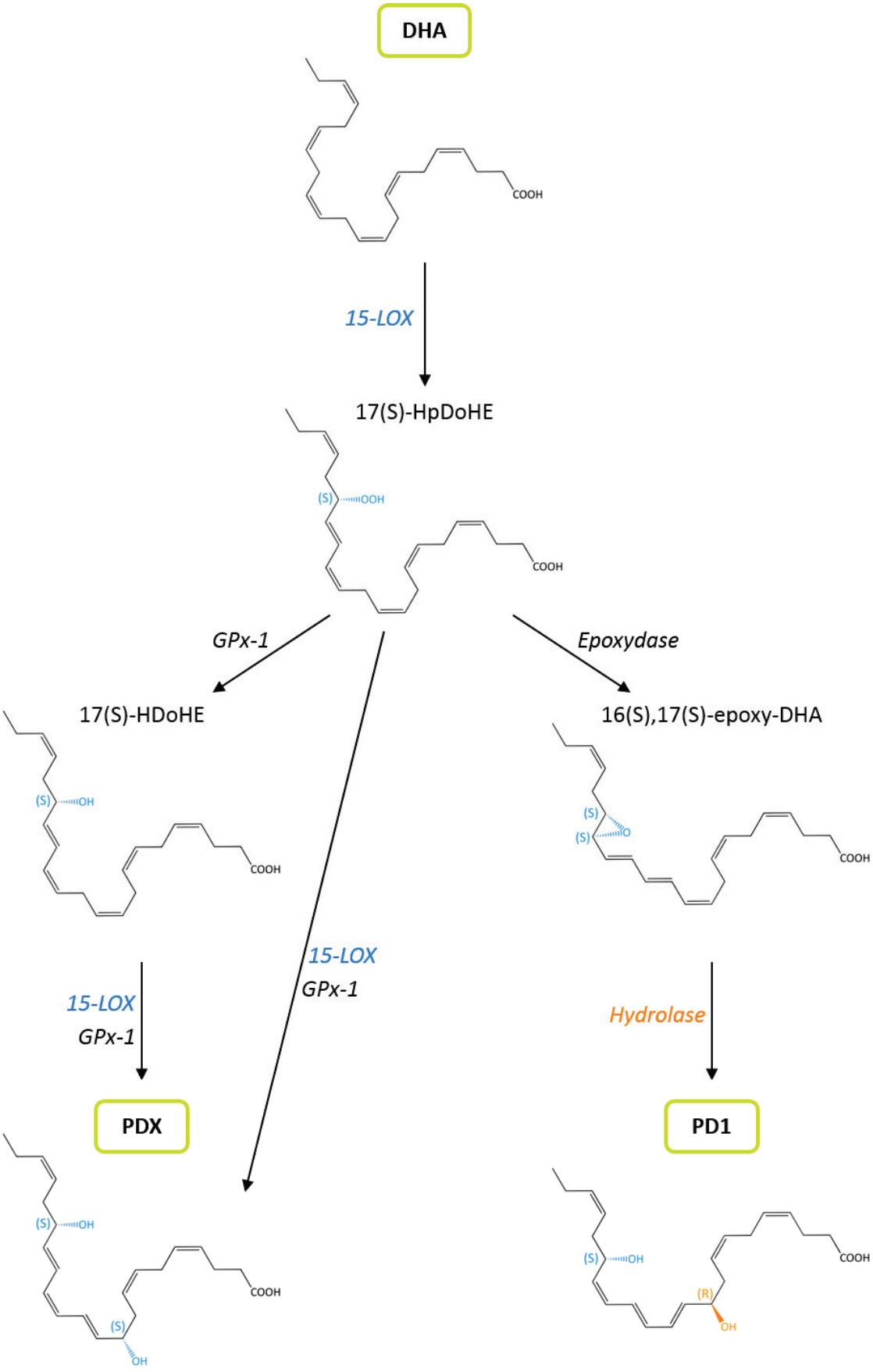


Figure 18. Synthèse des protectines *via* la voie de la 15-lipoxygénase

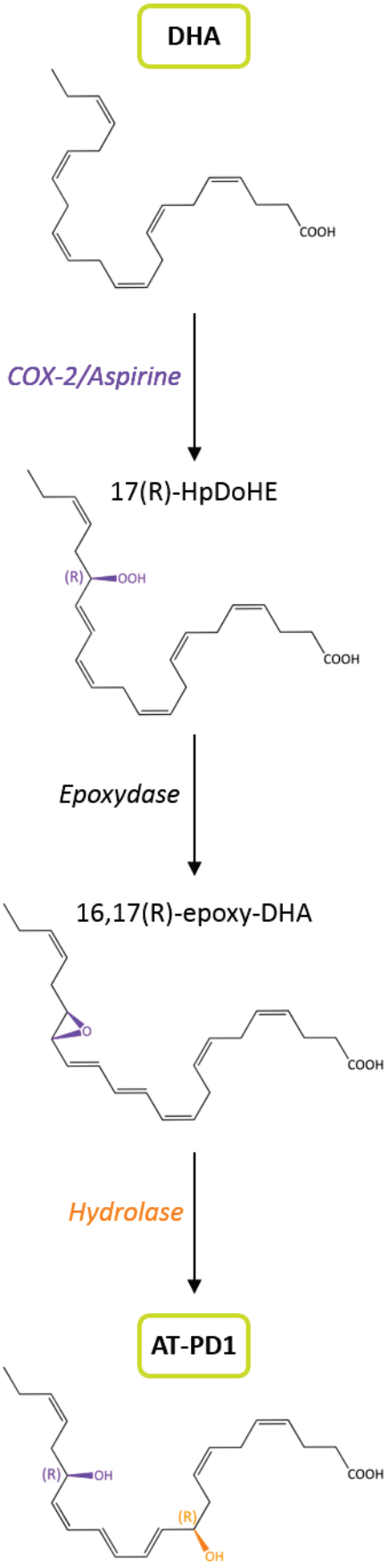


Figure 19. Biosynthèse de l'AT-PD1 en présence d'aspirine.

II.3.2.2 Les marésines

Une nouvelle famille de médiateurs pro-résolvants dérivés du DHA a été décrite dans les macrophages. Ces médiateurs ont donc été nommés marésines pour « macrophage mediators in resolving inflammation ». La biosynthèse de ces marésines est initiée dans les macrophages par l'insertion d'un hydroperoxyde sur le carbone 14 du DHA par la 12-LOX afin de former le 14(S)-HpDoHE (Serhan, C.N. *et al.* 2009). Similairement à la PD1, un intermédiaire époxyde (13(S),14(S)-époxy-marésine) est formé avant d'être hydrolysé enzymatiquement soit en marésine 1 soit en marésine 2 selon l'orientation de la délocalisation d'électrons et l'enzyme impliquée (Figure 20) (Deng, B. *et al.* 2014).

La marésine 1 (MaR1), identifiée comme étant l'acide 7(R),14(S)-dihydroxy-4*Z*,8E,10*E*,12*Z*,16*Z*,19*Z*-docosahexaénoïque, a été le premier membre de cette famille identifié dans les macrophages (Serhan, C.N. *et al.* 2009), mais également dans les fluides synoviaux de patients atteints d'arthrite (Giera, M. *et al.* 2012). La MaR1 présente des actions anti-inflammatoires et pro-résolvantes inhibant l'infiltration des neutrophiles et stimule stéréosélectivement la phagocytose des macrophages et l'efferocytose (Serhan, C.N. *et al.* 2009). Le précurseur de la MaR1, le 13(S),14(S)-époxy-marésine, est également capable de réguler l'inflammation. En effet, cet intermédiaire peut inhiber la production de LTB_4 pro-inflammatoire en inhibant la LTA_4 hydrolase, et ainsi diminuer l'inflammation. De plus, cet époxyde diminue spécifiquement la conversion de l'ArA par la 12-LOX en 12(S)-HpETE, sans aucun impact sur la conversion du DHA par cette enzyme (Dalli, J. *et al.* 2013). La MaR1 affiche de puissantes actions analgésiques en contrôlant l'inflammation locale et en réduisant la douleur inflammatoire associée (Serhan, C.N. *et al.* 2012). De plus, un isomère de la MaR1, l'acide 7(S),14(S)-dihydroxy-4*Z*,8E,10*Z*,12*E*,16*Z*,19*Z*-docosahexaénoïque, peut être formé par l'action consécutive de deux LOX (12-LOX et 5 LOX) sur le DHA. Ce produit de double oxygénation présente des actions anti-inflammatoires et pro-résolvantes similaires à la MaR1 mais de plus faible intensité (Serhan, C.N. *et al.* 2009, Serhan, C.N. *et al.* 2012).

Plus récemment un isomère de la marésine a été identifié dans les macrophages. Cette marésine 2 (ou MaR2) correspond à l'acide 13(R),14(S)-dihydroxy-4*Z*,7*Z*,9*E*,11*E*,16*Z*,19*Z*-docosahexaénoïque et exerce certains effets similaires à ceux de la

MaR1 sur l'inflammation (réduction de l'infiltration des neutrophiles et augmentation de la phagocytose des macrophages) (Deng, B. *et al.* 2014).

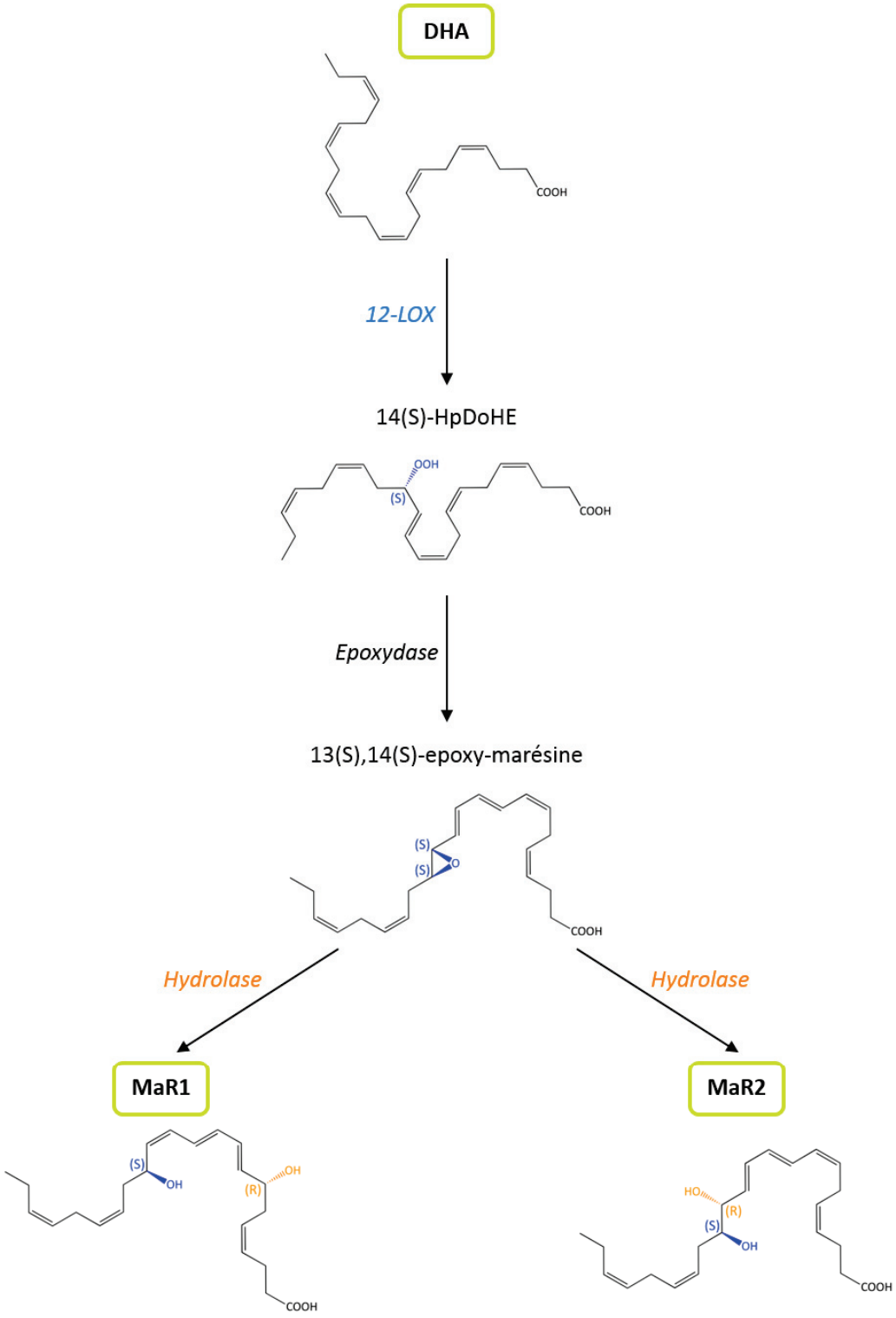


Figure 20. Voies de synthèse des marésines.

II.3.3 Les résolvines

Parmi ces médiateurs pro-résolvants, une famille de molécules se détache par ses effets très importants dans la résolution de l'inflammation. Ces molécules ont été découvertes dans les exsudats inflammatoires lors de la phase de résolution de l'inflammation. Elles ont ainsi été nommées résolvines pour « resolution phase interaction products » (Serhan, C.N. *et al.* 2000).

Six résolvines dérivant du DHA, résolvines de la série D (RvD1 – RvD6) ont pour l'instant été décrites. La conversion du DHA en résolvines de la série D implique deux lipoxygénases différentes. La 15-LOX, en association avec la GPx-1, convertit d'abord le DHA en 17(S)-HDoHE puis une seconde lipoxygénation sur le carbone 7 catalysée par la 5-LOX permet la formation d'un intermédiaire hydroperoxyde. Cet intermédiaire est ensuite transformé en 7(S),8(S)-époxyde qui est hydrolysé enzymatiquement pour générer les composés trihydroxylés RvD1 (résolvine D1, acide 7(S),8(R),17(S)-trihydroxy-4*Z*,9*E*,11*E*,13*Z*,15*E*,19*Z*-docosahexaénoïque) et RvD2 (résolvine D2, acide 7(S),16(R),17(S)-trihydroxy-4*Z*,8*E*,10,12*E*,14*E*,19*Z*-docosahexaénoïque). L'hydroperoxyde peut également être directement réduit en composé dihydroxylé, la RvD5 (résolvine D5, acide 7(S),17(S)-dihydroxy-5*Z*,8*E*,10*Z*,13*Z*,15*E*,19*Z*-docosahexaénoïque). Alternativement, la 5-LOX peut également agir sur le carbone 4 afin de former la RvD3 (résolvine D3, acide 4(S),11(R),17(S)-trihydroxy-5*Z*,7*E*,9*E*,13*Z*,15*E*,19*Z*-docosahexaénoïque), la RvD4 (résolvine D4, acide 4(S),5(R),17(S)-trihydroxy-6*E*,8*E*,10*E*,13*E*,15*Z*,19*Z*,docosahexaénoïque), et la RvD6 (résolvine D6, acide 4(S),17(S)-dihydroxy-5*E*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,15*E*,19*Z*-docosahexaénoïque), similairement à la voie des autres RvD (Figure 21). Le DHA peut également être transformé en résolvine *via* l'action de la COX-2 acétylée par l'aspirine. Cependant, l'action de cette enzyme entraîne la formation du 17(R)-HDoHE qui sera par la suite transformé en AT-RvD (« aspirin-triggered-RvD », acide 7(S),8(R),17(R)-trihydroxy-4*Z*,9*E*,11*E*,13*Z*,15*E*,19*Z*-docosahexaénoïque) selon les mêmes voies que pour la RvD (Figure 22) (Serhan, C.N. and Petasis, N.A. 2011).

Comme son nom l'indique, la RvD1 est impliquée principalement dans divers processus inflammatoires. Les actions de la RvD1 sont médiées par son interaction avec deux récepteurs, ALX/FPR2 et GPR32. La RvD1 a ainsi la capacité d'augmenter la phagocytose des macrophages et les PMN apoptotiques (Krishnamoorthy, S. *et al.* 2010). De plus, cette

molécule est connue pour inhiber le recrutement des neutrophiles dans certaines pathologies inflammatoires (Hong, S. *et al.* 2003) et pour inhiber la douleur spontanée et les mécanismes d'hypersensibilité (Xu, Z.Z. *et al.* 2010). La RvD1 est impliquée dans bien d'autres pathologies telles que le diabète (Hellmann, J. *et al.* 2011), l'obésité (Claria, J. *et al.* 2012) et les néphropaties (Zhang, X. *et al.* 2013). La RvD1 permet notamment de changer le type de médiateurs produits dans les macrophages. En effet, en favorisant l'exclusion nucléaire de la 5-LOX, la RvD1 inhibe la production du LTB_4 pro-inflammatoire au profit de celle de la LXA_4 (métabolite anti-inflammatoire) (Fredman, G. *et al.* 2014). Bien que moins étudiées du fait de leur découverte plus récente, plusieurs fonctions ont été associées aux autres résolvines de la série D. L'AT-RvD1 présente également différents rôles dans l'organisme. Elle peut notamment réduire l'inflammation mucosale lors de lésions pulmonaires (Eickmeier, O. *et al.* 2013) et agit comme un anti-hyperalgésique chez des sujets atteints d'arthrite (Lima-Garcia, J.F. *et al.* 2011). La RvD2 peut quant à elle réduire la production de cytokines et le recrutement des neutrophiles et augmenter la phagocytose des macrophages similairement à la RvD1 (Spite, M. *et al.* 2009). Cependant, la RvD2 semble avoir un rôle plus spécifique dans l'athérosclérose en réduisant la prolifération cellulaire, l'influx de leucocytes et l'hyperplasie néointomale (Miyahara, T. *et al.* 2013). Les RvD3, RvD4 et RvD5 semblent être impliquées dans les défenses contre des infections bactériennes en diminuant le nombre de bactéries infectieuses par stimulation de leurs phagocytoses et par stimulation des réponses anti-inflammatoires (Chiang, N. *et al.* 2012 ; Norris, P.C. *et al.* 2016 ; Winkler, J.W. *et al.* 2016).

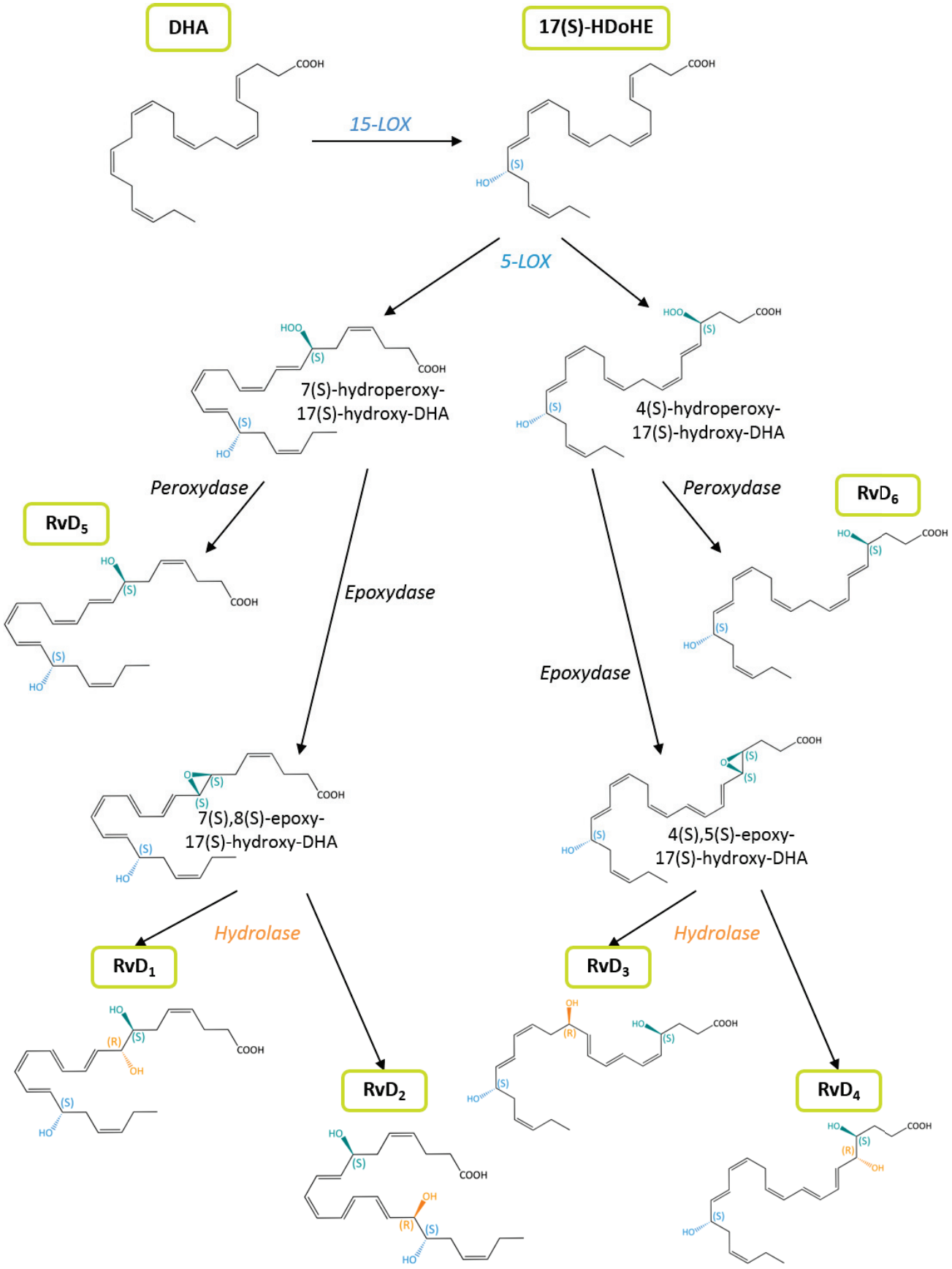


Figure 21. Voies de synthèse des résolvines de la série D.

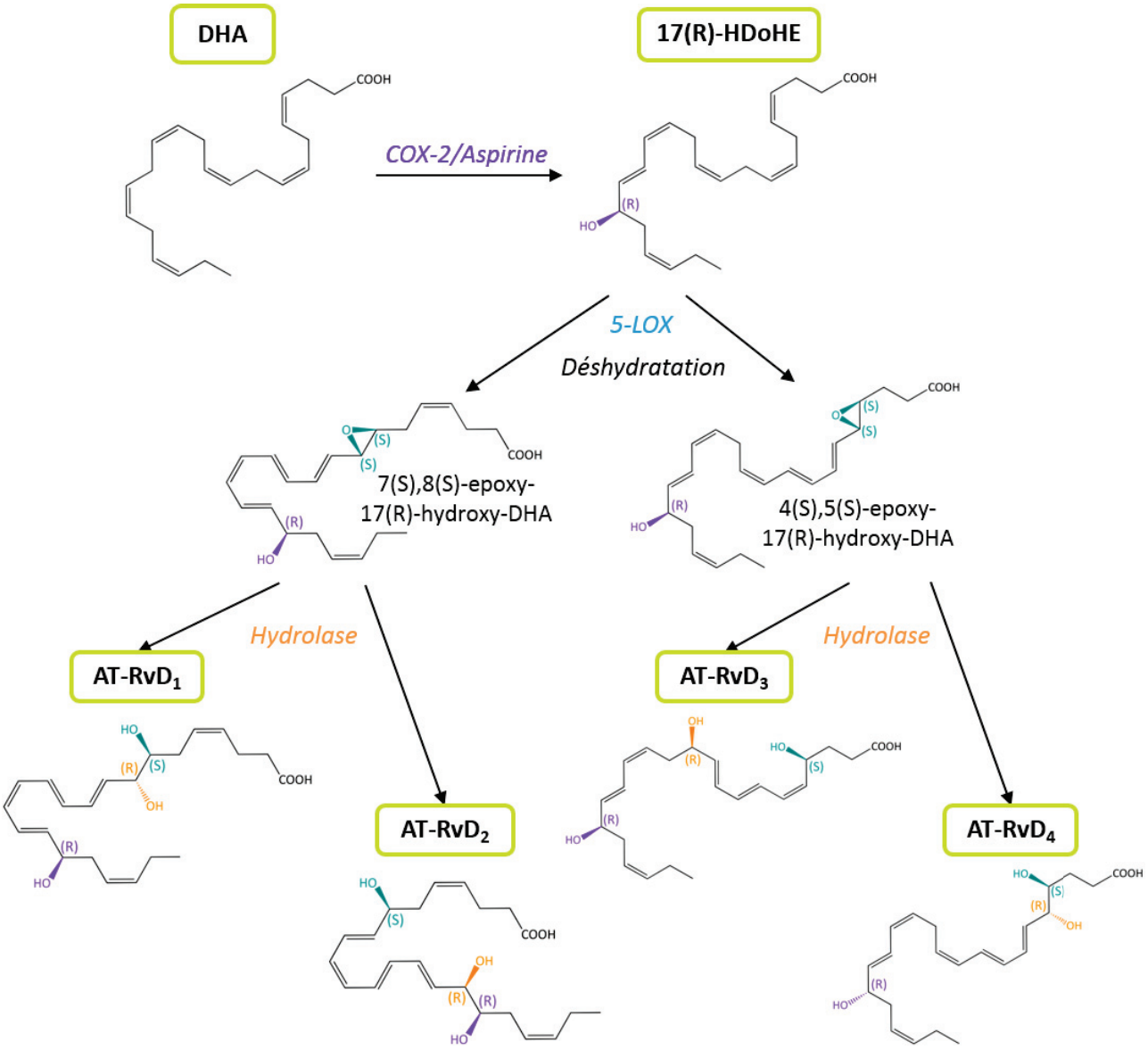


Figure 22. Biosynthèse des résolvines de la série D en présence d'aspirine.

II.3.4 Autres métabolites

Similairement à l'ArA (*Cf. §.II.2.5)*, le DHA peut être converti en d'autres métabolites que ce soit de manière enzymatique ou non. Les CYP450 peuvent notamment agir sur le DHA afin de former des dérivés monohydroxylés en position oméga-1 ou oméga (21-HDoHE et 22-HDoHE) mais également des composés époxydes : les acides 16,17- et 19,20-époxydocosapentaénoïque (16,17-EDP et 19,20-EDP). Plusieurs fonctions sont associées à

ces composés dont des effets cardioprotecteurs (Westphal, C. *et al.* 2011 ; Spector, A.A. and Kim, H.Y. 2015).

Des dérivés oxygénés du DHA peuvent également être synthétisés non enzymatiquement. Les hydroxy-alcénals décrits pour l'ArA existent également pour le DHA. Ainsi, à partir du DHA, le 4-hydroxy-hexenal (4-HHE) peut être formé à partir du 17-HpDoHE. Il possède des propriétés similaires à celles du 4-HNE (Guichardant, M. *et al.* 2006). Enfin, comme pour l'ArA, l'autooxydation du DHA génère des composés ressemblant aux isoprostanes qui ont été appelés neuroprostanes. Comme leur nom l'indique, ces composés présentent des actions au niveau neuronal (Roberts, L.J., 2nd *et al.* 1998) mais ils permettent également d'inhiber la réponse inflammatoire des macrophages (Gladine, C. *et al.* 2014).

II.4 Les métabolites oxygénés estérifiés dans les phospholipides

Après hydrolyse des PL membranaires par une phospholipase, l'ArA et le DHA peuvent être oxygénés par les LOX et les COX. Les métabolites résultant diffusent alors en dehors de cellules pour agir sur les cellules avoisinantes. Cependant, ces métabolites peuvent également être réestérifiés dans les PL membranaires (Hammond, V.J. and O'Donnell, V.B. 2012).

Ainsi il est possible de retrouver des PL oxydés dans les membranes (Figure 23). Il a été démontré que les HETE (métabolites monohydroxylés dérivés de l'ArA) peuvent être estérifiés dans les PL membranaires dans différents types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires. Cette incorporation semble spécifique selon les différentes classes de PL et les HETE impliqués. En effet, le 5-HETE et le 12-HETE semblent principalement estérifiés dans les PC et les PE (Richards, C.F. *et al.* 1986 ; Gordon, J.A. and Spector, A.A. 1987 ; Joulain, C. *et al.* 1995 ; Gormand, F. *et al.* 1996) alors que le 15-HETE est principalement retrouvé dans les PI (Brezinski, M.E. and Serhan, C.N. 1990 ; Girton, R.A. *et al.* 1994). L'incorporation sélective de ces HETE dans différents PL laisse penser que différentes voies d'estérification existent selon les isomères impliqués.

De plus, une oxydation directe AGPI estérifiés dans les PL a été mise en évidence. La 15-LOX peut en effet directement agir sur les AGPI estérifiés dans les PL (Brinckmann, R. *et al.* 1998) (Figure 23). Contrairement à la 5-LOX qui nécessite la protéine FLAP pour sa translocation à l'enveloppe nucléaire, la liaison membranaire de la 15-LOX ne nécessite pas de protéine d'amarrage. L'ancrage membranaire de la 15-LOX, et par la suite sa capacité à oxyder les membranes, est médié par une combinaison d'interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes exposés à la surface et les lipides membranaires, et le calcium qui forme des ponts salins entre les têtes chargées négativement des PL et les acides aminés de surface acides de l'enzyme. Ces interactions entre la 15-LOX et les PL membranaires sont permises non seulement par les tonneaux β de l'extrémité N-terminale de la 15-LOX mais également par son domaine catalytique COOH-terminal qui contient également des séquences déterminantes pour la liaison aux membranes (Walther, M. *et al.* 2004). Il a ainsi été montré que l'ArA peut être converti en 15-HETE directement dans les PE par une attaque directe de la 15-LOX sur les PL membranaires (Maskrey, B.H. *et al.* 2007 ; Morgan, A.H. *et al.* 2009).

Des mécanismes similaires ont été mis en évidence pour la génération de PL contenant des métabolites oxygénés dérivés du DHA (Morgan, L.T. *et al.* 2010).

Cette estérification de dérivés monohydroxylés dans les PL permet dans un premier temps d'établir un stock de ces dérivés qui pourront par la suite être relâchés après une activation cellulaire. Bien qu'estérifiés dans les PL, ces différents métabolites peuvent exercer les fonctions qui leur sont propres. Par exemple, le 5-HETE et le 5-HETE-PE sont tous les deux capables d'augmenter la production de superoxyde dans les neutrophiles (Clark, S.R. *et al.* 2011). Seule la fonction 5-HETE semble ici nécessaire pour réaliser cette action. De plus, la simple présence d'un groupement hydroxyle sur les PL peut avoir un impact important. En effet, le groupement hydroxyle du 12-HETE estérifié dans les PC permet notamment d'améliorer la génération de la thrombine (Thomas, C.P. *et al.* 2010). Enfin, les métabolites oxygénés estérifiés peuvent avoir des fonctions différentes seulement lorsqu'ils sont à l'état libre. En effet, le 5-HETE libre inhibe la génération d'IL-8 par les neutrophiles alors que le 5-HETE-PE augmente sélectivement cette production (Clark, S.R. *et al.* 2011).

Cette différence d'action laisse penser que selon les circonstances des voies différentes sont impliquées selon l'état (estérifié ou libre) du métabolite.

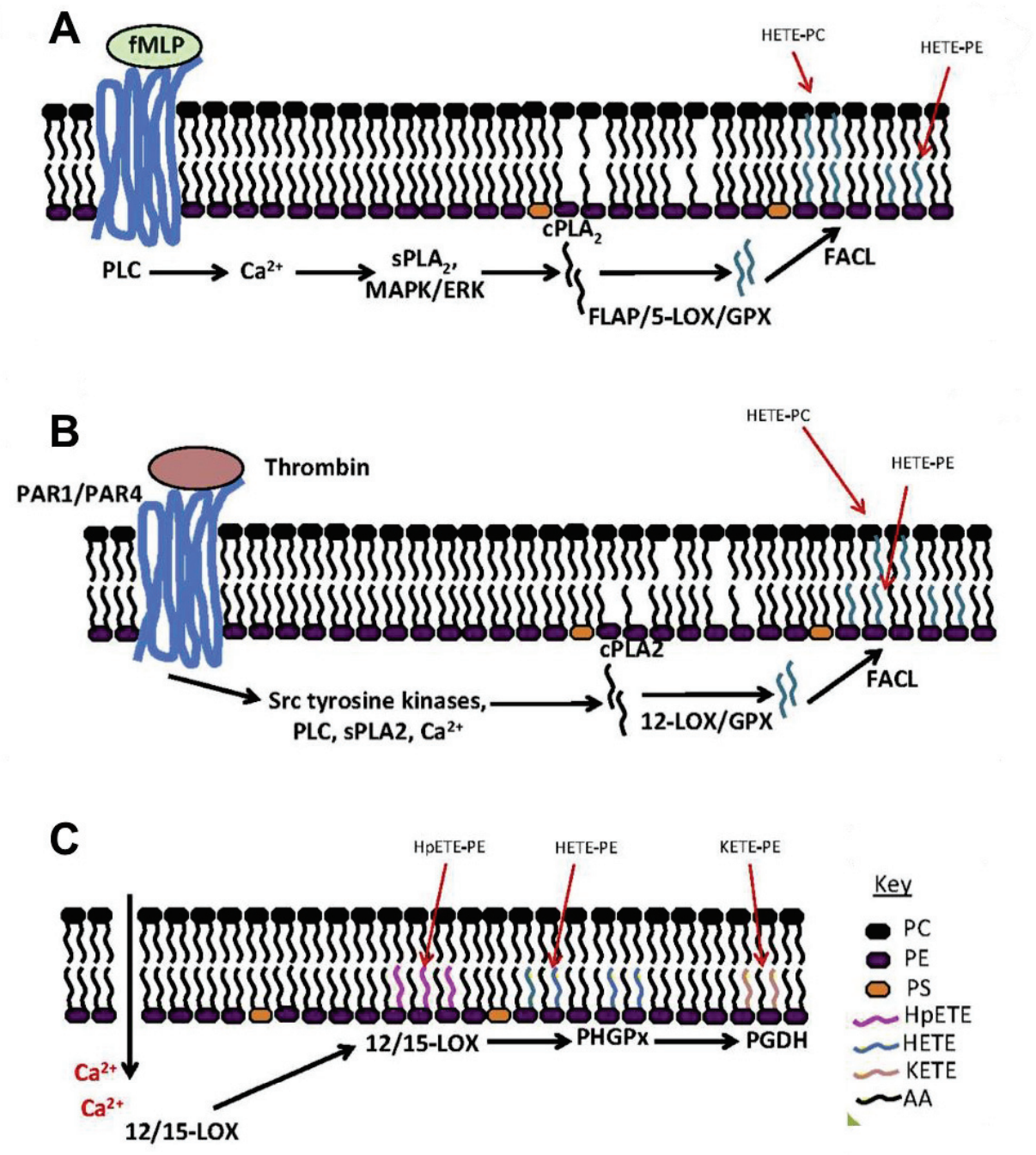


Figure 23. Schéma montrant les mécanismes de formation des phospholipides contenant des dérivés monohydroxylés de l'ArA. Après formation par les lipoxygénases, le 5-HETE (A), le 12-HETE (B) et le 15-HETE peuvent s'estérifier dans les phospholipides. Les phospholipides oxydés peuvent également être formés par une action directe de la 15-LOX sur l'acide arachidonique contenu dans ces phospholipides membranaires (C) (O'Donnell, V.B. and Murphy, R.C. 2012).

III Le cerveau, organe riche en acides gras polyinsaturés

Le cerveau, siège des fonctions supérieures (fonctions cognitives, réponses nerveuses) et végétatives, assure la régulation de toutes les fonctions vitales. Il ne représente que 2% du poids total du corps, mais les fonctions assurées par les centaines de milliards de cellules qui le composent en font un organe indispensable. Le cerveau est partagé en deux hémisphères chacun étant constitué de quatre lobes et forme l'encéphale en association avec le cervelet et le tronc cérébral (Figure 24). Chaque partie du cerveau présente des fonctions spécifiques. Ainsi, différentes structures profondes du lobe temporal assurent des fonctions cognitives spécifiques, telles que les hippocampes qui sont le siège de la mémoire ou l'amygdale impliquée dans le décodage des émotions. Après le tissu adipeux, le cerveau est un des organes les plus riches en lipides. En effet, les lipides représentent environ 50% du poids sec du cerveau. De très hauts niveaux de lipides peuvent être trouvés dans deux composants structuraux : les membranes cérébrales composées à 50 % de lipides et les gaines de myéline où les lipides représentent 70 % des constituants (Yehuda, S. *et al.* 2005). Les AGPI constituent une grande partie de ces lipides membranaires et possèdent des rôles très importants dans le cerveau.

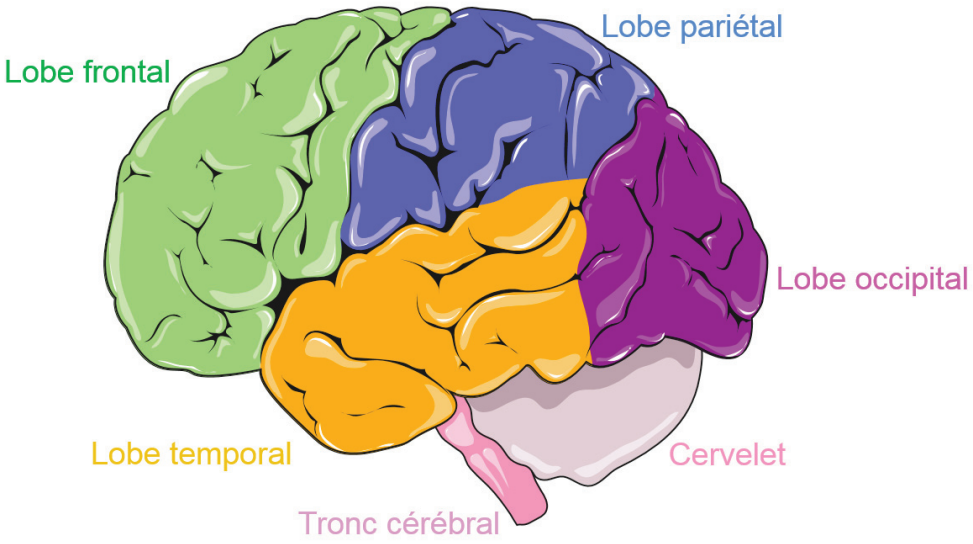


Figure 24. Présentation d'un hémisphère du cerveau divisé en quatre lobes. L'ensemble cerveau, tronc cérébral et cervelet compose l'encéphale.

III.1 Composition en acides gras polyinsaturés du cerveau

Par la très forte densité cellulaire du cerveau et donc la présence accrue de membranes cellulaires, cet organe présente un des plus forts taux de lipides de l'organisme. Ces lipides des membranes cérébrales sont constitués principalement de PL (50 % des lipides totaux) et en moindre proportion de cholestérol, cérébrosides, gangliosides… On distingue dans le cerveau plusieurs classes de PL : les PC (30 à 35% des PL totaux selon les espèces considérées), les PE (30 à 40 % des PL totaux), les PS (12 à 17% des PL totaux) et les PI (2 à 3 % des PL totaux) (Sastry, P.S. 1985).

Une étude menée sur des cortex prélevés sur des sujets (15 femmes et 15 hommes) âgés de 29 à 45 ans (McNamara, R.K. and Carlson, S.E. 2006) a permis de déterminer sa composition en acide gras (Figure 25). Une plus grande proportion de ces acides gras cérébraux est constituée d'acides gras saturés (36 % des acides gras totaux) et d'AGPI n-3 et n-6 qui représentent 31 % des acides gras totaux (14 % des acides gras totaux pour la série n-3 et 17 % pour la série n-6). D'après ces données, le DHA et l'ArA sont les AGPI les plus importants du cerveau (respectivement 13,5 % et 9 % des acides gras totaux). Au contraire, les précurseurs de ces deux séries d'AGPI, l'ALA et le LA, ainsi que l'EPA et le DPA, représentent chacun moins de 1 % des acides gras totaux. Le cerveau est donc unique dans sa composition en AGPI où la quasi-totalité des AGPI est représentée par le DHA et l'ArA. Une autre particularité du cerveau est sa faible concentration en EPA (200 à 500 fois plus bas que celle du DHA) alors qu'il y rentre à des taux similaires que le DHA. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une fois entré dans le cerveau, l'EPA est rapidement catabolisé par des étapes de β-oxydation, élongation et désaturation en DPA n-3 et DHA, et n'est donc pas beaucoup recyclé dans les PL cérébraux (Chen, C.T. and Bazinet, R.P. 2015). Ces résultats obtenus pour le cortex humain sont similaires à ceux obtenus au niveau du cerveau entier de rat (Salem, N.M. *et al.* 2015) (Figure 26). Dans cette étude, les AGPI n-3 représentent 12,4 % des acides gras totaux et les AGPI n-6 13 %. Chez le rat, le DHA et l'ArA sont également les deux AGPI largement majoritaires du cerveau (respectivement 12,2 % et 8,4 % des acides gras totaux).

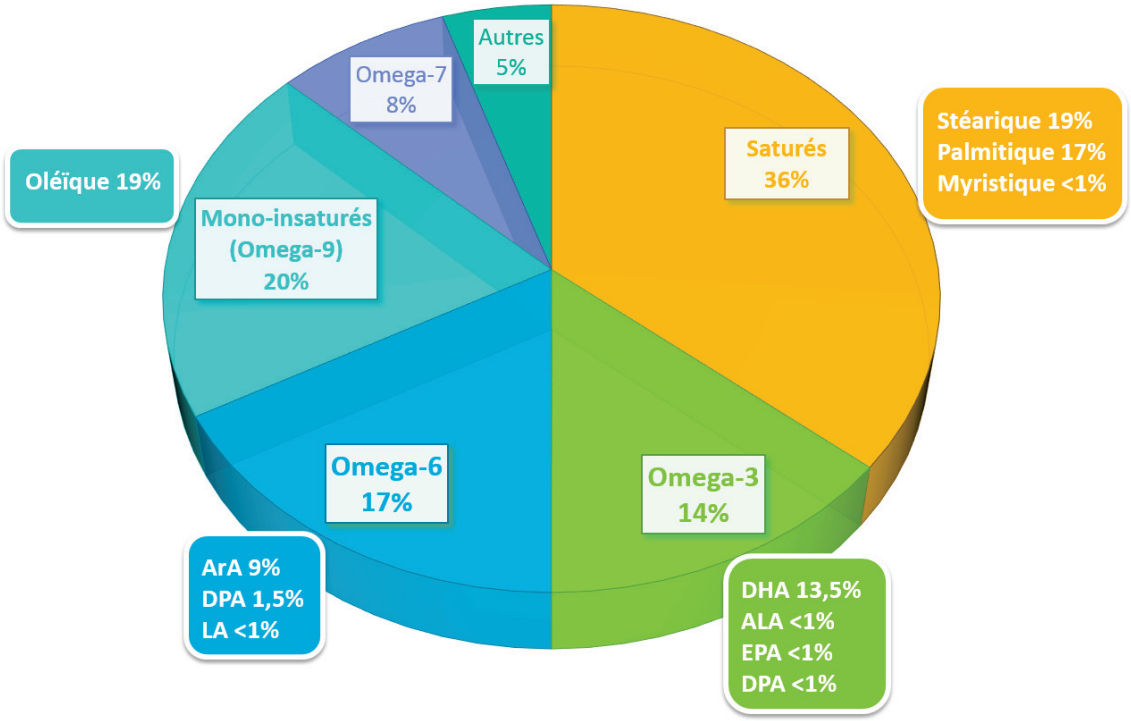


Figure 25. Composition en acides gras des cortex frontaux et préfrontaux humains de sujets males (n=15) et femelles (n=15) âgés de 29 à 45 ans (en % d'acides gras totaux). Adaptée de (McNamara, R.K. and Carlson, S.E. 2006).

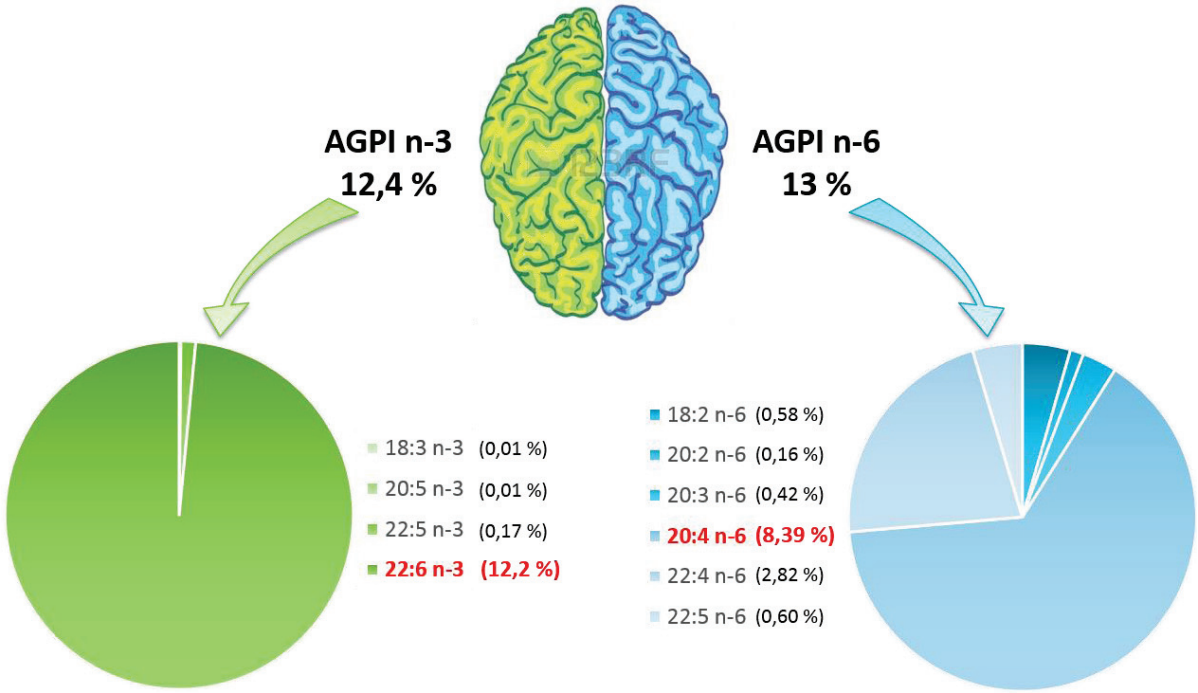


Figure 26. Proportion des différentes espèces d'acides gras dans le cerveau de rats (en % des acides gras totaux). Adaptée de (Salem, N.M. *et al.* 2015).

De manière similaire au reste de l'organisme, dans le cerveau, le DHA est principalement acétylé en position sn-2 des PE et des PS alors que l'ArA est préférentiellement incorporé en position sn-2 des PI et des PE (Sastry, P.S. 1985 ; Martinez, M. and Mougan, I. 1998 ; McNamara, R.K. and Carlson, S.E. 2006).

Ces valeurs varient cependant au cours de la vie. Ainsi, les niveaux d'AGPI changent dans le cortex cérébral depuis la petite enfance jusqu'à l'âge adulte, les principaux changements étant observés après l'âge de 18 ans. La concentration des AGPI dans le cerveau diminue avec l'âge chez des personnes âgées de moins de 18 ans, à l'exception du DHA qui augmente au cours du développement. Chez les adultes, certains AGPI diminuent avec l'âge, effet particulièrement marqué pour l'ArA, ou reste stable. Seul le LA augmente avec l'âge dans la population adulte (Carver, J.D. *et al.* 2001).

De plus, l'abondance de ces deux AGPI diffère d'une région du cerveau à l'autre. Ceci est particulièrement vrai pour le DHA où des forts taux sont présents dans le cortex (frontal et occipital), le cervelet et l'hippocampe et de faibles taux sont retrouvés dans l'ensemble pons-medulla et le striatum. Les niveaux d'ArA sont un peu moins sensibles à cette localisation cérébrale. On retrouve cependant un peu plus d'ArA dans l'hippocampe, le cortex et le striatum (Soderberg, M. *et al.* 1991 ; Carrie, I. *et al.* 2000 ; Xiao, Y. *et al.* 2005). Cette répartition différente au sein des structures cérébrales peut expliquer leurs différentes implications dans certains processus physiologiques mais également physiopathologiques.

Ces AGPI présents dans le cerveau peuvent également l'être sous leur forme oxygénée. En effet, des métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA apportés par la circulation ou synthétisés directement dans le cerveau par les COX et les LOX sont présents (Bazan, N.G. *et al.* 1994 ; Hoffmann, C. 2000b ; Kuhn, H. *et al.* 2015a). Parmi ces métabolites, plusieurs prostanoïdes ont été identifiées : PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$ et TxB_2 (Samuelsson, B. 1964 ; Wolfe, L.S. *et al.* 1976a ; Wolfe, L.S. *et al.* 1976b ; Abdel-Halim, M.S. *et al.* 1977). Cependant, ces dérivés formés par les COX sont minoritaires par rapport aux métabolites formés par les LOX. En effet, la plupart des métabolites monohydroxylés dérivés de l'ArA (Adesuyi, S.A. *et al.* 1985 ; Hambrecht, G.S. *et al.* 1987 ; Kim, H.Y. *et al.* 1991) et du DHA (Salem, N., Jr. *et al.* 1988 ; Shingu, T. *et al.* 1988 ; Derogis, P.B. *et al.* 2013) ont été mis en évidence. Enfin quelques métabolites dihydroxylés ont été identifiés dans cette organe : les leucotriènes

(Lindgren, J.A. *et al.* 1984 ; Miyamoto, T. *et al.* 1987) et la neuroprotectine D1 (Hong, S. *et al.* 2003 ; Marcheselli, V.L. *et al.* 2003).

III.2 Accrétion des acides gras polyinsaturés dans le cerveau

L'accrétion des AGPI dans le cerveau se fait par deux principaux mécanismes. Les AGPI peuvent soit provenir d'une synthèse intracérébrale à partir de leurs précurseurs, soit être apportés par la circulation sanguine.

III.2.1 Synthèse intracérébrale d'acides gras polyinsaturés à longues chaînes

Le LA et l'ALA peuvent être captés par le cerveau à partir de la circulation sanguine et être ensuite métabolisés en AGPI-LC. Les enzymes nécessaires à l'élongation et la désaturation de ces précurseurs (les Δ5- et Δ6-désaturases) sont exprimées dans le cerveau (Cho, H.P. *et al.* 1999a ; Cho, H.P. *et al.* 1999b). Des études réalisées sur des cellules en culture ont montré que les astrocytes, les cellules de l'endothélium cérébrale et les neurones (surtout hippocampiques) peuvent synthétiser l'ArA et le DHA respectivement à partir du LA et de l'ALA (Delton-Vandenbroucke, I. *et al.* 1997 ; Bernoud, N. *et al.* 1998 ; Moore, S.A. 2001 ; Kaduce, T.L. *et al.* 2008). Ces résultats obtenus *in vitro* ont également été confirmés lors d'études *in vivo*. En effet, il a été montré que le cerveau de rongeurs, et plus particulièrement lors du développement cérébral, a la capacité de synthétiser des AGPI-LC à partir de leurs précurseurs apportés par l'alimentation (Cunnane, S.C. *et al.* 1994 ; Pawlosky, R.J. *et al.* 1996). De plus, durant le développement des rongeurs, l'ALA s'accumulerait préférentiellement dans certaines structures cérébrales selon leurs niveaux de croissance (Pawlosky, R.J. *et al.* 1996). Un mécanisme de régulation permettrait donc aux structures cérébrales en croissance d'attirer préférentiellement l'ALA afin d'augmenter le DHA.

Cependant, ces voies de conversion des précurseurs des séries n-3 et n-6 ne permettent de couvrir qu'une très faible part des besoins du cerveau en AGPI-LC. En effet,

moins de 1 % du LA et de l'ALA entrés dans le cerveau sont retrouvés estérifiés dans les PL et les TG cérébraux sous forme d'ArA et de DHA, respectivement (Demar, J.C., Jr. *et al.* 2005 ; DeMar, J.C., Jr. *et al.* 2006). La plupart des besoins cérébraux en AGPI-LC sont donc couverts par l'apport, *via* la circulation sanguine, de ces dérivés synthétisés au niveau du foie ou provenant de l'alimentation (Rapoport, S.I. *et al.* 2007).

III.2.2 Apport des acides gras polyinsaturés au cerveau *via* la circulation sanguine

La synthèse cérébrale d'AGPI-LC étant insuffisante, ces acides gras doivent être apportés au cerveau par la circulation sanguine. Deux sources d'AGPI-LC sont alors possibles : les AGPI-LC alimentaires et ceux synthétisés par le foie. Les produits de la synthèse hépatique représentent la principale source d'AGPI-LC du cerveau. En effet, en cas d'absence ou d'insuffisance d'AGPI-LC dans notre alimentation, le foie est capable de prendre le relais. Il est aujourd'hui bien admis que le foie peut synthétiser une quantité suffisante de DHA à partir de l'ALA circulant chez des rats ayant un régime adéquat en ALA (4,6 % d'ALA dans le régime) pour couvrir les besoins d'AGPI du cerveau (Igarashi, M. *et al.* 2007 ; Rapoport, S.I. *et al.* 2010 ; Domenichiello, A.F. *et al.* 2014).

Pour atteindre le cerveau, les AGPI circulants doivent d'abord traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), interface entre le sang et les compartiments liquidiens du système nerveux central. La BHE est un système très complexe, constitué de péricytes, d'astrocytes et de cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux (Figure 27). Ces cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées composant une barrière permettant de contrôler l'homéostasie, grâce à une perméabilité sélective aux nutriments et autres molécules apportées par le flux sanguin (Ballabh, P. *et al.* 2004).

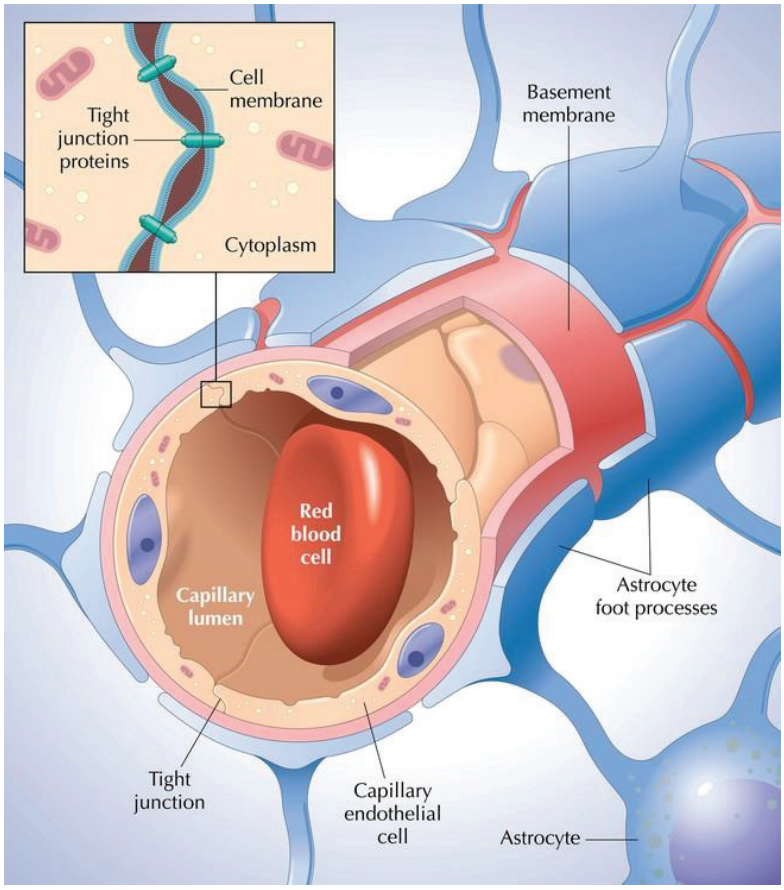


Figure 27. Constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique (Felten, D.L. *et al.* 2015).

Les AGPI ciblant le cerveau proviennent de différents pools dans le plasma, incluant les lipoprotéines, les lysophospholipides ou les acides gras non estérifiés (Bazinet, R.P. and Laye, S. 2014 ; Chen, C.T. and Bazinet, R.P. 2015) (Figure 28). Ces différentes sources d'acide gras impliquent des mécanismes d'entrée différents qui sont aujourd'hui encore controversés.

Les lipoprotéines, telles que les lipoprotéines à basse densité (LDL), sont composées notamment de PL et de TG, constituant ainsi un réservoir à acides gras. Ces lipoprotéines peuvent se fixer à la BHE grâce à leurs récepteurs présents sur les cellules endothéliales de cette barrière (Meresse, S. *et al.* 1989 ; Dehouck, B. *et al.* 1997 ; Stockinger, W. *et al.* 1998). Ainsi en 2001, Edmond a proposé que les récepteurs aux lipoprotéines soient impliqués dans le transport des AGPI au cerveau (Figure 28, 1). La liaison des lipoprotéines circulantes, le plus souvent les LDL, à leurs récepteurs spécifiques présents au niveau de la BHE, peut initier

l'endocytose du complexe lipoprotéine-récepteur (Edmond, J. 2001). Une fois dans la cellule endothéliale, ce complexe est ensuite hydrolysé afin de libérer les acides gras (Figure 28, 8).

Au lieu de se fixer à leur récepteur, les lipoprotéines peuvent également interagir avec la lipoprotéine lipase présente sur les membranes des cellules endothéliales (Figure 28, 2). L'action de cette enzyme permet d'hydrolyser les PL des lipoprotéines circulantes, libérant de ce fait dans le plasma un lysophospholipide contenant un acide gras et/ou un acide gras libre (Goldberg, I.J. *et al.* 2009). L'implication de ces lysophospholipides dans le transport des acides gras à travers la BHE a également été mise en évidence par Lagarde et son équipe. En effet, ils ont montré que le cerveau utilise la lysophosphatidylcholine (LPC) comme source préférentielle d'AGPI (Lagarde, M. *et al.* 2001), et que cette forme d'apport d'AGPI serait spécifique à cet organe (Thies, F. *et al.* 1992 ; Thies, F. *et al.* 1994). Cette classe de PL permettrait ainsi d'apporter des forts taux d'AGPI dans le cerveau car plus de 55 % du DHA et 80 % de l'ArA liés à l'albumine sont estérifiés dans les LPC dans le plasma (Croset, M. *et al.* 2000). Ces lysophospholipides, plasmatiques ou issus de l'hydrolyse des PL des lipoprotéines, sont ensuite transportés dans les cellules endothéliales par un récepteur orphelin récemment découvert, Mfsd2a (« major facilitator superfamily domain-containing protein 2 A) (Figure 28, 3). Ce récepteur est hautement et exclusivement exprimé au niveau des membranes des cellules endothéliales de la BHE et a été identifié comme étant le transporteur essentiel des LPC liées à l'albumine et donc de l'AGPI associé dans le cerveau (Nguyen, L.N. *et al.* 2014). De plus, les acides gras non estérifiés liés à l'albumine, libérés par la lipoprotéine lipase ou présents dans le plasma, peuvent également être une source majeure d'AGPI pour le cerveau (Hamilton, J.A. *et al.* 2001) (Figure 28, 4 et 5). Ces AGPI non estérifiés liés à l'albumine peuvent traverser la membrane neuronale par deux mécanismes. Ces AGPI peuvent d'une part diffuser passivement à travers la membrane endothéliale (Figure 28, 7). Pour cela, ils se lient à cette membrane, diffusent à travers la bicouche lipidique par « flip-flop » et sont ensuite libérés dans le cytosol (Kamp, F. and Hamilton, J.A. 1992). D'autre part, des transporteurs actifs, tels que CD36 (également appelé SRB-1), sont capables de prendre en charge les AGPI libres liés à l'albumine (Hamilton, J.A. and Brunaldi, K. 2007 ; Goldberg, I.J. *et al.* 2009) (Figure 28, 6). Il a récemment été démontré que CD36 n'est pas un transporteur classique mais favoriserait la consommation d'acide gras par l'augmentation du taux d'estérification intracellulaire (Xu, S. *et al.* 2013).

Une fois entrés dans les cellules endothéliales de la BHE, les AGPI non estérifiés sont pris en charge par une protéine liant les acides gras (FABP) (Figure 28, 9). Grâce à cette liaison, les AGPI sont transportés à travers la membrane neuronale soit passivement (Figure 28, 10), soit par des transporteurs d'acides gras (FATP) (Figure 28, 11) (Edmond, J. 2001 ; Schwenk, R.W. *et al.* 2010). Dans les membranes neuronales, ces acides gras sont convertis en thioesters coA par une famille de protéine possédant une activité acyl coA synthétase (ACSL) (Figure 28, 12) et seront soit estérifiés dans les PL cérébraux, soit β-oxydés dans les mitochondries et peroxysomes (Mashek, D.G. *et al.* 2007).

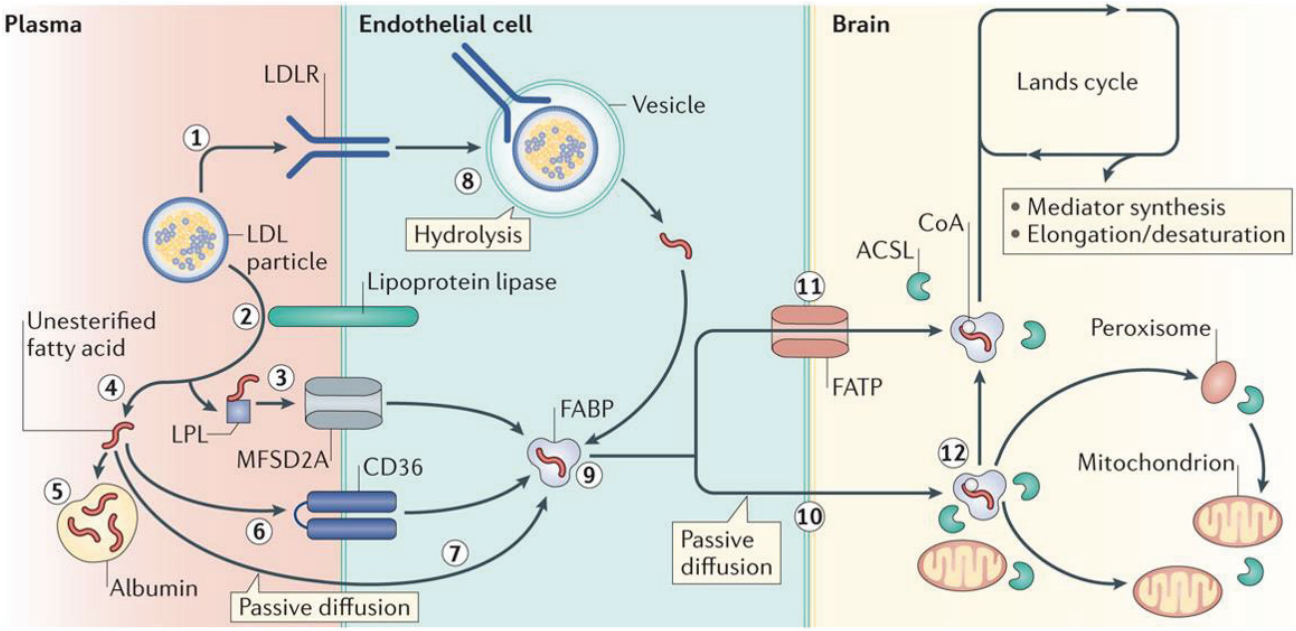


Figure 28. Les différentes voies d'accrétion des acides gras dans le cerveau à partir du plasma (Bazinet, R.P. and Laye, S. 2014).

III.3 Rôle des acides gras polyinsaturés dans le cerveau

L'ArA et le DHA étant très abondants dans les structures cérébrales, l'étude de ces AGPI dans cet organe a suscité un intérêt particulier. Ainsi au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont démontré l'implication de ces AGPI dans le cerveau que ce soit dans des situations physiologiques ou pathologiques (McNamara, R.K. and Carlson, S.E. 2006 ; Lavialle, M. and Laye, S. 2010 ; Bazinet, R.P. and Laye, S. 2014 ; Dyall, S.C. 2015).

III.3.1 Neurodéveloppement et neurogenèse

Le développement cérébral se déroule durant la période périnatale qui s'étend du dernier trimestre de la grossesse jusqu'aux deux premières années de la vie. Cette période impliquant une forte activité cérébrale (forts taux de neurogenèse, de synaptogenèse et de myélinisation) coïncide avec des phases d'incorporation et d'accumulation intenses des AGPI dans les membranes des cellules cérébrales chez l'homme (Clandinin, M.T. 1999 ; Green, P. *et al.* 1999). L'ArA et le DHA sont les deux acides gras les plus fortement incorporés dans les membranes cérébrales et jouent des rôles importants dans la croissance et le développement du cerveau. La qualité des apports en ces AGPI est donc déterminante pour le bon développement fonctionnel du cerveau. Ainsi, il a été démontré que le taux d'incorporation du DHA dans le cerveau est estimé à 3 mg/jour pendant le dernier trimestre de la grossesse et jusqu'à 5 mg/jour lors de la période d'allaitement. Ce taux d'incorporation durant le dernier trimestre tombe à seulement 2,5 mg/jour lorsque le nourrisson est nourri par certains laits artificiels. La source de DHA est donc primordiale pour assurer une bonne incorporation du DHA dans le cerveau des nouveau-nés. De plus, au cours des six premiers mois de la vie, le cerveau est capable d'accumuler la moitié du DHA incorporé dans l'organisme, soit environ 900 mg (Cunnane, S.C. *et al.* 2000). Malgré quelques variations, la composition en AGPI des membranes cérébrales se stabilise jusqu'à l'âge adulte. Dans des cerveaux adultes, l'incorporation de DHA depuis le pool d'acides gras non estérifiés du plasma est estimée à environ 4 mg/jour et sa demi-vie dans le cerveau est estimée à 773 jours (Rapoport, S.I. *et al.* 2007 ; Umhau, J.C. *et al.* 2009).

Un ensemble d'études a montré que les AGPI n-3 sont capables de moduler la neurogenèse à différents stades de la vie. La neurogenèse désigne un ensemble de processus (formation et maturation de neurones, migration vers leur zone cible et établissement de connections avec les autres neurones) aboutissant à la création de neurones fonctionnels à partir de cellules souches neurales. Elle est particulièrement active au cours du développement cérébral de l'embryon, pour établir l'ensemble des réseaux neuronaux, mais elle se poursuit également dans certaines structures cérébrales de mammifères adultes (Ming, G.L. and Song, H. 2011). Au niveau embryonnaire, il a notamment été démontré que le DHA a un effet bénéfique sur la différenciation et la

maturation neuronale, et sur la croissance des neurites des neurones corticaux (Cao, D. *et al.* 2005). Un dérivé oxygéné du DHA, la NPD1 semble également favoriser la différenciation neuronale des cellules souches embryonnaires (Yanes, O. *et al.* 2010).

Bien que moins important, ce processus de neurogenèse persiste à l'âge adulte permettant une réorganisation permanente des réseaux neuronaux. Cette neurogenèse semble se dérouler principalement dans deux zones du cerveau : la zone subventriculaire des ventricules latéraux et la couche subgranulaire du gyrus denté hippocampique (Ehninger, D. and Kempermann, G. 2008). Le DHA exerce des effets similaires sur la neurogenèse adulte, augmentation de la différenciation des cellules souches neuronales et croissance neutritique, notamment au niveau des hippocampes de rats adultes recevant un régime enrichi en DHA (Calderon, F. and Kim, H.Y. 2004 ; Kawakita, E. *et al.* 2006). De plus, le DHA peut stimuler la neurogenèse et inhiber la mort cellulaire *via* son action sur les voies de signalisation Akt et Raf1. En effet, une supplémentation en DHA favorise l'accumulation des PS dans les membranes neuronales, qui elle-même augmente la translocation et l'activation de ces protéines qui présentent un rôle important dans la neurogenèse (Kim, H.Y. *et al.* 2010).

Les AGPI n-3 présentent également des effets directs sur les neurotrophines, famille de molécules rassemblant entre autre le BDNF (brain derived neurotrophic factor) et le NGF (nerve growth factor) qui sont indispensables pour la survie des neurones et la neurogenèse (Lee, E. and Son, H. 2009). Les AGPI n-3, et plus particulièrement le DHA, ont la capacité d'augmenter le niveau de BDNF dans les structures cérébrales (Wu, A. *et al.* 2004 ; Venna, V.R. *et al.* 2009) favorisant ainsi la neurogenèse. Il a également été démontré qu'une supplémentation en ALA induit une augmentation de la neurogenèse, par l'amélioration de la prolifération, de la survie et de la maturation des neurones, et l'augmentation de l'expression de protéines clés impliquées dans les fonctions synaptiques, tout en augmentant le niveau de BDNF dans le cerveau (Blondeau, N. *et al.* 2009). Les AGPI n-3 n'exercent pas seuls ces effets sur la neurogenèse. Il a été montré dans des cultures d'astrocytes de souris que deux dérivés de l'ArA, la PGE_2 et la PGD_2, favorisent également la production de ce facteur neurotrophique (Toyomoto, M. *et al.* 2004).

III.3.2 Régulation synaptique

La synapse désigne une zone de contact fonctionnelle qui s'établit entre deux neurones, ou un neurone et une autre cellule. Elle représente le lieu de la transmission de l'influx nerveux et de la propagation de l'information dans le cerveau. Une synapse est composée d'une terminaison présynaptique où est stocké puis libéré le neurotransmetteur après son excitation et d'une terminaison postsynaptique exprimant les récepteurs aux neurotransmetteurs qui permettent la propagation de l'influx nerveux à un autre neurone (Figure 29). C'est au niveau de ces terminaisons que l'on retrouve les plus fortes concentrations de DHA (Lavialle, M. and Laye, S. 2010). Un autre partenaire cellulaire intervient dans cette transmission de l'information : les astrocytes qui réalisent l'interaction entre les vaisseaux sanguins et les neurones adjacents. En effet, après stimulation locale des astrocytes, ces cellules peuvent émettre des longs prolongements qui viennent enrober la synapse. Ce contact permet ainsi l'apport d'énergie à la synapse sous la forme de glucose provenant de la circulation ainsi que la récupération dans l'espace synaptique des neurotransmetteurs libérés en excès. Ces prolongements permettent donc de créer un large réseau de communication pouvant transférer l'information à des neurones distants grâce à des influx calciques (Lavialle, M. *et al.* 2007 ; Lavialle, M. and Laye, S. 2010).

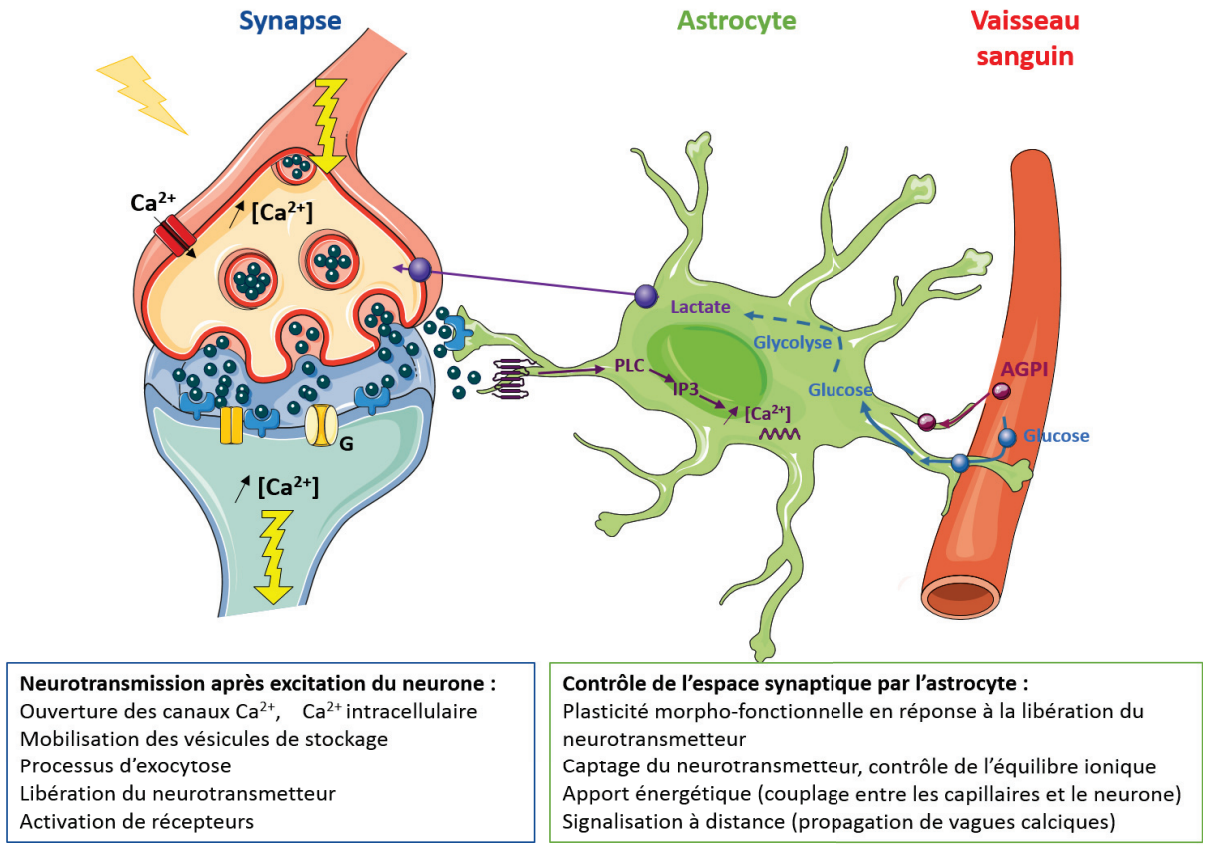


Figure 29. Différentes activités du complexe synaptique : la libération du neurotransmetteur du neurone présynaptique, le contrôle du microenvironnement neuronal par l'astrocyte, le passage des nutriments à travers la barrière hémato-encéphalique. Adaptée de (Lavialle, M. *et al.* 2007 ; Lavialle, M. and Laye, S. 2010).

Plusieurs études ont mis en évidence des effets des AGPI n-3 sur la régulation synaptique. Un déficit en AGPI n-3 dans les membranes cérébrales a pour effet d'altérer plusieurs systèmes de neurotransmission. Ce déficit peut notamment entraîner des augmentations ou des diminutions du taux de stockage de certains neurotransmetteurs (dopamine, sérotonine, acétylcholine) dans les vésicules présynaptiques ou de leurs libérations selon les structures cérébrales prises en compte (Aid, S. *et al.* 2003 ; Chalon, S. 2006). De plus, un déficit en AGPI entraîne également des problèmes lors de l'exocytose des vésicules (Pongrac, J.L. *et al.* 2007) et de leur recyclage (Marza, E. *et al.* 2008).

Un ensemble de processus conduit à la libération d'AGPI dans le microenvironnement synaptique lors d'une activation neuronale dépolarisante. En effet, la liaison du neurotransmetteur nouvellement libéré à son récepteur peut activer la PLA_2 permettant la libération de l'ArA et du DHA. L'ArA peut alors être métabolisé en PGE_2,

molécule connue pour ses rôles multiples sur les récepteurs et les transporteurs neuronaux et astrocytaires, sur la propagation de vagues calciques et sur la vasodilatation des capillaires cérébraux (Chen, C. and Bazan, N.G. 2005 ; Lavialle, M. *et al.* 2007). La PGE_2 générée par la COX-2 peut réguler la transmission synaptique et l'excitabilité membranaire à travers les récepteurs aux PG (EPs) présents sur les neurones. Selon la localisation de ces récepteurs dans le complexe synaptique, la PGE_2 peut agir comme : i) un messager rétrograde en se fixant sur les récepteurs EPs pré-synaptiques, ce qui favorisera la libération de glutamate ; ii) un messager paracrine en agissant sur les récepteurs EPs des astrocytes voisins afin de libérer le glutamate par un mécanisme dépendant du calcium ; iii) un messager autocrine en se fixant sur les récepteurs EPs post-synaptiques (Chen, C. and Bazan, N.G. 2005). Le DHA libéré dans le microenvironnement a également une influence sur les fonctions astrocytaires en protégeant notamment les cellules contre la cytotoxicité induite par un excès de glutamate (Wang, X. *et al.* 2003 ; Grintal, B. *et al.* 2009). Cette régulation de la capture du glutamate fait intervenir différentes voies de signalisation comme celles de la protéine kinase A, de la protéine kinase C et des flux calciques (Berry, C.B. *et al.* 2005). L'ajout de DHA dans le milieu de culture d'astrocytes entraîne une réorganisation du cytosquelette de ces cellules et permet d'améliorer la communication intercellulaire *via* les jonctions communicantes (Champeil-Potokar, G. *et al.* 2006).

III.3.3 Neuroinflammation

L'inflammation est impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies chroniques dont les maladies neurodégénératives.

Grâce à ses jonctions serrées, la BHE limite l'entrée des cellules immunes de l'organisme. Ainsi un des 4 types de cellules présentes dans le cerveau, la microglie, assure la première ligne de défense immunitaire. Les cellules microgliales sont ainsi considérées comme les cellules immunitaires résidentes du cerveau capables de phagocytose. Les cytokines pro-inflammatoires périphériques peuvent également agir dans le cerveau en se fixant à leurs récepteurs présents sur les cellules microgliales qui produiront à leur tour des cytokines inflammatoires agissant dans le cerveau (Layé, S. *et al.* 2011).

De manière similaire au reste de l'organisme, la réponse inflammatoire aigüe dans le cerveau est protectrice pour l'hôte. Cependant, lorsque cette réponse inflammatoire n'est pas contrôlée ou inappropriée, elle peut entraîner une inflammation chronique persistante qui peut favoriser des dysfonctionnements de l'organisme (Mjano, G. and Joris, I. 2004). La réponse inflammatoire aigüe est divisée en deux phases : la phase d'initiation et la phase de résolution, deux étapes faisant intervenir entre autres des dérivés oxygénés des AGPI (Figure 30) (Spite, M. *et al.* 2014). La phase d'initiation est notamment contrôlée par des médiateurs lipidiques tels que les prostaglandines et les leucotriènes qui jouent des rôles dans la régulation du flux sanguin, la perméabilité endothéliale et la diapédèse des PMN (Samuelsson, B. *et al.* 1987). La PGE_2 peut agir comme un perturbateur de la perméabilité de l'endothélium vasculaire afin de favoriser le passage des pathogènes. De plus, le LTB_4 est impliqué dans le contrôle de la migration transendothéliale et le chimiotactisme des PMN vers les tissus lésés et/ou les pathogènes (Spite, M. *et al.* 2014). Lorsque le niveau de PMN diminue, il existe un inversement des médiateurs lipidiques marquant le passage de la phase d'initiation à la phase de résolution de l'inflammation. Ainsi les différents médiateurs lipidiques sont générés à des temps précis de la réponse inflammatoire. En effet, alors que le niveau de LTB_4 est maximum durant l'infiltration des PMN dans le tissu, les PGE_2 et PGD_2 stimulent la biosynthèse de la LXA_4 en activant la régulation positive par les leucocytes des enzymes requises pour sa synthèse (Levy, B.D. *et al.* 2001). La synthèse de la LXA_4 agit alors comme un signal stop endogène qui diminue l'infiltration des PMN et débute la phase de résolution de l'inflammation. Les médiateurs lipidiques pro-résolvants, les résolvines, les marésines et les protectines, sont alors générés par une biosynthèse transcellulaire (Dalli, J. and Serhan, C.N. 2012). Ces médiateurs vont ensuite faciliter la phagocytose et d'autres évènements de la résolution de l'inflammation (*Cf. §.II.3.2*).

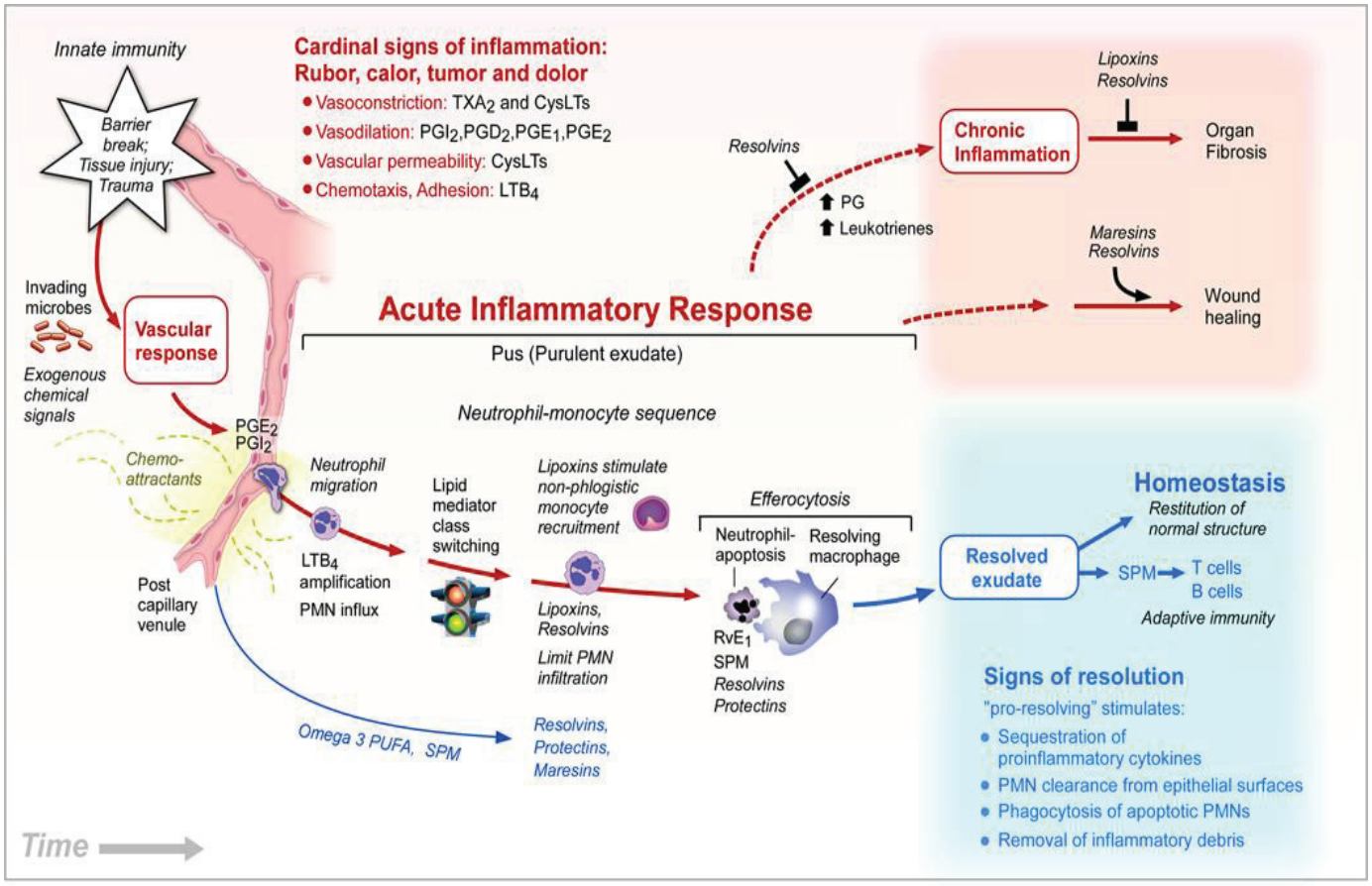


Figure 30. Rôle des différents médiateurs lipidiques dans la réponse inflammatoire aigüe (Serhan, C.N. 2014).

Le DHA et ses médiateurs exercent de puissants effets anti-inflammatoires et pro-résolvants sur les tissus périphériques (Serhan, C.N. 2014) qui sont également retrouvés au niveau du cerveau. Chez l'Homme, une consommation importante de DHA est notamment associée à un risque plus faible de développer des maladies neurologiques ayant une composante inflammatoire (Laye, S. 2010). Une partie des effets anti-inflammatoires du DHA est liée à l'action de ce dernier sur les macrophages ou la microglie. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le DHA bloque l'activation de NF-κB induite par les macrophages et la microglie lors d'une neuroinflammation (De Smedt-Peyrusse, V. *et al.* 2008 ; Figueroa, J.D. *et al.* 2012). Le DHA favoriserait le changement de la microglie vers un phénotype M2 anti-inflammatoire (Hjorth, E. *et al.* 2013). De plus, le DHA diminuerait également l'expression de plusieurs enzymes de la cascade de l'ArA dont la COX-2 dans le cerveau (Orr, S.K. *et al.* 2013b) comme dans le reste de l'organisme que ce soit à l'état basal

ou lors de la réponse inflammatoire. Une étude suggère que l'atténuation de la neuroinflammation serait liée au DHA non estérifié (Orr, S.K. *et al.* 2013a) et pas au DHA estérifié dans les PL. En effet, il a été montré que le DHA non estérifié est neuroprotecteur dans des modèles de neuroinflammation induite par des lipopolysaccharides (LPS) (Orr, S.K. *et al.* 2013a) et d'ischémie-reperfusion (accident vasculaire cérébral) en atténuant l'induction des protéines de signalisation pro-inflammatoires telles que NF-κB et COX-2 (Marcheselli, V.L. *et al.* 2003).

Le DHA exerce aussi son rôle anti-inflammatoire *via* la synthèse de médiateurs lipidiques. La PD1/NPD1 est notamment connue pour ses fortes propriétés anti-inflammatoires (*Cf. §.II.3.2.1*), notamment au niveau du cerveau. Ainsi, lors d'une ischémie cérébrale, le DHA non estérifié est relâché des PL membranaires et converti en NPD1 qui joue des rôles similaires au DHA. Elle peut notamment inhiber l'expression des gènes pro-inflammatoires clés tels que la COX-2 ou NF-κB lors d'une ischémie-reperfusion du cerveau. De plus, dans ces situations d'accident vasculaire cérébral, la NPD1 exerce des effets dans la résolution de l'inflammation en diminuant l'infiltration des leucocytes (Marcheselli, V.L. *et al.* 2003). La NPD1 est également impliquée dans des pathologies cérébrales comportant une phase inflammatoire telle que la maladie d'Alzheimer (*Cf. §.III.3.4.3*). Il a récemment été mis en évidence que la RvD1 peut agir au niveau du cerveau. En effet, les cellules microgliales expriment les récepteurs à la RvD1 à leur surface ce qui laisse suggérer que cette dernière peut y induire la résolution de l'inflammation. Cette résolvine est responsable de la modification du phénotype de la microglie. C'est un puissant inhibiteur de l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-6 et IL-1β lors de l'infection de la microglie par des LPS (Rey, C. *et al.* 2016). Un des mécanismes pourrait être l'augmentation de l'expression de trois micro-ARNs impliqués dans la résolution de l'inflammation par la RvD1 (Sheedy, F.J. and O'Neill, L.A. 2008 ; Faraoni, I. *et al.* 2009 ; Quinn, S.R. and O'Neill, L.A. 2011). Dans les macrophages, ces micro-ARN diminuent la traduction de l'ARN messager des principales cytokines inflammatoires et permettent donc de diminuer l'inflammation (Fredman, G. and Serhan, C.N. 2011).

Le DHA n'est pas le seul AGPI précurseur de métabolites anti-inflammatoires dans le cerveau. La LXA_4 dérivée de l'ArA exerce également des effets anti-inflammatoires en

atténuant par exemple les dommages cérébraux et la production de cytokines pro-inflammatoires dans un modèle murin avec des liaisons cérébrales traumatiques (Luo, C.L. *et al.* 2013). D'autres études montrent les effets anti-inflammatoires de la LXA_4, notamment chez des rats présentant une hémorragie sub-arachnoïdienne (Guo, Z. *et al.* 2016) et dans la maladie d'Alzheimer (Dunn, H.C. *et al.* 2015). De plus, des métabolites monohydroxylés dérivés de l'ArA, le 12-HETE et le 15-HETE, peuvent diminuer l'inflammation lors d'une ischémie cérébrale en activant les PPARγ connus pour réguler négativement la signalisation pro-inflammatoire induite par l'ischémie cérébrale (Han, J. *et al.* 2015 ; Sun, L. *et al.* 2015).

III.3.4 Les acides gras polyinsaturés dans le vieillissement cérébral

Le vieillissement du cerveau se traduit par des nombreux changements biochimiques tels qu'une augmentation du stress oxydatif (Perluigi, M. *et al.* 2014), des dysfonctions mitochondriales et du métabolisme énergétique (Ames, B.N. 2004), des changements structuraux dont une réduction du volume et du poids du cerveau (Anderton, B.H. 2002) ainsi qu'une altération du contenu lipidique des membranes (Svennerholm, L. *et al.* 1997).

III.3.4.1 Altération du contenu cérébral en acides gras polyinsaturés durant le vieillissement

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence les effets de l'âge sur le contenu en lipides des membranes cérébrales à plusieurs niveaux. Ainsi, chez l'Homme, l'augmentation de l'âge est associée à une diminution progressive de certains AGPI, incluant le DHA et l'ArA (Carver, J.D. *et al.* 2001 ; McNamara, R.K. *et al.* 2008). Cette diminution des acides gras totaux peut notamment s'expliquer par la baisse des niveaux de PC et de PE chez des sujets âgés de 89 à 92 ans dans certaines régions cérébrales telles que l'hippocampe (Soderberg, M. *et al.* 1991).

Des études chez l'animal ont permis de mettre en évidence que cette baisse du contenu en AGPI n'est pas homogène dans le cerveau, elle varie selon les structures

cérébrales impliquées. Elle affecte particulièrement le cortex et l'hippocampe, deux zones impliquées dans l'apprentissage et la mémoire. (Giusto, N.M. *et al.* 2002) ont par exemple mis en évidence, chez le rat âgé de 28 mois, une baisse de 13 % du DHA et de 10 % de l'ArA dans le cortex cérébral. Cette diminution est beaucoup plus marquée dans le cervelet où le niveau d'ArA est diminué de 26% et celui de DHA de 23%. Cet effet dépend également de la classe de PL impliquée. Ainsi, chez des rats âgés de 18 mois (comparés à des rats âgés de 2 mois), il a été observé une baisse importante des AGPI n-3, en particulier du DHA, dans les PE et les PS des hippocampes (respectivement - 37 % et - 30 %) et du cortex cérébral (Favreliere, S. *et al.* 2003). Plusieurs études animales mettent en évidence cette diminution du DHA dans certaines classes de PL, souvent associée à une augmentation des acides gras monoinsaturés (Barcelo-Coblijn, G. *et al.* 2003 ; Favreliere, S. *et al.* 2003 ; Little, S.J. *et al.* 2007 ; Labrousse, V.F. *et al.* 2012). Cependant, la plupart de ces études ne montrent pas de modification du contenu en ArA dans les PL cérébraux chez le sujet âgé.

Ces variations du contenu en AGPI, plus particulièrement en DHA, dans le cerveau peuvent s'expliquer par plusieurs mécanismes (Yehuda, S. *et al.* 2002 ; Bourre, J.M. 2004) : i) une plus faible capacité des acides gras à traverser la BHE. En effet, des études ont démontré des changements structuraux de la BHE au cours du vieillissement et dans la maladie d'Alzheimer (de la Torre, J.C. and Mussivand, T. 1993 ; Ginsberg, L. *et al.* 1998) qui gêneraient le passage des acides gras. Cependant, peu de données sont disponibles à ce sujet et les résultats obtenus sont contradictoires (Alberghina, M. *et al.* 1994 ; Strosznajder, J. *et al.* 1996); ii) une baisse du niveau et de l'activité des enzymes Δ6 et Δ9 désaturases. Plusieurs études ont démontré une diminution de l'activité de ces deux désaturases au niveau du foie et du cerveau (Bourre, J.M. and Piciotti, M. 1992 ; Kumar, V.B. *et al.* 1999) ralentissant ainsi la conversion des précurseurs LA et ALA en AGPI-LC ; iii) une diminution du taux d'incorporation des AGPI dans les membranes cérébrales. En effet, les voies de synthèse des PL sont altérées durant le vieillissement (Ilincheta de Boschero, M.G. *et al.* 2000) ce qui entraîne une diminution du renouvellement des PL dans les membranes (Ando, S. *et al.* 2002) et donc une moindre incorporation des acides gras dans les membranes. Tous ces changements métaboliques survenant avec l'âge soulignent l'importance d'un apport alimentaire satisfaisant en AGPI, et plus particulièrement en AGPI n-3.

III.3.4.2 Impact des acides gras polyinsaturés n-3 au cours du vieillissement cérébral normal

Le vieillissement normal est accompagné d'un déclin des fonctions cognitives, incluant la mémoire (Glisky, E.L. 2007). Plusieurs travaux ont suggéré que ces troubles cognitifs étaient associés à la baisse du contenu cérébral en AGPI n-3 liée à l'âge (Horrocks, L.A. and Farooqui, A.A. 2004 ; Denis, I. *et al.* 2013 ; Joffre, C. *et al.* 2014).

Ainsi, plusieurs études se sont intéressées aux relations entre la consommation d'AGPI n-3 et un vieillissement cérébral réussi.

Plusieurs études animales ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une supplémentation en AGPI n-3 apportés sous différentes formes. Par exemple, l'administration orale de DHA (300 mg/kg/j) pendant 10 semaines à des rats âgés de 25 mois améliore la mémoire spatiale liée à l'apprentissage (Gamoh, S. *et al.* 2001). De plus, une supplémentation en PL riches en DHA permet d'améliorer la capacité d'apprentissage et d'inverser les modifications biochimiques présentes chez des souris âgées nourries avec un régime déficient en AGPI n-3 (Carrie, I. *et al.* 2002). Enfin, l'accumulation de DHA et d'EPA dans le cerveau *via* une supplémentation nutritionnelle en huile de poisson durant deux mois protège contre la neuroinflammation et la détérioration cognitive dues à l'âge (Labrousse, V.F. *et al.* 2012).

Plusieurs études épidémiologiques réalisées chez l'Homme ont permis de confirmer ces résultats. Il a notamment été démontré que des sujets âgés qui consomment régulièrement du poisson présentent des risques moins importants de développer des troubles cognitifs (Samieri, C. *et al.* 2008). D'autres études épidémiologiques ont mis en évidence chez des sujets âgés une corrélation entre la consommation d'AGPI n-3 et un déclin cognitif plus lent (Kotani, S. *et al.* 2006 ; Yurko-Mauro, K. *et al.* 2010 ; Dacks, P.A. *et al.* 2013). Une étude sur une cohorte de 485 sujets sains présentant un déclin cognitif lié à l'âge (supérieur à 55 ans) montre qu'une supplémentation de 24 semaines avec 900 mg/j de DHA améliore l'apprentissage et la mémoire (Yurko-Mauro, K. *et al.* 2010). Cependant d'autres études montrent que les effets des AGPI n-3 sont limités sur les fonctions cognitives (van de Rest, O. *et al.* 2008 ; Dangour, A.D. *et al.* 2010). Ces différences de résultats entre ces études

peuvent être dues à des variables telles que l'hétérogénéité de la population, les habitudes alimentaires, le statut en AGPI n-3 avant l'étude et l'état cognitif des participants (Calon, F. 2011). De plus, le développement de l'imagerie du cerveau par IRM, technique non invasive, ouvre de nouvelles possibilités pour l'étude des effets des AGPI dans le cerveau vieillissant. En effet, ces dernières années plusieurs études incluant des analyses en IRM ont permis de mesurer les marqueurs physiologiques associés à ces changements cognitifs (Denis, I. *et al.* 2015). Une étude par IRM a par exemple démontré que les fonctions exécutives augmentées, chez des sujets âgés sains après 26 semaines de supplémentation en AGPI n-3, étaient associées à des améliorations de l'intégrité de la matière blanche (moins de dommages vasculaires et sur la myéline), du volume de la matière grise (moins de pertes synaptiques et neuronales) et des paramètres vasculaires (Witte, A.V. *et al.* 2014). Une autre étude interventionnelle sur des sujets sains âgés de 61 à 72 ans a montré une activité corticale améliorée durant des exercices cognitifs (Konagai, C. *et al.* 2013).

Ces différentes données suggèrent que les AGPI n-3 participent au maintien des fonctions cognitives qui peuvent être altérées au cours du vieillissement cérébral.

III.3.4.3 Vieillissement cérébral altéré et AGPI

A cause des différentes altérations touchant le cerveau vieillissant, ce dernier est plus susceptible de développer des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer.

Cette maladie est la forme la plus commune de démence chez les personnes âgées, avec une prévalence de 4,4 % de la population de plus de 65 ans (Ward, A. *et al.* 2012). Les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent également des déficits en AGPI. La plupart des études montrent une diminution de DHA et de d'ArA en particulier dans les PE (Soderberg, M. *et al.* 1991 ; Edlund, C. *et al.* 1992 ; Corrigan, F.M. *et al.* 1998 ; Prasad, M.R. *et al.* 1998). Les hippocampes de ces patients, zone clé de la mémoire, sont particulièrement impactés par cette diminution. En effet, chez les personnes atteintes, le DHA estérifié dans les PE est réduit de 40 à 50 % dans les hippocampes de personnes atteintes comparé à des sujets sains (Soderberg, M. *et al.* 1991 ; Prasad, M.R. *et al.* 1998).

Afin de pouvoir étudier les mécanismes de cette maladie, plusieurs modèles animaux de la maladie d'Alzheimer ont été créés, le plus souvent en exprimant de manière transgénique des gènes mutants connus pour causer cette maladie. Ainsi chez des souris ayant reçu une infusion intracérébrale de peptides Aβ (peptides s'accumulant anormalement dans le cerveau Alzheimer), le DHA alimentaire exerce des effets bénéfiques sur les capacités d'apprentissage et sur la mémoire (Hashimoto, M. *et al.* 2005 ; Hashimoto, M. *et al.* 2006). D'autres études sur des souris transgéniques APP (APP = amyloid precursor protein) montrent une diminution cérébrale de ces peptides Aβ après un traitement au DHA (Lim, G.P. *et al.* 2005 ; Oksman, M. *et al.* 2006 ; Perez, S.E. *et al.* 2010). Dans un autre modèle murin recréant les enchevêtrements neurofibrillaires (souris 3xTg-AD), un autre marqueur neuropathologique, il a été démontré qu'un traitement à long terme avec du DHA améliore la cognition et réduit les périodes akinétiques chez ces souris âgées de 12 mois (Arsenault, D. *et al.* 2011).

D'après ces études sur les modèles animaux, le DHA exercerait des effets bénéfiques sur la maladie. Cependant, les essais sur l'Homme sont moins concluants. En effet, des études épidémiologiques sur les habitudes alimentaires ont révélé un rôle préventif des AGPI n-3 mais les essais de supplémentation en AGPI n-3 chez des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer ont été peu fructueux. D'après plusieurs études réalisées chez l'Homme, les AGPI n-3 auraient un rôle plus important dans la prévention de la maladie d'Alzheimer que dans son traitement. Ainsi, il a été démontré que la consommation régulière de poisson réduit le risque de développer une démence, en particulier celle de type Alzheimer, chez des sujets âgés (Kalmijn, S. *et al.* 1997 ; Barberger-Gateau, P. *et al.* 2007). Les données obtenues lors du Chicago Health and Aging Project confirme que la consommation de poisson régulière est associée à un ralentissement du déclin cognitif (réduction du déclin de 10 à 13%) et diminue le risque de développer la maladie d'Alzheimer (60 % de risque en moins) (Morris, M.C. *et al.* 2003 ; Morris, M.C. *et al.* 2005). Plusieurs facteurs biologiques pourraient masquer les effets bénéfiques des AGPI n-3 dans la maladie d'Alzheimer. Récemment, le statut en apolipoprotéines E (ApoE) des personnes a été mis en avant. En effet, l'allèle ε4 de l'ApoE est un facteur de risque génétique souvent associé à l'apparition tardive ou sporadique de la maladie d'Alzheimer. Les porteurs de cette ApoE4 ne seraient pas protégés contre la démence par une prise alimentaire importante de

poissons (Huang, T.L. *et al.* 2005 ; Barberger-Gateau, P. *et al.* 2007). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la présence de l'allèle ε4 de l'ApoE serait associée à une diminution du transport du DHA au cerveau (Vandal, M. *et al.* 2014 ; Yassine, H.N. *et al.* 2016). Ainsi, le statut en ApoE devrait être pris en compte dans les futures recherches sur l'effet de la supplémentation en AGPI n-3 chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus, ces résultats montrent bien l'importance des polymorphismes génétiques à prendre en compte lors de nos différentes études.

Des études *in vitro* (co-culture de neurones et de cellules gliales humaines) laissent entrevoir des possibles effets bénéfiques du DHA chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer (Lukiw, W.J. *et al.* 2005). En effet, il a été démontré dans cette étude que le DHA diminue la sécrétion des peptides Aβ40 et Aβ42, constituants principaux des plaques amyloïdes, dans les cellules humaines âgées. Cet effet est accompagné d'une biosynthèse de NPD1. De plus, dans ces cellules, la NPD1 a la capacité d'augmenter l'expression de trois protéines anti-apoptotiques, Bcl-xl, Bcl-2 et Bfl-1 (A1), et de légèrement diminuer les protéines pro-apoptotiques Bax et Bik, protéines dont l'expression est fortement augmentée par le peptide Aβ42. Ces données suggèrent que la NPD1 favorise la survie cellulaire par l'induction de l'expression de gènes anti-apoptotiques, supprimant ainsi l'apoptose et donc la neurotoxicité induite par Aβ42 dans des cellules neurales humaines âgées. Enfin, cette étude met en évidence une potentielle implication de la NPD1 dans la maladie d'Alzheimer car cette dernière est très fortement diminuée dans la zone CA1 des hippocampes de patients atteints de cette maladie (Lukiw, W.J. *et al.* 2005). Par ailleurs, il a été montré que la NPD1 altère la transformation des protéines β précurseurs du peptide amyloïde (APPβ) en diminuant l'expression de β-sécrétase 1 (BACE1) et en activant l'α-sécrétase ADAM10 et l'APPα soluble (sAPPα) (Figure 31) (Zhao, Y. *et al.* 2011).

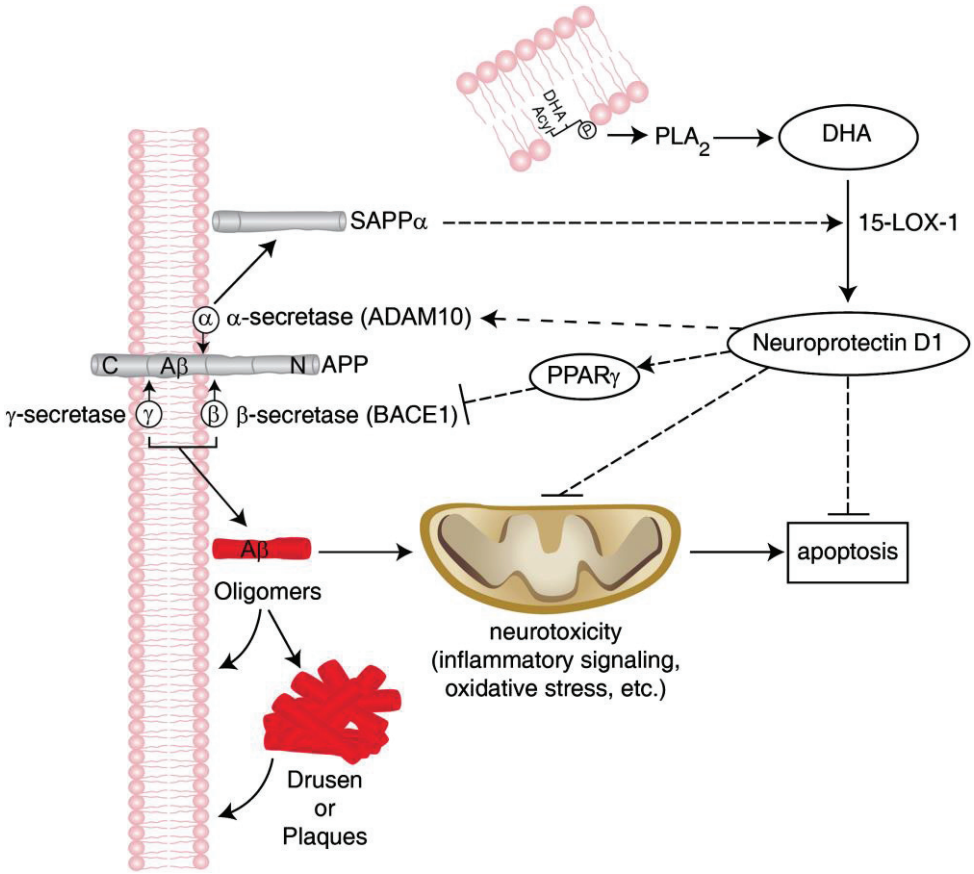


Figure 31. Action de la NPD1 sur la formation des plaques amyloïdiennes (Bazan, N.G. 2013).

La NPD1 n'est pas le seul métabolite impliqué dans cette maladie. Il semblerait que la voie entière de résolution de l'inflammation soit perturbée durant la maladie d'Alzheimer. En effet, d'après deux études récentes, les niveaux de la MaR1, NPD1, RvD1 et LXA_4 sont diminués dans les hippocampes et le cortex entorhinal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer comparé à des sujets contrôles ayant le même âge (Wang, X. *et al.* 2015 ; Zhu, M. *et al.* 2016). De plus, d'après Zhu et ses collaborateurs, des études *in vitro* montrent que la LXA_4, la MaR1, la RvD1 et la PDX exerceraient des activités neuroprotectrices (augmentation de la viabilité et de la survie cellulaire) et que la MaR1 et la RvD1 diminueraient l'inflammation induite par les peptides amyloïdes Aβ42 dans la microglie humaine (Zhu, M. *et al.* 2016).

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

L'ensemble des données présentes dans la littérature souligne le rôle essentiel des AGPI et de leurs dérivés oxygénés dans le fonctionnement cérébral durant toutes les étapes de la vie. De ce fait, lors de l'altération d'un processus cérébral, ces différents acides gras sont directement impliqués et pourraient représenter une cible thérapeutique très importante. A ce jour, différents métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA ont été caractérisés dans le cerveau. Cependant, cette caractérisation est souvent réalisée dans des études différentes, ne permettant pas de comparer le niveau de chaque métabolite.

Ainsi, l'objectif principal de ce travail est de réaliser une cartographie des différents métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA présents dans le cerveau en conditions physiologiques ou physiopathologiques.

Pour cela, nous avons tout d'abord dû développer une méthode d'analyse en chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) permettant de séparer et de quantifier ces différents métabolites en une seule analyse. Au cours de ce travail analytique, nous nous sommes particulièrement intéressés à la séparation par UHPLC-MS/MS de deux isomères : la protectine DX et la protectine D1 dont les propriétés respectives sont encore mal identifiées dans le cerveau.

Différentes approches ont été utilisées pour quantifier dans le cerveau l'ensemble des métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA.

Dans un premier temps, la contribution du sang dans le cerveau de rat sur la quantification de nos métabolites a été évaluée. En effet, des enzymes du métabolisme oxygéné du DHA et de l'ArA, dont la 12-LOX, sont connues pour être présentes dans les cellules sanguines. Pour cela, nous avons comparé la quantité de ces métabolites dans des cerveaux de rats exsanguinés ou non exsanguinés. De plus, nous avons testé l'effet de l'addition de DHA dans les homogénats de cerveau sur la synthèse de ces métabolites oxygénés.

Généralement seuls les métabolites oxygénés libres sont pris en compte bien qu'ils peuvent s'estérifier dans les PL membranaires. Nous avons pour cela, dans un deuxième temps, recherché ces métabolites estérifiés dans les PL.

De plus, comme nous l'avons souligné dans la partie « synthèse bibliographique », les dérivés oxygénés du DHA et de l'ArA sont fortement impliqués dans la réponse inflammatoire, que ce soit dans l'initiation ou dans la résolution de l'inflammation. Ainsi certains de ces métabolites sont synthétisés uniquement en condition inflammatoire. Pour cela, nous avons étudié l'effet d'une inflammation induite par une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide sur la synthèse de ces métabolites dans le cerveau de rats.

Enfin, nous nous sommes aussi intéressés à la répartition de ces métabolites dans différentes régions du cerveau. En effet, il est connu que le DHA et l'ArA sont répartis différemment dans les structures cérébrales et que selon leur localisation dans le cerveau, ils seront impliqués dans différentes pathologies. Ainsi, il a été montré que le DHA et certains de ces dérivés étaient particulièrement diminués dans les hippocampes de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les métabolites oxygénés ont donc été quantifiés dans les hippocampes, le cervelet et le cortex, trois structures du cerveau particulièrement riches en DHA et en ArA et qui sont le siège de fonctions essentielles du cerveau.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

I Produits

- Acide docosahexaénoïque : Sigma Aldrich
- Standards de métabolites oxygénés : 4-HDoHE, 7-HDoHE, 11-HDoHE, 13-HDoHE, 14-HDoHE, 17-HDoHE, MaR1, RvD1, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 8,15-diHETE, LTB4, PGE2, PGD2, PGF2α, 15-HETE-d8 and 14,15-DiHETrE-d11 : Cayman Chemicals via Interchim
- PDX : synthétisée au sein du laboratoire (Chen, P. et al. 2009).
- PD1 : synthétisée par l'équipe de Thierry Durand de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (Montpellier, France) (Dayaker, G. et al. 2014 ; Jonasdottir, H.S. et al. 2015).
- Acétonitrile, acide acétique glacial, acide formique, ammonium, chloroforme, éthanol, éther diéthylique, hexane, méthanol et 2-propanol : Carlo Erba.
- Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine(HEPES), acide borique (H3BO3), bicarbonate de sodium (NaHCO3), borax anhydre (Na2B4O7), chlorure de magnésium (MgCl2), chlorure de potassium (KCl), chlorure de sodium (NaCl), glucose, hydroxyde de potassium (KOH), phosphate de sodium (NaH2PO4): Sigma Aldrich
- Lipopolysaccharide (Escherichia coli, sérotype 0111 :B4) : Sigma Aldrich
- Uréthane : Sigma Aldrich
- DPBS 1X, sans calcium, sans magnesium : Gibco, Introgen

II Appareils

- Balances : Mettler, Denver Instrument
- Cartouches SPE OASIS MAXTM : Waters
- Centrifugeuse GR 4.11 : Jouan
- Chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC) LC-30 : Shimadzu
- Colonne chirale OD-H (250 x 4,6 mm, 5 µm) : Chiralcel
- Colonne C18 AcquityTM UPLC (2,1 x 150 mm, 1,7 µm) : Waters
- Incubateur : Bioblock Scientific
- pH-mètre Hanna pH 210 : Bioblock Scientific
- Plaques de chromatographie sur couche mince silica gel G60 (200 x 200 x 0,25 mm) : Merck
- Spectromètre de masse Qtrap 4500 : AB Sciex
- SPE Vacuum Manifold VisiprepTM DL : Supelco

Méthodes

Pour étudier le métabolisme oxygéné du DHA et de l'ArA plus en détail, plusieurs études ont été réalisées. Ces différentes études font souvent appel aux mêmes techniques. Ainsi, afin d'alléger cette partie Matériels et Méthodes, les différentes méthodes sont présentées à la suite sans tenir compte de l'étude réalisée.

Un résumé des études réalisées est présenté ici, le détail des différentes techniques utilisées est situé dans les paragraphes suivants :

- **Quantification des dérivés oxygénés libres du DHA et de l'ArA dans les cerveaux exsanguinés et non exsanguinés de rat** (— Partie A de la Figure 32). Après leur prélèvement, les cerveaux exsanguinés et non exsanguinés sont broyés dans de l'azote liquide et les homogénats sont ensuite incubés en présence ou non de DHA. Après deux étapes d'extractions successives (liquide/liquide et en phase solide), les métabolites oxygénés libres sont analysés en UHPLC-MS/MS.

- **Quantification des dérivés oxygénés du DHA et de l'ArA estérifiés dans les PL membranaires des cerveaux exsanguinés et non exsanguinés de rat** (— Partie B de la Figure 32). Les cerveaux exsanguinés et non exsanguinés sont broyés dans de l'azote liquide et les homogénats sont incubés en présence ou non de DHA. Les PL totaux sont ensuite isolés par chromatographie sur couche mince et hydrolysés pour libérer les métabolites oxygénés estérifiés. Ces métabolites sont ensuite analysés en UHPLC-MS/MS.

- **Quantification des dérivés oxygénés libres du DHA et de l'ArA dans les cerveaux exsanguinés de rat traités au LPS** (— Partie C de la Figure 32). Une injection intrapéritonéale est pratiquée avec du sérum physiologique (rats contrôle) ou des lipopolysaccharides (LPS) (10mg/kg) pour induire une inflammation générale. Après exsanguination des rats, les cerveaux sont broyés et les homogénats sont incubés ou non avec du DHA. Après deux

étapes d'extraction successives (liquide/liquide et en phase solide), les métabolites oxygénés libres sont analysés en UHPLC-MS/MS.

- **Répartition des dérivés oxygénés libres du DHA et de l'ArA dans les structures cérébrales** (Partie D de la Figure 32). Après leur prélèvement, les cerveaux de rats exsanguinés sont dissectés pour isoler différentes régions : hippocampes, cervelet et cortex. Ces différentes fractions sont ensuite broyées indépendamment dans de l'azote liquide et les homogénats résultant sont incubés avec de l'éthanol. Après deux étapes d'extractions successives (liquide/liquide et en phase solide), les métabolites oxygénés libres sont analysés en UHPLC-MS/MS.

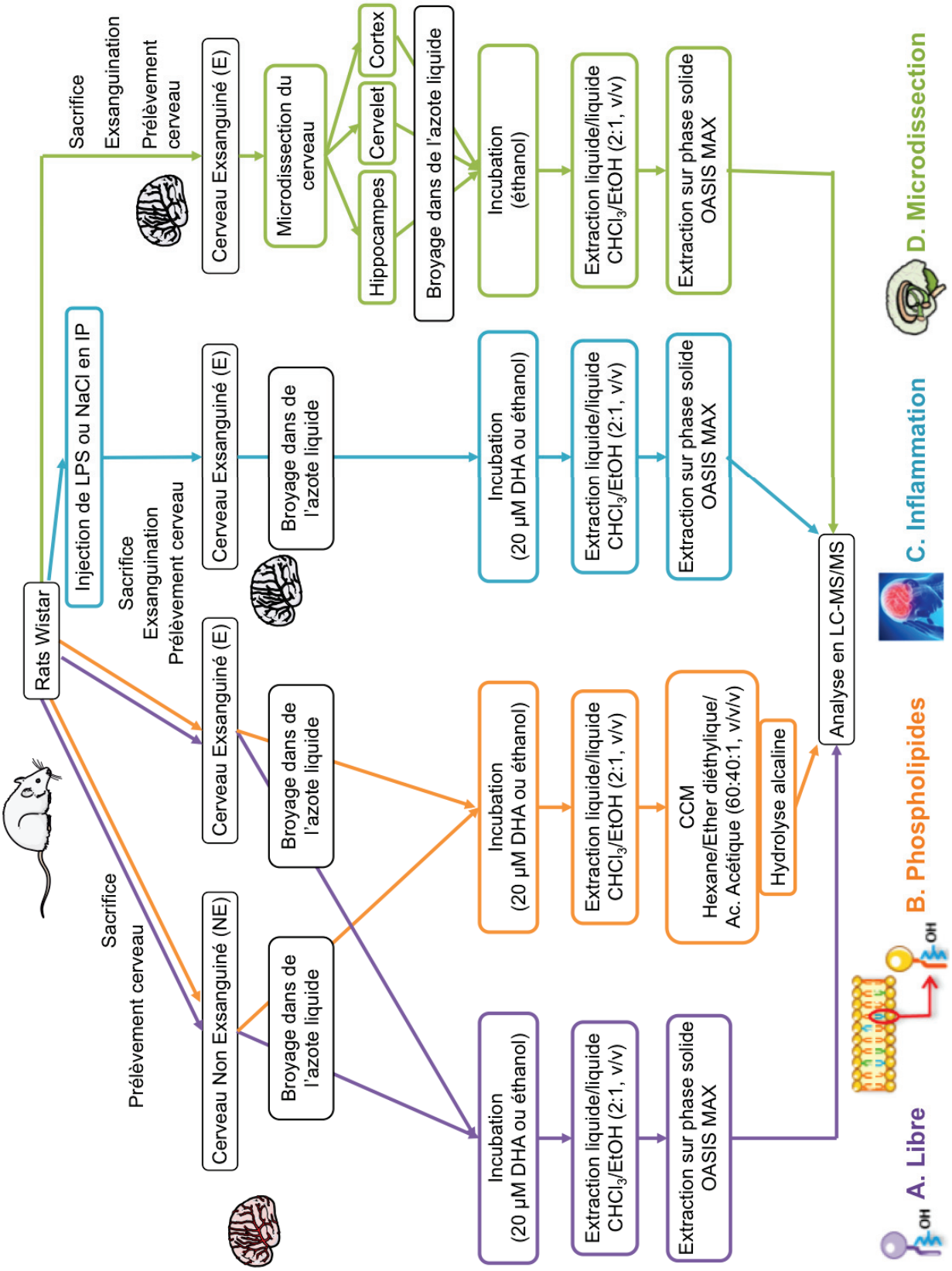


Figure 32. Présentation des différentes études réalisées.

I Préparation des échantillons biologiques

I.1 Prélèvement des cerveaux exsanguinés ou non exsanguinés de rats

Toutes les expérimentations animales sont réalisées en accord avec les principes éthiques pour les soins et l'utilisation d'animaux vertébrés dans la recherche et la formation et avec les directives du ministère français de l'agriculture (décret 87-848 suivi par le décret 2001-461) et européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (décret 2010/63/EU).

Les rats mâles Wistar âgés de 7 semaines environ (200 – 250 g) utilisés proviennent de chez Janvier Labs. Ils sont logés dans une pièce à température contrôlée (22 °C) équipée avec un cycle de lumière-obscurité et sont alimentés avec de la nourriture et de l'eau *ab libitum*.

Au cours de ce projet, les rats males Wistar sont séparés en deux groupes.

Dans le premier groupe, appelé non exsanguiné (NE), des rats sont euthanasiés par une surcharge d'anesthésique (uréthane, 0,7 g/mL) et immédiatement décapités. Les cerveaux sont rapidement prélevés et congelés dans de l'azote liquide puis stockés à – 80 °C.

Dans le deuxième groupe, appelé exsanguiné (E), des rats sont euthanasiés comme décrit précédemment. Lors de cette exsanguination, consistant à enlever le sang de l'organisme, l'aorte est sectionnée et le sang s'écoule hors de l'organisme. Le cœur est ensuite directement perfusé avec du sérum physiologique (NaCl, 0,9 %) pendant 3 minutes. Après décapitation, les cerveaux sont prélevés et congelés dans de l'azote liquide. Le processus dure 4 minutes entre l'euthanasie et le prélèvement du cerveau. Ces cerveaux, qui ne contiennent plus de traces de sang, sont ensuite stockés à – 80 °C.

Selon l'étude réalisée, le nombre de rats utilisés varie :

- Pour l'étude des métabolites oxygénés libres, cinq rats ont été utilisés dans chaque groupe (E vs NE).
- Pour l'étude des métabolites oxygénés estérifiés dans les PL, six rats ont été utilisés dans chaque groupe (E vs NE).
- Pour l'étude de la répartition des métabolites oxygénés libres dans les différentes structures cérébrales, neuf rats exsanguinés ont été utilisés.

I.2 Traitement des rats par des lipopolysaccharides

Afin d'induire une inflammation générale, les rats ont reçu des injections de lipopolysaccharide (LPS). Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Dr. Marlène Wiart et son étudiante en thèse Violaine Hubert.

Pour cela, trois rats mâles Wistar (Janvier Labs) ont reçu une injection intrapéritonéale (10 mg/kg de LPS dilué dans 300 µL de NaCl) de LPS (*Escherichia coli*, sérotype 0111:B4) et trois autres rats une injection intrapéritonéale de NaCl (rats contrôle). Deux jours plus tard (temps nécessaire pour provoquer une inflammation générale), les rats sont euthanasiés et traités selon le protocole décrit précédemment (*Cf. §.I.1*).

I.3 Microdissection des cerveaux

La dissection des différentes régions du cerveau (cervelet, cortex et hippocampes) a été réalisée en collaboration avec le Dr. Sandrine Parrot.

Après l'exsanguination du rat, le cerveau est prélevé (comme décrit paragraphe I.1) et est rapidement rincé dans une solution fraîche et stérile de DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered salines) 1X sans calcium, ni magnésium afin de rincer le cerveau et empêcher la

fuite des composés intracellulaires par des mécanismes calcium-dépendants. Chaque cerveau est ensuite disséqué à froid sur des blocs de froid recouverts de papier d'aluminium à l'aide d'une lame de scalpel stérile n°22. Le tronc cérébral est dans un premier temps écarté afin de faciliter la dissection. Le cervelet est prélevé en premier puis les deux hémisphères sont séparés. Le cortex est ensuite prélevé en retirant la structure la plus externe de l'hémisphère et en réséquant bien le corps calleux. Enfin, l'hippocampe, structure du cortex limbique présente dans les deux hémisphères, est prélevé. Cette structure est facilement repérable chez le rat car elle est placée sous le cortex et présente une forme d'hippocampe ou encore de corne de bélier.

Chaque dissection de cerveau est réalisée en moins de 5 minutes car le tissu cérébral se dégrade assez vite post-mortem sans congélation.

Ces structures étant très petites, leur contenu en lipides est très faible. Afin de pouvoir détecter les différents métabolites en UHPLC-MS/MS, nous avons dû grouper plusieurs structures identiques. Ainsi, nous avons broyé indépendamment des pools de 3 cortex, de 3 cervelets et de 4 hippocampes.

I.4 Broyage des cerveaux et incubation des homogénats

Les cerveaux exsanguinés et non exsanguinés, ainsi que les différentes régions du cerveau (hippocampes, cervelet et cortex), sont homogénéisés séparément dans l'azote liquide, permettant d'éviter toute oxydation lors du broyage.

Les homogénats sont ensuite incubés dans du tampon Tyrode-HEPES glucose (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 11,9 mM $NaHCO_3$, 0,41 mM NaH_2PO_4, 1 mM $MgCl_2$, 5,5 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7,35) en présence ou non de 20 µM de DHA apportés dans de l'éthanol pendant 30 minutes à 37 °C. A la fin de cette incubation, 1 nmol de 15-HETE-d8, de 14,15-DiHETrE-d11, de PGE_2-d4, de PGD_2-d4 et de TxB_2-d4 sont ajoutés comme standards internes aux échantillons.

II Extraction des lipides

II.1 Extraction liquide/liquide des lipides

Les homogénats sont ensuite acidifiés à pH 3 avec de l'acide acétique glacial et les lipides sont extraits par 9 volumes d'un mélange de chloroforme/éthanol (2:1, v/v). Après décantation, la phase organique inférieure est récupérée. Une deuxième extraction de la phase est réalisée. Les phases organiques sont réunies puis évaporées sous azote. Le résidu est ensuite repris par 1 mL d'un mélange chloroforme/éthanol (2:1, v/v) et stocké sous azote à – 20°C.

II.2 Extraction en phase solide des métabolites oxygénés libres

Les dérivés oxygénés extraits de l'homogénat sont ensuite purifiés par une extraction sur phase solide. Les cartouches OASIS MAX (Waters) utilisées pour cette extraction sont lavées avec 6 mL de méthanol et équilibrées avec 6 mL d'eau. Après l'évaporation sous azote liquide du chloroforme et de l'éthanol, l'échantillon est reconstitué dans 100 µL d'éthanol et 10 mL de tampon borate de sodium 0,2 M pH 8,2 avant d'être chargé dans la cartouche. Ensuite, la cartouche est lavée avec 8 mL d'une solution d'ammoniaque 1,2 M suivi par 8 mL de méthanol, pour éliminer les composés neutres ou basiques. Les métabolites oxygénés sont élués par un mélange d'acétonitrile et de 2-propanol contenant 5 % d'acide formique (ACN:2-propanol:acide formique, 60:40:5, v/v/v). Le solvant est évaporé sous azote gazeux et le résidu repris par 1 mL d'un mélange chloroforme/éthanol (2:1, v/v) est stocké sous azote à – 20°C.

II.3 Isolement des métabolites oxygénés estérifiés dans les phospholipides

Les PL totaux sont séparés des autres classes de lipides par chromatographie sur couche mince (CCM) réalisée sur une plaque de silice en utilisant le mélange de solvant hexane/éther diéthylique/acide acétique glacial (60:40:1, v/v/v). Avec ce système de solvant, les PL totaux restent au niveau de la ligne de dépôt, alors que les lipides moins polaires migrent plus haut sur la plaque. Après cette migration, le gel de silice contenant les PL est gratté au niveau du dépôt. Les standards internes, 15-HETE-d8 et 14,15-DiHETrE-d11 (1,5 nmol de chaque), sont ajoutés à la fraction de PL avant leur hydrolyse alcaline par 5 % d'hydroxyde de potassium dissout dans du méthanol pendant 1 h à 100 °C. Les acides gras sont acidifiés à pH 3 par de l'acide chlorhydrique 3N. Ils sont ensuite extraits deux fois du gel de silice par un mélange de chloroforme/éthanol (2:1, v/v). Les échantillons sont centrifugés à 600 g durant 5 min à 4 °C afin de récupérer les surnageants contenant les dérivés oxygénés. Après évaporation sous azote, le résidu sec est repris par 1 mL de chloroforme/éthanol (2:1, v/v) puis stocké sous azote à – 20°C.

III Analyse des métabolites oxygénés en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS)

III.1 Méthode d'analyse en UHPLC-MS/MS

Après évaporation sous azote, le résidu sec est repris par du méthanol. Les métabolites oxygénés en solution sont séparés par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) (Shimadzu LC-30) équipée avec une colonne C18 Acquity UPLC (2,1 x 150 mm, 1,7 µm). Cette élution se fait avec un débit de 0,3 mL/min à 60 °C en utilisant un gradient linéaire. La phase mobile A est constituée par de l'eau acidifiée par 0,1 % d'acide

acétique glacial et la phase mobile B est du méthanol contenant 0,1 % d'acide acétique glacial. Le gradient linéaire suivant est utilisé : 0 % de B à 0 min, 65 % de B à 20 min et 100 % de B à 40 min.

Le système de chromatographie liquide (LC) est couplé avec un spectromètre de masse à trappe d'ion quadripolaire (Qtrap 4500, AB Sciex). Le spectromètre de masse est équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) et opère avec une température de source de 250 °C, un voltage de source de – 4500 V, un réglage du gaz rideau à 40 et de l'azote comme gaz de collision. Les analyses sont réalisées en mode d'ionisation négatif avec le mode « multiple reaction monitoring » (MRM) pour identifier et quantifier les métabolites.

Un mélange de standards des différents métabolites oxygénés (17-HDoHE, 14-HDoHE, 11-HDoHE, 7-HDoHE, 4-HDoHE, 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE, 8,15-diHETE, LTB_4, PDX, PD1, MaR1, RvD1, PGE_2, PGD_2, $PGF_{2\alpha}$, 14,15-diHETrE-d_{11} et 15-HETE-d_8) présents en quantité équivalente (3 pmoles) est analysé en UHPLC-MS/MS. Les signaux d'UHPLC-MS/MS des acides monohydroxylés ont été normalisés par rapport à la réponse du 15-HETE-d8, utilisé par ailleurs comme standard interne pour la quantification de ces métabolites. De la même façon, les signaux des PG et des acides gras di- et trihydroxylés ont été normalisés par rapport à la réponse du 14,15-DiHETrE-d11 aussi utilisé comme standard interne. Ces facteurs de réponses sont intégrés dans la quantification de chaque métabolite.

Les différents paramètres servant à l'analyse par UHPLC-MS/MS des différents métabolites sont présentés dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Paramètres utilisés en UHPLC-MS/MS pour analyser les métabolites oxygénés du DHA et de l'ArA. m/z : transitions massiques optimisées ; RT : temps de rétention ; CV : voltage de cône ; CE : énergie de collision.

Métabolite	Ion précurseur (m/z)	Ion fils (m/z)	RT (min)	CV (eV)	CE (eV)	Facteurs de réponses
PGE_2	351.2	175.1	28.32	-65	-20	1.65
PGD_2	351.2	233.2	28.66	-65	-20	0.80
$PGF_{2\alpha}$	353.3	193.1	29.25	-90	-32	0.29
$PGF_{2\alpha}$	353.3	309.0	29.25	-90	-32	
RvD_1	375.2	215.1	30.26	-50	-20	0.14
8,15-diHETE	335.1	235.2	34.30	-45	-20	0.18
PDX	359.2	152.9	35.01	-50	-20	1.12
PDX	359.2	206.2	35.01	-50	-20	
PD1	359.2	152.9	35.51	-50	-20	0.83
PD1	359.2	206.2	35.51	-50	-20	
MaR_1	359.2	250.1	35.56	-50	-20	0.10
LTB_4	335.1	195.2	35.88	-70	-20	0.62
14,15-diHETrE-d_{11}	348.6	207.0	37.51	-70	-24	
15-HETE-d_8	327.3	226.1	40.85	-65	-19	
15-HETE	319.2	219.1	41.00	-65	-19	0.73
17-HDoHE	343.2	245.1	41.35	-80	-18	0.10
12-HETE	319.2	179.1	41.68	-70	-21	0.90
14-HDoHE	343.2	205.1	41.70	-80	-18	0.27
11-HDoHE	343.2	149.2	42.03	-80	-13	0.25
7-HDoHE	343.2	141.1	42.17	-80	-18	0.38
5-HETE	319.2	115.1	42.57	-90	-21	0.39
4-HDoHE	343.2	101.1	43.29	-80	-18	0.43

III.2 Séparation des deux isomères de protectine par UHPLC-MS/MS

La PDX et la PD1 sont deux isomères avec les mêmes paramètres d'analyse en spectrométrie de masse (voir Tableau 2) et des temps de rétention très proches. Pour confirmer leur identification, 0,1 pmoles de PDX et 0,1 pmoles de PD1 ont été ajoutés séparément dans les échantillons de cerveau. Après évaporation du solvant sous azote, les échantillons sont repris par un faible volume de méthanol avant leur analyse par UHPLC-MS/MS.

III.3 Détermination de la chiralité des métabolites oxygénés par LC-MS/MS

Afin de déterminer la stéréochimie des métabolites oxygénés, une chromatographie chirale est réalisée. Cette méthode d'analyse est adaptée de celles publiées par (Lee, S.H. *et al.* 2003 ; Lê, Q.H. *et al.* 2015).

Afin d'améliorer la séparation des métabolites sur la colonne chirale, les échantillons sont au préalable estérifiés à du pentafluorobenzyl bromide (PFB-Br). Ainsi, les échantillons sont traités avec 60 µL d'acétonitrile anhydre, 20 µL de PFB-Br (35 % de PFB-Br dans acétonitrile anhydre) et 20 µL de N-éthyl diisopropylamine (DIPE) (catalyseur de la réaction captant les protons formés) et chauffés pendant 30 min à 40 °C. La solution est ensuite évaporée sous azote et le résidu sec est repris par 100 µL d'un mélange hexane/éthanol (97:3, v/v).

La séparation des métabolites en chromatographie chirale s'effectue sur une colonne chirale Chiralcel OD-H de 25 cm de long avec un diamètre externe de 4,6 mm remplie avec des particules de gel de silice de 5 µm recouverte de cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate). Cette séparation se fait avec un débit de 1 mL/min à 30 °C en utilisant un gradient linéaire. La phase mobile A est constituée d'hexane et la phase mobile B d'un mélange de méthanol et d'isopropanol (1:1, v/v). Le gradient est délivré comme suivi : 2 % de B à 0 min, 4 % de B à 13 min, 30 % de B à 15 min et 50 % de B à 22 min.

La spectrométrie de masse est conduite par un spectromètre de masse à trappe d'ion quadripolaire (Qtrap 4500, AB Sciex) équipé avec une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (ACPI). Il opère avec une température de source de 250 °C, un voltage de source de – 4500 V, un réglage du gaz rideau à 40 et de l'azote comme gaz de collision. Le mode d'ionisation négatif utilisant un « multiple reaction monitoring » (MRM) est utilisé pour l'identification et la quantification des métabolites.

Du fait que le groupement PFB-Br est perdu lors de la première fragmentation, des paramètres de spectrométrie de masse identiques à ceux présentés Tableau 2 sont utilisés.

IV Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism version 6, en utilisant les tests anova à un ou deux facteurs associés au test de Tukey. Les valeurs sont exprimées comme des moyennes ± l'erreur standard de la moyenne de *n* expériences indépendantes ($n \geq 3$), avec une significativité statistique à $p < 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre étude vise à identifier et à quantifier les métabolites oxygénés du DHA et de l'ArA afin d'avoir une vue d'ensemble de ces voies métaboliques dans le cerveau et ainsi réaliser leur cartographie.

Pour cela, une première partie du projet a été consacrée au développement de plusieurs méthodes ; l'étude du métabolisme oxygéné des AGPI dans le cerveau n'ayant jamais été réalisée dans le laboratoire. De plus, nous avons développé et optimisé une méthode d'UHPLC-MS/MS pour identifier les différents métabolites dans les cerveaux.

Dans un premier temps, différentes méthodes de broyage du cerveau ont été testées afin de limiter la dégradation et l'oxydation des lipides. En effet, les lipides, et en particulier les AGPI, sont très sensibles à l'oxygène. Du fait de la présence d'insaturation dans leur chaîne carbonée, les AGPI peuvent s'autooxyder et ainsi former des dérivés oxygénés. Le broyage des cerveaux dans l'azote liquide s'est avéré être la méthode protégeant le plus les lipides de cette autooxydation. L'utilisation d'antioxydant tel que l'hydroxytoluène butylé ou BHT pour limiter ce phénomène n'était pas compatible avec l'incubation des homogénats de cerveau avec du DHA. L'ajout d'un antioxydant inhiberait les enzymes impliquées dans le métabolisme du DHA. Le maximum de précautions a ainsi été pris afin de limiter ce phénomène oxydatif (stockage des échantillons sous azote gazeux, manipulation sur glace…). Différentes méthodes d'extraction des métabolites oxygénés du tissu cérébral ont ensuite été testées. Un travail d'optimisation a notamment été réalisé au niveau de l'extraction sur phase solide. Des tests réalisés sur une colonne en phase inverse C18 classique et sur une colonne mixte (phase inverse et échangeuse d'anions (OASIS MAX, Waters®)) ont montré que les colonnes mixtes permettaient un meilleur rendement de récupération des dérivés oxygénés.

L'UHPLC-MS/MS étant nouvellement acquise au début de ce projet, nous avons dans un deuxième temps développé une méthode d'analyse en s'inspirant de données trouvées dans la littérature. Un travail d'optimisation réalisé sur les différents paramètres d'UHPLC-MS/MS nous a permis par la suite de séparer, d'identifier et de quantifier en une seule étape les différents métabolites oxygénés. Différents paramètres de spectrométrie de masse (transitions massiques caractéristiques des molécules, énergie de collision…) ont ainsi été

testés afin d'assurer une identification correcte des molécules et leur bonne détection. Les paramètres issus de ce travail d'optimisation sont présentés dans le Tableau 2 (*Cf. §.III.1 de la partie « Matériels et Méthodes »*). La séparation chromatographique est une étape cruciale en UHPLC-MS/MS. Lors de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux métabolites mono-, di- et tri-hydroxylés formés à partir du DHA et de l'ArA. Au sein de ces familles de molécules, plusieurs isomères sont présents (énantiomères pour les dérivés monohydroxylés (5-, 12- et 15-HETE par exemple) et diastéréoisomères pour les métabolites dihydroxylés (protectines DX et D1 par exemple)). Du fait de leurs structures très proches, leur séparation en chromatographie liquide peut s'avérer difficile et a nécessité l'optimisation du gradient de solvants utilisé pour l'élution. Plusieurs systèmes de solvants (eau et méthanol associés dans des proportions différentes et acidifiés ou non) et plusieurs gradients (pourcentage de chaque solvant au cours de l'analyse) ont été testés. Ceci est par exemple vrai pour la séparation de la PDX et de la PD1, deux diastéréoisomères ne différant que par la stéréochimie de leur carbone 10 et la géométrie de leur triène conjugué. Les premiers essais ne permettaient pas de séparer correctement ces molécules, leurs pics se chevauchaient. Au fur et à mesure des optimisations de notre méthode, nous sommes parvenus à séparer correctement ces deux isomères avec une vallée nulle entre les deux pics (Figures 34 et 38). Les conditions d'analyse optimales ont ainsi été recherchées pour tous les métabolites. Au final, un gradient utilisant de l'eau et du méthanol acidifiés à pH 3 avec de l'acide acétique glacial a permis une résolution optimale des différents métabolites oxygénés.

I Caractérisation des métabolites oxygénés en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem

Afin d'identifier les différents métabolites dérivés de l'ArA et du DHA dans le cerveau, la technique de chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) est une des méthodes les plus performantes. Elle permet de séparer et d'identifier en une seule analyse une multitude de métabolites oxygénés présents dans un échantillon.

Au cours de l'analyse en UHPLC-MS/MS, les métabolites contenus dans un échantillon sont dans un premier temps séparés sur une colonne C18 en fonction de leur polarité puis détectés par un spectromètre de masse en mode MRM. Ce type de détecteur permet de sélectionner l'ion moléculaire de masse m/z, appelé ion parent, correspondant au métabolite que l'on veut mesurer. Ce dernier est fragmenté dans une chambre de collision et l'un des ions fils produits est sélectionné. Par exemple, l'ion parent à m/z 359 a été utilisé pour sélectionner la PDX (en rouge sur la Figure 33) et les deux ions fils majoritaires à m/z 206 et 153 (en orange sur la Figure 33) ont été choisis pour l'indentification de cette molécule. Les paramètres d'ionisation et de mesure des autres métabolites sont consignés dans le Tableau 2 (*Cf. §.III.1 de la partie « Matériels et Méthodes »*).

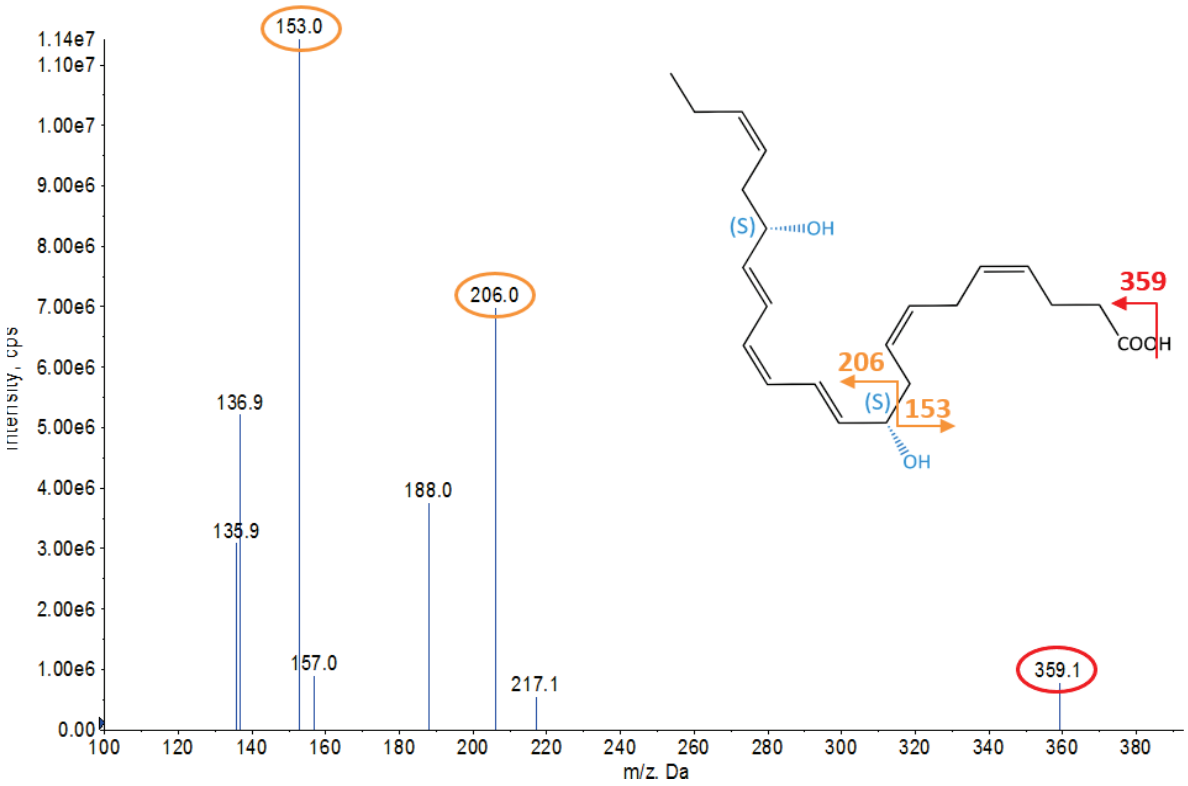


Figure 33. Spectre de masse de la PDX obtenu par analyse en UHPLC-MS/MS.

Un chromatogramme UHPLC-MS/MS type de différents composés oxygénés issus des AGPI est présenté Figure 34. Ce mélange comporte 19 molécules commerciales en quantité équivalente. Dans cet exemple, 3 picomoles ont été injectés. Les molécules se séparent en fonction de leur polarité, les plus polaires étant éluées les premières sur cette colonne de silice greffée C18. Ainsi, les composés les plus polaires, les prostanoïdes (PGE_2, PGD_2 et $PGF_{2\alpha}$), sont élués en premier, suivis par le composé trihydroxylé RvD1. Ensuite, les métabolites dihydroxylés (8,15-diHETE, PDX, PD1, MaR1 et LTB_4) sont élués. Finalement, le gradient linéaire utilisé pour l'élution permet la séparation des composés monohydroxylés (17-, 14-, 11-, 7-, 4-HDoHE et 15-, 12-, 5-HETE). Tous ces métabolites sont bien résolus avec un minimum d'interférences entre chaque pic.

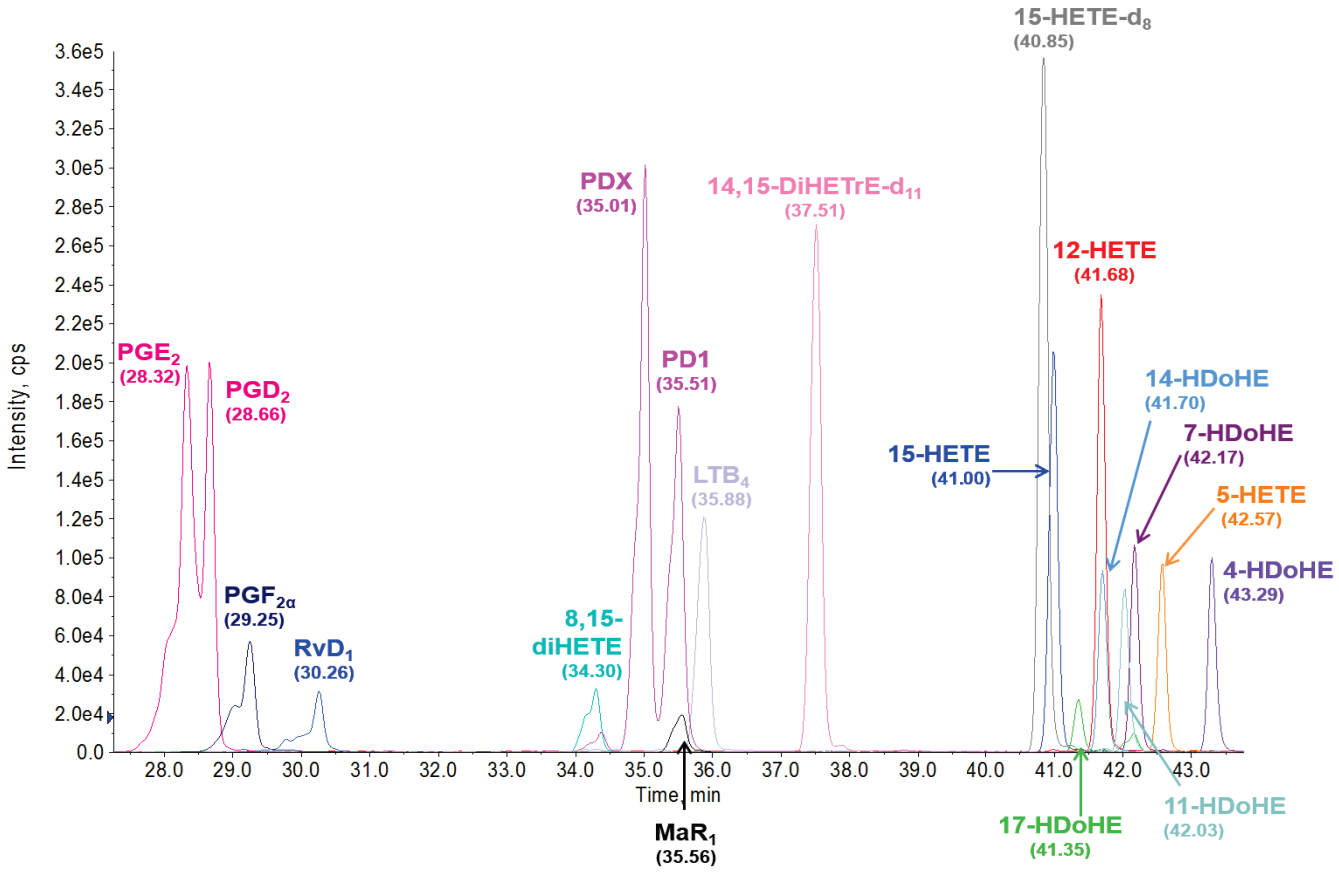


Figure 34. Chromatogramme reconstitué obtenu par analyse en UHPLC-MS/MS d'un mélange de standards de métabolites oxygénés.

Les temps de rétention des différents métabolites sont déterminés grâce à l'analyse de ces molécules standards commerciales dans les mêmes conditions. Enfin, la quantification de ces métabolites est réalisée par rapport à des standards internes marqués aux isotopes stables et corrigée par leur facteur de réponse respectif.

II Métabolites oxygénés non estérifiés dérivés de l'ArA et du DHA

La plupart des études sur le métabolisme oxygéné des AGPI dans le cerveau rapportées dans la littérature sont réalisées sur des cerveaux non exsanguinés. Or, compte tenu du fait que le sang et en particulier les cellules sanguines contiennent les enzymes LOX et COX, il est important de faire les mesures des métabolites oxygénés sur des cerveaux exsanguinés.

La méthode d'UHPLC-MS/MS décrite auparavant a été utilisée pour estimer les quantités de différents métabolites oxygénés dérivés de l'ArA et du DHA dans les cerveaux exsanguinés (E) et non exsanguinés (NE). Seize métabolites ont été détectés dans ces échantillons (Figure 35 et Figure 36).

II.1 Caractérisation des métabolites oxygénés libres dans les cerveaux exsanguinés et non exsanguinés.

Dans cette étude, plusieurs métabolites dérivés de l'ArA et du DHA non estérifiés ont été trouvés à différents niveaux à la fois dans les cerveaux E (représentés en bleu sur la Figure 35 et la Figure 36) et NE (représentés en rouge sur la Figure 35 et Figure 36), certains n'ayant encore jamais été décrits à notre connaissance dans le cerveau (exemple de la PDX).

Dans les cerveaux E et NE, les métabolites monohydroxylés sont les produits oxygénés les plus abondants (15337 ± 2746 pmoles par gramme de cerveau dans les cerveaux NE en conditions basales par exemple, Figure 35 A). L'activité des trois LOX (5-, 12- et 15-LOX) est bien présente dans le cerveau et convertit l'ArA et le DHA en métabolites monohydroxylés (15-, 12- et 5-HETE pour les dérivés de l'ArA et 17-, 14-, 11-, 7- et 4-HDoHE pour les dérivés du DHA) (Figure 36 A). De plus, des petites quantités de métabolites di- et trihydroxylés ont été trouvées en conditions basales (61 ± 9 pmoles par gramme de cerveau dans les cerveaux NE) (Figure 35 B). Ainsi, la PDX, le 8,15-diHETE et le LTB_4 ont été identifiés dans les cerveaux E et NE ainsi que la RvD1 détectée uniquement dans les cerveaux NE

(Figure 36 B). Certains métabolites dihydroxylés n'ont pu être détectés dans les cerveaux E ou NE avec nos conditions d'analyse. C'est le cas de la PD1 et de la MaR1 qui ne sont pas détectées dans ces cerveaux (Figure 36 B). Ceci peut être expliqué par le fait que ces deux molécules ont été décrites comme étant synthétisées dans des conditions inflammatoires uniquement. De plus, la MaR1 n'a encore jamais été décrite dans le cerveau.

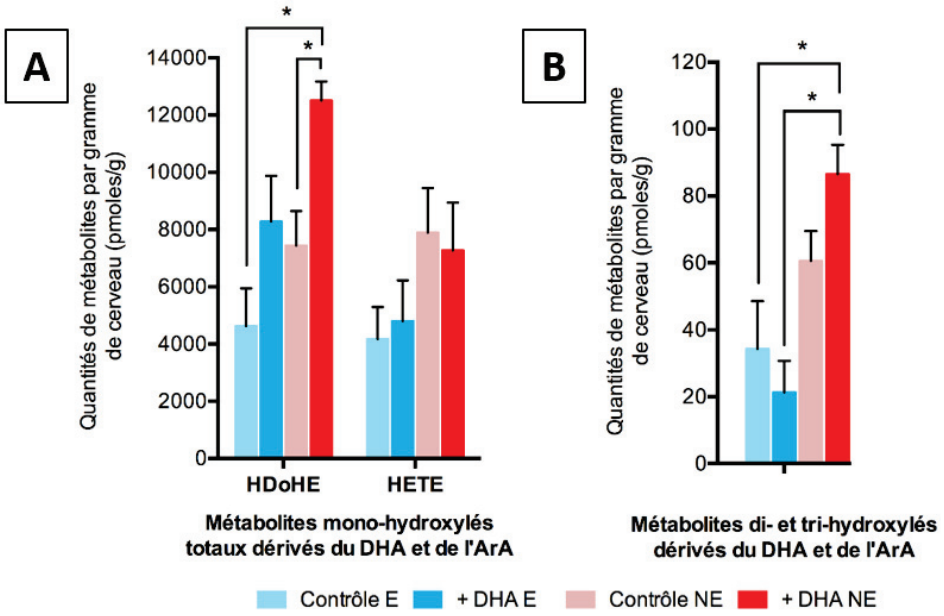


Figure 35. Métabolites oxygénés non estérifiés dans les homogénats de cerveau de rat. Les quantités d'HDoHE et d'HETE totaux dans les cerveaux exsanguinés (E) et non-exsanguinées (NE) sont présentées sur la partie A et celles des métabolites di- et trihydroxylés totaux sur la partie B. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de cinq analyses indépendantes (n = 5) et sont exprimés en picomoles par gramme de cerveau. Pour chaque métabolite oxygéné, *p < 0.05. N.D. : non détecté avec nos conditions d'analyse

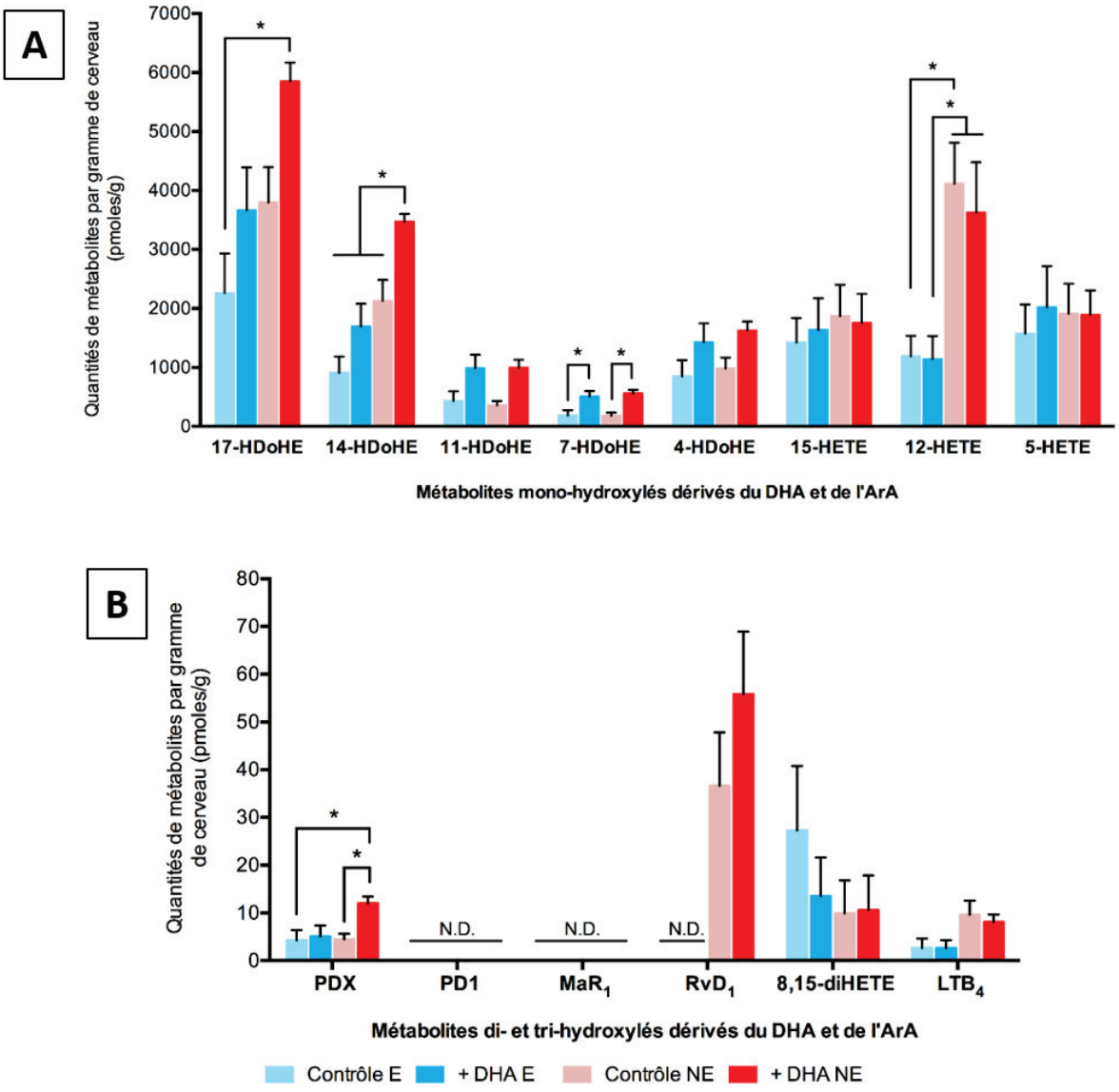


Figure 36. Métabolites oxygénés non estérifiés dans les homogénats de cerveau de rat. Les quantités des métabolites monohydroxylés dérivés du DHA et de l'ArA dans les cerveaux exsanguinés (E) et non-exsanguinés (NE) sont présentées sur la partie A et celles des métabolites di- et trihydroxylés dans la partie B. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de cinq analyses indépendantes (n = 5) et sont exprimés en picomoles par gramme de cerveau. Pour chaque métabolite oxygéné, *p < 0.05. N.D. : non détecté avec nos conditions d'analyse.

II.2 Effet de l'addition de DHA sur le métabolisme oxygéné du DHA et de l'ArA

Certains dérivés du DHA exercent des effets bénéfiques pour l'organisme, tels que des effets anti-inflammatoires ou anti-agrégants (*Cf. §.II.3 de la partie « Synthèse bibliographique »*). De plus, la concentration cérébrale de certains métabolites peut diminuer dans certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (*Cf. §.III.3.4.3 de la partie « Synthèse bibliographique »*). Ainsi, nous nous sommes demandés s'il était possible d'augmenter la quantité de certains de ces métabolites dans le cerveau. Pour répondre à cette question, les homogénats de cerveau ont été incubés avec du DHA exogène.

L'addition de DHA dans les homogénats de cerveau de rat augmente la quantité totale de métabolites monohydroxylés dérivés du DHA (HDoHE) dans les cerveaux NE (12506 ± 665 pmoles par gramme de cerveau *vs* 7442 ± 1204 pmoles par gramme de cerveau, Figure 35 A). Cette augmentation des quantités globales n'est pas retrouvée dans les cerveaux E. L'addition de DHA se traduit par une augmentation des métabolites monohydroxylés 17-, 14-, 11- et 7-HDoHE. Le 4-HDoHE, synthétisé à priori *via* la 5-LOX comme le 7-HDoHE, ne varie que très peu. L'ajout de DHA induit également un accroissement de la quantité du métabolite dihydroxylé PDX présent dans les cerveaux NE (12 ± 2 pmoles par gramme de cerveau *vs* 5 ± 1 pmoles par gramme de cerveau, Figure 36 B). L'augmentation de la quantité des métabolites dérivés du DHA après incubation avec ce dernier indique clairement que les 5-, 12- et 15-LOX sont bien présentes dans les cerveaux. En effet, si cette synthèse était non enzymatique, les dérivés de l'ArA seraient aussi augmentés. Une addition de DHA pourrait donc augmenter la quantité de certains métabolites bioactifs et ainsi amplifier leurs effets ou combler leurs déficits dans certaines pathologies.

Au contraire, les quantités des différents métabolites dérivés de l'ArA ne sont pas modifiées par l'addition de DHA (Figure 35 et Figure 36).

II.3 Intérêt de l'exsanguination sur la mesure des métabolites oxygénés libres

Les LOX impliquées dans le métabolisme oxygéné de ces deux AGPI sont présentes dans les cellules sanguines. La 12-LOX est par exemple fortement exprimée dans les plaquettes sanguines. En conséquence, la présence de sang dans le cerveau peut biaiser le dosage des métabolites oxygénés détectés dans le cerveau. L'exsanguination permet de discriminer l'origine de ces métabolites.

Dans nos conditions basales, l'acide gras monohydroxylé le plus abondant est le 17-HDoHE, sauf dans les cerveaux NE où le 12-HETE est le métabolite monohydroxylé majoritaire. Les quantités de 17-HDoHE, de 14-HDoHE et de 12-HETE ont tendance à être plus importantes dans les cerveaux NE que dans les cerveaux E. Cette différence est significative pour le 12-HETE (11867 ± 348 pmoles par gramme de cerveau dans les cerveaux E *vs* 4115 ± 691 pmoles par gramme de cerveau dans les cerveaux NE en conditions basales, Figure 36 A). De plus, l'augmentation de la quantité du 14-HDoHE après l'addition de DHA dans les cerveaux NE n'est pas observée dans les cerveaux E, ce qui pourrait être expliqué par le fait que les enzymes responsables de la conversion du DHA en 14-HDoHE sont fortement diminuées par l'exsanguination. Ceci montre clairement que l'exsanguination est indispensable pour ces mesures. Lorsque nous considérons les métabolites oxygénés de l'ArA (12-HETE + 15-HETE) et du DHA (14-HDoHE + 17-HDoHE) issus de l'action des 15-LOX et 12-LOX, la somme des quantités mesurées est doublée dans les cerveaux NE (11907 pmoles par gramme de cerveau) comparée à celle dans les cerveaux E (5775 pmoles par gramme de cerveau). Ceci suggère que les acides gras monohydroxylés circulants sont présents en quantité similaire dans le sang cérébral et dans le tissu cérébral et laisse présager d'importants échanges entre ces deux compartiments.

Par ailleurs, l'exsanguination a un effet très marqué sur la RvD1 (Figure 36 B). En effet, cette dernière est présente seulement dans les cerveaux NE, ce qui suggère qu'elle n'est pas synthétisée par les structures cérébrales mais uniquement par les cellules sanguines.

Les métabolites dihydroxylés dérivés de l'ArA (8,15-diHETE et LTB_4) et la PDX, détectés dans les cerveaux E et NE, ne sont pas affectés par cette exsanguination (Figure 36

B). En effet, ces métabolites sont synthétisés *via* l'action des 5- et 15-LOX, enzymes moins affectés par l'exsanguination comparées à la 12-LOX, enzyme plus confinée dans les plaquettes sanguines. Nous pouvons penser que ces métabolites dihydroxylés sont essentiellement formés dans le tissu cérébral. Il en est de même pour les prostanoïdes synthétisés *via* les COX. Ces derniers sont très minoritaires. Ils ne représentent qu'un dixième des produits totaux issus de la voie des LOX.

Cette exsanguination nous a permis de quantifier les métabolites lipidiques présents uniquement dans le tissu cérébral, en minimisant les interférences avec les cellules sanguines.

II.4 Identification des deux isomères de protectine par UHPLC-MS/MS

Par la voie de la 15-LOX, le DHA peut être converti en deux isomères dihydroxylés, la PDX et la PD1, différant uniquement par la stéréochimie de leur carbone 10 (S pour la PDX et R pour la PD1) et par la géométrie de leur double liaison (*E,Z,E* pour la PDX et *E,E,Z* pour la PD1). La production de la PDX fait intervenir une double lipoxygénation du DHA par la 15-LOX (Chen, P. *et al.* 2009) alors que la production de la PD1 nécessite l'intervention de la 15-LOX et d'une deuxième enzyme (époxyde hydrolase) pour hydrolyser l'intermédiaire 16,17-époxy en PD1 (Hong, S. *et al.* 2003) (Figure 37). La PD1 (également appelée neuroprotectine D1, NPD1) a déjà été décrite dans les tissus cérébraux (Marcheselli, V.L. *et al.* 2003), mais pas la PDX. Cependant, dans les résultats présentés précédemment, seule la PDX a été identifiée dans les homogénats de cerveau (Figure 36 B). Ces deux molécules étant des isomères et ayant des paramètres de fragmentation similaires, il est nécessaire de valider leur séparation chromatographique.

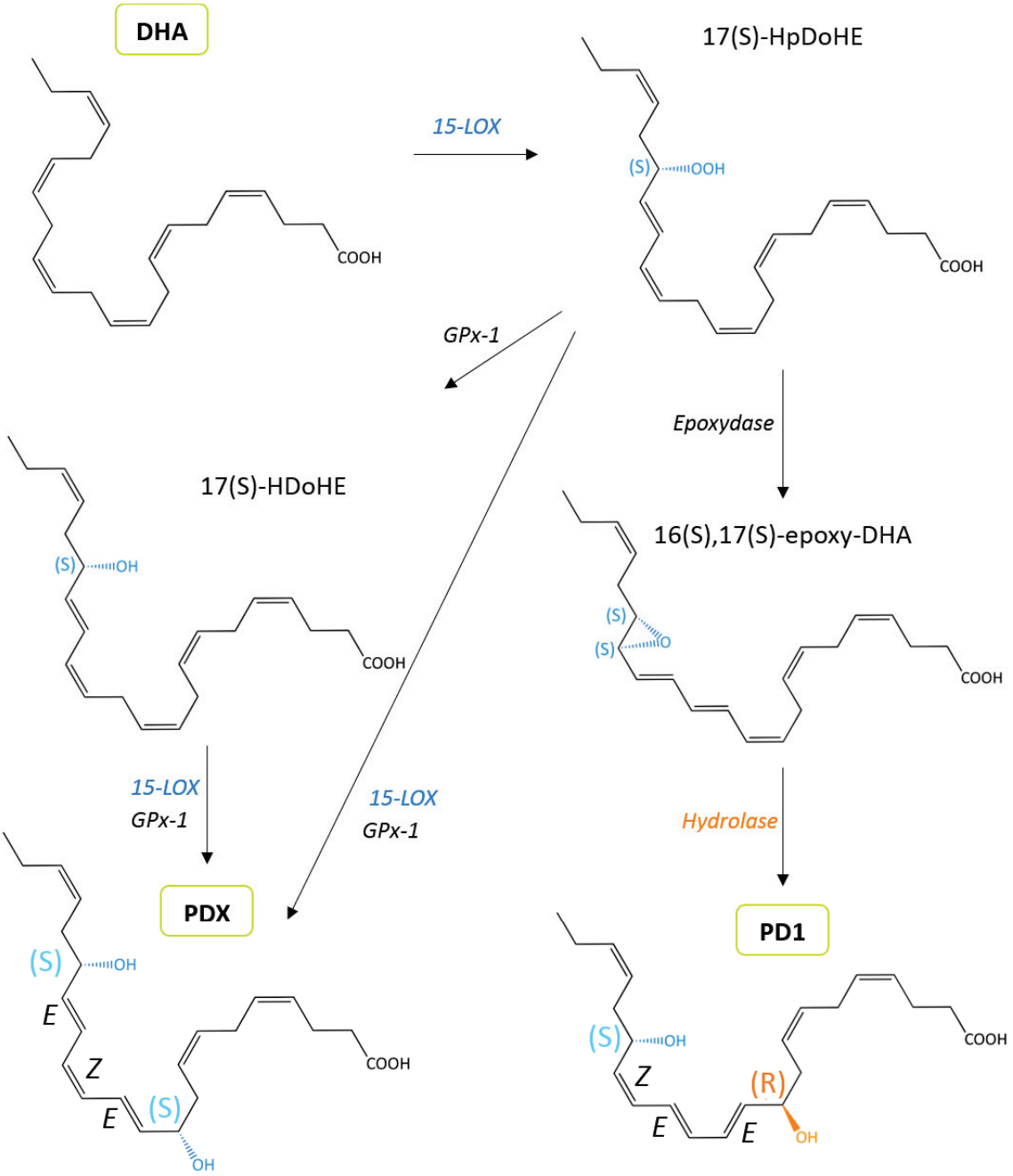


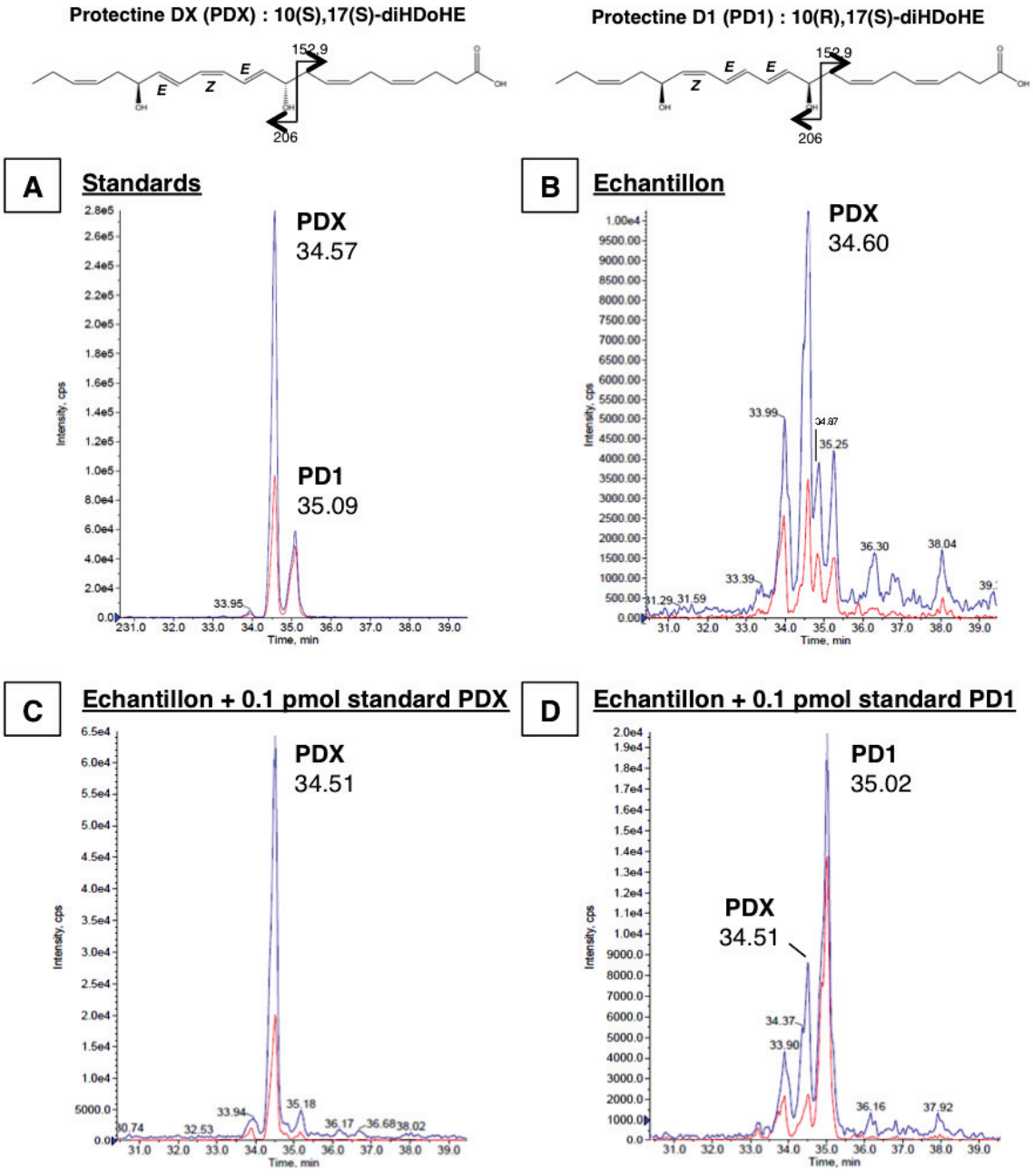
Figure 37. Synthèse des protectines DX et D1 *via* la voie de la 15-LOX. La 15-LOX permet la conversion du DHA en 17(S)-HpDoHE, qui est un précurseur commun à ces deux protectines. Des voies différentes sont ensuite utilisées pour leur synthèse et expliquent la configuration différente des doubles liaisons de leur triène conjugué.

Pour cela, nous avons dans un premier temps optimisé la séparation chromatographique par UHPLC (*Cf. §.III.1 dans la partie « Matériels et Méthodes » et §.I dans la partie « Résultats et Discussion »*) de ces deux molécules. Cependant, les transitions retenues (Figure 33) pour leur quantification 359,2 → 152,9 (chromatogramme bleu) et 359,2 → 206,0 (chromatogramme rouge) (Figure 38) sont communes pour ces deux molécules et ne permettent donc pas de les différencier.

Seuls leurs spectres UV et leur temps de rétention respectifs permettent cette différenciation. Avec cette optimisation, les deux standards sont parfaitement séparés : 34,57 min pour la PDX et 35,09 min pour la PD1 (Figure 38 A). Les échantillons biologiques ont ensuite été analysés avec cette méthode d'UHPLC-MS/MS. Un pic ayant le même temps de rétention que la PDX est présent dans ce chromatogramme, ce qui n'est pas le cas pour la PD1 (Figure 38 B). Pour confirmer l'attribution des pics, dont les temps de rétention peuvent varier en fonction des conditions environnantes, nous avons surchargé l'échantillon successivement avec de la PDX (synthétisée dans notre laboratoire) puis avec de la PD1 (fournie par l'équipe de Thierry Durand basé à Montpellier). Il apparaît clairement que le pic élué à 34,60 min dans notre échantillon (Figure 38 B) est bien de la PDX car son intensité augmente lors de la surcharge de PDX (Figure 38 C). On observe également qu'il n'y a pas de PD1 détectable dans nos conditions basales car un nouveau pic apparaît au temps de rétention de la PD1 lors de la surcharge de cette molécule (Figure 38 D).

Ces deux molécules présentent par ailleurs des spectres UV caractéristiques avec un maximum d'absorption à λ = 270 nm et deux épaulements à λ = 260 nm et λ = 280 nm, du fait de la présence du triène conjugué dans leur structure. Selon la géométrie des doubles liaisons conjuguées, un épaulement sera plus élevé que l'autre. En 2009, Chen, P. *et al.* ont démontré que les spectres UV des acides gras dihydroxylés présentant des doubles liaisons conjuguées de géométrie *E/Z/E* (comme la PDX) ont l'épaulement à 260 nm qui est plus haut que celui à 280 nm (Figure 39 A). Ils se différencient des acides gras dihydroxylés qui possèdent un triène conjugué avec des doubles liaisons de géométrie *E/E/Z* (comme la PD1). En effet, ces molécules ont un spectre UV identique mais avec des épaulements à 260 nm et à 280 nm quasiment au même niveau (Chen, P. *et al.* 2009, Balas, L. *et al.* 2014) (Figure 39

B). Effectivement, le spectre UV du pic élué à 34,51 min (Figure 38 D) comporte bien un épaulement à 260 nm plus élevé que celui à 280 nm ce qui nous permet de conclure qu'il s'agit bien de la PDX (Figure 39 A). L'autre pic élué à 35,02 min (Figure 38 D) montre des



épaulements de hauteur quasi similaire qui caractérisent la PD1 (Figure 39 B).

Figure 38. Identification des deux isomères de protectines : PDX et PD1. Chromatogrammes obtenus en mode MRM (A) du mélange des standards PDX et PD1, (B) d'un échantillon d'homogénat de cerveau de rat, (C) d'un même échantillon surchargé avec de la PDX et (D) d'un même échantillon

surchargé avec de la PD1. Deux transitions ont été utilisées pour la caractérisation de la PDX et de la PD1 : 359,2 → 152,9 (chromatogramme bleu) et 359,2 → 206,0 (chromatogramme rouge).

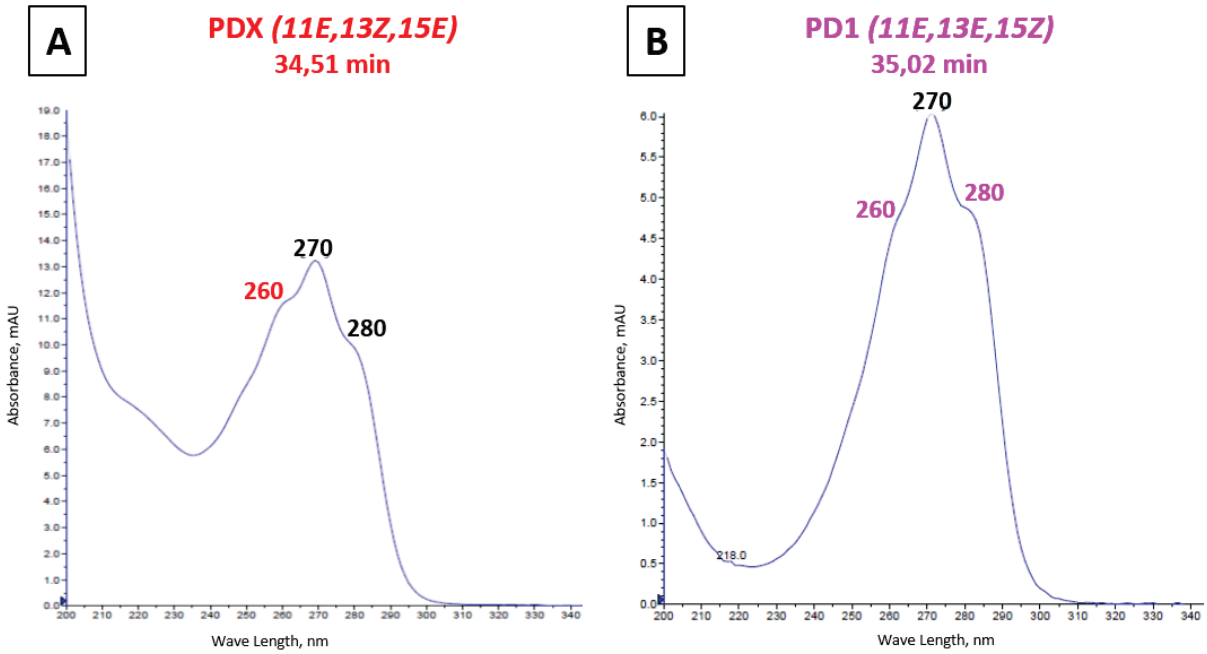


Figure 39. Comparaison des spectres UV de la PDX (A) et de la PD1 (B) identifiés dans la Figure 38 D.

Nous validons ainsi notre méthode d'analyse et nous pouvons conclure que seule la PDX est détectable dans les cerveaux dans nos conditions basales.

II.5 Mécanismes impliqués dans la synthèse des métabolites oxygénés

Les AGPI peuvent être hydroxylés par différentes enzymes dans l'organisme telles que les LOX. Cependant, ils peuvent également être oxydés non enzymatiquement par un processus appelé peroxydation lipidique en présence d'espèces réactives de l'oxygène (VanRollins, M. and Murphy, R.C. 1984) et aussi par un mécanisme d'abortion de l'activité des COX (Mancini, J.A. *et al.* 1994 ; Tosco, P. 2013). Il est bien établi que les LOX génèrent des hydroperoxydes dont le carbone qui porte le groupement hydroperoxyle présente une

stéréochimie S tandis que la peroxydation lipidique produit principalement des mélanges racémiques de ces hydroperoxydes. Ces hydroperoxydes intermédiaires sont ensuite réduits *in vivo* par la glutathion peroxydase en acides gras monohydroxylés qui conservent la stéréochimie de leur précurseur.

Pour déterminer la part de métabolites monohydroxylés formés par les LOX, nous avons séparé par chromatographie chirale en UHPLC-MS/MS les acides gras monohydroxylés en fonction de leur stéréochimie S ou R (*Cf. §.III.3 de la partie « Matériels et Méthodes »*). Ainsi, nous avons dans un premier temps analysé par UHPLC-MS/MS sur une colonne chirale des standards de métabolites monohydroxylés de stéréochimie connue : des composés de stéréochimie S et des mélanges racémiques (présence de composés S et R dans le mélange) afin de déterminer leur temps de rétention (Figure 40). La chromatographie chirale apparaît efficace pour séparer les énantiomères. Pour le 17-HDoHE, nous pouvons par exemple observer que dans le mélange racémique (Figure 40 B) deux pics sont présents dont un ayant le même temps de rétention que le composé S (Figure 40 A). Nous pouvons ainsi conclure que le composé qui est élué au bout de 12,17 min est le 17(R)-HDoHE et que celui qui élué à 12,79 min est le 17(S)-HDoHE (Figure 40 B). Il en est de même pour le 15-HETE où le composé de stéréochimie R est élué avant celui de stéréochimie S (Figure 40 D).

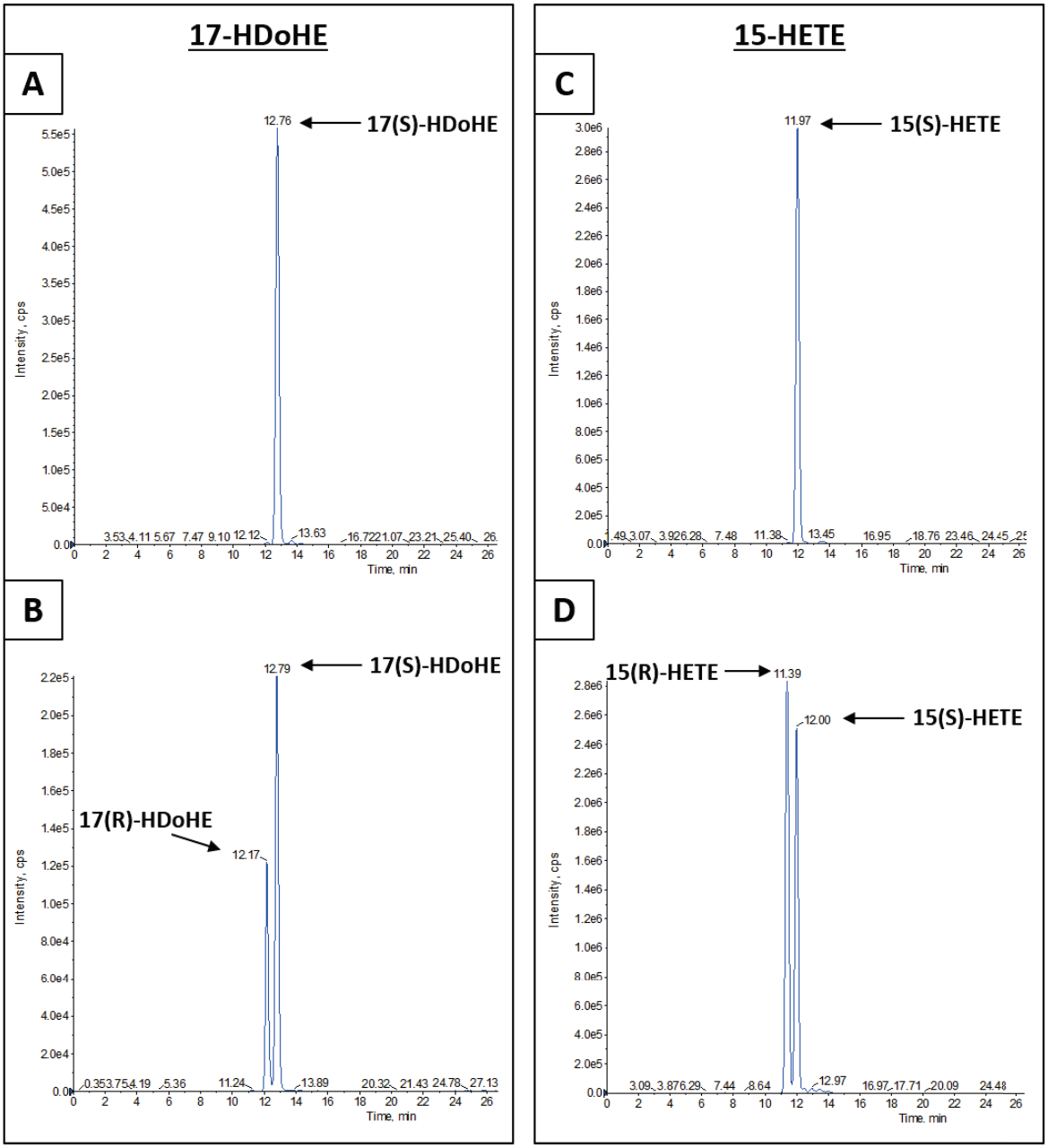


Figure 40. Exemples de séparation d'énantiomères sur colonne chirale. Les composés de stéréochimie S (A) et (C) et les mélanges racémiques (C) et (D) sont analysés par UHPLC-MS/MS afin de déterminer les temps de rétention respectifs des isomères S et R.

Les homogénats de cerveaux E précédemment étudiés ont ensuite été analysés afin de déterminer le pourcentage de métabolites monohydroxylés libres formés par voie enzymatique.

Tableau 3. Pourcentage de métabolites de stéréochimie S comparés à ceux de stéréochimie R. Ces résultats sont issus de l'analyse de deux échantillons de cerveaux exsanguinés incubés soit avec de l'éthanol, soit avec du DHA.

	Contrôle E		+ DHA E	
	% S	% R	% S	% R
17-HDoHE	51	49	63	37
7-HDoHE	35	65	51	49
4-HDoHE	47	53	67	33
15-HETE	56	44	54	46
5-HETE	42	58	43	57

Ces résultats obtenus avec notre méthode UHPLC-MS/MS qui utilise une colonne chirale montrent qu'en conditions basales (Tableau 3, Contrôle E) des mélanges racémiques du 17-HDoHE et du 15-HETE sont présents dans nos échantillons, avec cependant légèrement plus d'isomères S que d'isomères R. Ces données suggèrent donc que la peroxydation lipidique contribue de façon égale avec les LOX à la génération d'acides gras monohydroxylés dans le cerveau, confirmant ainsi les résultats obtenus par Kim, H.Y. *et al.* en 1991. De plus, les isomères R du 5-HETE, du 4-HDoHE et du 7-HDoHE sont plus abondants que les isomères S. Ceci peut s'expliquer par le fait que la 5-LOX, qui est principalement activée par un stimulus inflammatoire, n'est pas impliquée ici. Leur synthèse serait plutôt issue de la peroxydation lipidique. Enfin, quand le cerveau est incubé avec du DHA (Tableau 3, + DHA E), la quantité de ses dérivés d'isomérie S est augmentée (augmentation de 24% du 17(S)-HDoHE en condition + DHA) suggérant que les LOX cérébrales sont actives en présence d'AGPI.

III Recherche des métabolites oxygénés dérivés de l'ArA et du DHA estérifiés dans les phospholipides

Plusieurs métabolites oxygénés ont été détectés sous forme libre dans les cerveaux. Cependant, les acides gras hydroxylés peuvent également être estérifiés dans les PL. En effet, il a été montré que ces métabolites présents dans les PL peuvent provenir soit d'une ré-estérification après leur formation, soit d'une synthèse *in situ* par la 15-LOX (c'est la seule LOX qui a été montrée capable d'oxyder directement les AGPI estérifiés aux PL) (Maskrey, B.H. *et al.* 2007 ; Morgan, L.T. *et al.* 2010 ; Thomas, C.P. *et al.* 2010 ; Clark, S.R. *et al.* 2011) (*Cf. §.II.4*). Dans cette étude, nous avons recherché les métabolites oxygénés estérifiés dans les PL totaux afin d'avoir une vue globale de la synthèse de ces dérivés oxygénés présents à l'état basal dans le cerveau.

Dans les cerveaux E et NE, tous les métabolites monohydroxylés détectés sous forme libre ont également été retrouvés estérifiés dans les PL. Des quantités similaires d'acides gras monohydroxylés dérivés du DHA et de l'ArA ont été trouvées estérifiées dans les PL des cerveaux E et NE (par exemple dans cerveau E, 5159 ± 1917 pmoles par gramme de cerveau pour les HDoHE et 3430 ± 1379 pmoles par gramme de cerveau pour les HETE en conditions basales, Figure 41 A). De plus, les quantités de ces métabolites (Figure 41) sont du même ordre de grandeur (de l'ordre du millier de pmoles par gramme de cerveau) que celles des métabolites non estérifiés (Figure 36). A notre connaissance, cette étude rapporte pour la première fois la présence de métabolites monohydroxylés formés par l'action de la 5-LOX et de la 15-LOX sur le DHA dans les PL.

L'addition de DHA n'a pas d'effet significatif sur les niveaux des HDoHE (exemple de la quantité d'HDoHE totaux estérifiés dans les PL des cerveaux NE est de 5553 ± 1913 pmoles par gramme de cerveau à l'état basal et de 7263 ± 3404 pmoles par gramme de cerveau après l'addition de DHA, Figure 41 A). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en 30 minutes d'incubation, le DHA exogène n'a pas eu le temps d'être converti en métabolites oxygénés puis estérifié dans les PL.

Contrairement aux acides gras hydroxylés sous forme libre qui diminuent si les rats sont exsanguinés (Figure 36), les acides gras hydroxylés estérifiés dans les PL ne varient pas (Figure 41). En effet, à l'état basal, la quantité de 12-HETE non estérifié est plus grande dans les cerveaux NE (4115 ± 691 pmoles par gramme de cerveau) que dans les cerveaux E (1187 ± 348 pmoles par gramme de cerveau) (Figure 36). Par contre, le 12-HETE estérifié dans les PL ne diminue pas après l'exsanguination. On retrouve 208 ± 91 pmoles par gramme de cerveau dans les cerveaux E et 316 ± 91 pmoles par gramme de cerveau dans les cerveaux NE (Figure 41 C). Ce résultat suggère que ces métabolites oxygénés estérifiés dans les PL sont essentiellement formés par les tissus cérébraux, et non par les cellules sanguines circulantes du sang qui irrigue le cerveau.

Seuls deux métabolites dihydroxylés ont été retrouvés estérifiés dans les PL : la PDX et le 8,15-diHETE qui sont présents à la fois dans les cerveaux E et NE, à des quantités similaires à celles mesurées pour les métabolites sous forme libre (Figure 41 B). Ces deux métabolites sont formés par une double lipoxygénation par la 15-LOX, enzyme connue pour oxyder directement les PL présents dans les membranes. Nous pouvons donc penser que la synthèse de ces métabolites est favorisée par l'action directe de cette enzyme sur les PL, action nécessitant moins d'énergie que la synthèse puis la réestérification des métabolites dans les PL membranaires.

Une quantification totale des métabolites oxygénés doit donc considérer à la fois les métabolites libres et les métabolites estérifiés dans les PL.

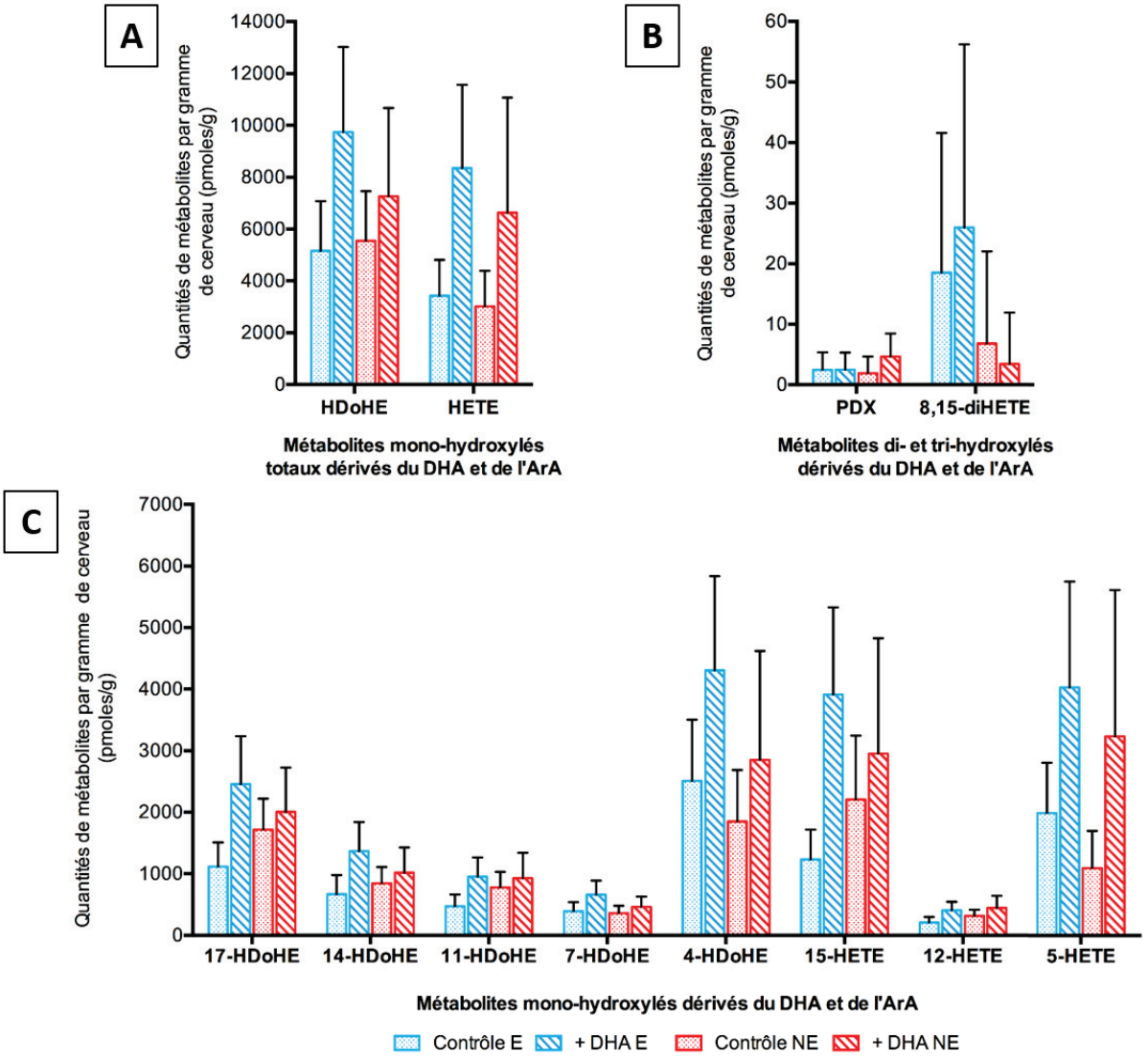


Figure 41. Métabolites monohydroxylés estérifiés dans les phospholipides des homogénats de cerveaux de rats. Les quantités totales d'acides gras monohydroxylés (HDoHE et HETE) estérifiés dans les phospholipides des cerveaux exsanguinés (E) et non exsanguinés (NE) sont présentées dans la partie A. Dans la partie B et la partie C, les différents métabolites dihydroxylés et monohydroxylés dérivés du DHA et de l'ArA estérifiés dans les phospholipides dans les cerveaux E et NE sont respectivement représentés. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de six analyses indépendantes (n = 6) et sont exprimés en picomoles par gramme de cerveau. Aucune différence significative n'a été observée à $p < 0,05$.

IV Impact d'une inflammation cérébrale sur les métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA

Le DHA et l'ArA, ainsi que leurs métabolites oxygénés respectifs, sont fortement impliqués dans la réponse inflammatoire. Alors que la plupart des dérivés oxygénés de l'ArA sont pro-inflammatoires, ceux du DHA sont dotés de propriétés anti-inflammatoires (Serhan, C.N. 2014 ; Spite, M. *et al.* 2014). L'inflammation est un processus majeur dans l'organisme et plusieurs maladies neurodégénératives ont une forte composante inflammatoire. Pour étudier l'impact de cette inflammation sur la synthèse des métabolites oxygénés, nous avons mesuré ces métabolites oxygénés dans les cerveaux E de rats traités ou non par des LPS qui sont connus pour induire une inflammation sévère. De plus, l'effet de l'addition de DHA a également été testé.

Dans cette étude préliminaire, plusieurs métabolites dérivés de l'ArA et du DHA non estérifiés ont été trouvés en quantités différentes à la fois dans les cerveaux E en conditions basales (injection de NaCl, représentés en bleu sur la Figure 42) et en conditions inflammatoires (injection de LPS, représentés en violet sur la Figure 42).

Tous les métabolites identifiés précédemment sont présents dans ces conditions inflammatoires (Figure 42). Cette inflammation se traduit notamment par une augmentation significative de la synthèse du LTB_4 (Figure 42 B) et de la PGE_2 (25,50 ± 1,21 pmoles par gramme de cerveau (sans LPS) *vs* 67,56 ± 17,49 pmoles par gramme de cerveau (avec LPS) Figure 43). La PGD_2 est également légèrement augmentée (Figure 43). Ces molécules, du fait de leur forte implication dans l'initiation de l'inflammation, sont considérées comme des marqueurs de l'inflammation. Ces effets étant assez faibles, nous pouvons penser que l'inflammation induite par les LPS est insuffisante. De plus, les métabolites monohydroxylés (5-HETE, 4-HDoHE et 7-HDoHE) (Figure 42 A) synthétisés *via* l'action de la 5-LOX et considérés comme des marqueurs de l'inflammation ne sont que très peu impactés par le traitement des rats au LPS.

Dans ce modèle inflammatoire, l'addition de DHA induit une synthèse accrue de ses métabolites oxygénés (17-, 14-, 11- et 7-HDoHE) (Figure 42 A). Par contre, le DHA semble inhiber complètement la synthèse du LTB_4. Cependant, cette molécule n'étant pas détectée dans les cerveaux contrôles (sans LPS) en présence de DHA, nous ne pouvons pas conclure que le DHA inhibe sa synthèse induite par les LPS.

Il est intéressant de noter que la PD1 est ici détectée pour la première dans cette étude mais seulement dans le cerveau de rat traité par les LPS et avec addition de DHA. Sa synthèse reste cependant très marginale par rapport à celle de la PDX. La synthèse de cette dernière est stimulée par les LPS mais ces résultats qui portent sur trois expériences ne sont pas significatifs. La RvD1 et la MaR1 restent non détectables dans nos conditions (Figure 42 B). Le statut inflammatoire semble déclencher la synthèse de métabolites impliqués dans la résolution de l'inflammation.

Ces premiers résultats obtenus sur des cerveaux exsanguinés inflammés suggèrent que lors d'une inflammation, la synthèse de certains métabolites est augmentée voire déclenchée. De plus, l'addition exogène de DHA entraîne une augmentation de la quantité de certains de ses métabolites anti-inflammatoires (PDX, PD1, 17-HDoHE, 14-HDoHE). Cette étude devrait être reproduite avec des conditions d'inflammation optimisées afin de confirmer ces résultats. De plus, ne connaissant pas le statut inflammatoire des animaux, il est difficile de conclure sur ces premiers résultats. Il sera donc nécessaire de mesurer d'autres marqueurs du statut inflammatoire tels que les interleukines IL-6 et IL-8 ou le facteur de nécrose tumorale TNF-α.

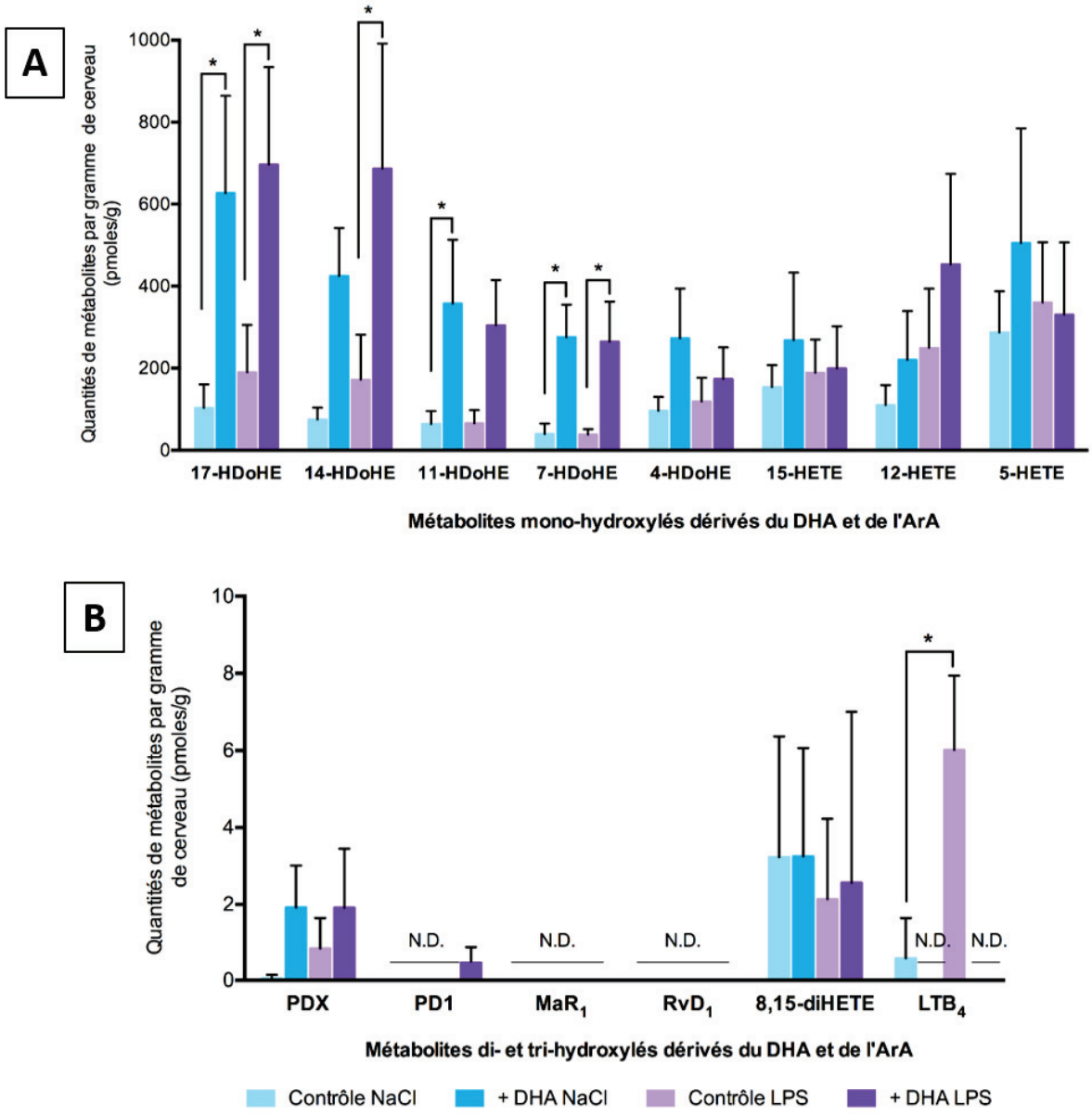


Figure 42. Impact de l'inflammation cérébrale sur les métabolites lipidiques oxygénés libres dérivés du DHA et de l'ArA. Les quantités des différents métabolites monohydroxylés (A) et di- et trihydroxylés (B) dérivés du DHA et de l'ArA dans les cerveaux exsanguinés de rats sont représentés. Les résultats représentent la moyenne ± SD de trois analyses indépendantes (n = 3) et sont exprimés en picomoles par gramme de cerveau. Pour chaque métabolite, *p < 0,05. N.D. : non détectés avec nos conditions d'analyse.

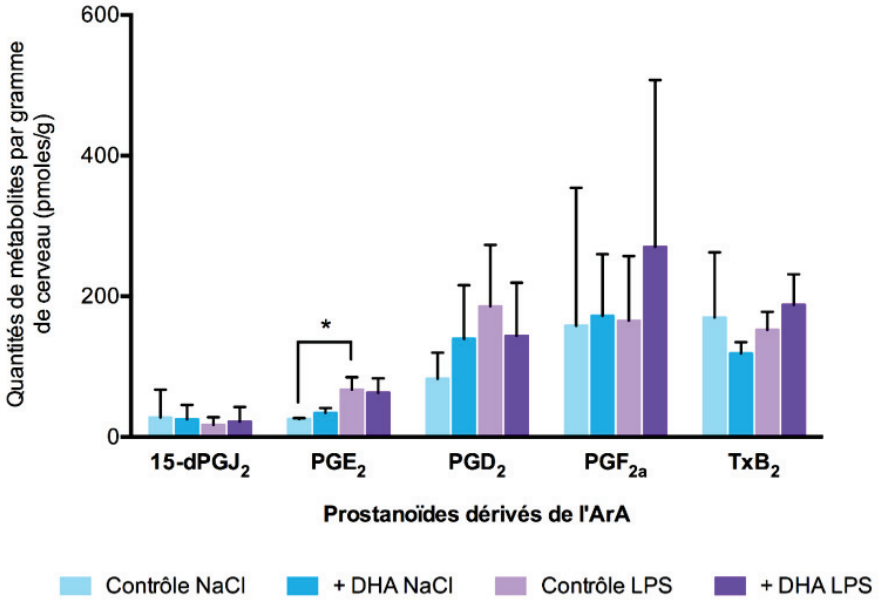


Figure 43. Impact de l'inflammation cérébrale sur les prostanoïdes dérivés de l'ArA. Les quantités totales des prostanoïdes dans les cerveaux exsanguinés (E) de rats sont présentées. Les résultats représentent la moyenne ± SD de trois analyses indépendantes (n = 3) et sont exprimés en picomoles par gramme de cerveau. Pour chaque métabolite, *p < 0,05.

V Répartition des dérivés oxygénés sous forme libre du DHA et de l'ArA dans les différentes régions du cerveau de rat

Les différents AGPI ne sont pas répartis de façon uniforme dans le cerveau, certaines régions étant plus riches en AGPI que d'autres. Le DHA et l'ArA sont par exemple préférentiellement retrouvés dans les hippocampes, le cortex et le cervelet (Soderberg, M. *et al.* 1991 ; Carrie, I. *et al.* 2000 ; Xiao, Y. *et al.* 2005). Ainsi, ces AGPI peuvent être impliqués dans certaines pathologies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer qui touche principalement l'hippocampe. Nous nous sommes donc intéressés au métabolisme oxygéné du DHA et de l'ArA dans ces trois structures cérébrales.

Les résultats présentés ici sont issus d'une expérience préliminaire consistant à identifier les métabolites présents sous forme libre dans ces zones cérébrales isolées à partir de cerveaux E. Ces trois parties du cerveau étant petites, surtout les hippocampes, nous avons dû réunir des structures identiques pour détecter ces métabolites oxygénés par UHPLC-MS/MS. Chaque mesure a été répétée trois fois pour les cortex (groupés par trois) et pour les cervelets (groupés par trois) et seulement deux fois avec les hippocampes (groupés par quatre).

Dans ces trois zones cérébrales, les métabolites monohydroxylés dérivés du DHA et de l'ArA ont été mesurés sous forme libre (Figure 44 C). Bien que les métabolites monohydroxylés du DHA semblent être principalement présents dans le cervelet, aucune différence significative de leur répartition dans les différentes régions étudiées n'est observée (Figure 44 A et C). La différence de répartition des métabolites monohydroxylés dérivés de l'ArA est moins marquée bien qu'il semble y en avoir moins dans les hippocampes (Figure 44 A et C).

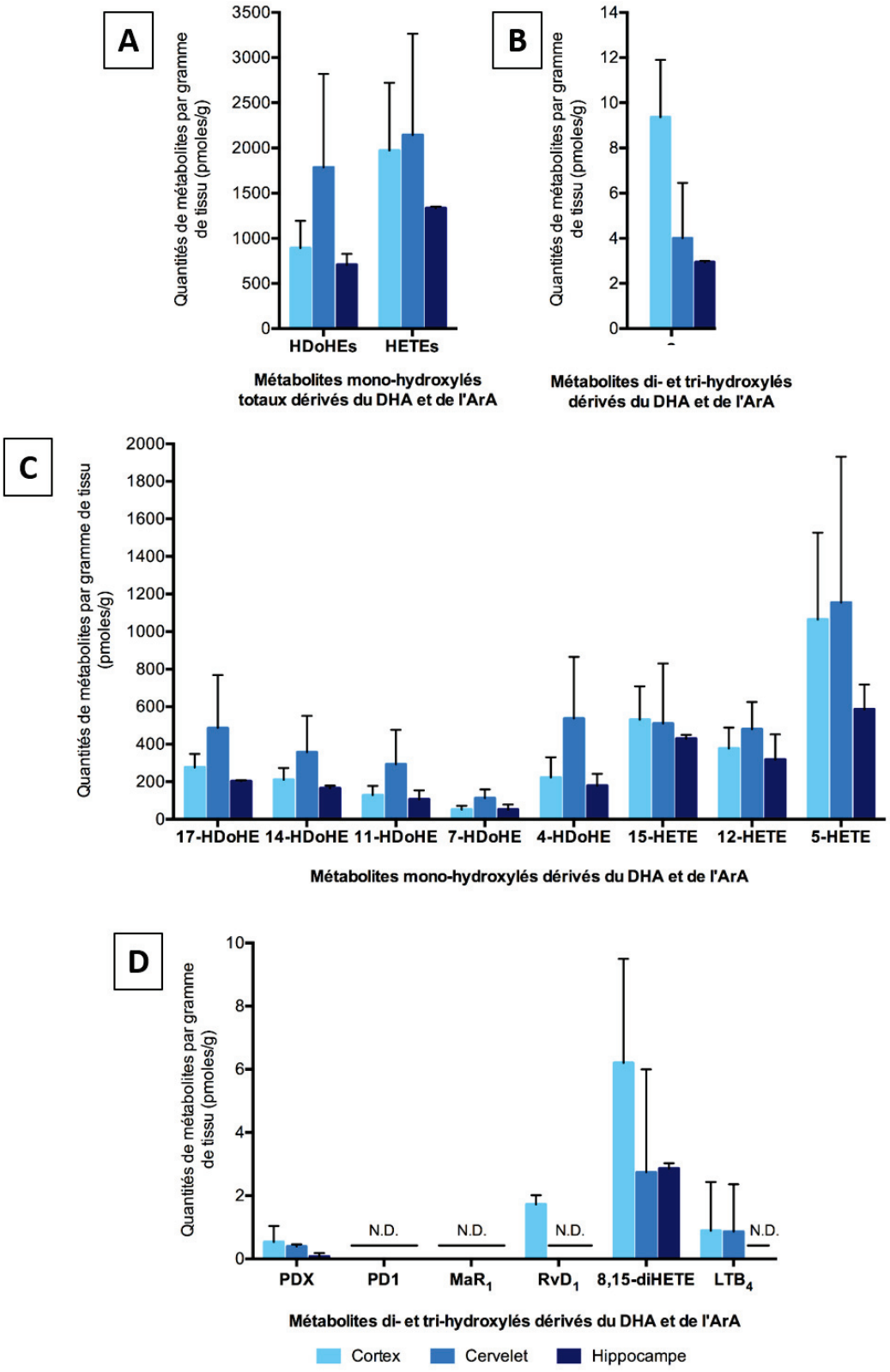


Figure 44. Répartitions des métabolites lipidiques oxygénés libres dans les structures cérébrales de rat. Les quantités totales de métabolites monohydroxylés (HDoHE et HETE) et des métabolites di-et trihydroxylés présents dans le cortex, le cervelet et les hippocampes des cerveaux exsanguinés (E) de rats sont présentées dans les parties A et B respectivement. Dans les parties C et D, les différents

métabolites monohydroxylés (C) et di- et trihydroxylés (D) dérivés du DHA et de l'ArA présents dans le cortex, le cervelet et les hippocampes des cerveaux E de rats sont représentés. Les résultats représentent la moyenne ± SD de trois analyses indépendantes (n = 3) pour le cortex et le cervelet et de deux analyses indépendantes pour les hippocampes et sont exprimés en picomoles par gramme de tissu. Aucune différence significative n'a été observée à $p < 0,05$. N.D. non détectés avec nos conditions d'analyse.

Bien qu'en très faible quantité, des métabolites dihydroxylés (PDX, 8,15-diHETE et LTB_4) ont également été détectés dans ces régions. Ces métabolites semblent être majoritairement présents dans le cortex et le cervelet mais la répartition de ces métabolites n'est pas significativement différente entre ces différentes structures (Figure 44 B et D). La RvD1 est détectée uniquement dans le cortex des cerveaux E alors qu'elle est absente dans les cerveaux E totaux (Figure 36 B). Compte tenu de la très faible quantité de RvD1 mesurée dans le cortex, il apparaît logique que la RvD1 soit indétectable dans les cerveaux totaux.

Ces résultats préliminaires permettent de mettre en évidence la présence de ces métabolites oxygénés dans ces structures cérébrales et nécessitent de nouvelles répétitions pour les confirmer. Ces expérimentations réalisées sur des cerveaux sains ouvrent de nouvelles perspectives de travail, notamment sur des cerveaux pathologiques.

DISCUSSION GENERALE

L'ArA et le DHA sont des facteurs nutritionnels possédant d'importantes fonctions dans le cerveau du fait de leurs fortes concentrations dans ses membranes. Ces deux AGPI sont notamment impliqués dans le développement cérébral et la régulation synaptique. Cependant, au cours de ces dernières années, des études font état d'une trop grande consommation d'AGPI n-6 au détriment des AGPI n-3 dans le régime occidental (Guesnet, P. *et al.* 2005). Cette déficience en AGPI n-3, et notamment en DHA, semble être associée à des altérations du fonctionnement cérébral lors du vieillissement (Soderberg, M. *et al.* 1991 ; McNamara, R.K. *et al.* 2008 ; Cunnane, S.C. *et al.* 2009). A l'inverse, une supplémentation en AGPI n-3 semble améliorer les fonctions cognitives et réduire l'incidence de certaines maladies neurodégénératives (Barberger-Gateau, P. *et al.* 2007 ; Yurko-Mauro, K. *et al.* 2010). Il est aujourd'hui bien admis que certains effets observés dans le cerveau sont dus aux AGPI mais également à certains de leurs dérivés oxygénés (Phillis, J.W. *et al.* 2006 ; Bazinet, R.P. and Laye, S. 2014 ; Dyall, S.C. 2015).

En effet, la présence de nombreuses insaturations dans leur structure permet la conversion des AGPI en de nombreux métabolites oxygénés, tels que les prostaglandines, les protectines ou les résolvines. Ces dernières années, un intérêt particulier a été apporté à ces différents dérivés oxygénés dotés de puissantes propriétés et impliqués dans de multiples processus dans l'organisme. Dans le cerveau, quelques métabolites ainsi que leurs rôles associés ont été étudiés. Il a notamment été montré que la NPD1 favorise la survie cellulaire par l'induction de l'expression de protéines anti-apoptotiques dans un modèle cellulaire de maladie d'Alzheimer (Lukiw, W.J. *et al.* 2005). Cependant, la plupart des études s'intéressent à un métabolite particulier mais pas à l'ensemble des métabolites oxygénés.

Aussi, l'objectif principal de ce travail a été de réaliser une cartographie des métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA présents dans le cerveau en conditions basales et inflammatoires, en les identifiant et en les quantifiant par UHPLC-MS/MS.

Afin de pouvoir identifier ces métabolites dans le cerveau, une technique d'analyse à haute performance a été utilisée : l'UHPLC-MS/MS. Après un long travail d'optimisation, cet outil a permis une analyse précise de plusieurs métabolites oxygénés dérivés du DHA et de

l'ArA dans le cerveau. Cependant, certains métabolites n'ont pas pu être correctement identifiés et n'ont pas été intégrés dans nos résultats. En effet, pour être sûr de l'identification d'une molécule avec cette technique, il est essentiel de posséder le standard commercial correspondant afin de déterminer son temps de rétention et ses paramètres d'analyse en UHPLC-MS/MS. Or au début de cette étude, certains standards de molécule n'étaient pas disponibles commercialement (exemple de la RvD3 ou de la MaR2). Il sera donc possible d'étendre dans le futur notre investigation à d'autres métabolites grâce à l'acquisition des standards manquants.

Le DHA et l'ArA, deux AGPI précurseurs de métabolites oxygénés dans le cerveau

Une première approche expérimentale a consisté à déterminer la quantité de métabolites oxygénés non estérifiés dérivés du DHA et de l'ArA produits par le tissu cérébral. Pour cela, des rats ont été exsanguinés afin d'éliminer le sang présent dans le cerveau. En effet, des LOX et des COX sont présentes dans le sang. Elles peuvent générer des métabolites et biaiser la quantification des métabolites dans le tissu cérébral. Dans cette étude, plusieurs métabolites oxygénés dérivés de ces deux AGPI ont été identifiés sous forme libre dans les cerveaux E et NE. Quelques études ont déjà caractérisé certains de ces métabolites dans le cerveau (Abdel-Halim, M.S. *et al.* 1977 ; Lindgren, J.A. *et al.* 1984 ; Salem, N., Jr. *et al.* 1988 ; Kim, H.Y. *et al.* 1991 ; Marcheselli, V.L. *et al.* 2003), telles que l'étude réalisée par Kim, H.Y. *et al.* en 1991 qui décrit la production de plusieurs HETE dans le cerveau de rats exsanguinés après incubation avec de l'ArA. Cependant, la plupart des études rapportées dans la littérature se réfèrent seulement à un métabolite ou un groupe de métabolites dans le cerveau. Elles ne permettent pas d'avoir une vue d'ensemble du métabolisme oxygéné dans le cerveau. Dans cette étude, nous caractérisons pour la première fois à notre connaissance les métabolites dérivés du DHA et de l'ArA simultanément dans le cerveau, permettant ainsi d'avoir une vue d'ensemble et de comparer les niveaux de ces différents métabolites. Il apparaît clairement, comme cela est attendu, que les acides gras hydroxylés sous forme libre synthétisés *via* les 12- et 15-LOX aussi bien à partir de l'ArA que du DHA sont majoritaires. En effet, la 5-LOX est surtout présente lors de phénomènes inflammatoires. Nous retrouvons

effectivement ces dérivés dans les cerveaux de rats exsanguinés traités par des LPS pour induire une inflammation.

Nous avons ainsi montré que, dans les cerveaux exsanguinés, les quantités du 17-HDoHE, du 14-HDoHE et plus particulièrement du 12-HETE étaient diminuées. Cette diminution implique qu'une part non négligeable de ces métabolites est produite dans le sang qui irrigue le cerveau. De plus, la RvD1 est uniquement détectée dans les cerveaux NE, laissant penser que seule la partie sanguine est responsable de sa synthèse. De ce fait, il serait intéressant de vérifier dans quelle mesure ces métabolites oxygénés sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'atteindre les différentes cellules du tissu nerveux. L'exsanguination des rats permet donc de quantifier les métabolites oxygénés présents uniquement dans le tissu cérébral lavé de son sang. Cette précaution peut être étendue à l'ensemble de l'organisme pour toute analyse quantitative. Cependant, nous pouvons affirmer d'après ces résultats que ces métabolites sont présents dans le tissu cérébral mais pas qu'ils y sont synthétisés. Pour affirmer cela, il faudrait réaliser des études plus approfondies, notamment des études cellulaires, afin de déterminer la part de métabolites synthétisés par ce tissu. Lors d'une analyse quantitative de ces métabolites dans un tissu, il faut donc faire attention à l'environnement sanguin qui peut entraîner des biais dans les mesures. Cependant, du fait de ces possibles échanges entre le cerveau et le sang, il est également important de prendre en compte les cerveaux NE. En effet, en situation physiologique le cerveau étant irrigué par le sang, il est nécessaire de prendre en compte cet ensemble, et pas uniquement le tissu cérébral, lors d'études fonctionnelles. Par exemple, il est nécessaire de travailler sur des cerveaux NE lors d'une étude sur les rôles éventuels de la PDX, molécule fortement anti-agrégantes, dans les accidents vasculaires cérébraux.

Plus spécifiquement, deux médiateurs bioactifs dérivés du DHA ont été identifiés dans ces cerveaux : la RvD1 et la PDX. Cependant, le fait que la RvD1 soit détectée uniquement dans les cerveaux NE suggère qu'elle n'est pas présente dans le tissu cérébral en conditions basales. Il est également intéressant de noter que seule la PDX est détectée dans ces homogénats de cerveaux E et NE, mais pas son isomère la NPD1 bien qu'elle ait été caractérisée dans le cerveau par de nombreux auteurs (Marcheselli, V.L. *et al.* 2003). L'optimisation de notre méthode nous a permis de confirmer que la NPD1 n'est pas présente

dans nos conditions. C'est ainsi la première fois que nous mettons en évidence la présence de la PDX dans le cerveau. Cette molécule est dotée de fortes propriétés anti-agrégantes (Chen, P. *et al.* 2011) et anti-inflammatoires (Liu, M. *et al.* 2014), aussi il serait intéressant d'observer son effet sur les accidents vasculaires cérébraux. Les propriétés respectives de ces deux protectines sont encore mal identifiées dans le cerveau. Il serait donc intéressant de comparer leurs effets au niveau cérébral afin de connaître leurs rôles respectifs. Notre méthode d'analyse et nos conditions expérimentales ne permettent pas de détecter la NPD1, la MaR1 et la RvD1 dans le tissu cérébral. Ces résultats pourraient être différents lors d'une inflammation car ces trois molécules sont décrites pour être synthétisées en conditions inflammatoires (Serhan, C.N. *et al.* 2000 ; Marcheselli, V.L. *et al.* 2003 ; Serhan, C.N. *et al.* 2009).

Ces différents métabolites sont présents en quantité relativement faibles dans le cerveau (de l'ordre du millier de picomoles par gramme de cerveau pour les acides gras monohydroxylés et de l'ordre de la dizaine de picomoles par gramme de cerveau pour les acides gras dihydroxylés) comparés aux quantités totales d'ArA et de DHA (de l'ordre du millier de nanomoles par gramme de cerveau (Salem, N.M. *et al.* 2015)). Cependant certains métabolites exercent des effets très puissants malgré leurs faibles quantités dans le cerveau, d'où l'importance de leur étude.

Les phospholipides, réserves de métabolites oxygénés potentiellement actifs ?

Ce travail montre aussi que ces métabolites oxygénés sont détectables dans les PL extraits de cerveau de rats exsanguinés ou non. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que plusieurs études ont démontré que des PL oxydés présents dans les membranes cellulaires pouvaient jouer des rôles importants dans la signalisation cellulaire. L'oxydation de ces PL se fait par ré-estérification ou synthèse *in situ* de métabolites monohydroxylés (Maskrey, B.H. *et al.* 2007 ; Morgan, L.T. *et al.* 2010 ; Thomas, C.P. *et al.* 2010 ; Clark, S.R. *et al.* 2011). Les métabolites estérifiés dans les PL et libres sont retrouvés en quantités similaires dans le cerveau. Ainsi, une quantification totale des métabolites oxygénés doit donc prendre en compte les métabolites sous forme libre et estérifiés dans les PL, d'autant que ces derniers sont présents en quantités non négligeables. On remarque aussi que l'exsanguination des rats ne change pas le contenu en acides gras monohydroxylés estérifiés

dans les PL. Il est donc probable que ces métabolites soient directement formés dans le cerveau. Les quantités de métabolites oxygénés estérifiés dans les PL (1200 pmoles par gramme de cerveau en moyenne dans les cerveaux NE en conditions basales) sont négligeables par rapport aux AGPI estérifiés dans les PL totaux (environ 6000 nanomoles par gramme de cerveau, (Lin, L.E. *et al.* 2015)). Cependant, en fonction de leur localisation dans la membrane, ils peuvent modifier leur microenvironnement et affecter la fluidité membranaire. De plus, ces PL oxydés peuvent être considérés comme une réserve de médiateurs lipidiques. En effet, suite à un stimulus activant les phospholipases, ces métabolites peuvent être facilement hydrolysés des PL membranaires et exercer leurs fonctions dans l'organisme. Toutes ces données sur les PL oxydés montrent leur importance et la nécessité de les prendre en compte lors de l'étude du métabolisme oxygéné des AGPI.

Effet de l'inflammation sur la synthèse des métabolites oxygénés

Certains médiateurs lipidiques identifiés dans le cerveau sont impliqués à différents niveaux de l'inflammation selon leur AGPI précurseur. En effet, la plupart des métabolites oxygénés dérivés de l'ArA sont impliqués dans l'initiation de l'inflammation alors que ceux dérivés du DHA interviennent dans la résolution de l'inflammation. Ainsi, selon le statut inflammatoire de l'organisme, la synthèse de certains métabolites peut être déclenchée (Serhan, C.N. 2014 ; Spite, M. *et al.* 2014). Afin d'observer l'impact d'une inflammation cérébrale sur la synthèse de ces métabolites, des injections intrapéritonéales de LPS ont été réalisées. Les premiers résultats obtenus sur des cerveaux de rats exsanguinés montrent que le statut inflammatoire entraîne une augmentation de la quantité de métabolites pro-inflammatoires (LTB_4, PGE_2) mais également anti-inflammatoires (PDX). Ces résultats suggèrent qu'au moment où les rats ont été sacrifiés, la résolution de l'inflammation débutait. En effet, il semble que dans ces cerveaux, la synthèse de certains métabolites anti-inflammatoires était augmentée alors que des quantités encore importantes de métabolites pro-inflammatoires étaient présentes. Cependant, les conditions expérimentales utilisées semblent n'induire qu'une inflammation limitée. En effet, les variations sont assez faibles voir inexistantes pour certains métabolites et des métabolites connus pour être synthétisés en conditions inflammatoires (PD1, MaR1) ne sont pas détectés. Nous pouvons nous demander si cela est dû aux conditions expérimentales. Bien que le maximum de précaution

soit pris lors des expérimentations, il se peut que des pertes aient lieu du fait de l'extrême instabilité de ces métabolites. La PD1, déjà détectée dans le cerveau en conditions inflammatoires, pourrait par exemple être convertie en d'autres dérivés tels que le 22-OH-PD1 (Hong, S. *et al.* 2003). De plus, les quantités de ces métabolites étant extrêmement faibles, il se peut qu'ils ne soient pas détectés en UHPLC-MS/MS. Les conditions utilisées pour déclencher l'inflammation ne sont peut être pas optimales. Le temps d'induction de l'inflammation n'est peut être pas suffisant pour qu'elle atteigne le cerveau. Une autre hypothèse peut concerner le fait que ces cerveaux soient exsanguinés. Du fait de la contribution importante de certaines cellules sanguines dans l'inflammation, l'effet général de l'inflammation pourrait être atténué par l'exsanguination. Cette étude devrait donc être reproduite sur des cerveaux NE et éventuellement avec des conditions d'inflammation optimisées afin de confirmer ces résultats.

Cartographie des métabolites oxygénés dans le cerveau

Nos études ont toutes été réalisées sur la totalité du cerveau. Cependant, il est connu que certaines maladies neurodégénératives affectent plus spécifiquement certaines zones cérébrales. Par exemple, il a été montré que le DHA et certains de ses médiateurs lipidiques étaient diminués lors de la maladie d'Alzheimer (Wang, X. *et al.* 2015 ; Zhu, M. *et al.* 2016), et ce plus particulièrement au niveau du cervelet et de l'hippocampe. Ainsi, dans l'optique d'étudier par la suite ces voies métaboliques dans des modèles neuropathologiques, une étude a été démarrée afin de localiser ces médiateurs lipidiques dans les différentes régions de cerveaux de rats exsanguinés (hippocampes, cervelet et cortex). Nos résultats préliminaires montrent que plusieurs métabolites oxygénés sont présents dans ces structures cérébrales exsanguinées. De nouvelles expériences sont nécessaires pour confirmer ces résultats en conditions physiologiques. Cette approche est surtout importante pour réaliser des études en conditions physiopathologiques. De plus, ces résultats montrent la puissance de notre méthode d'analyse qui permet de détecter des quantités très faibles de métabolites dans un tissu humain.

Mécanismes de synthèse des métabolites oxygénés : lipoxygénation vs peroxydation lipidique

Nos résultats suggèrent que le tissu nerveux exprime les trois lipoxygénases 5-, 12- et 15-LOX, enzymes impliquées dans la synthèse des métabolites détectés. Cependant, la lipoxygénation n'est pas le seul mécanisme responsable de la synthèse des métabolites monohydroxylés. En effet, il est connu que les LOX génèrent presque exclusivement des isomères S (Yamamoto, S. 1992), tandis que la peroxydation lipidique conduit à la formation d'un mélange racémique (énantiomères S et R) (VanRollins, M. and Murphy, R.C. 1984) et que l'énantiomère R peut aussi résulter d'un mécanisme d'abortion des COX chez l'homme (Mancini, J.A. *et al.* 1994 ; Tosco, P. 2013). Ainsi, les acides gras monohydroxylés ont été analysés sur une colonne chirale afin de connaître le pourcentage d'isomères R et S. Ces analyses ont révélé que les deux énantiomères S et R étaient présents, confirmant les résultats obtenus par Kim, H.Y. *et al.* en 1991. Nous pouvons donc déduire que la lipoxygénation n'est pas le seul mécanisme responsable de la formation de ces métabolites. Ces produits seraient également formés par peroxydation lipidique.

La supplémentation en DHA, une stratégie nutritionnelle favorisant la synthèse de métabolites oxygénés

En parallèle des expériences de quantification des métabolites dans le cerveau, nous avons étudié l'impact d'une addition de DHA sur les niveaux de ces métabolites. En effet, le DHA est un AGPI présent en grande quantité dans le cerveau. Cet AGPI ainsi que certains de ces dérivés exercent des rôles très importants, le plus souvent bénéfiques, dans cet organe. Cependant, une déficience en AGPI n-3, et notamment en DHA, est observée dans le régime occidental ces dernières années. Il est donc intéressant de voir si la quantité de certains métabolites dérivés du DHA est impactée par son addition. Pour cela, les homogénats de cerveaux E et NE, en conditions basales et inflammatoires, ont été incubés en présence de DHA. Dans les deux conditions d'étude (basale et inflammatoire), une augmentation de la synthèse du 7-HDoHE (formé *via* la 5-LOX), du 14-HDoHE et du 11-HDoHE (formés *via* la 12-LOX) et du 17-HDoHE (formé *via* la 15-LOX), ainsi que de la PDX, a été observée dans les

cerveaux. Ce résultat confirme la présence et l'activité des LOX dans les tissus nerveux. En effet, si cette augmentation été due à la production des métabolites par peroxydation lipidique, nous observerions également une augmentation de la quantité des dérivés de l'ArA. Les analyses en chromatographie chirale des homogénats de cerveau incubés avec du DHA permettent également de confirmer l'implication des LOX dans la synthèse de ces métabolites. En effet, cette dernière révèle une proportion plus importante de métabolites dérivés du DHA d'isomérie S, métabolites pouvant être produit uniquement par lipoxygénation. A la vue de ces résultats, il est donc difficile de déterminer par quel mécanisme ces acides gras monohydroxylés ont été formés. Il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs spécifiques des LOX afin de déterminer le pourcentage de métabolites formés enzymatiquement ou non.

De plus, lors d'une inflammation cérébrale, l'addition exogène de DHA avec des homogénats de cerveaux E entraîne une augmentation de la quantité de deux de ses métabolites présentant des propriétés anti-inflammatoires : la PDX et la PD1. C'est dans ces conditions, que la PD1 est pour la première fois détectée au niveau du tissu cérébral dans notre étude. De plus, cette addition de DHA semble diminuer la quantité de certains métabolites pro-inflammatoires. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une supplémentation en DHA pourrait stimuler la diminution de l'inflammation dans certaines maladies.

Ces résultats montrent l'importance des effets que pourrait avoir une supplémentation nutritionnelle en DHA sur les niveaux de ses métabolites. En effet, le DHA apporté dans l'alimentation qui passe la barrière hémato-encéphalique pourra être converti en métabolites bioactifs dans le cerveau. Ainsi, une supplémentation en DHA pourrait avoir un double effet bénéfique : combler des carences nutritionnelles et stimuler la synthèse de certains métabolites possédant des propriétés bénéfiques.

Durant ces études, la méthode d'UHPLC-MS/MS développée nous a donc permis de réaliser une quantification totale des métabolites dérivés du DHA et de l'ArA dans le tissu

cérébral en prenant en compte à la fois les dérivés libres et ceux estérifiés dans les PL. Nous avons ainsi pu réaliser une cartographie globale des différents métabolites dérivés du DHA et de l'ArA présents dans le cerveau à l'état basal. Cette cartographie peut servir de référence pour des études fonctionnelles. Il est possible d'utiliser cette méthode et ces résultats afin de mesurer par exemple les variations des quantités de ces métabolites lors du neurodéveloppement ou de la régulation synaptique. Ainsi, il serait possible d'attribuer un rôle potentiel aux métabolites dont les quantités varient. De plus, cette cartographie peut servir de base pour des études en conditions physiopathologiques. Par exemple, un modèle de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer qui est associée à une importante neuroinflammation pourrait être étudié. Ainsi en utilisant ce modèle, la mesure des différents métabolites permettrait de mieux comprendre les mécanismes inflammatoires associés et éventuellement de trouver des solutions pour atténuer cette neuroinflammation.

De nombreuses perspectives s'ouvrent à ce travail. En effet, cette méthode d'analyse n'est pas spécifique au cerveau et peut être étendue à d'autres tissus.

CONCLUSION

Du fait de leurs fortes concentrations dans le cerveau, le DHA et l'ArA sont fortement impliqués dans le fonctionnement cérébral, que ce soit en conditions physiologiques ou physiopathologiques. Ces deux acides gras peuvent être convertis en dérivés oxygénés bioactifs. Ces métabolites ainsi que leurs rôles ont été décrits dans plusieurs compartiments de l'organisme, cependant peu d'études se sont intéressées à leur métabolisme oxygéné dans le cerveau. Il est donc nécessaire de déterminer les métabolites présents dans le cerveau avant toute étude fonctionnelle.

Une première partie de ce travail a permis d'identifier et de quantifier plusieurs métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA dans le tissu cérébral par UHPLC-MS/MS. Ainsi, il a été mis en évidence que le DHA et l'ArA sont convertis principalement en dérivés monohydroxylés mais également en dérivés di- et trihydroxylés par les 5-, 12-, et 15-LOX. Cependant, la lipoxygénation ne semble pas être le seul mécanisme impliqué dans la synthèse des acides gras monohydroxylés, une partie étant également formée par peroxydation lipidique. Grâce à cette approche, certains métabolites, tels que la PDX, ont été décrits pour la première fois dans le cerveau. Notre travail souligne que dans le cerveau les métabolites oxygénés peuvent être formés aussi bien par le tissu nerveux que par le sang qui l'irrigue. Il est donc primordial de mesurer ces métabolites dans des cerveaux de rats exsanguinés ou non.

Nous avons aussi détectés pour la première fois certains métabolites monohydroxylés dérivés du DHA (comme par exemple le 17-HDoHE) et dihydroxylés (comme par exemple la PDX) estérifiés dans les PL. Une quantification globale des métabolites oxygénés dans le tissu cérébral nécessite donc de considérer à la fois les métabolites sous forme libre ainsi que ceux estérifiés dans les PL. Par ailleurs, bien que présent en faible quantité par rapport aux AGPI estérifiés dans les PL totaux, ces métabolites estérifiés dans les PL pourraient jouer un rôle dans la fluidité des membranes en créant notamment des microenvironnements plus polaires. Une fois activées, les phospholipases peuvent aussi hydrolyser ces métabolites des PL et les rendre directement actifs en tant que médiateurs lipidiques.

Une deuxième approche a consisté à tester l'effet d'une inflammation cérébrale sur la synthèse de ces différents métabolites. Nos résultats préliminaires montrent que le LPS injecté à des rats induit une inflammation que l'on peut détecter au niveau des cerveaux exsanguinés en mesurant des marqueurs comme les leucotriènes et/ou les prostaglandines E_2 et D_2. Le DHA pourrait contrecarrer cette inflammation en générant des métabolites anti-inflammatoires comme les protectines PDX et NPD1 ainsi que des résolvines.

Enfin, nos travaux montrent également que notre méthode d'analyse est suffisamment sensible pour permettre la localisation des métabolites oxygénés dans diverses régions du cerveau. Des résultats préliminaires ont été obtenus pour les hippocampes, le cervelet et le cortex.

Ainsi, ces travaux ont permis de réaliser une cartographie globale des dérivés de l'ArA et du DHA dans le cerveau en conditions basales et d'observer l'influence de certains facteurs (addition de DHA, inflammation…) sur les niveaux de ces métabolites.

PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons développé un outil analytique puissant pour mesurer les métabolites oxygénés dérivés du DHA et de l'ArA dans le cerveau. La connaissance des métabolites présents dans des conditions physiologiques offre de nombreuses perspectives de travail.

L'exsanguination réalisée permet de quantifier les métabolites présents uniquement dans le tissu cérébral. Cependant, les métabolites présents dans le sang peuvent traverser les membranes et atteindre le tissu cérébral. Il est donc nécessaire de répéter ce travail avec des acides gras radioactifs ou marqués avec des isotopes stables afin de déterminer les métabolites synthétisés dans le tissu cérébral. Des études cinétiques seraient aussi intéressantes pour suivre le devenir de ces métabolites et leur localisation dans le temps. L'utilisation d'oxygène marqué à ^{18}O sur des cellules nerveuses en culture permettrait aussi de mieux discriminer le mécanisme de leur synthèse (peroxydation *vs* enzymatique).

Les rôles de certains métabolites peuvent changer lorsqu'ils sont estérifiés dans une classe de PL particulière (*Cf. §.II.4).* Il serait donc intéressant d'aller plus loin dans cette étude et de déterminer dans quelles classes de PL sont estérifiés les différents métabolites monohydroxylés. De plus, l'étude de la répartition des PL oxydés dans les membranes serait également intéressante. En effet, les métabolites oxygénés possèdent des groupements polaires supplémentaires (le plus souvent des groupements hydroxyles) par rapport à leurs AGPI précurseurs, ce qui pourrait engendrer des perturbations membranaires.

L'identification des métabolites formés durant une inflammation doit également être poursuivie afin de confirmer les résultats obtenus. Il est ainsi envisagé de supplémenter des rats en DHA pendant plusieurs jours afin d'observer ses effets sur la synthèse de médiateurs impliqués dans l'inflammation. D'autre part, une cinétique de la synthèse de ces médiateurs permettrait d'améliorer nos connaissances sur la résolution de la neuroinflammation.

Il serait également intéressant d'étudier ces voies métaboliques dans certaines maladies neurologiques, et plus particulièrement dans la maladie d'Alzheimer. En effet, il est connu que le DHA et/ou certains de ses médiateurs peuvent être altérés au cours de cette maladie. On pourrait supplémenter des animaux en DHA et suivre l'évolution des paramètres pro- et anti-inflammatoires dans un modèle Alzheimer afin de mieux

comprendre leurs effets. Une supplémentation en médiateurs lipidiques tels que la PDX (molécule anti-agrégante et anti-inflammatoire) pourrait également être envisagée afin de tester leurs effets dans le cerveau, notamment dans des modèles d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques.

Parmi les très nombreuses perspectives de ce travail, il est possible d'utiliser notre approche expérimentale et notre outil analytique pour étudier les métabolites oxygénés dérivés d'autres AGPI (ALA, LA…), de l'appliquer à d'autres organes afin d'avoir une vue d'ensemble du métabolisme oxygéné des AGPI mais également d'utiliser différents modèles pathologiques afin d'étudier l'implication de ces métabolites oxygénés dans ces maladies.

REFERENCES

A

Abdel-Halim, M. S., Hamberg, M., Sjoquist, B. and Anggard, E. (**1977**). "Identification of prostaglandin D2 as a major prostaglandin in homogenates of rat brain." Prostaglandins 14(4): 633-643.

Adesuyi, S. A., Cockrell, C. S., Gamache, D. A. and Ellis, E. F. (**1985**). "Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in brain." J Neurochem 45(3): 770-776.

Aid, S., Vancassel, S., Poumes-Ballihaut, C., Chalon, S., Guesnet, P. and Lavialle, M. (**2003**). "Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus." J Lipid Res 44(8): 1545-1551.

Alberghina, M., Lupo, G., Anfuso, C. D. and Infarinato, S. (**1994**). "Differential transport of docosahexaenoate and palmitate through the blood-retina and blood-brain barrier of the rat." Neurosci Lett 171(1-2): 133-136.

Alessandri, J. M., Extier, A., Langelier, B., Perruchot, M. H., Heberden, C., Guesnet, P. and Lavialle, M. (**2008**). "Estradiol favors the formation of eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and n-3 docosapentaenoic acid (22:5n-3) from alpha-linolenic acid (18:3n-3) in SH-SY5Y neuroblastoma cells." Lipids 43(1): 19-28.

Allen, S., Dashwood, M., Morrison, K. and Yacoub, M. (**1998**). "Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries." Circulation 97(24): 2406-2413.

Ally, A. I. and Horrobin, D. F. (**1980**). "Thromboxane A2 in blood vessel walls and its physiological significance: relevance to thrombosis and hypertension." Prostaglandins and medicine 4(6): 431-438.

Ames, B. N. (**2004**). "Delaying the mitochondrial decay of aging." Ann N Y Acad Sci 1019: 406-411.

Amin, M. (**1989**). "Simultaneous determination of prostaglandins (PG) E2, A2 and B2 and stability studies of PGE2 in pharmaceutical preparations by ion-pair reversed phase HPLC." Pharmaceutica acta Helvetiae 64(2): 45-50.

Anderton, B. H. (**2002**). "Ageing of the brain." Mech Ageing Dev 123(7): 811-817.

Ando, S., Tanaka, Y., Toyoda nee Ono, Y., Kon, K. and Kawashima, S. (**2002**). "Turnover of synaptic membranes: age-related changes and modulation by dietary restriction." J Neurosci Res 70(3): 290-297.

Arsenault, D., Julien, C., Tremblay, C. and Calon, F. (**2011**). "DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice." PLoS One 6(2): e17397.

Arterburn, L. M., Hall, E. B. and Oken, H. (**2006**). "Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans." The American journal of clinical nutrition 83(6 Suppl): 1467S-1476S.

Authi, K. S., Lagarde, M. and Crawford, N. (**1985**). "Diacylglycerol lipase activity in human platelet intracellular and surface membranes. Some kinetic properties and fatty acid specificity." FEBS letters 180(1): 95-101.

Aveldano, M. I. and Sprecher, H. (**1983**). "Synthesis of hydroxy fatty acids from 4, 7, 10, 13, 16, 19-[1-14C] docosahexaenoic acid by human platelets." The Journal of biological chemistry 258(15): 9339-9343.

B

Baer, A. N., Klaus, M. V. and Green, F. A. (**1995**). "Epidermal fatty acid oxygenases are activated in non-psoriatic dermatoses." The Journal of investigative dermatology 104(2): 251-255.

Balas, L., Guichardant, M., Durand, T. and Lagarde, M. (**2014**). "Confusion between protectin D1 (PD1) and its isomer protectin DX (PDX). An overview on the dihydroxy-docosatrienes described to date." Biochimie 99: 1-7.

Ballabh, P., Braun, A. and Nedergaard, M. (**2004**). "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications." Neurobiol Dis 16(1): 1-13.

Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J. F. and Alperovitch, A. (**2007**). "Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study." Neurology 69(20): 1921-1930.

Barcelo-Coblijn, G., Hogyes, E., Kitajka, K., Puskas, L. G., Zvara, A., Hackler, L., Jr., Nyakas, C., Penke, Z. and Farkas, T. (**2003**). "Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids." Proc Natl Acad Sci U S A 100(20): 11321-11326.

Basu, S. (**2004**). "Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation." Free radical research 38(2): 105-122.

Basu, S., Whiteman, M., Mattey, D. L. and Halliwell, B. (**2001**). "Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases." Annals of the rheumatic diseases 60(6): 627-631.

Bazan, N. G. (**2013**). "The docosanoid neuroprotectin D1 induces homeostatic regulation of neuroinflammation and cell survival." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 88(1): 127-129.

Bazan, N. G., Fletcher, B. S., Herschman, H. R. and Mukherjee, P. K. (**1994**). "Platelet-activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene." Proc Natl Acad Sci U S A 91(12): 5252-5256.

Bazinet, R. P. and Laye, S. (**2014**). "Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease." Nat Rev Neurosci 15(12): 771-785.

Bernoud, N., Fenart, L., Benistant, C., Pageaux, J. F., Dehouck, M. P., Moliere, P., Lagarde, M., Cecchelli, R. and Lecerf, J. (**1998**). "Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro." J Lipid Res 39(9): 1816-1824.

Berry, C. B., Hayes, D., Murphy, A., Wiessner, M., Rauen, T. and McBean, G. J. (**2005**). "Differential modulation of the glutamate transporters GLT1, GLAST and EAAC1 by docosahexaenoic acid." Brain Res 1037(1-2): 123-133.

Blanchard, H., Pedrono, F., Boulier-Monthean, N., Catheline, D., Rioux, V. and Legrand, P. (**2013**). "Comparative effects of well-balanced diets enriched in alpha-linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 88(5): 383-389.

Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D. N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R. H., Plumier, J. C., Marini, A. M. and Heurteaux, C. (**2009**). "Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke." Neuropsychopharmacology 34(12): 2548-2559.

Boeglin, W. E., Kim, R. B. and Brash, A. R. (**1998**). "A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(12): 6744-6749.

Bourre, J. M. (**2004**). "Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing." J Nutr Health Aging 8(3): 163-174.

Bourre, J. M. and Piciotti, M. (**1992**). "Delta-6 desaturation of alpha-linolenic acid in brain and liver during development and aging in the mouse." Neurosci Lett 141(1): 65-68.

Brash, A. R., Boeglin, W. E. and Chang, M. S. (**1997**). "Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(12): 6148-6152.

Brenner, R. R. and Peluffo, R. O. (**1966**). "Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids." The Journal of biological chemistry 241(22): 5213-5219.

Brezinski, M. E. and Serhan, C. N. (**1990**). "Selective incorporation of (15S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in phosphatidylinositol of human neutrophils: agonist-induced deacylation and transformation of stored hydroxyeicosanoids." Proc Natl Acad Sci U S A 87(16): 6248-6252.

Brinckmann, R., Schnurr, K., Heydeck, D., Rosenbach, T., Kolde, G. and Kuhn, H. (**1998**). "Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme." Blood 91(1): 64-74.

Burdge, G. (**2004**). "Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications." Current opinion in clinical nutrition and metabolic care 7(2): 137-144.

C

Calderon, F. and Kim, H. Y. (**2004**). "Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons." J Neurochem 90(4): 979-988.

Calon, F. (**2011**). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease: key questions and partial answers." Curr Alzheimer Res 8(5): 470-478.

Calzada, C., Vericel, E., Mitel, B., Coulon, L. and Lagarde, M. (**2001**). "12(S)-Hydroperoxy-eicosatetraenoic acid increases arachidonic acid availability in collagen-primed platelets." Journal of lipid research 42(9): 1467-1473.

Cao, D., Xue, R., Xu, J. and Liu, Z. (**2005**). "Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures." J Nutr Biochem 16(9): 538-546.

Capdevila, J. H., Falck, J. R. and Harris, R. C. (**2000**). "Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase." Journal of lipid research 41(2): 163-181.

Carrie, I., Clement, M., de Javel, D., Frances, H. and Bourre, J. M. (**2000**). "Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation." J Lipid Res 41(3): 465-472.

Carrie, I., Smirnova, M., Clement, M., De, J. D., Frances, H. and Bourre, J. M. (**2002**). "Docosahexaenoic acid-rich phospholipid supplementation: effect on behavior, learning ability, and retinal function in control and n-3 polyunsaturated fatty acid deficient old mice." Nutr Neurosci 5(1): 43-52.

Carver, J. D., Benford, V. J., Han, B. and Cantor, A. B. (**2001**). "The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects." Brain research bulletin 56(2): 79-85.

Chalon, S. (**2006**). "Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 75(4-5): 259-269.

Champeil-Potokar, G., Chaumontet, C., Guesnet, P., Lavialle, M. and Denis, I. (**2006**). "Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes." Eur J Neurosci 24(11): 3084-3090.

Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S. and Simmons, D. L. (**2002**). "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(21): 13926-13931.

Chandrasekharan, N. V. and Simmons, D. L. (**2004**). "The cyclooxygenases." Genome biology 5(9): 241.

Chapkin, R. S., Wang, N., Fan, Y. Y., Lupton, J. R. and Prior, I. A. (**2008**). "Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains." Biochimica et biophysica acta 1778(2): 466-471.

Chawengsub, Y., Gauthier, K. M. and Campbell, W. B. (**2009**). "Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone." American journal of physiology. Heart and circulatory physiology 297(2): H495-507.

Chen, C. and Bazan, N. G. (**2005**). "Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection." Prostaglandins Other Lipid Mediat 77(1-4): 65-76.

Chen, C. T. and Bazinet, R. P. (**2015**). "beta-oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 92: 33-40.

Chen, P., Fenet, B., Michaud, S., Tomczyk, N., Vericel, E., Lagarde, M. and Guichardant, M. (**2009**). "Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation." FEBS letters 583(21): 3478-3484.

Chen, P., Vericel, E., Lagarde, M. and Guichardant, M. (**2011**). "Poxytrins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 25(1): 382-388.

Chiang, N., Fredman, G., Backhed, F., Oh, S. F., Vickery, T., Schmidt, B. A. and Serhan, C. N. (**2012**). "Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements." Nature 484(7395): 524-528.

Chiu, C. Y., Gomolka, B., Dierkes, C., Huang, N. R., Schroeder, M., Purschke, M., Manstein, D., Dangi, B. and Weylandt, K. H. (**2012**). "Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis." Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.] 61(9): 967-976.

Cho, H. P., Nakamura, M. and Clarke, S. D. (**1999a**). "Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase." J Biol Chem 274(52): 37335-37339.

Cho, H. P., Nakamura, M. T. and Clarke, S. D. (**1999b**). "Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase." J Biol Chem 274(1): 471-477.

Clandinin, M. T. (**1999**). "Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid." Lipids 34(2): 131-137.

Claria, J., Dalli, J., Yacoubian, S., Gao, F. and Serhan, C. N. (**2012**). "Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat." J Immunol 189(5): 2597-2605.

Clark, S. R., Guy, C. J., Scurr, M. J., Taylor, P. R., Kift-Morgan, A. P., Hammond, V. J., Thomas, C. P., Coles, B., Roberts, G. W., Eberl, M., Jones, S. A., Topley, N., Kotecha, S. and O'Donnell, V. B. (**2011**). "Esterified eicosanoids are acutely generated by 5-lipoxygenase in primary human neutrophils and in human and murine infection." Blood 117(6): 2033-2043.

Clarke, S. D. (**2001**). "Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome." The Journal of nutrition 131(4): 1129-1132.

Cobanoglu, B., Toskala, E., Ural, A. and Cingi, C. (**2013**). "Role of leukotriene antagonists and antihistamines in the treatment of allergic rhinitis." Current allergy and asthma reports 13(2): 203-208.

Corey, E. J., Shih, C. and Cashman, J. R. (**1983**). "Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80(12): 3581-3584.

Corrigan, F. M., Horrobin, D. F., Skinner, E. R., Besson, J. A. and Cooper, M. B. (**1998**). "Abnormal content of n-6 and n-3 long-chain unsaturated fatty acids in the phosphoglycerides and cholesterol esters of parahippocampal cortex from Alzheimer's disease patients and its relationship to acetyl CoA content." Int J Biochem Cell Biol 30(2): 197-207.

Croset, M., Brossard, N., Polette, A. and Lagarde, M. (**2000**). "Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat." Biochem J 345 Pt 1: 61-67.

Croset, M. and Lagarde, M. (**1985**). "Enhancement of eicosaenoic acid lipoxygenation in human platelets by 12-hydroperoxy derivative of arachidonic acid." Lipids 20(11): 743-750.

Croset, M., Sala, A., Folco, G. and Lagarde, M. (**1988**). "Inhibition by lipoxygenase products of TXA2-like responses of platelets and vascular smooth muscle. 14-Hydroxy from 22:6n-3 is more potent than 12-HETE." Biochemical pharmacology 37(7): 1275-1280.

Cunnane, S. C. and Anderson, M. J. (**1997**). "The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat." The Journal of nutrition 127(1): 146-152.

Cunnane, S. C., Francescutti, V., Brenna, J. T. and Crawford, M. A. (**2000**). "Breast-fed infants achieve a higher rate of brain and whole body docosahexaenoate accumulation than formula-fed infants not consuming dietary docosahexaenoate." Lipids 35(1): 105-111.

Cunnane, S. C., Plourde, M., Pifferi, F., Begin, M., Feart, C. and Barberger-Gateau, P. (**2009**). "Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease." Prog Lipid Res 48(5): 239-256.

Cunnane, S. C., Williams, S. C., Bell, J. D., Brookes, S., Craig, K., Iles, R. A. and Crawford, M. A. (**1994**). "Utilization of uniformly labeled 13C-polyunsaturated fatty acids in the synthesis of long-chain fatty acids and cholesterol accumulating in the neonatal rat brain." J Neurochem 62(6): 2429-2436.

D

Dacks, P. A., Shineman, D. W. and Fillit, H. M. (**2013**). "Current evidence for the clinical use of long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer's disease." J Nutr Health Aging 17(3): 240-251.

Dalli, J. and Serhan, C. N. (**2012**). "Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators." Blood 120(15): e60-72.

Dalli, J., Zhu, M., Vlasenko, N. A., Deng, B., Haeggstrom, J. Z., Petasis, N. A. and Serhan, C. N. (**2013**). "The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype." FASEB J 27(7): 2573-2583.

Dangour, A. D., Allen, E., Elbourne, D., Fasey, N., Fletcher, A. E., Hardy, P., Holder, G. E., Knight, R., Letley, L., Richards, M. and Uauy, R. (**2010**). "Effect of 2-y n-3 long-chain

polyunsaturated fatty acid supplementation on cognitive function in older people: a randomized, double-blind, controlled trial." Am J Clin Nutr 91(6): 1725-1732.

Dayaker, G., Durand, T. and Balas, L. (**2014**). "A versatile and stereocontrolled total synthesis of dihydroxylated docosatrienes containing a conjugated E,E,Z-triene." Chemistry 20(10): 2879-2887.

de la Torre, J. C. and Mussivand, T. (**1993**). "Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease?" Neurol Res 15(3): 146-153.

De Smedt-Peyrusse, V., Sargueil, F., Moranis, A., Harizi, H., Mongrand, S. and Laye, S. (**2008**). "Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization." J Neurochem 105(2): 296-307.

Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M. P., Pierce, A., Torpier, G. and Cecchelli, R. (**1997**). "A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier." J Cell Biol 138(4): 877-889.

Delton-Vandenbroucke, I., Grammas, P. and Anderson, R. E. (**1997**). "Polyunsaturated fatty acid metabolism in retinal and cerebral microvascular endothelial cells." J Lipid Res 38(1): 147-159.

DeMar, J. C., Jr., Lee, H. J., Ma, K., Chang, L., Bell, J. M., Rapoport, S. I. and Bazinet, R. P. (**2006**). "Brain elongation of linoleic acid is a negligible source of the arachidonate in brain phospholipids of adult rats." Biochim Biophys Acta 1761(9): 1050-1059.

Demar, J. C., Jr., Ma, K., Chang, L., Bell, J. M. and Rapoport, S. I. (**2005**). "alpha-Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipids of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid." J Neurochem 94(4): 1063-1076.

Deng, B., Wang, C. W., Arnardottir, H. H., Li, Y., Cheng, C. Y., Dalli, J. and Serhan, C. N. (**2014**). "Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages." PloS one 9(7): e102362.

Denis, I., Potier, B., Heberden, C. and Vancassel, S. (**2015**). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain aging." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 18(2): 139-146.

Denis, I., Potier, B., Vancassel, S., Heberden, C. and Lavialle, M. (**2013**). "Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: body of evidence and possible mechanisms." Ageing Res Rev 12(2): 579-594.

Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y. H., Magrioti, V. and Kokotos, G. (**2011**). "Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention." Chemical reviews 111(10): 6130-6185.

Derogis, P. B., Freitas, F. P., Marques, A. S., Cunha, D., Appolinario, P. P., de Paula, F., Lourenco, T. C., Murgu, M., Di Mascio, P., Medeiros, M. H. and Miyamoto, S. (**2013**). "The development of a specific and sensitive LC-MS-based method for the detection and quantification of hydroperoxy- and hydroxydocosahexaenoic acids as a tool for lipidomic analysis." PLoS One 8(10): e77561.

Devillier, P. and Bessard, G. (**1997**). "Thromboxane A2 and related prostaglandins in airways." Fundamental & clinical pharmacology 11(1): 2-18.

Domenichiello, A. F., Chen, C. T., Trepanier, M. O., Stavro, P. M. and Bazinet, R. P. (**2014**). "Whole body synthesis rates of DHA from alpha-linolenic acid are greater than brain DHA accretion and uptake rates in adult rats." J Lipid Res 55(1): 62-74.

Dorn, G. W., 2nd and DeJesus, A. (**1991**). "Human platelet aggregation and shape change are coupled to separate thromboxane A2-prostaglandin H2 receptors." The American journal of physiology 260(2 Pt 2): H327-334.

DuBois, R. N. (**2003**). "Leukotriene A4 signaling, inflammation, and cancer." Journal of the National Cancer Institute 95(14): 1028-1029.

Dunn, H. C., Ager, R. R., Baglietto-Vargas, D., Cheng, D., Kitazawa, M., Cribbs, D. H. and Medeiros, R. (**2015**). "Restoration of lipoxin A4 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology in the 3xTg-AD mouse model." J Alzheimers Dis 43(3): 893-903.

Dyall, S. C. (**2015**). "Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA." Front Aging Neurosci 7: 52.

E

Edlund, C., Soderberg, M., Kristensson, K. and Dallner, G. (**1992**). "Ubiquinone, dolichol, and cholesterol metabolism in aging and Alzheimer's disease." Biochem Cell Biol 70(6): 422-428.

Edmond, J. (**2001**). "Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport." J Mol Neurosci 16(2-3): 181-193; discussion 215-121.

Ehninger, D. and Kempermann, G. (**2008**). "Neurogenesis in the adult hippocampus." Cell Tissue Res 331(1): 243-250.

Eickmeier, O., Seki, H., Haworth, O., Hilberath, J. N., Gao, F., Uddin, M., Croze, R. H., Carlo, T., Pfeffer, M. A. and Levy, B. D. (**2013**). "Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury." Mucosal Immunol 6(2): 256-266.

F

Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J. and Bonmassar, E. (**2009**). "miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA." Biochim Biophys Acta 1792(6): 497-505.

Favreliere, S., Perault, M. C., Huguet, F., De Javel, D., Bertrand, N., Piriou, A. and Durand, G. (**2003**). "DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus." Neurobiol Aging 24(2): 233-243.

Felten, D. L., O'Banion, M. K. and Maida, M. E. (**2015**). Netter's Atlas of Neuroscience, Elsevier Health Sciences.

Figueroa, J. D., Cordero, K., Baldeosingh, K., Torrado, A. I., Walker, R. L., Miranda, J. D. and Leon, M. D. (**2012**). "Docosahexaenoic acid pretreatment confers protection and functional improvements after acute spinal cord injury in adult rats." J Neurotrauma 29(3): 551-566.

Fonlupt, P., Croset, M. and Lagarde, M. (**1991**). "12-HETE inhibits the binding of PGH2/TXA2 receptor ligands in human platelets." Thrombosis research 63(2): 239-248.

Ford-Hutchinson, A. W., Bray, M. A., Doig, M. V., Shipley, M. E. and Smith, M. J. (**1980**). "Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes." Nature 286(5770): 264-265.

Fredman, G., Ozcan, L., Spolitu, S., Hellmann, J., Spite, M., Backs, J. and Tabas, I. (**2014**). "Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B4 synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 111(40): 14530-14535.

Fredman, G. and Serhan, C. N. (**2011**). "Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution." Biochem J 437(2): 185-197.

Fukushima, M. (**1992**). "Biological activities and mechanisms of action of PGJ2 and related compounds: an update." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 47(1): 1-12.

Funk, C. D., Chen, X. S., Johnson, E. N. and Zhao, L. (**2002**). "Lipoxygenase genes and their targeted disruption." Prostaglandins & other lipid mediators 68-69: 303-312.

Funk, C. D., Furci, L. and FitzGerald, G. A. (**1990**). "Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythroleukemia cell 12-lipoxygenase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(15): 5638-5642.

G

Gamoh, S., Hashimoto, M., Hossain, S. and Masumura, S. (**2001**). "Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats." Clin Exp Pharmacol Physiol 28(4): 266-270.

Giera, M., Ioan-Facsinay, A., Toes, R., Gao, F., Dalli, J., Deelder, A. M., Serhan, C. N. and Mayboroda, O. A. (**2012**). "Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS." Biochim Biophys Acta 1821(11): 1415-1424.

Ginsberg, L., Xuereb, J. H. and Gershfeld, N. L. (**1998**). "Membrane instability, plasmalogen content, and Alzheimer's disease." J Neurochem 70(6): 2533-2538.

Girton, R. A., Spector, A. A. and Gordon, J. A. (**1994**). "15-HETE: selective incorporation into inositol phospholipids of MDCK cells." Kidney Int 45(4): 972-980.

Giusto, N. M., Salvador, G. A., Castagnet, P. I., Pasquare, S. J. and Ilincheta de Boschero, M. G. (**2002**). "Age-associated changes in central nervous system glycerolipid composition and metabolism." Neurochem Res 27(11): 1513-1523.

Gladine, C., Laurie, J. C., Giulia, C., Dominique, B., Corinne, C., Nathalie, H., Bart, S., Giuseppe, Z., Alessio, P., Jean-Marie, G., Camille, O. and Thierry, D. (**2014**). "Neuroprostanes, produced by free-radical mediated peroxidation of DHA, inhibit the inflammatory response of human macrophages." Free Radic Biol Med 75 Suppl 1: S15.

Gleissman, H., Yang, R., Martinod, K., Lindskog, M., Serhan, C. N., Johnsen, J. I. and Kogner, P. (**2010**). "Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 24(3): 906-915.

Glisky, E. L. (**2007**). Changes in Cognitive Function in Human Aging. Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. D. R. Riddle. Boca Raton (FL).

Goldberg, I. J., Eckel, R. H. and Abumrad, N. A. (**2009**). "Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways." J Lipid Res 50 Suppl: S86-90.

Gordon, J. A. and Spector, A. A. (**1987**). "Effects of 12-HETE on renal tubular epithelial cells." Am J Physiol 253(2 Pt 1): C277-285.

Gormand, F., Chabannes, B., Moliere, P., Perrin-Fayolle, M., Lagarde, M. and Pacheco, Y. (**1996**). "Uptake of 12-HETE by human bronchial epithelial cells (HBEC): effects on HBEC cytokine production." Prostaglandins 51(4): 263-273.

Gray, S. J. and Heptinstall, S. (**1991**). "Interactions between prostaglandin E2 and inhibitors of platelet aggregation which act through cyclic AMP." European journal of pharmacology 194(1): 63-70.

Green, P., Glozman, S., Kamensky, B. and Yavin, E. (**1999**). "Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid." J Lipid Res 40(5): 960-966.

Grintal, B., Champeil-Potokar, G., Lavialle, M., Vancassel, S., Breton, S. and Denis, I. (**2009**). "Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid." Neurochem Int 54(8): 535-543.

Guesnet, P., Alessandri, J. M., Astorg, P., Pifferi, F. and Lavialle, M. (**2005**). "Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI)." OCL 12(4-5): 333-343.

Guichardant, M., Bacot, S., Moliere, P. and Lagarde, M. (**2006**). "Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 75(3): 179-182.

Guillou, H., Zadravec, D., Martin, P. G. and Jacobsson, A. (**2010**). "The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice." Progress in lipid research 49(2): 186-199.

Guo, Z., Hu, Q., Xu, L., Guo, Z. N., Ou, Y., He, Y., Yin, C., Sun, X., Tang, J. and Zhang, J. H. (**2016**). "Lipoxin A4 Reduces Inflammation Through Formyl Peptide Receptor 2/p38 MAPK Signaling Pathway in Subarachnoid Hemorrhage Rats." Stroke 47(2): 490-497.

H

Hamberg, M., Svensson, J. and Samuelsson, B. (**1975**). "Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 72(8): 2994-2998.

Hambrecht, G. S., Adesuyi, S. A., Holt, S. and Ellis, E. F. (**1987**). "Brain 12-HETE formation in different species, brain regions, and in brain microvessels." Neurochem Res 12(11): 1029-1033.

Hamilton, J. A. and Brunaldi, K. (**2007**). "A model for fatty acid transport into the brain." J Mol Neurosci 33(1): 12-17.

Hamilton, J. A., Johnson, R. A., Corkey, B. and Kamp, F. (**2001**). "Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes." J Mol Neurosci 16(2-3): 99-108; discussion 151-107.

Hammarstrom, S. (**1983**). "Leukotrienes." Annual review of biochemistry 52: 355-377.

Hammond, V. J. and O'Donnell, V. B. (**2012**). "Esterified eicosanoids: generation, characterization and function." Biochimica et biophysica acta 1818(10): 2403-2412.

Han, J., Sun, L., Xu, Y., Liang, H. and Cheng, Y. (**2015**). "Activation of PPARgamma by 12/15-lipoxygenase during cerebral ischemia-reperfusion injury." Int J Mol Med 35(1): 195-201.

Hashimoto, M., Hossain, S., Agdul, H. and Shido, O. (**2005**). "Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid beta-infused rats relates to the decreases of amyloid beta and cholesterol levels in detergent-insoluble membrane fractions." Biochim Biophys Acta 1738(1-3): 91-98.

Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T. and Shido, O. (**2006**). "Docosahexaenoic acid-induced protective effect against impaired learning in amyloid beta-infused rats is associated with increased synaptosomal membrane fluidity." Clin Exp Pharmacol Physiol 33(10): 934-939.

Hassan, I. R. and Gronert, K. (**2009**). "Acute changes in dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids have a pronounced impact on survival following ischemic renal injury and formation of renoprotective docosahexaenoic acid-derived protectin D1." Journal of immunology 182(5): 3223-3232.

Hata, A. N. and Breyer, R. M. (**2004**). "Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation." Pharmacology & therapeutics 103(2): 147-166.

Helliwell, R. J., Adams, L. F. and Mitchell, M. D. (**2004**). "Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 70(2): 101-113.

Hellmann, J., Tang, Y., Kosuri, M., Bhatnagar, A. and Spite, M. (**2011**). "Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice." FASEB J 25(7): 2399-2407.

Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y., Ichimasa, M., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S. and Nagata, K. (**2001**). "Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2." The Journal of experimental medicine 193(2): 255-261.

Hjorth, E., Zhu, M., Toro, V. C., Vedin, I., Palmblad, J., Cederholm, T., Freund-Levi, Y., Faxen-Irving, G., Wahlund, L. O., Basun, H., Eriksdotter, M. and Schultzberg, M. (**2013**). "Omega-3 fatty acids enhance phagocytosis of Alzheimer's disease-related amyloid-beta42 by human microglia and decrease inflammatory markers." J Alzheimers Dis 35(4): 697-713.

Hoffmann, C. (**2000a**). "COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use." Current medicinal chemistry 7(11): 1113-1120.

Hoffmann, C. (**2000b**). "COX-2 in brain and spinal cord implications for therapeutic use." Curr Med Chem 7(11): 1113-1120.

Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., Moussignac, R. L. and Serhan, C. N. (**2003**). "Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation." The Journal of biological chemistry 278(17): 14677-14687.

Horrocks, L. A. and Farooqui, A. A. (**2004**). "Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 70(4): 361-372.

Huang, C. and Freter, C. (**2015**). "Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy." Int J Mol Sci 16(1): 924-949.

Huang, T. L., Zandi, P. P., Tucker, K. L., Fitzpatrick, A. L., Kuller, L. H., Fried, L. P., Burke, G. L. and Carlson, M. C. (**2005**). "Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4." Neurology 65(9): 1409-1414.

I

Ide, T., Egan, K., Bell-Parikh, L. C. and FitzGerald, G. A. (**2003**). "Activation of nuclear receptors by prostaglandins." Thrombosis research 110(5-6): 311-315.

Igarashi, M., DeMar, J. C., Jr., Ma, K., Chang, L., Bell, J. M. and Rapoport, S. I. (**2007**). "Upregulated liver conversion of alpha-linolenic acid to docosahexaenoic acid in rats on a 15 week n-3 PUFA-deficient diet." J Lipid Res 48(1): 152-164.

Ihara, A., Wada, K., Yoneda, M., Fujisawa, N., Takahashi, H. and Nakajima, A. (**2007**). "Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer." Journal of pharmacological sciences 103(1): 24-32.

Ilincheta de Boschero, M. G., Roque, M. E., Salvador, G. A. and Giusto, N. M. (**2000**). "Alternative pathways for phospholipid synthesis in different brain areas during aging." Exp Gerontol 35(5): 653-668.

Imai, Y. (**2015**). "Role of omega-3 PUFA-derived mediators, the protectins, in influenza virus infection." Biochimica et biophysica acta 1851(4): 496-502.

Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V. B., Kuhn, H. and Walther, M. (**2010**). "Molecular enzymology of lipoxygenases." Archives of biochemistry and biophysics 503(2): 161-174.

J

Jack, G. S., Brash, A. R., Olson, S. J., Manning, S., Coffey, C. S., Smith, J. A., Jr. and Shappell, S. B. (**2000**). "Reduced 15-lipoxygenase-2 immunostaining in prostate adenocarcinoma: correlation with grade and expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia." Human pathology 31(9): 1146-1154.

Joffre, C., Nadjar, A., Lebbadi, M., Calon, F. and Laye, S. (**2014**). "n-3 LCPUFA improves cognition: the young, the old and the sick." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 91(1-2): 1-20.

Jonasdottir, H. S., Papan, C., Fabritz, S., Balas, L., Durand, T., Hardardottir, I., Freysdottir, J. and Giera, M. (**2015**). "Differential mobility separation of leukotrienes and protectins." Anal Chem 87(10): 5036-5040.

Joulain, C., Meskini, N., Anker, G., Lagarde, M. and Prigent, A. F. (**1995**). "Esterification of 12(S)-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid into the phospholipids of human peripheral blood mononuclear cells: inhibition of the proliferative response." J Cell Physiol 164(1): 154-163.

K

Kaduce, T. L., Chen, Y., Hell, J. W. and Spector, A. A. (**2008**). "Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 fatty acid precursors in rat hippocampal neurons." J Neurochem 105(4): 1525-1535.

Kaduce, T. L., Fang, X., Harmon, S. D., Oltman, C. L., Dellsperger, K. C., Teesch, L. M., Gopal, V. R., Falck, J. R., Campbell, W. B., Weintraub, N. L. and Spector, A. A. (**2004**). "20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) metabolism in coronary endothelial cells." The Journal of biological chemistry 279(4): 2648-2656.

Kalmijn, S., Launer, L. J., Ott, A., Witteman, J. C., Hofman, A. and Breteler, M. M. (**1997**). "Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study." Ann Neurol 42(5): 776-782.

Kamp, F. and Hamilton, J. A. (**1992**). "pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A 89(23): 11367-11370.

Karanian, J. W., Kim, H. Y. and Salem, N., Jr. (**1996**). "The structure-activity relationship of lipoxygenase products of long-chain polyunsaturated fatty acids: effects on human platelet aggregation." Lipids 31 Suppl: S305-308.

Katagiri, Y. U., Kiyokawa, N. and Fujimoto, J. (**2001**). "A role for lipid rafts in immune cell signaling." Microbiology and immunology 45(1): 1-8.

Katoh, A., Ikeda, H., Murohara, T., Haramaki, N., Ito, H. and Imaizumi, T. (**1998**). "Platelet-derived 12-hydroxyeicosatetraenoic acid plays an important role in mediating canine coronary thrombosis by regulating platelet glycoprotein IIb/IIIa activation." Circulation 98(25): 2891-2898.

Kawabe, J., Ushikubi, F. and Hasebe, N. (**2010**). "Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives." Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society 74(5): 836-843.

Kawakita, E., Hashimoto, M. and Shido, O. (**2006**). "Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo." Neuroscience 139(3): 991-997.

Kelavkar, U., Cohen, C., Eling, T. and Badr, K. (**2002**). "15-lipoxygenase-1 overexpression in prostate adenocarcinoma." Advances in experimental medicine and biology 507: 133-145.

Khanapure, S. P., Garvey, D. S., Janero, D. R. and Letts, L. G. (**2007**). "Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers." Current topics in medicinal chemistry 7(3): 311-340.

Kim, H. Y., Akbar, M. and Kim, Y. S. (**2010**). "Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signaling promoted by docosahexaenoic acid." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 82(4-6): 165-172.

Kim, H. Y., Sawazaki, S. and Salem, N., Jr. (**1991**). "Lipoxygenation in rat brain?" Biochem Biophys Res Commun 174(2): 729-734.

Kirsch, C. M., Sigal, E., Djokic, T. D., Graf, P. D. and Nadel, J. A. (**1988**). "An in vivo chemotaxis assay in the dog trachea: evidence for chemotactic activity of 8,15-diHETE." Journal of applied physiology 64(5): 1792-1795.

Konagai, C., Yanagimoto, K., Hayamizu, K., Han, L., Tsuji, T. and Koga, Y. (**2013**). "Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: a randomized controlled trial in healthy elderly volunteers." Clin Interv Aging 8: 1247-1257.

Kotani, S., Sakaguchi, E., Warashina, S., Matsukawa, N., Ishikura, Y., Kiso, Y., Sakakibara, M., Yoshimoto, T., Guo, J. and Yamashima, T. (**2006**). "Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction." Neurosci Res 56(2): 159-164.

Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel, L. J. and American Heart Association. Nutrition, C. (**2002**). "Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease." Circulation 106(21): 2747-2757.

Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N., Yacoubian, S., Lee, C. H., Yang, R., Petasis, N. A. and Serhan, C. N. (**2010**). "Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 107(4): 1660-1665.

Kudo, I. and Murakami, M. (**2002**). "Phospholipase A2 enzymes." Prostaglandins & other lipid mediators 68-69: 3-58.

Kuhn, H. (**1996**). "Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid." Progress in lipid research 35(3): 203-226.

Kuhn, H., Banthiya, S. and van Leyen, K. (**2015a**). "Mammalian lipoxygenases and their biological relevance." Biochim Biophys Acta 1851(4): 308-330.

Kuhn, H., Banthiya, S. and van Leyen, K. (**2015b**). "Mammalian lipoxygenases and their biological relevance." Biochimica et biophysica acta 1851(4): 308-330.

Kumar, V. B., Vyas, K., Buddhiraju, M., Alshaher, M., Flood, J. F. and Morley, J. E. (**1999**). "Changes in membrane fatty acids and delta-9 desaturase in senescence accelerated (SAMP8) mouse hippocampus with aging." Life Sci 65(16): 1657-1662.

Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C. and Stallings, W. C. (**1996**). "Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents." Nature 384(6610): 644-648.

Kurvinen, J. P., Kuksis, A., Sinclair, A. J., Abedin, L. and Kallio, H. (**2000**). "The effect of low alpha-linolenic acid diet on glycerophospholipid molecular species in guinea pig brain." Lipids 35(9): 1001-1009.

L

Labrousse, V. F., Nadjar, A., Joffre, C., Costes, L., Aubert, A., Gregoire, S., Bretillon, L. and Laye, S. (**2012**). "Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice." PLoS One 7(5): e36861.

Lagarde, M. (**1988**). "Metabolism of fatty acids by platelets and the functions of various metabolites in mediating platelet function." Progress in lipid research 27(2): 135-152.

Lagarde, M., Bernoud, N., Brossard, N., Lemaitre-Delaunay, D., Thies, F., Croset, M. and Lecerf, J. (**2001**). "Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain." J Mol Neurosci 16(2-3): 201-204; discussion 215-221.

Lagarde, M., Calzada, C., Jouvene, C., Bernoud-Hubac, N., Letisse, M., Guichardant, M. and Vericel, E. (**2015**). "Functional fluxolipidomics of polyunsaturated fatty acids and oxygenated metabolites in the blood vessel compartment." Progress in lipid research 60: 41-49.

Lavialle, M., Champeil-Potokar, G., Denis, I., Guesnet, P., Pifferi, F. and Vancassel, S. (**2007**). "Le DHA dans la neurotransmission." OCL 14(1): 11-15.

Lavialle, M. and Laye, S. (**2010**). "Acide gras poly-insaturés (oméga 3, oméga 6) et fonctionnement du système nerveux central." Innov. Agron. 10: 25-42.

Laye, S. (**2010**). "Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 82(4-6): 295-303.

Layé, S., Delpech, J.-C., De Smedt-Peyrusse, V., Joffre, C., Larrieu, T., Madore, C., Nadjar, A. and Capuron, L. (**2011**). "Neuroinflammation and aging: influence of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid*." Ocl 18(6): 301-306.

Leaf, A., Kang, J. X., Xiao, Y. F. and Billman, G. E. (**2003**). "Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils." Circulation 107(21): 2646-2652.

Lê, Q. H., El Alaoui, M., Véricel, E., Ségrestin, B., Soulère, L., Guichardant, M., Lagarde, M., Moulin, P., and Calzada, C. (**2015**). "Glycoxidized HDL, HDL enriched with oxidized phospholipids and HDL from diabetic patients inhibit platelet function." J Clin Ebdocrinol Metab 100(5):2006-2014.

Lee, E. and Son, H. (**2009**). "Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors." BMB Rep 42(5): 239-244.

Lee, S. H., Williams, M. V., DuBois, R. N. and Blair, I. A. (**2003**). "Targeted lipidomics using electron capture atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom 17(19): 2168-2176.

Lee, T. H., Mencia-Huerta, J. M., Shih, C., Corey, E. J., Lewis, R. A. and Austen, K. F. (**1984**). "Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxygenase pathway products by ionophore-activated human neutrophils." The Journal of clinical investigation 74(6): 1922-1933.

Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., Gronert, K. and Serhan, C. N. (**2001**). "Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution." Nat Immunol 2(7): 612-619.

Levy, B. D., Kohli, P., Gotlinger, K., Haworth, O., Hong, S., Kazani, S., Israel, E., Haley, K. J. and Serhan, C. N. (**2007**). "Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness." Journal of immunology 178(1): 496-502.

Li, X., Hong, S., Li, P. L. and Zhang, Y. (**2011**). "Docosahexanoic acid-induced coronary arterial dilation: actions of 17S-hydroxy docosahexanoic acid on K+ channel activity." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 336(3): 891-899.

Lim, G. P., Calon, F., Morihara, T., Yang, F., Teter, B., Ubeda, O., Salem, N., Jr., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (**2005**). "A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model." J Neurosci 25(12): 3032-3040.

Lima-Garcia, J. F., Dutra, R. C., da Silva, K., Motta, E. M., Campos, M. M. and Calixto, J. B. (**2011**). "The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats." Br J Pharmacol 164(2): 278-293.

Limor, R., Sharon, O., Knoll, E., Many, A., Weisinger, G. and Stern, N. (**2008**). "Lipoxygenase-derived metabolites are regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 expression in human vascular smooth muscle cells." American journal of hypertension 21(2): 219-223.

Lin, L. E., Chen, C. T., Hildebrand, K. D., Liu, Z., Hopperton, K. E. and Bazinet, R. P. (2015). "Chronic dietary n-6 PUFA deprivation leads to conservation of arachidonic acid and more rapid loss of DHA in rat brain phospholipids." J Lipid Res 56(2): 390-402.

Lindgren, J. A., Hokfelt, T., Dahlen, S. E., Patrono, C. and Samuelsson, B. (**1984**). "Leukotrienes in the rat central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A 81(19): 6212-6216.

Little, S. J., Lynch, M. A., Manku, M. and Nicolaou, A. (**2007**). "Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: a lipidomic analysis." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 77(3-4): 155-162.

Liu, M., Boussetta, T., Makni-Maalej, K., Fay, M., Driss, F., El-Benna, J., Lagarde, M. and Guichardant, M. (**2014**). "Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities." Lipids 49(1): 49-57.

Lukiw, W. J., Cui, J. G., Marcheselli, V. L., Bodker, M., Botkjaer, A., Gotlinger, K., Serhan, C. N. and Bazan, N. G. (**2005**). "A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease." J Clin Invest 115(10): 2774-2783.

Luo, C. L., Li, Q. Q., Chen, X. P., Zhang, X. M., Li, L. L., Li, B. X., Zhao, Z. Q. and Tao, L. Y. (**2013**). "Lipoxin A4 attenuates brain damage and downregulates the production of pro-inflammatory cytokines and phosphorylated mitogen-activated protein kinases in a mouse model of traumatic brain injury." Brain Res 1502: 1-10.

M

Maas, R. L., Brash, A. R. and Oates, J. A. (**1981**). "A second pathway of leukotriene biosynthesis in porcine leukocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78(9): 5523-5527.

Mancini, J. A., Abramovitz, M., Cox, M. E., Wong, E., Charleson, S., Perrier, H., Wang, Z., Prasit, P. and Vickers, P. J. (**1993**). "5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein." FEBS letters 318(3): 277-281.

Mancini, J. A., O'Neill, G. P., Bayly, C., and Vickers, P. J. (**1994**) "Mutation of serine-516 in human prostaglandin G/H synthase-2 to methionine or aspirin acetylation of this residue stimulates 15-R-HETE synthesis." FEBS Lett. 342(1):33−37.

Manev, H., Chen, H., Dzitoyeva, S. and Manev, R. (**2011**). "Cyclooxygenases and 5-lipoxygenase in Alzheimer's disease." Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry 35(2): 315-319.

Marcheselli, V. L., Hong, S., Lukiw, W. J., Tian, X. H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J. M., Chiang, N., Serhan, C. N. and Bazan, N. G. (**2003**). "Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression." The Journal of biological chemistry 278(44): 43807-43817.

Marion-Letellier, R., Savoye, G. and Ghosh, S. (**2015**). "Polyunsaturated fatty acids and inflammation." IUBMB Life 67(9): 659-667.

Martin, C., Uhlig, S. and Ullrich, V. (**2001**). "Cytokine-induced bronchoconstriction in precision-cut lung slices is dependent upon cyclooxygenase-2 and thromboxane receptor activation." American journal of respiratory cell and molecular biology 24(2): 139-145.

Martin, H. (**2010**). "Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components." Mutation research 690(1-2): 57-63.

Martinez, M. and Mougan, I. (**1998**). "Fatty acid composition of human brain phospholipids during normal development." J Neurochem 71(6): 2528-2533.

Marza, E., Long, T., Saiardi, A., Sumakovic, M., Eimer, S., Hall, D. H. and Lesa, G. M. (**2008**). "Polyunsaturated fatty acids influence synaptojanin localization to regulate synaptic vesicle recycling." Mol Biol Cell 19(3): 833-842.

Mashek, D. G., Li, L. O. and Coleman, R. A. (**2007**). "Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling." Future Lipidol 2(4): 465-476.

Maskrey, B. H., Bermudez-Fajardo, A., Morgan, A. H., Stewart-Jones, E., Dioszeghy, V., Taylor, G. W., Baker, P. R., Coles, B., Coffey, M. J., Kuhn, H. and O'Donnell, V. B. (**2007**). "Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase." J Biol Chem 282(28): 20151-20163.

Masterson, J. C., McNamee, E. N., Fillon, S. A., Hosford, L., Harris, R., Fernando, S. D., Jedlicka, P., Iwamoto, R., Jacobsen, E., Protheroe, C., Eltzschig, H. K., Colgan, S. P., Arita, M., Lee, J. J. and Furuta, G. T. (**2015**). "Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis." Gut 64(8): 1236-1247.

McNamara, R. K. and Carlson, S. E. (**2006**). "Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 75(4-5): 329-349.

McNamara, R. K., Liu, Y., Jandacek, R., Rider, T. and Tso, P. (**2008**). "The aging human orbitofrontal cortex: decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearoyl-CoA desaturase activity." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 78(4-5): 293-304.

Meresse, S., Delbart, C., Fruchart, J. C. and Cecchelli, R. (**1989**). "Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries." J Neurochem 53(2): 340-345.

Miller, S. B. (**2006**). "Prostaglandins in health and disease: an overview." Seminars in arthritis and rheumatism 36(1): 37-49.

Ming, G. L. and Song, H. (**2011**). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." Neuron 70(4): 687-702.

Miyahara, T., Runge, S., Chatterjee, A., Chen, M., Mottola, G., Fitzgerald, J. M., Serhan, C. N. and Conte, M. S. (**2013**). "D-series resolvin attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury." FASEB J 27(6): 2220-2232.

Miyamoto, T., Lindgren, J. A., Hokfelt, T. and Samuelsson, B. (**1987**). "Regional distribution of leukotriene and mono-hydroxyeicosatetraenoic acid production in the rat brain. Highest leukotriene C4 formation in the hypothalamus." FEBS Lett 216(1): 123-127.

Mjano, G. and Joris, I. (**2004**). Cells, Tissues, and Diseases: Principles of General Pathology.

Moore, S. A. (**2001**). "Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro." J Mol Neurosci 16(2-3): 195-200; discussion 215-121.

Moore, S. A., Hurt, E., Yoder, E., Sprecher, H. and Spector, A. A. (**1995**). "Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid." Journal of lipid research 36(11): 2433-2443.

Morgan, A. H., Dioszeghy, V., Maskrey, B. H., Thomas, C. P., Clark, S. R., Mathie, S. A., Lloyd, C. M., Kuhn, H., Topley, N., Coles, B. C., Taylor, P. R., Jones, S. A. and O'Donnell, V. B. (**2009**). "Phosphatidylethanolamine-esterified eicosanoids in the mouse: tissue localization and inflammation-dependent formation in Th-2 disease." J Biol Chem 284(32): 21185-21191.

Morgan, L. T., Thomas, C. P., Kuhn, H. and O'Donnell, V. B. (**2010**). "Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase." Biochem J 431(1): 141-148.

Moriguchi, T., Lim, S. Y., Greiner, R., Lefkowitz, W., Loewke, J., Hoshiba, J. and Salem, N., Jr. (**2004**). "Effects of an n-3-deficient diet on brain, retina, and liver fatty acyl composition in artificially reared rats." Journal of lipid research 45(8): 1437-1445.

Morita, M., Kuba, K., Ichikawa, A., Nakayama, M., Katahira, J., Iwamoto, R., Watanebe, T., Sakabe, S., Daidoji, T., Nakamura, S., Kadowaki, A., Ohto, T., Nakanishi, H., Taguchi, R., Nakaya, T., Murakami, M., Yoneda, Y., Arai, H., Kawaoka, Y., Penninger, J. M., Arita, M. and Imai, Y. (**2013**). "The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza." Cell 153(1): 112-125.

Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S. and Tominaga, M. (**2005**). "Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins." Molecular pain 1: 3.

Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Wilson, R. S., Aggarwal, N. and Schneider, J. (**2003**). "Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease." Arch Neurol 60(7): 940-946.

Morris, M. C., Evans, D. A., Tangney, C. C., Bienias, J. L. and Wilson, R. S. (**2005**). "Fish consumption and cognitive decline with age in a large community study." Arch Neurol 62(12): 1849-1853.

Mozaffarian, D. and Wu, J. H. (**2011**). "Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events." J Am Coll Cardiol 58(20): 2047-2067.

Mukherjee, P. K., Marcheselli, V. L., Serhan, C. N. and Bazan, N. G. (**2004**). "Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(22): 8491-8496.

Murphy, R. C. and Gijon, M. A. (**2007**). "Biosynthesis and metabolism of leukotrienes." The Biochemical journal 405(3): 379-395.

N

Nakahata, N. (**2008**). "Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology." Pharmacology & therapeutics 118(1): 18-35.

Nakamura, M. T. and Nara, T. Y. (**2004**). "Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases." Annual review of nutrition 24: 345-376.

Nasjletti, A. (**1998**). "Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension." Hypertension 31(1 Pt 2): 194-200.

Neuhofer, A., Zeyda, M., Mascher, D., Itariu, B. K., Murano, I., Leitner, L., Hochbrugger, E. E., Fraisl, P., Cinti, S., Serhan, C. N. and Stulnig, T. M. (**2013**). "Impaired local production of proresolving lipid mediators in obesity and 17-HDHA as a potential treatment for obesity-associated inflammation." Diabetes 62(6): 1945-1956.

Nguyen, L. N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M. R., Goh, E. L. and Silver, D. L. (**2014**). "Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid." Nature 509(7501): 503-506.

Nie, D., Hillman, G. G., Geddes, T., Tang, K., Pierson, C., Grignon, D. J. and Honn, K. V. (**1998**). "Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth." Cancer research 58(18): 4047-4051.

Norris, P. C., Arnardottir, H., Sanger, J. M., Fichtner, D., Keyes, G. S. and Serhan, C. N. (**2016**). "Resolvin D3 multi-level proresolving actions are host protective during infection." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.

O

O'Donnell, V. B. and Murphy, R. C. (**2012**). "New families of bioactive oxidized phospholipids generated by immune cells: identification and signaling actions." Blood 120(10): 1985-1992.

Oksman, M., Iivonen, H., Hogyes, E., Amtul, Z., Penke, B., Leenders, I., Broersen, L., Lutjohann, D., Hartmann, T. and Tanila, H. (**2006**). "Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice." Neurobiol Dis 23(3): 563-572.

Orr, S. K., Palumbo, S., Bosetti, F., Mount, H. T., Kang, J. X., Greenwood, C. E., Ma, D. W., Serhan, C. N. and Bazinet, R. P. (**2013a**). "Unesterified docosahexaenoic acid is protective in neuroinflammation." J Neurochem 127(3): 378-393.

Orr, S. K., Trepanier, M. O. and Bazinet, R. P. (**2013b**). "n-3 Polyunsaturated fatty acids in animal models with neuroinflammation." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 88(1): 97-103.

P

Palmblad, J., Malmsten, C. L., Uden, A. M., Radmark, O., Engstedt, L. and Samuelsson, B. (**1981**). "Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence." Blood 58(3): 658-661.

Patrono, C. (**1989**). "Aspirin and human platelets: from clinical trials to acetylation of cyclooxygenase and back." Trends in pharmacological sciences 10(11): 453-458.

Pawlosky, R. J., Ward, G. and Salem, N., Jr. (**1996**). "Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain." Lipids 31 Suppl: S103-107.

Perez, S. E., Berg, B. M., Moore, K. A., He, B., Counts, S. E., Fritz, J. J., Hu, Y. S., Lazarov, O., Lah, J. J. and Mufson, E. J. (**2010**). "DHA diet reduces AD pathology in young APPswe/PS1 Delta E9 transgenic mice: possible gender effects." J Neurosci Res 88(5): 1026-1040.

Perluigi, M., Swomley, A. M. and Butterfield, D. A. (**2014**). "Redox proteomics and the dynamic molecular landscape of the aging brain." Ageing Res Rev 13: 75-89.

Petasis, N. A., Akritopoulou-Zanze, I., Fokin, V. V., Bernasconi, G., Keledjian, R., Yang, R., Uddin, J., Nagulapalli, K. C. and Serhan, C. N. (**2005**). "Design, synthesis and bioactions of novel stable mimetics of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 73(3-4): 301-321.

Peters-Golden, M. and Henderson, W. R., Jr. (**2007**). "Leukotrienes." The New England journal of medicine 357(18): 1841-1854.

Phillis, J. W., Horrocks, L. A. and Farooqui, A. A. (**2006**). "Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders." Brain Res Rev 52(2): 201-243.

Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L. A., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antonny, B. and Barelli, H. (**2014**). "Lipid cell biology. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins." Science 345(6197): 693-697.

Plourde, M. and Cunnane, S. C. (**2007**). "Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements." Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme 32(4): 619-634.

Pogash, T. J., El-Bayoumy, K., Amin, S., Gowda, K., de Cicco, R. L., Barton, M., Su, Y., Russo, I. H., Himmelberger, J. A., Slifker, M., Manni, A. and Russo, J. (**2015**). "Oxidized derivative of docosahexaenoic acid preferentially inhibit cell proliferation in triple negative over luminal breast cancer cells." In vitro cellular & developmental biology. Animal 51(2): 121-127.

Pongrac, J. L., Slack, P. J. and Innis, S. M. (**2007**). "Dietary polyunsaturated fat that is low in (n-3) and high in (n-6) fatty acids alters the SNARE protein complex and nitrosylation in rat hippocampus." J Nutr 137(8): 1852-1856.

Prasad, M. R., Lovell, M. A., Yatin, M., Dhillon, H. and Markesbery, W. R. (**1998**). "Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease." Neurochem Res 23(1): 81-88.

Q

Qu, Q., Xuan, W. and Fan, G. H. (**2015**). "Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation." Cell biology international 39(1): 3-22.

Quinn, S. R. and O'Neill, L. A. (**2011**). "A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling." Int Immunol 23(7): 421-425.

R

Radmark, O., Malmsten, C. and Samuelsson, B. (**1980a**). "Leukotriene A4: enzymatic conversion to leukotriene C4." Biochemical and biophysical research communications 96(4): 1679-1687.

Radmark, O., Malmsten, C., Samuelsson, B., Clark, D. A., Goto, G., Marfat, A. and Corey, E. J. (**1980b**). "Leukotriene A: stereochemistry and enzymatic conversion to leukotriene B." Biochemical and biophysical research communications 92(3): 954-961.

Radmark, O. and Samuelsson, B. (**2010**). "Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis." Biochemical and biophysical research communications 396(1): 105-110.

Ramon, S., Baker, S. F., Sahler, J. M., Kim, N., Feldsott, E. A., Serhan, C. N., Martinez-Sobrido, L., Topham, D. J. and Phipps, R. P. (**2014**). "The specialized proresolving mediator 17-HDHA enhances the antibody-mediated immune response against influenza virus: a new class of adjuvant?" Journal of immunology 193(12): 6031-6040.

Rao, G. H., Radha, E. and White, J. G. (**1983**). "Effect of docosahexaenoic acid (DHA) on arachidonic acid metabolism and platelet function." Biochemical and biophysical research communications 117(2): 549-555.

Rapoport, S. I., Igarashi, M. and Gao, F. (**2010**). "Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 82(4-6): 273-276.

Rapoport, S. I., Rao, J. S. and Igarashi, M. (**2007**). "Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 77(5-6): 251-261.

Rey, C., Nadjar, A., Buaud, B., Vaysse, C., Aubert, A., Pallet, V., Laye, S. and Joffre, C. (**2016**). "Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells in vitro." Brain Behav Immun 55: 249-259.

Ricciotti, E. and FitzGerald, G. A. (**2011**). "Prostaglandins and inflammation." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 31(5): 986-1000.

Richards, C. F., Johnson, A. R. and Campbell, W. B. (**1986**). "Specific incorporation of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid into phosphatidylcholine in human endothelial cells." Biochim Biophys Acta 875(3): 569-581.

Roberts, L. J., 2nd, Montine, T. J., Markesbery, W. R., Tapper, A. R., Hardy, P., Chemtob, S., Dettbarn, W. D. and Morrow, J. D. (**1998**). "Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid." J Biol Chem 273(22): 13605-13612.

Romano, M., Cianci, E., Simiele, F. and Recchiuti, A. (**2015**). "Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation." European journal of pharmacology 760: 49-63.

Rouzer, C. A. and Marnett, L. J. (**2009**). "Cyclooxygenases: structural and functional insights." Journal of lipid research 50 Suppl: S29-34.

Ryan, A. and Godson, C. (**2010**). "Lipoxins: regulators of resolution." Current opinion in pharmacology 10(2): 166-172.

S

Salem, N., Jr., Litman, B., Kim, H. Y. and Gawrisch, K. (**2001**). "Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system." Lipids 36(9): 945-959.

Salem, N., Jr., Shingu, T., Kim, H. Y., Hullin, F., Bougnoux, P. and Karanian, J. W. (**1988**). "Specialization in membrane structure and metabolism with respect to polyunsaturated lipids." Prog Clin Biol Res 282: 319-333.

Salem, N. M., Lin, Y. H., Moriguchi, T., Lim, S. Y., Salem, N., Jr. and Hibbeln, J. R. (**2015**). "Distribution of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids in the whole rat body and 25 compartments." Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 100: 13-20.

Samieri, C., Jutand, M. A., Feart, C., Capuron, L., Letenneur, L. and Barberger-Gateau, P. (**2008**). "Dietary patterns derived by hybrid clustering method in older people: association with cognition, mood, and self-rated health." J Am Diet Assoc 108(9): 1461-1471.

Sampath, H. and Ntambi, J. M. (**2004**). "Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression." Nutrition reviews 62(9): 333-339.

Samuelsson, B. (**1964**). "Identification of a Smooth Muscle-Stimulating Factor in Bovine Brain. Prostaglandins and Related Factors 25." Biochim Biophys Acta 84: 218-219.

Samuelsson, B. (**1981**). "Leukotrienes: mediators of allergic reactions and inflammation." International archives of allergy and applied immunology 66 Suppl 1: 98-106.

Samuelsson, B., Dahlen, S. E., Lindgren, J. A., Rouzer, C. A. and Serhan, C. N. (**1987**). "Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects." Science 237(4819): 1171-1176.

Sapieha, P., Stahl, A., Chen, J., Seaward, M. R., Willett, K. L., Krah, N. M., Dennison, R. J., Connor, K. M., Aderman, C. M., Liclican, E., Carughi, A., Perelman, D., Kanaoka, Y., Sangiovanni, J. P., Gronert, K. and Smith, L. E. (**2011**). "5-Lipoxygenase metabolite 4-HDHA is a mediator of the antiangiogenic effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids." Science translational medicine 3(69): 69ra12.

Sastry, P. S. (**1985**). "Lipids of nervous tissue: composition and metabolism." Prog Lipid Res 24(2): 69-176.

Sawazaki, S., Salem, N., Jr. and Kim, H. Y. (**1994**). "Lipoxygenation of docosahexaenoic acid by the rat pineal body." Journal of neurochemistry 62(6): 2437-2447.

Schwenk, R. W., Holloway, G. P., Luiken, J. J., Bonen, A. and Glatz, J. F. (**2010**). "Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 82(4-6): 149-154.

Scott, B. L. and Bazan, N. G. (**1989**). "Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86(8): 2903-2907.

Sehmi, R., Cromwell, O., Taylor, G. W. and Kay, A. B. (**1991**). "Identification of guinea pig eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis as leukotriene B4 and 8(S),15(S)-dihydroxy-5,9,11,13(Z,E,Z,E)-eicosatetraenoic acid." Journal of immunology 147(7): 2276-2283.

Serhan, C. N. (**1989**). "On the relationship between leukotriene and lipoxin production by human neutrophils: evidence for differential metabolism of 15-HETE and 5-HETE." Biochimica et biophysica acta 1004(2): 158-168.

Serhan, C. N. (**2014**). "Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology." Nature 510(7503): 92-101.

Serhan, C. N., Arita, M., Hong, S. and Gotlinger, K. (**2004**). "Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers." Lipids 39(11): 1125-1132.

Serhan, C. N., Chiang, N., Dalli, J. and Levy, B. D. (**2015a**). "Lipid mediators in the resolution of inflammation." Cold Spring Harbor perspectives in biology 7(2): a016311.

Serhan, C. N., Clish, C. B., Brannon, J., Colgan, S. P., Chiang, N. and Gronert, K. (**2000**). "Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing." J Exp Med 192(8): 1197-1204.

Serhan, C. N., Dalli, J., Colas, R. A., Winkler, J. W. and Chiang, N. (**2015b**). "Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome." Biochimica et biophysica acta 1851(4): 397-413.

Serhan, C. N., Dalli, J., Karamnov, S., Choi, A., Park, C. K., Xu, Z. Z., Ji, R. R., Zhu, M. and Petasis, N. A. (**2012**). "Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain." FASEB J 26(4): 1755-1765.

Serhan, C. N., Fredman, G., Yang, R., Karamnov, S., Belayev, L. S., Bazan, N. G., Zhu, M., Winkler, J. W. and Petasis, N. A. (**2011**). "Novel proresolving aspirin-triggered DHA pathway." Chemistry & biology 18(8): 976-987.

Serhan, C. N., Gotlinger, K., Hong, S., Lu, Y., Siegelman, J., Baer, T., Yang, R., Colgan, S. P. and Petasis, N. A. (**2006**). "Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes." Journal of immunology 176(3): 1848-1859.

Serhan, C. N., Hamberg, M. and Samuelsson, B. (**1984**). "Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81(17): 5335-5339.

Serhan, C. N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S. P., Devchand, P. R., Mirick, G. and Moussignac, R. L. (**2002**). "Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals." The Journal of experimental medicine 196(8): 1025-1037.

Serhan, C. N. and Petasis, N. A. (**2011**). "Resolvins and protectins in inflammation resolution." Chem Rev 111(10): 5922-5943.

Serhan, C. N., Yang, R., Martinod, K., Kasuga, K., Pillai, P. S., Porter, T. F., Oh, S. F. and Spite, M. (**2009**). "Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions." The Journal of experimental medicine 206(1): 15-23.

Shaikh, S. R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W. and Wassall, S. R. (**2003**). "Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation?" Biochemistry 42(41): 12028-12037.

Sheedy, F. J. and O'Neill, L. A. (**2008**). "Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation." Ann Rheum Dis 67 Suppl 3: iii50-55.

Shingu, T., Karanian, J. W., Kim, H. Y., Yergey, J. A. and Salem, N., Jr. (**1988**). "Discovery of novel brain lipoxygenase products formed from docosahexaenoic acid (22:6w3)." Adv Alcohol Subst Abuse 7(3-4): 235-240.

Sigal, E., Dicharry, S., Highland, E. and Finkbeiner, W. E. (**1992**). "Cloning of human airway 15-lipoxygenase: identity to the reticulocyte enzyme and expression in epithelium." The American journal of physiology 262(4 Pt 1): L392-398.

Sigal, E., Grunberger, D., Cashman, J. R., Craik, C. S., Caughey, G. H. and Nadel, J. A. (**1988**). "Arachidonate 15-lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes: partial purification and properties." Biochemical and biophysical research communications 150(1): 376-383.

Simons, K. and Toomre, D. (**2000**). "Lipid rafts and signal transduction." Nature reviews. Molecular cell biology 1(1): 31-39.

Singh, R. K., Tandon, R., Dastidar, S. G. and Ray, A. (**2013**). "A review on leukotrienes and their receptors with reference to asthma." The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma 50(9): 922-931.

Smedegard, G., Hedqvist, P., Dahlen, S. E., Revenas, B., Hammarstrom, S. and Samuelsson, B. (**1982**). "Leukotriene C4 affects pulmonary and cardiovascular dynamics in monkey." Nature 295(5847): 327-329.

Smith, W. L. (**1986**). "Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells." Annual review of physiology 48: 251-262.

Smith, W. L., DeWitt, D. L. and Garavito, R. M. (**2000**). "Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology." Annual review of biochemistry 69: 145-182.

Smith, W. L. and Song, I. (**2002**). "The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2." Prostaglandins & other lipid mediators 68-69: 115-128.

Soderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K. and Dallner, G. (**1991**). "Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease." Lipids 26(6): 421-425.

Spector, A. A. (**2009**). "Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway." Journal of lipid research 50 Suppl: S52-56.

Spector, A. A. and Kim, H. Y. (**2015**). "Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism." Biochim Biophys Acta 1851(4): 356-365.

Spite, M., Claria, J. and Serhan, C. N. (**2014**). "Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases." Cell Metab 19(1): 21-36.

Spite, M., Norling, L. V., Summers, L., Yang, R., Cooper, D., Petasis, N. A., Flower, R. J., Perretti, M. and Serhan, C. N. (**2009**). "Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis." Nature 461(7268): 1287-1291.

Sprecher, H. (**2000**). "Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids." Biochimica et biophysica acta 1486(2-3): 219-231.

Stein, K., Stoffels, M., Lysson, M., Schneiker, B., Dewald, O., Kronke, G., Kalff, J. C. and Wehner, S. (**2016**). "A role for 12/15-lipoxygenase-derived proresolving mediators in postoperative ileus: protectin DX-regulated neutrophil extravasation." Journal of leukocyte biology 99(2): 231-239.

Stillwell, W. and Wassall, S. R. (**2003**). "Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid." Chemistry and physics of lipids 126(1): 1-27.

Stockinger, W., Hengstschlager-Ottnad, E., Novak, S., Matus, A., Huttinger, M., Bauer, J., Lassmann, H., Schneider, W. J. and Nimpf, J. (**1998**). "The low density lipoprotein receptor gene family. Differential expression of two alpha2-macroglobulin receptors in the brain." J Biol Chem 273(48): 32213-32221.

Strokin, M., Sergeeva, M. and Reiser, G. (**2003**). "Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca2+." British journal of pharmacology 139(5): 1014-1022.

Strosznajder, J., Chalimoniuk, M., Strosznajder, R. P., Albanese, V. and Alberghina, M. (**1996**). "Arachidonate transport through the blood-retina and blood-brain barrier of the rat during aging." Neurosci Lett 209(3): 145-148.

Sun, L., Xu, Y. W., Han, J., Liang, H., Wang, N. and Cheng, Y. (**2015**). "12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPARgamma: a possible neuroprotective effect in ischemic brain." J Lipid Res 56(3): 502-514.

Svennerholm, L., Bostrom, K. and Jungbjer, B. (**1997**). "Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes." Acta Neuropathol 94(4): 345-352.

T

Tanaka, K., Hirai, H., Takano, S., Nakamura, M. and Nagata, K. (**2004**). "Effects of prostaglandin D2 on helper T cell functions." Biochemical and biophysical research communications 316(4): 1009-1014.

Thies, F., Delachambre, M. C., Bentejac, M., Lagarde, M. and Lecerf, J. (**1992**). "Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-l-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form." J Neurochem 59(3): 1110-1116.

Thies, F., Pillon, C., Moliere, P., Lagarde, M. and Lecerf, J. (**1994**). "Preferential incorporation of sn-2 lysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain." Am J Physiol 267(5 Pt 2): R1273-1279.

Thomas, C. P., Morgan, L. T., Maskrey, B. H., Murphy, R. C., Kuhn, H., Hazen, S. L., Goodall, A. H., Hamali, H. A., Collins, P. W. and O'Donnell, V. B. (**2010**). "Phospholipid-esterified eicosanoids are generated in agonist-activated human platelets and enhance tissue factor-dependent thrombin generation." J Biol Chem 285(10): 6891-6903.

Tilley, S. L., Coffman, T. M. and Koller, B. H. (**2001**). "Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes." The Journal of clinical investigation 108(1): 15-23.

Tobin, D. M., Vary, J. C., Jr., Ray, J. P., Walsh, G. S., Dunstan, S. J., Bang, N. D., Hagge, D. A., Khadge, S., King, M. C., Hawn, T. R., Moens, C. B. and Ramakrishnan, L. (**2010**). "The lta4h locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans." Cell 140(5): 717-730.

Tong, W. G., Ding, X. Z., Hennig, R., Witt, R. C., Standop, J., Pour, P. M. and Adrian, T. E. (**2002**). "Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 8(10): 3232-3242.

Tosco, P. (**2013**) "A mechanistic hypothesis for the aspirin-induced switch in lipid mediator production by cyclooxygenase-2." J Am Chem Soc. 135(28):10404−10410.

Toyomoto, M., Ohta, M., Okumura, K., Yano, H., Matsumoto, K., Inoue, S., Hayashi, K. and Ikeda, K. (**2004**). "Prostaglandins are powerful inducers of NGF and BDNF production in mouse astrocyte cultures." FEBS Lett 562(1-3): 211-215.

U

Umhau, J. C., Zhou, W., Carson, R. E., Rapoport, S. I., Polozova, A., Demar, J., Hussein, N., Bhattacharjee, A. K., Ma, K., Esposito, G., Majchrzak, S., Herscovitch, P., Eckelman, W. C., Kurdziel, K. A. and Salem, N., Jr. (**2009**). "Imaging incorporation of circulating docosahexaenoic acid into the human brain using positron emission tomography." J Lipid Res 50(7): 1259-1268.

V

van de Rest, O., Geleijnse, J. M., Kok, F. J., van Staveren, W. A., Dullemeijer, C., Olderikkert, M. G., Beekman, A. T. and de Groot, C. P. (**2008**). "Effect of fish oil on cognitive performance in older subjects: a randomized, controlled trial." Neurology 71(6): 430-438.

Vandal, M., Alata, W., Tremblay, C., Rioux-Perreault, C., Salem, N., Jr., Calon, F. and Plourde, M. (**2014**). "Reduction in DHA transport to the brain of mice expressing human APOE4 compared to APOE2." J Neurochem 129(3): 516-526.

Vane, J. R. and Botting, R. M. (**1995**). "Pharmacodynamic profile of prostacyclin." The American journal of cardiology 75(3): 3A-10A.

VanRollins, M. and Murphy, R. C. (**1984**). "Autooxidation of docosahexaenoic acid: analysis of ten isomers of hydroxydocosahexaenoate." J Lipid Res 25(5): 507-517.

Venna, V. R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M. and Bordet, R. (**2009**). "PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus." Psychoneuroendocrinology 34(2): 199-211.

Virmani, J., Johnson, E. N., Klein-Szanto, A. J. and Funk, C. D. (**2001**). "Role of 'platelet-type' 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis." Cancer letters 162(2): 161-165.

W

Wallis, J. G., Watts, J. L. and Browse, J. (**2002**). "Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?" Trends in biochemical sciences 27(9): 467.

Walther, M., Wiesner, R. and Kuhn, H. (**2004**). "Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium." J Biol Chem 279(5): 3717-3725.

Wang, X., Zhao, X., Mao, Z. Y., Wang, X. M. and Liu, Z. L. (**2003**). "Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in rat hippocampal cultures." Neuroreport 14(18): 2457-2461.

Wang, X., Zhu, M., Hjorth, E., Cortes-Toro, V., Eyjolfsdottir, H., Graff, C., Nennesmo, I., Palmblad, J., Eriksdotter, M., Sambamurti, K., Fitzgerald, J. M., Serhan, C. N., Granholm, A. C. and Schultzberg, M. (**2015**). "Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease." Alzheimers Dement 11(1): 40-50 e41-42.

Ward, A., Crean, S., Mercaldi, C. J., Collins, J. M., Boyd, D., Cook, M. N. and Arrighi, H. M. (**2012**). "Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis." Neuroepidemiology 38(1): 1-17.

Wassall, S. R., Brzustowicz, M. R., Shaikh, S. R., Cherezov, V., Caffrey, M. and Stillwell, W. (**2004**). "Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation." Chemistry and physics of lipids 132(1): 79-88.

Westphal, C., Konkel, A. and Schunck, W. H. (**2011**). "CYP-eicosanoids--a new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease?" Prostaglandins Other Lipid Mediat 96(1-4): 99-108.

Weylandt, K. H., Chiu, C. Y., Gomolka, B., Waechter, S. F. and Wiedenmann, B. (**2012**). "Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation." Prostaglandins & other lipid mediators 97(3-4): 73-82.

White, P. J., Mitchell, P. L., Schwab, M., Trottier, J., Kang, J. X., Barbier, O. and Marette, A. (**2015**). "Transgenic omega-3 PUFA enrichment alters morphology and gene expression profile in adipose tissue of obese mice: Potential role for protectins." Metabolism: clinical and experimental 64(6): 666-676.

White, P. J., St-Pierre, P., Charbonneau, A., Mitchell, P. L., St-Amand, E., Marcotte, B. and Marette, A. (**2014**). "Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis." Nature medicine 20(6): 664-669.

Winkler, J. W., Orr, S. K., Dalli, J., Cheng, C. Y., Sanger, J. M., Chiang, N., Petasis, N. A. and Serhan, C. N. (**2016**). "Resolvin D4 stereoassignment and its novel actions in host protection and bacterial clearance." Sci Rep 6: 18972.

Witte, A. V., Kerti, L., Hermannstadter, H. M., Fiebach, J. B., Schreiber, S. J., Schuchardt, J. P., Hahn, A. and Floel, A. (**2014**). "Long-chain omega-3 fatty acids improve brain function and structure in older adults." Cereb Cortex 24(11): 3059-3068.

Wolfe, L. S., Rostworowski, K. and Marion, J. (**1976a**). "Endogenous formation of the prostaglandin endoperoxide metabolite, thromboxane B2, by brain tissue." Biochem Biophys Res Commun 70(3): 907-913.

Wolfe, L. S., Rostworowski, K. and Pappius, H. M. (**1976b**). "The endogenous biosynthesis of prostaglandins by brain tissue in vitro." Can J Biochem 54(7): 629-640.

Wood, R. and Harlow, R. D. (**1969a**). "Structural analyses of rat liver phosphoglycerides." Archives of biochemistry and biophysics 135(1): 272-281.

Wood, R. and Harlow, R. D. (**1969b**). "Structural studies of neutral glycerides and phosphoglycerides of rat liver." Archives of biochemistry and biophysics 131(2): 495-501.

Wu, A., Ying, Z. and Gomez-Pinilla, F. (**2004**). "Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats." J Neurotrauma 21(10): 1457-1467.

Wu, K. K., Papp, A. C., Manner, C. E. and Hall, E. R. (**1987**). "Interaction between lymphocytes and platelets in the synthesis of prostacyclin." The Journal of clinical investigation 79(6): 1601-1606.

X

Xiao, Y., Huang, Y. and Chen, Z. Y. (**2005**). "Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain." Br J Nutr 94(4): 544-550.

Xu, S., Jay, A., Brunaldi, K., Huang, N. and Hamilton, J. A. (**2013**). "CD36 enhances fatty acid uptake by increasing the rate of intracellular esterification but not transport across the plasma membrane." Biochemistry 52(41): 7254-7261.

Xu, Z. Z., Zhang, L., Liu, T., Park, J. Y., Berta, T., Yang, R., Serhan, C. N. and Ji, R. R. (**2010**). "Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions." Nat Med 16(5): 592-597, 591p following 597.

Y

Yabuuchi, H. and O'Brien, J. S. (**1968**). "Positional distribution of fatty acids in glycerophosphatides of bovine gray matter." Journal of lipid research 9(1): 65-67.

Yamamoto, K., Ebina, S., Nakanishi, H. and Nakahata, N. (**1995**). "Thromboxane A2 receptor-mediated signal transduction in rabbit aortic smooth muscle cells." General pharmacology 26(7): 1489-1498.

Yamamoto, S. (**1992**). "Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions." Biochimica et biophysica acta 1128(2-3): 117-131.

Yanes, O., Clark, J., Wong, D. M., Patti, G. J., Sanchez-Ruiz, A., Benton, H. P., Trauger, S. A., Desponts, C., Ding, S. and Siuzdak, G. (**2010**). "Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation." Nature chemical biology 6(6): 411-417.

Yaqoob, P. (**2009**). "The nutritional significance of lipid rafts." Annual review of nutrition 29: 257-282.

Yassine, H. N., Rawat, V., Mack, W. J., Quinn, J. F., Yurko-Mauro, K., Bailey-Hall, E., Aisen, P. S., Chui, H. C. and Schneider, L. S. (**2016**). "The effect of APOE genotype on the delivery of DHA to cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease." Alzheimers Res Ther 8: 25.

Yates, C. M., Calder, P. C. and Ed Rainger, G. (**2014**). "Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease." Pharmacol Ther 141(3): 272-282.

Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R. L. and Mostofsky, D. I. (**2002**). "The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane." Neurobiol Aging 23(5): 843-853.

Yehuda, S., Rabinovitz, S. and Mostofsky, D. I. (**2005**). "Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging." Neurobiol Aging 26 Suppl 1: 98-102.

Yoshimoto, T. and Takahashi, Y. (**2002**). "Arachidonate 12-lipoxygenases." Prostaglandins & other lipid mediators 68-69: 245-262.

Yurko-Mauro, K., McCarthy, D., Rom, D., Nelson, E. B., Ryan, A. S., Blackwell, A., Salem, N., Jr., Stedman, M. and Investigators, M. (**2010**). "Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline." Alzheimers Dement 6(6): 456-464.

Z

Zhang, X., Qu, X., Sun, Y. B., Caruana, G., Bertram, J. F., Nikolic-Paterson, D. J. and Li, J. (**2013**). "Resolvin D1 protects podocytes in adriamycin-induced nephropathy through modulation of 14-3-3beta acetylation." PLoS One 8(6): e67471.

Zhao, L. and Funk, C. D. (**2004**). "Lipoxygenase pathways in atherogenesis." Trends in cardiovascular medicine 14(5): 191-195.

Zhao, Y., Calon, F., Julien, C., Winkler, J. W., Petasis, N. A., Lukiw, W. J. and Bazan, N. G. (**2011**). "Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPARgamma-mediated mechanisms in Alzheimer's disease models." PLoS One 6(1): e15816.

Zhu, M., Wang, X., Hjorth, E., Colas, R. A., Schroeder, L., Granholm, A. C., Serhan, C. N. and Schultzberg, M. (**2016**). "Pro-Resolving Lipid Mediators Improve Neuronal Survival and Increase Abeta42 Phagocytosis." Mol Neurobiol 53(4): 2733-2749.